



Carlos Eduardo Saranz Zago

**ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM
Chelonoidis carbonaria E *Phrynops geoffroanus* (TESTUDINES)**



Carlos Eduardo Saranz Zago

ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM
Chelonoidis carbonaria E *Phrynops geoffroanus* (TESTUDINES)

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor em Genética, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Carlos Eduardo Saranz Zago

**ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM
Chelonoidis carbonaria E *Phrynops geoffroanus* (TESTUDINES)**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração – Citogenética Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos
Instituto Butantan – São Paulo

Profa. Dra. Alba Regina de Abreu Lima Catelani
FAMERP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari
FAMERP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Lílían Madi Ravazzi
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
25/Fevereiro/2011

Dedico este Trabalho:

A Edna Pereira do Vale, meu amor, pela compreensão, carinho, respeito e amizade e especialmente pela ajuda nas horas mais difíceis.

A meu filho Nicolas Eduardo do Vale Zago, minha eterna alegria, pelos momentos de afeto, carinho e amor.

A minha filha Carolina Ribeiro Crespo Zago, minha eterna princesa, pelo seu amor e momentos de alegria que vivemos juntos.

Aos meus pais João José Zago e Judith Saranz Zago por sempre incentivarem minha vida.

A Deus, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela incrível família que colocou no meu caminho.

Agradecimentos:

À orientação da Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, que confiou no meu trabalho, abrindo seu laboratório e ensinando o caminho da pesquisa, pela dedicação e paciência.

À Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos, por acreditar nesse trabalho e ser a professora pioneira nesta nova linha de pesquisa sobre a biologia das tartarugas. Pela amizade, carinho, respeito, dedicação e pela coragem de realizar uma pesquisa em um universo diferente da área humana.

Ao Prof. Dr. Luiz Dino Vizotto, pelo carinho, dedicação, por estar presente em todos os momentos de dificuldades que encontramos pelo caminho, pelas viagens ao criatório e pelos rios da região, pela confiança e, principalmente, pelo seu conhecimento.

À Edna Pereira do Vale, minha esposa, minha eterna paixão, meu amor, por sempre me apoiar, pelo carinho, respeito, dedicação e me ajudar nas horas difíceis.

Ao meu querido filho Nicolas Eduardo do Vale Zago, minha luz, afeto a qual eu admiro e amo muito.

À minha querida filha Carolina Ribeiro Crespo Zago, minha fonte inspiradora, por ser esta menina incrível a qual eu amo muito.

Aos meus pais, João José Zago e Judith Saranz Zago, pelo apoio, compreensão, carinho e amor e por fazerem parte da minha vida.

Ao meu irmão, Anderson Saranz Zago, e sua esposa, Paula Polastri Zago, pelo carinho e compreensão, pois são pesquisadores e conhecem os caminhos das pedras e as dificuldades encontradas.

A Profa. Dra. Ana Elizabete Silva e ao Prof. Dr. André Luiz Laforga Vanzela, por abrirem as portas dos laboratórios, onde desenvolvi parte da tese, pela compreensão, confiança e dedicação.

Aos amigos Carlos Fabian Mendiburu e Nelson Cazuo Tukamoto Junior, pela amizade, carinho, pelos bons momentos dentro e fora do laboratório, que esta amizade de irmandade dure para sempre.

À grande amiga Karina Kazue Okada Thomé ("in memoriam") por começarmos juntos a desbravar o mundo das tartarugas e pelas horas boas que passamos juntos. Este trabalho, com certeza, tem a sua contribuição, pois hoje, vivendo ao lado de Deus, está olhando por nós na conclusão de um sonho.

Ao grande amigo Tiago Lucena da Silva por participar em todas as etapas do mundo das tartarugas, pelas inúmeras horas juntos no laboratório, viagens e dedicação, pelo carinho e respeito, que nossa amizade atravesse as fronteiras e continue.

Ao grande amigo e técnico Josué Rodrigues dos Santos, pelos grandes momentos que passamos no laboratório e nas viagens, pela dedicação, auxílio, respeito e apontamentos que ajudaram neste trabalho.

À Maria Isabel Afonso da Silva, minha estagiária, por acreditar no mundo das tartarugas, pela luta de cada dia para implantar este projeto na Universidade, pelo carinho e pela dedicação. Peço desculpas pelas minhas falhas e espero que eu tenha contribuído com algo para sua formação de bióloga e pesquisadora.

Aos amigos do laboratório Edis Belini júnior, Isabeth da Fonseca Estevão, Gisele Cristine de Souza Carrocini, Priscila

Pasquetto Mendonça e Rita Luiza Peruquetti, pela amizade e companheirismo, carinho e apoio.

Aos amigos do Centro de Estudos de Quelônios (CEQ): Tiago Lucena da Silva, Maria Isabel Afonso da Silva, Josué Rodrigues dos Santos, Vinícius Augusto Gobbe Moschetta, Ítalo Cristiano Ribeiro e Larissa Paola Rodrigues Venâncio, por trabalharem com os quelônios, pelo companheirismo, apoio e dedicação.

Ao amigo, Edson Lucena da Silva, pela ajuda na coleta dos animais, dedicação, prestação de serviço e, principalmente, pela amizade e conhecimentos.

Aos amigos do programa de Pós – Graduação em Genética, pelo companheirismo durante as disciplinas, simpósios e viagens.

Aos órgãos de fomento à pesquisa Capes e a FUNDUNESP, pelo auxílio financeiro.

Ao IBAMA por fornecer a licença de coleta dos animais.

A Deus pela vida e oportunidade de realizar este trabalho.

“Se eu pudesse...

Se eu pudesse deixar algum presente a você

Deixaria aceso o sentimento de amar

A vida dos seres humanos

A consciência de aprender tudo

O que foi ensinado pelo tempo a fora.

Lembraria os erros que foram cometidos

Para não mais se repetissem.

A capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para você, se pudesse,

O respeito, aquilo que é indispensável:

Além do pão, o trabalho.

Além do trabalho, a ação.

E, quando tudo mais faltasse,

Um segredo:

O de buscar no interior de si mesmo

A resposta e a força para

Encontrar a saída.”

(Mahatma Gandhi)

“Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais, e nesse dia, um crime contra um animal será um crime contra a humanidade”

(Leonardo Da Vinci)

RESUMO

Os répteis sofreram redução do número de espécies desde a época em que dominavam a Terra até os dias atuais. Os quelônios são poucos estudados, principalmente quanto à sua caracterização citogenética. O presente trabalho objetivou estudar, por meio das técnicas de citogenética clássica e molecular, os cromossomos de *Chelonoidis carbonaria*, espécie terrestre e *Phrynops geoffroanus*, espécie ameaçada de extinção que vive nas margens dos rios no continente Sul Americano. As amostras de sangue foram coletadas de animais do criatório, “Reginaldo Uvo Leone”, em Tabapuã-SP. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal (nº 50/07-CEEA – Botucatu – SP) e pelo IBAMA/RAN (nº 14729-1). Para obter as metáfases, o sangue foi inoculado em meio de cultura de linfócitos que foram estimulados a se dividirem pela adição de fito-hemaglutina. Após esse procedimento, a colchicina foi adicionada para inibir a formação das fibras do fuso, mantendo as células em metáfase. Foram avaliados machos e fêmeas de *Chelonoidis carbonaria*, que apresentaram número de cromossomos igual a $2n = 52$, e de *Phrynops geoffroanus*, descrito pela primeira vez, cujas fêmeas apresentaram $2n = 58$ e os machos com $2n = 57$ cromossomos. Pela metodologia de bandamento G, foi possível identificar os pares de cromossomos homólogos, e pela técnica de bandamento C, a presença de regiões de heterocromatina constitutiva em macrocromossomos e em microcromossomos. Pela impregnação com íons prata, foram detectadas Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) em dois microcromossomos nos machos e em apenas um microcromossomo nas fêmeas de *Chelonoidis carbonaria*. O mesmo padrão foi encontrado em *Phrynops geoffroanus*. A técnica de FISH revelou a presença dos sítios de RNAr marcados na Região Organizadora Nucleolar. O presente estudo permitiu, pelas técnicas de citogenética clássica e molecular, identificar os cromossomos de fêmeas e machos de *Chelonoidis carbonaria* e *Phrynops geoffroanus*, espécies terrestres e aquáticas, respectivamente, o que possibilitará utilizá-las como modelo para estudos genéticos e evolutivos.

ABSTRACT

The reptiles were reduced in number of species since the time that they ruled the Earth until the present day. The turtles have been little studied, particularly regarding its cytogenetics. The present study investigated, using the techniques of classical cytogenetics and molecular chromosomes of *Chelonoidis carbonaria* terrestrial species and *Phrynops geoffroanus*, endangered species that lives along the rivers in the South American continent. Blood samples were collected from animals in the breeding Reginaldo Uvo Leone in Tabapuã-SP. All procedures were approved by the Animal Ethics Committee (n° 50/07-CEEA - Botucatu – SP) and IBAMA/RAN (n°. 14729-1). For the metaphases, the blood was inoculated into the culture medium of lymphocytes that were stimulated to divide by the addition of phyto-hemagglutinin. After this procedure, colchicine was added to inhibit the formation of spindle fibers, maintaining the cells in metaphase. We assessed male and female *Chelonoidis carbonaria*, which had the same number of chromosomes $2n = 52$ and specimens of *Phrynops geoffroanus*, first described, whose females had $2n = 58$ and males with $2n = 57$ chromosomes. By G-banding methodology, it was possible to identify pairs of homologous chromosomes and the C banding technique, the presence of regions of constitutive heterochromatic in macrochromosomes and microchromosomes. By impregnation with silver ions were detected Nucleolar Organizer Regions (NORs) in two microchromosomes in males and females in only one of microchromosomes *Chelonoidis carbonaria*. The same pattern was found in *Phrynops geoffroanus*. The FISH technique revealed the presence of sites of rRNA marked Nucleolar Organizing Region. This study allowed for the techniques of classical and molecular cytogenetics to identify the chromosomes of males and females of *Chelonoidis carbonaria* and *Phrynops geoffroanus*, terrestrial and aquatic species, respectively, making possible to use them as a model for genetic and evolutionary studies.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
1.1 Aspectos Gerais dos Répteis	15
1.2 Ordem Testudines	16
1.3 Chelonoidis carbonaria (SPIX, 1824).....	18
1.4 Phrynops geoffroanus (SCHWEIGGER, 1812)	21
1.5 Citogenética.....	23
Objetivos.....	33
2.1 Objetivos Gerais.....	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3. Material e Métodos.....	35
3.1 Amostras	35
3.2. Montagem do Cariograma.....	35
3.2.1. Colheita de Sangue.....	35
3.2.2. Montagem da cultura.....	36
3.2.3. Bloqueio	37
3.2.4. Hipotonização e fixação	37
3.2.5. Preparo das lâminas.....	38
3.2.6. Coloração usual: Giemsa.....	38
3.3. Técnicas de Bandamento Cromossômico.....	39
3.3.1. Bandamento C.....	39
3.3.2. Bandamento G.....	40
3.3.3. Impregnação por íons prata	41
3.3.4. Análise Cromossômica ao microscópio	41
3.4. FISH.....	42
3.4.1. Hibridação <i>In Situ</i> com Fluorocromos	42
3.4.2. <i>Nick Translation</i>	45
3.4.3. <i>Dot Blot</i>	45
4- Resultados.....	49
4.1. Karyotypic characterization of Chelonoidis carbonaria (Testudinidae).....	50
Resumo.....	51
Abstract	52
Introdução	52
Material e Método	54
Resultados	54
Discussão	55
Referências.....	58
4.2. Description of Phrynops geoffroanus karyotype (Chelidae)	67
Resumo.....	68
Abstract	69
Introdução	70
Material e Método	71
Resultados	71
Discussão	73
Referências.....	75
Conclusões.....	87
Referências.....	89
APÊNDICE A – COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	99
APÊNDICE B – AUTORIZAÇÃO DO IBAMA.....	100

Lista de Figuras

1 : Relacionamento filogenético da ordem Testudines.....	16
2: Figura 2: <i>Chelonoidis carbonaria</i> : Jabuti Piranga. A: Animal adulto. B: Alimentação para Jabuti Piranga. C: Dimorfismo sexual (F= fêmea; M= macho). D: Filhotes de Jabuti Piranga.....	19
3: Figura 3: <i>Phrynops geoffroanus</i> . A: Animal adulto. B: Diferença de coloração entre fêmeas (F) e machos (M). C: Fêmea: Abertura cloacal não ultrapassa o rebordo da carapaça (seta). D: Machos: Abertura cloacal ultrapassa o rebordo da carapaça (seta).....	22
4: Figura 4: Coleta de sangue. A: Punção da veia margino-costal em <i>Chelonoidis carbonaria</i> . B: Cardiocentese em <i>Phrynops geoffroanus</i>	35
5: Artigo 1: Figura 1: <i>Chelonoidis carbonaria</i> : Coloração convencional: Giemsa. A: Cariograma de fêmea. B: Cariograma de macho. Barra de escala: 5 µm.....	61
6: Artigo 1: Figura 2: Metáfases de <i>Chelonoidis carbonaria</i> submetidas às técnicas de bandamento G. A: Fêmea. B: Macho.....	62
7: Artigo 1: Figura 3: Pareamento dos macrocromossomos homólogos de <i>Chelonoidis carbonaria</i> pela técnica de bandamento G. A: Fêmea. B: Macho....	62
8: Artigo 1: Figura 4: Metáfases de <i>Chelonoidis carbonaria</i> submetidas às técnicas de bandamento cromossômico. A e B- Bandamento C; C e D – Bandamento Ag-NOR. Fêmeas: A e C. Machos: B e D. As setas em A e B indicam regiões heterocromáticas constitutivas (Bandamento C) e em C e D indicam as RONS impregnadas por íons prata. Barra: 10 µm.....	63
9: Artigo 2: Figura 1: <i>Phrynops geoffroanus</i> : Coloração convencional de Giemsa. A: Cariograma de fêmea. B: Cariograma de macho. Barra: 5 µm.....	76
10: Artigo 2: Figura 2: Metáfases de <i>Phrynops geoffroanus</i> submetidas à técnica de Bandamento G, A e B – Fêmeas; C e D – Machos. Barra: 10 µm.....	77
11: Artigo 2: Figura 3: Pareamento dos macrocromossomos homólogos de <i>Phrynops geoffroanus</i> pela técnica de Bandamento G. A: Fêmea. B: Macho. Barra: 5 µm.....	77

12: Artigo 2: Figura 4: Metáfases de <i>Phrynos geoffroanus</i> submetidas à técnica de Bandamento C. A e B – Fêmeas; C e D – Machos. As setas indicam regiões heterocromáticas constitutivas (Bandamento C). Barra = 10 µm.....	78
13: Artigo 2: Figura 5: Metáfases de <i>Phrynos geoffroanus</i> submetidas à técnica de Impregnação por íons pratas (Bandamento Ag-NOR). A e B – Fêmeas; C e D – Machos. As setas indicam um único cromossomo marcado, nas fêmeas, e um par de cromossomos portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares, nos machos. Barra = 10µm.....	79
14: Artigo 2: Figura 6: Metáfases de <i>Phrynos geoffroanus</i> submetidas à técnica de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH). A e B – Fêmeas; C e D – Machos. A: Filtro vermelho com FITC; B e D: Coloração com DAPI; C: Filtro verde com FITC. As setas indicam os sinais positivos de hibridização nos cromossomos portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs). Barra = 10 µm.....	80
15: Artigo 2: Figura 7: Metáfases de <i>Phrynos geoffroanus</i> submetidas à técnica de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH). A, C e E – Fêmeas; B, D e F – Machos. A- Filtro vermelho com FITC; B- Filtro verde com FITC; C e D- Coloração com DAPI; E e F- Imagem com sobreposição. As setas indicam os sinais positivos de hibridização nos cromossomos portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs). Barra = 10µm.....	81

Lista de Tabelas

1: Artigo 1: Tabela 1: Comparação entre o número de cromossomos dos quelônios cryptodiras.....	66
2: Artigo 2: Tabela 1: Comparação entre o número de cromossomos dos quelônios pleurodiras.....	85

1. Introdução

1.1 Aspectos Gerais dos Répteis

Os répteis surgiram há 200 milhões de anos e são constituídos por lagartos, serpentes, crocodilos, tartarugas, anfisbenas e tuataras. Evoluíram dos anfíbios no Período Pensilvaniano, na Era Paleozóica. Na Era Mesozóica, os répteis tornaram-se os animais dominantes na Terra. Representam um grupo transitório na evolução dos vertebrados, estando entre peixes, aves e mamíferos terrestres (ERNEST; BARBOUR, 1989).

A Era Mesozóica pode ser subdividida em três períodos distintos com seu início no período Triássico, há 200 milhões de anos, quando existia um único bloco continental chamado *Pangea*. O período seguinte, Jurássico, há cerca de 125 milhões de anos, é caracterizado pelo surgimento dos grandes répteis, em especial os dinossauros, que predominaram no ambiente até o próximo período, o Cretáceo. Sua extinção em massa ocorreu por volta de 60 milhões de anos atrás (GOULART, 2004).

Os répteis e os demais amniotas foram classificados em Anapsida, Diapsida e Sinapsida. Os primeiros são representados pelos répteis que não possuem nenhuma fossa temporal, denominados Chelonia ou Testudomorpha. Os Diapsidas possuem duas aberturas temporais no crânio e são representados pelos Lepidosauromorpha (lagartos, serpentes, tuataras e anfisbenas) e pelos Archosauromorpha (crocodilianos e aves). Os últimos apresentam uma abertura temporal lateral, tendo como representantes os Pelycosaurias e os Therapsidas, ambos extintos, e os mamíferos dos dias atuais (POUGH et al., 2002; POUGH et al., 2003).

Os répteis vêm sofrendo redução do número de espécies no decorrer da sua história sendo que das 23 ordens existentes no passado, restaram apenas quatro: Testudines, constituída por 316 espécies de jabutis, cágados e tartarugas; Crocodylia, com 23 espécies de jacarés, crocodilos, aligátors e gaviais; e Rhynchocephalia, com duas espécies de tuataras e Squamata, formada por 2940

espécies de serpentes, 4675 espécies de lagartos e 160 espécies de anfíbios (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; STORE et al., 2000; GOULART, 2004; RIDLEY, 2006; SHAFTER, 2009).

Os répteis são animais pecilotérmicos, sua pele apresenta modificações como, por exemplo, a ausência das glândulas cutâneas existentes nos anfíbios para realizar as trocas gasosas, mas possuem escamas queratinizadas de origem epidérmica, que evitam a desidratação; possuem fisiologia renal desenvolvida e no aparelho digestório apresentam um aumento no comprimento do intestino grosso, evitando, dessa forma, a perda de água; apresentam glândulas lacrimais e de Harder, conferindo proteção antibacteriana e evitando desidratação ocular; possuem ovos com casca calcária para retardar a perda de umidade, e membranas embrionárias (âmnio, córion e alantóide) diferentes das presentes em peixes e anfíbios (GANS, 1980; ERNEST; BARBOUR, 1989; STORER et al., 2000; GOULART, 2004).

1.2 Ordem Testudines

A ordem Testudines é constituída por 14 famílias com 316 espécies e está dividida em duas subordens: A) Cryptodira (cripto: escondido; dire: pescoço), retraem a cabeça verticalmente em relação ao eixo longitudinal. Essa subordem está dividida em três superfamílias: Testudinoidea, Trionychoidea e Chelonioidea, que incluem tartarugas, cágados e jabutis encontrados, em sua maioria, no hemisfério sul, com formas terrestres e aquáticas na América do Sul, terrestres na África e sem representantes na Austrália e na Antártica; B) Pleurodira (pleuro: lado), retraem a cabeça e o pescoço lateralmente, representados pela família Chelidae e pela superfamília Pelomedusoidea que apresenta duas famílias: Pelomedusidae e Podocnemididae, encontradas apenas no hemisfério sul. A árvore filogenética está representada na figura 1 (AUFFENBERG, 1974; BICKHAM; CARR, 1983; ZUG, 1993; POUGH et al., 2003; GOULART, 2004; SHAFTER, 2009).

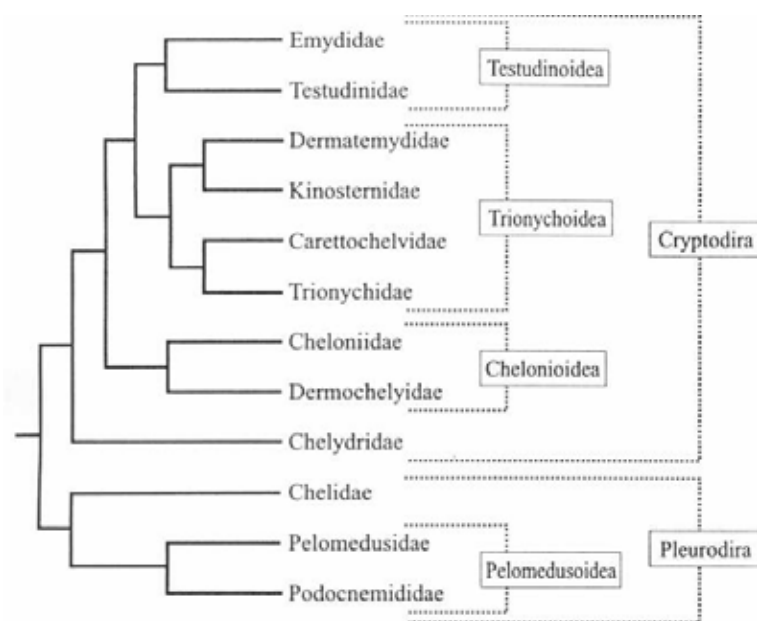


Figura 1: Relação filogenética da ordem Testudines (GOULART, 2004).

A principal característica dessa ordem é o casco que reveste o corpo do animal, formado pela fusão das costelas, vértebras torácicas, lombares e sacrais e alguns ossos da cintura pélvica e torácica. Os ossos da carapaça são recobertos por escudos córneos de origem epidérmica. A carapaça é a porção convexa – dorsal, e o plastrão, a porção ventral plana ou côncava. Esses animais possuem diferentes habitats, com espécies exclusivamente terrestres, como os jabutis (Testudinidae), espécies que vivem em ambientes fluviais e lacustres, como os cágados (Chelidae), exclusivamente marinhas como as tartarugas (Cheloniidae), e ainda, aquelas que vivem em ambientes terrestre e de água doce, como a tartaruga *Aperema* (*Rhynoclemmys punctularia*) (ZUG, 1993; GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; STORER et al., 2000; GOULART, 2004).

A maxila e a mandíbula apresentam um bico córneo e a cavidade oral comunica-se com a cavidade nasal por uma fenda palatina. O pescoço é formado por oito vértebras cervicais recobertas por forte musculatura que propicia a retração da cabeça quando são ameaçados (STORER et al., 2000; GOULART, 2004).

A pele dos quelônios pode ser macia, lisa com ou sem escamas, com placas, papilas ou tuberosidades, possibilitando proteção contra agentes infecciosos, traumatismo, desidratação e camuflagem (GOULART, 2004).

O sistema porta renal desvia parte da circulação diretamente para os rins, localizados caudal e ventralmente com relação à carapaça e posteriormente ao acetábulo, tendo origem metanéfrica, a excreção é uma mistura de uréia com ácido úrico (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; MADER, 1996).

O pulmão é bem desenvolvido e localizado bilateralmente. Por não possuírem diafragma e apresentarem os arcos intercostais fundidos, o ar é bombeado para os pulmões por movimentos da faringe. Em algumas espécies aquáticas pode ocorrer respiração pela mucosa cloacal e pela cavidade oronasal, possibilitando permanecer longo tempo debaixo d'água. A expulsão do ar é auxiliada por contração da musculatura das cinturas peitoral e pélvica, que movimentam as vísceras comprimindo os pulmões (STORER et al., 2000; GOULART, 2004; JACKSON et al., 2004). O coração caracteriza-se por possuir três cavidades, dois átrios e um ventrículo parcialmente dividido por um septo mediano, proporcionando, uma mistura entre o sangue arterial com o sangue venoso, conferindo uma melhor resposta à taxa respiratória e a termorregulação (ERNEST; BARBOUR, 1989; GARCIA- NAVARRO; PACHALY, 1994; POUGH et al., 2003; GOULART, 2004).

1.3 *Chelonoidis carbonaria* (SPIX, 1824)

A família Testudinidae está representada exclusivamente por espécies terrestres, incluindo mais de duzentas formas fósseis e aproximadamente quarenta espécies viventes, que ocorrem em quase todos os continentes, exceto Austrália e Antártica (AUFFENBERG, 1974; ZUG, 1993; POUGH et al., 2002). O gênero *Chelonoidis* (Spix, 1824) possui quatro espécies na América do sul, sendo: *Chelonoidis carbonaria*, *Chelonoidis denticulata* e *Chelonoidis chilensis* no continente, e *Chelonoidis nigra*, exclusiva das Ilhas de Galápagos. O gênero *Chelonoidis* foi inicialmente considerado um subgênero de *Geochelone* (Fitzinger, 1856), mas em uma recente análise filogenética molecular dos Testudines, que

representa a mais abrangente amostragem taxonômica para esse grupo, foi defendida a elevação de *Chelonoidis* para o *status* de gênero (LE et al., 2006).

Chelonoidis carbonaria, jabuti piranga ou jabuti de patas vermelhas, foi descrito pela primeira vez, por Spix, em 1824 (Figura 2: A e B), pertence à classe Reptilia, subclasse Anapsida, ordem Chelonia, família Testudinidae e gênero *Chelonoidis*. São animais que possuem uma expectativa média de vida de 80 anos (PRICHARD, 1979; PRICHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989).

Chelonoidis carbonaria, ocorre em todos os países da região norte da América do Sul, com exceção do Peru e Equador, além de ocorrer em parte da região transandina da Colômbia, no sudeste do Panamá, e está presente em várias ilhas do Caribe, na maioria dos casos devido à introdução (PRICHARD, 1979; PRICHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989;). Entretanto, segundo Censky (1988), a possibilidade de dispersão natural para algumas das ilhas do Caribe não pode ser descartada. As áreas mais ao sul de sua distribuição incluem regiões do Paraguai e do norte da Argentina. No Brasil, parece ocorrer por toda a Amazônia Legal, com exceção, aparentemente, do estado do Acre e da região central e ocidental do estado do Amazonas. Além de ocorrer na região Nordeste, com registros para os estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Piauí, e na região central, com registros para os estados de Tocantins, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (PRICHARD, 1979; PRICHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989; JEROZOLIMSKI, 2005).

Estes animais apresentam uma forte carapaça convexa de cor cinza a marrom ou preta com desenhos simétricos vermelhos amarelados. Seu plastrão apresenta a mesma coloração escura, sendo côncavo nos machos, facilitando a cópula, e discreta concavidade nas fêmeas (Figura 2: C). Apresentam uma cabeça diminuta, com narinas na extremidade frontal e um bico córneo com bordas cortante, pois são desprovidos de dentes. Os olhos são grandes e negros. Possuem cauda curta que fica normalmente recolhida dentro da carapaça. Os machos podem atingir 40 cm, e pesar mais de 10 kg, e as fêmeas 33 cm, pesando 7 kg. As fêmeas fazem a postura de dois a quinze ovos entre os meses de fevereiro e março (PRICHARD, 1979; PRICHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989; HIGHFIELD, 1996; JEROZOLIMSKI, 2005).

A maioria das espécies de quelônios apresenta maturidade tardia, porém a grande longevidade associada à alta taxa de sobrevivência de indivíduos adultos e à aparente ausência de senilidade fisiológica ou anatômica permite que elas apresentem períodos reprodutivos prolongados (GIBBONS, 1987; CONGDON et al., 1993). Medem e colaboradores (1979) relatam que a maturidade sexual *Chelonoidis carbonaria* é atingida aos cinco anos de idade: porém há relatos na literatura de uma fêmea que depositou ovos pela primeira vez apenas aos 11 anos de idade (JEROZOLIMSKI, 2005).

Possuem hábitos diurnos e são resistentes, podendo ficar dias sem alimentar-se. Sua dieta consiste de frutas, folhas, flores, gramíneas, pequenos animais como minhocas e animais encontrados mortos, tendo um consumo maior de frutas na estação chuvosa e um consumo maior de folhas na estação seca. (PRICHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989; MOSKOVITS; BJORNDAL, 1990; HIGHFIELD, 1996). Os filhotes deste grupo alimentam-se frequentemente das fezes de adultos, processo que auxilia a composição de sua flora intestinal (Figura 2: D) (HIGHFIELD, 1996).



Figura 2: *Chelonoidis carbonaria*: Jabuti Piranga. **A:** Animal adulto **B:** Alimentação para Jabuti Piranga. **C:** Dimorfismo sexual (F= fêmea; M= macho). **D:** Filhotes de Jabuti Piranga.

1.4 *Phrynops geoffroanus* (SCHWEIGGER, 1812)

Aproximadamente 20% das espécies de quelônios do mundo ocorrem na América do Sul, com representantes em oito famílias. Dessas, a família Chelidae é a mais diversificada, contando com 23 espécies, das quais 19 ocorrem no Brasil, distribuídas em cinco gêneros: *Achantochelys* sp, *Chelus* sp, *Hydromedusa* sp, *Phrynops* sp e *Platemys* sp (SOUZA, 2004). O gênero *Phrynops* é o menos conhecido e apresenta a mais complexa e diversificada taxonomia (MITTERMEIER et al., 1980; MOLINA, 1998).

Os cágados são animais que habitam rios, com exceção de alguns exemplares do gênero *Malaclemys* que vivem em águas salgadas da costa do atlântico nos Estados Unidos. Estes animais possuem carapaças baixas que oferecem pequena resistência ao deslocamento na água, e patas palmadas com garras e membranas interdigitais, para facilitar a locomoção, cópula e procura por alimentos (POUGH et al., 2003; GOULART, 2004).

Phrynops geoffroanus ou “cágado-de-barbelas” (Figura 3: A), como é popularmente conhecido, foi descrito pela primeira vez no Brasil, por Schweigger, em 1812, pertence à ordem Testudines, subordem Pleurodira, família Chelidae, subfamília Austrochelidinae e gênero *Phrynops*. (PRITCHARD, 1979; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; POUGH et al., 2003).

São animais de hábitos diurnos diferindo de outras espécies, como *Phrynops gibbus* e *Phrynops rufipes*, que possuem hábitos noturnos. *Phrynops geoffroanus* necessita de uma grande área seca, com troncos quase que totalmente submersos, tendo alimentação basicamente carnívora constituída por pequenos peixes, coleópteros, minhocas, insetos e aves aquáticas. A espécie é encontrada em rios, lagos e lagoas com correnteza lenta (PRITCHARD; TREBBAU, 1984).

Essa espécie é encontrada na bacia dos rios Amazonas e Orinoco, Guiana, Venezuela (região da La Gran Sabana), Colômbia, Bolívia (Parque Nacional Canaima, Edo), Nordeste da Argentina, Uruguai, extremo sul do Paraguai e no Brasil, nos estados do Maranhão, Sul do Piauí, Paraíba, Bahia, Mato Grosso, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul

(PRITCHARD, 1979; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989).

A carapaça é achatada e larga, com coloração preta ou cinza esverdeada. O plastrão tem coloração vermelho rosado com manchas pretas irregulares. Os escudos gulares são irregulares e separados dos escudos umerais, apresentam escudos inguinais. A cabeça é achatada, principalmente no topo, que é coberto por uma pele granular grosseira ou com fissuras, esta se torna finamente granular sobre os músculos adutores mandibulares externos, com coloração preta, linhas brancas e irregulares e, na parte inferior, branca com linhas e pontos pretos. Os olhos são grandes e desenvolvidos e estão localizados dorso-lateralmente e a característica mais proeminente dessa espécie é uma linha preta e larga que se estende longitudinalmente pelo olho, e um par de barbelas na mandíbula, com a extremidade preta, que a difere da *Phrynops hilarii*, cujas extremidades das barbelas são brancas. Os membros são cinza com manchas brancas (PRITCHARD 1979; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989).

Os machos (Figura 3: B e D) possuem, em média, 21 cm, pequena concavidade no plastrão e a abertura cloacal ultrapassa o rebordo da carapaça. As fêmeas (Figura 3: B e C) têm, aproximadamente, 35 cm e abertura cloacal que não ultrapassa o rebordo da carapaça. As posturas ocorrem entre novembro e março, nos bancos de areia nas margens dos rios, à noite, quando não existe a ameaça de predadores. O período de nidificação e desova da espécie ocorre nos meses de março até novembro, quando novamente voltam a se acasalar, dentro da água, onde o macho agarra na fêmea, com suas garras, possibilitando a introdução do pênis. Em cada ninho são colocados de seis a dezoito ovos brancos, esféricos e medindo entre 3 e 5 cm (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; GUIX et al., 1989; MOLINA, 1998).

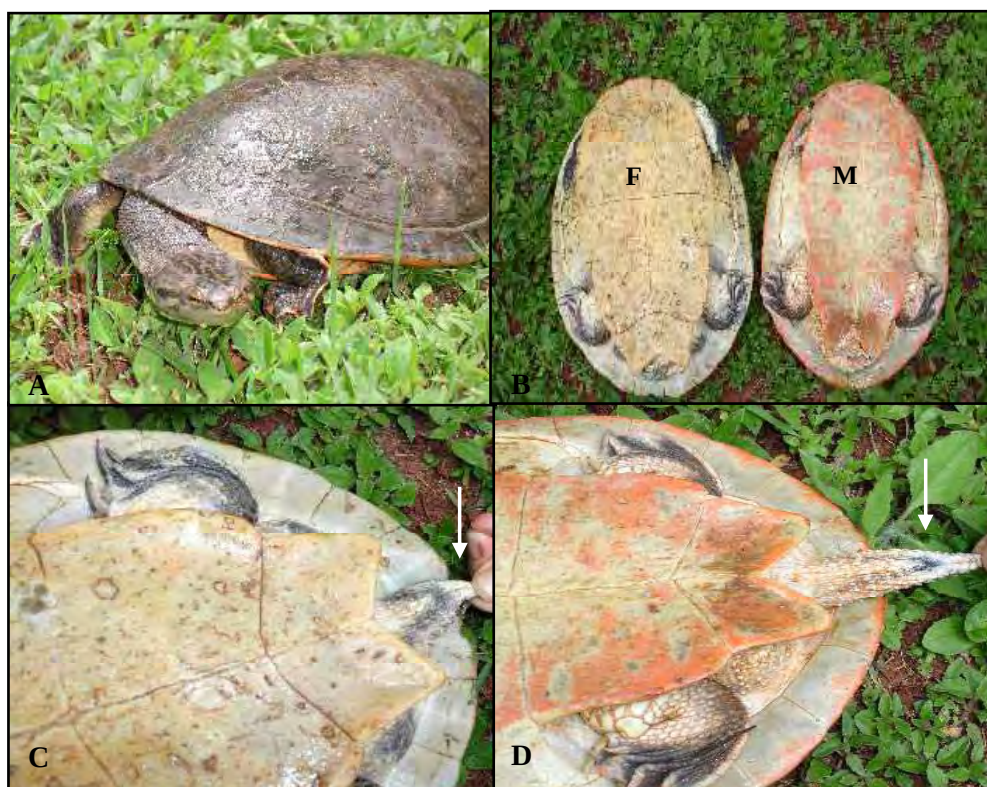


Figura 3: *Phrynops geoffroanus*. **A:** Animal adulto. **B:** Diferença de coloração entre fêmeas (F) e machos (M). **C:** Fêmea: Abertura cloacal não ultrapassa o rebordo da carapaça (seta). **D:** Machos: Abertura cloacal ultrapassa o rebordo da carapaça (seta).

1.5 Citogenética

O estudo dos cromossomos foi facilitado pelo descobrimento da inibição mitótica durante a metáfase pela ação de um alcalóide chamado colchicina (substância que bloqueia a formação dos microtúbulos do fuso acromático). Ao receber esse tipo de tratamento, as células, quando comprimidas entre lâminas e lamínulas, apresentam os seus cromossomos metafásicos num só plano. Nesta fase, os cromossomos podem ser reconhecidos por suas formas e tamanhos (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

Para análise citogenética, as metáfases bem coradas são fotomicrografadas, recortadas e cada cromossomo pareado com o seu homólogo e esses são ordenados pelo tamanho em uma folha de papel. Esta disposição é denominada cariótipo, que pode ser utilizado para a identificação de anomalias numéricas e

estruturais dos cromossomos (SNUSTAD; SIMMONS, 2001; STRACHAN; READ, 2002).

Desde a década de 70, com o avanço das análises citogenéticas, foram descobertas novas técnicas de bandamentos que possibilitaram estudar detalhes dos cromossomos. As técnicas de bandamento da estrutura cromossômica possibilitaram a identificação de cada um dos cromossomos, assim como distinguir cada um de seus braços, determinados pela posição do centrômero, que divide o cromossomo em braços longo (q) e curto (p) (SNUSTAD; SIMMONS, 2001; STRACHAN; READ, 2002).

Pardue e Gall (1970), e Jones (1970), foram os primeiros pesquisadores a verificar em cromossomos de ratos, que o corante acidófilo Giemsa, a 2%, tratados com NaOH, cora regiões ricas em DNA. Essas observações foram realizadas em estudos de hibridação “*in situ*”, na presença de DNA satélites marcados com trítio. Modificações realizadas por Arrighi e Hsu (1971) também permitiram revelar a presença de heterocromatina centromérica em cromossomos humanos. A heterocromatina foi definida como material cromossômico que não se condensa durante a fase de telófase, mas se apresenta mais condensada durante a intérfase, permanecendo condensada até o início da prófase (NITTA, 1980).

Brown (1966) identificou dois tipos de heterocromatina, a facultativa que se comporta como heterocromatina condensada na intérfase, tendo replicação tardia e ausência de expressão gênica, ou pode se comportar como uma típica eucromatina; e a heterocromatina constitutiva, que permanece condensada durante todo o ciclo celular e em todas as células do indivíduo, concentrando em blocos nos cromossomos, aparecendo em ambos os homólogos na mesma posição e com o mesmo tamanho. Nesse tipo de heterocromatina raramente ocorre genes estruturais, sendo o local onde encontramos a maior parte de DNA satélite. A heterocromatina constitutiva pode ser pobre em gene, ter excessiva quantidade de DNA repetitivo com replicação tardia, pode ter baixa frequência de recombinação, uma vez que não apresenta genes ativos e localiza-se, geralmente, nas regiões pericentroméricas dos cromossomos de eucariotos superiores, além de estar associada a proteínas específicas como a *HP1* (relacionada à repressão gênica) (NITTA, 1980; GUERRA, 1988; GREWAL; ELGIN, 2002).

A heterocromatina constitutiva apresenta-se sob duas formas: a α -heterocromatina, formada por regiões repetitivas de sequência simples (regiões em *tandem*), sendo a forma encontrada no bandamento C de cromossomos em eucariotos superiores, e a β -heterocromatina, forma rara, composta por *retrotransposons* e observada em insetos e plantas (GREWAL; ELGIN, 2002). Embora a heterocromatina constitutiva componha uma importante fração do genoma, ainda resta muito a se conhecer desse importante componente de DNA repetido, pois sua função ainda não foi completamente esclarecida. Acreditava-se que a heterocromatina constitutiva era componente sem importância, sendo conhecida como “DNA lixo” e, portanto, desprezível como componente do genoma. Nos dias atuais, com o advento de técnicas mais elaboradas de biologia molecular, as concepções sobre a heterocromatina constitutiva mudaram e, dessa forma, funções celulares vitais como manutenção e auxílio dos papéis desempenhados pelos telômeros e centrômeros e endoreplicação diferencial são algumas das funções importantes desempenhadas por essa fração de DNA (GREWAL; ELGIN, 2002).

O bandamento C consiste numa técnica bastante utilizada em citogenética para identificar o número de marcações e a localização da heterocromatina constitutiva, onde os cromossomos espalhados na lâmina são mergulhados numa solução básica (hidróxido de bário) e, em seguida, expostos a uma solução salina à temperatura elevada. Durante esse procedimento, o DNA é fragmentado e, progressivamente, eliminado dos cromossomos. O DNA da heterocromatina constitutiva é menos extraído, durante esse processo que o restante do DNA. Aparentemente, a associação do DNA com proteínas na heterocromatina é diferente e mais resistente às condições da técnica de bandamento C do que a associação DNA - proteína da eucromatina, ocorrendo assim, maior extração de DNA na eucromatina. Quando os cromossomos são corados, as regiões heterocromáticas ficam evidenciadas, formando blocos escuros denominados bandas C (C = constitutiva), que são muito utilizadas na identificação de cromossomos meióticos em mamíferos (NITTA, 1980; SNUSTAD; SIMMONS, 2001). No entanto, quando o objetivo é distinguir a composição da heterocromatina constitutiva, empregam-se os fluorocromos CMA e DAPI, que

possuem afinidade preferencial por regiões ricas em GC e AT, respectivamente (SUMNER, 1990).

Os fluorocromos são corantes fluorescentes que, por mostrarem especificidade de ligação com sequências de bases de DNA, são muito utilizados em estudos citogenéticos. Dentre estes, os mais empregados são o DAPI (4'-6-diamidino-2, fenilindol) e o CMA (cromomicina A3). Outros corantes como o Hoechst 33258 e a quinacrina apresentam propriedades semelhantes ao DAPI e marcam regiões ricas em AT, enquanto que a mitramicina e a olivomicina são isômeros da cromomicina e marcam regiões de DNA ricas em GC (SUMNER, 1990). Também existem os contra-corantes, que além de aumentar o contraste das bandas fluorescentes, permitem visualizar melhor os limites da morfologia cromossômica, como por exemplo, a distamicina A (DA) e a actinomicina D (AMD) (WEISBLUM; HAENSSLER, 1974; SCHWEIZER, 1976).

Após a descoberta da técnica de bandamento C, foi desenvolvida por Summer et al. (1971) uma outra técnica que produzia várias bandas claras e escuras em cada cromossomo. Essa técnica foi denominada bandamento G porque se acreditava que o corante Giemsa estava envolvido no mecanismo de determinação dessas bandas. Sabe-se, atualmente, que as bandas G, ou segmentos que reagem positivamente à técnica de bandas G (regiões escuras), representam os segmentos cromossômicos que se condensam mais cedo na prófase, enquanto o segmento negativo para bandas G (regiões claras) é condensado mais tardiamente na prófase. As bandas G são equivalentes às bandas Q, porém mais fácil de obter, pois não envolvem a microscopia de fluorescência como ocorre nas bandas Q. O bandamento G cora a eucromatina, não evidenciando a heterocromatina, uma vez que a mesma é circunscrita às regiões de banda C. Esta técnica constitui um excelente meio de identificação cromossômica, permitindo detectar rearranjos cromossômicos, anormalidades cromossômicas como aneuploidia, estudar cromossomos de células cancerígenas e comparar cariótipos de espécies relacionadas (NITTA, 1980; MURUGESAN et al., 2001). Para estudos evolutivos, o bandamento G possibilitou a observação detalhada das transformações que ocorrem em grupos de espécies próximas que apresentam cariótipos muito semelhantes em répteis, aves e mamíferos (GUERRA, 1988).

Os bandamentos G e C permitem detectar pequenas variações estruturais, como deleções, duplicações e inversões, entre outras, geralmente relacionadas com determinadas anomalias do desenvolvimento. Além disso, é possível localizar exatamente a região do cromossomo afetada, o que seria impossível com a coloração convencional, pois a mesma revela apenas a heterozigosidade desse par e a presença de constrições secundárias (GUERRA, 1988).

O bandamento Ag-NOR foi descrito por Howell e Black, (1980) sendo um método seletivo para a marcação de nucléolos interfásicos e Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) ativas em cromossomos, apesar da técnica de hibridação *in situ*, que utiliza sondas de DNA ribossômico, ser mais recomendada devido à sua maior especificidade (SUMNER, 2003).

Os nucléolos são formas ativas da região do DNAr 45S. Neles, estão sendo produzidos e processados RNAs que são necessários para a síntese de todas as proteínas requeridas para o funcionamento celular. Os genes ribossomais estão presentes em inúmeras cópias, e não estão distribuídos aleatoriamente no DNA. Estudos têm mostrado que esses genes estão concentrados em um domínio nuclear ocupado pelos nucléolos. Embora genes extranucleolares e seus RNAs transcritos podem também ser localizados em territórios nucleares específicos, os nucléolos são particularmente um bom modelo para correlacionar aspectos moleculares da expressão gênica com estruturas nucleares. Além das proteínas ribossomais, os nucléolos contêm um grande número de proteínas não ribossomais envolvidas em vários aspectos da biogênese ribossomal e na manutenção da estrutura nucleolar (FEITOSA, 2008).

Nos eucariotos são reconhecidos quatro tipos diferentes de RNAr designados pelos seus respectivos coeficientes de sedimentação: 5S, 5,8S, 18S e 28S. Exceto o 5S, os demais são transcritos pelos genes localizados nas RONS, e estão arranjados em *tandem*, formando unidades transcricionais que originam um RNAr 45S precursor das formas 5,8S, 18S e 28S. As RONS são sítios cromossômicos de genes que codificam RNAs ribossômicos, os quais são sintetizados e processados em pré-ribossomos no nucléolo, constituindo, futuramente, os ribossomos no citoplasma, essenciais para o mecanismo de síntese protéica (SUMNER, 2003).

Cada unidade dos genes ribossomais consiste basicamente de uma região não transcrita, localizada no espaço intergênico, e separada por espaços transcritos internos, onde ficam os genes. O comprimento real do gene RNAr varia entre as espécies, e embora o 5.8S tenha geralmente o mesmo comprimento, as outras subunidades podem se apresentar menores. Ao contrário das variações em comprimento, existe uma considerável similaridade de sequências entre os genes ribossomais de diferentes organismos. Já os espaços entre esses genes são mais variáveis (FEITOSA, 2008). O número de cópias dos genes ribossomais também são de uma variabilidade muita alta, e alguns organismos como fungos e insetos apresentam em torno de 100 cópias de RNAr, enquanto plantas e anfíbios tem cerca de 10.000 cópias. O polimorfismo no número de cópias é frequente, e pode ocorrer no mesmo indivíduo ou entre indivíduos diferentes. Os genes RNAr podem estar restritos a um único sítio de um par de homólogos, ou podem ocorrer em vários cromossomos (HOWELL, 1982).

No processo de mitose, a síntese de RNA é estagnada e, concomitantemente, o nucléolo é desorganizado. Assim, no estágio de prófase, o componente fibrilar denso desaparece e o componente granular permanece solto no núcleo. Em algumas situações o conteúdo granular pode ficar associado aos cromossomos, especialmente na metáfase. Na telófase, novos nucléolos são formados em uma ou mais RONS, de forma que o componente fibrilar denso surge adjacente ao centro fibrilar, enquanto que o componente granular desaparece (DERENZINI, 2000).

A natureza citoquímica desse processo de coloração pelos íons prata não está totalmente esclarecida (HOWELL; BLACK, 1980). Estudos mostraram que o material impregnado pela prata poderia ser proteínas não histônicas que se acumulam ao redor das RONS ou dos nucléolos. Outros estudos propuseram que a marcação das RONS pelos íons prata ocorre devido às proteínas associadas ao RNA recém-transcrito. Estas proteínas são a C23 (37 Kda), encontrada no centro fibrilar do nucléolo interfásico e nas RONS metafásicas, e a proteína B23 (100 Kda) localizada na periferia do nucléolo (HOWELL; BLACK, 1980).

A grande limitação da técnica é o fato dos íons prata marcarem apenas as Regiões Organizadoras de Nucléolos que foram ativamente transcritas durante as

intérfases precedentes às metáfases analisadas, não possibilitando, muitas vezes, a demonstração do número real de RONS, sendo apenas possível confirmar o número de Regiões Organizadoras Nucleolares por meio da técnica de hibridação *in situ* (SUMNER, 1990). Segundo Santos et al. (2003), o número e a distribuição das RONS pode variar entre diferentes espécies ou dentro da mesma espécie, em diferentes grupos celulares. Esses padrões determinam quais cromossomos fazem parte da organização nucleolar auxiliando na caracterização cromossômica de diferentes espécies ou táxons. No caso, onde mais de uma RON está presente no mesmo complemento, nem sempre indica que estão todas ativas em uma mesma célula. O processo de ativação pode ser ao acaso ou pode existir uma ativação diferencial que produz diferentes tipos de RONS (SCHEER et al., 1993).

A impregnação por íons prata também se destina ao estudo do comportamento nucleolar durante o ciclo celular, estudos de várias patologias como, por exemplo, leucemia mielóide crônica onde os pacientes apresentaram atividades Ag-NOR aumentada e na diferenciação das células tumorais das células normais devido a um aumento da quantidade de proteínas Ag-NOR indicando um aumento na taxa de proliferação celular e um aumento no grau de malignidade (SUMNER, 2003).

A técnica molecular de FISH ou HIS foi utilizada, pela primeira vez, por Gall e Pardue, em 1969, para análises cromossômicas, e por Buongiorno-Nardelli e Amaldi, no mesmo ano, para cortes histológicos. Esta técnica representa uma tecnologia de alta resolução e eficaz para a detecção e mapeamento de segmentos alvo de DNA, para localizar as mais diversas sequências de nucleotídeos, com um gene de cópia única, moléculas de RNA mensageiro ou um DNA viral inserido no cromossomo e para detecção de segmentos cromossômicos não identificáveis pelas técnicas clássicas de bandamento (LEITCH et al., 1994; GUERRA, 2004).

O princípio da técnica consiste no fato de que o DNA é formado por duas fitas complementares, as quais, por meio de aquecimento, podem ser facilmente separadas em fitas simples, ou desnaturadas, e, em seguida, renaturadas, voltando a ser fita dupla. Se no momento da renaturação do DNA existir uma sonda disponível em solução, esta sonda competirá com as fitas de DNA cromossômico e poderá ser hibridizada no DNA alvo, ao invés da fita complementar original. Em

outras palavras a técnica consiste no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA, com uma sequência de nucleotídeos complementares, situada dentro da célula, visando a verificar se a célula possui essa sequência e qual é a sua localização (GUERRA, 2004).

Para visualizar o segmento de DNA ou RNA hibridizado, é necessário que ele esteja marcado com alguma molécula de fácil identificação, funcionando como uma sonda para detectar a sequência complementar de nucleotídeos, chamada sequência alvo. As sondas são derivadas de fragmentos de DNA ou RNA que foram isolados, purificados e amplificados para serem usados. Podem ser de sequência única ou repetida. As sequências repetidas podem estar organizadas no cromossomo em *tandem*, formando blocos de DNA-alvo, ou podem se encontrar dispersas no complemento cromossômico, intercaladas com diversos outros tipos de sequências. As sondas de DNA repetido mais utilizadas são os DNAs satélite, o gene que codifica o RNA ribossomal 5S e a sequência que codifica o precursor 45S dos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5,8S, amplamente conhecidos como DNAr 5S e 45S, respectivamente. O híbrido sonda/alvo pode ser DNA/RNA, RNA/RNA ou DNA/RNA (SUMNER, 2003; GUERRA, 2004).

O DNAr 45S, conhecido também como DNAr, é uma sequência moderadamente repetida, que fica localizada em um ou mais pares cromossômicos, e é muito conservada evolutivamente. Cada unidade de repetição do 45S contem três genes (DNAr 18S+5,8S+28S) e seus espaçadores, sempre transcritos juntos em um único RNA precursor. Os sítios de DNAr correspondem às constrições secundárias, que podem ser visualizadas por coloração convencional ou pela aplicação da técnica de nitrato de prata, embora algumas vezes, sítios muito pequenos ou pouco ativos podem não ser visíveis e serem localizados apenas com a hibridização *in situ*. A sequência do DNA 5S, no entanto, é mais variável que a 45S, e é repetida em *tandem* geralmente em um único par de sítios cromossômicos, ou mais raramente em dois sítios (FEITOSA, 2008).

Após a hibridização, a sonda precisa ser detectada, o que é feito por meio de moléculas conjugadas, constituídas por uma unidade capaz de reconhecer e se ligar fortemente à molécula marcadora da sonda e outra que permite sua

visualização ao microscópio, esta etapa é chamada de sinalização. A molécula marcadora, geralmente, é um anticorpo, por exemplo, se a sonda for marcada com biotina usa-se o anticorpo antibiotina. Os corantes fluorescentes mais utilizados na técnica de FISH são Cy3, FITC (*fluorescein isothiocyanate*), o vermelho – Texas e a rodamina. A técnica necessita de um microscópio fluorescente equipado com lâmpada ultravioleta para a análise (LEITCH et al., 1994; GUERRA, 2004).

As sondas são marcadas pela técnica de *Nick Translation* que utiliza duas enzimas (Dnase e a DNA polimerase) e sua marcação é confirmada pela técnica de *Dot Blot* que consiste numa variação da técnica de *Southern Blot*, na qual o DNA é ligado a uma membrana, sendo, posteriormente, hibridizado com uma sonda, numa fenda circular. No *Dot Blot* não ocorre separação eletroforética, como ocorre no *Southern Blot* não tendo informações quanto ao peso molecular e o número de classe de DNA responsável pelo sinal (LEITCH, 1994).

Nos quelônios ocorrem macrocromossomos e microcromossomos (MATSUDA, et al., 2005). No entanto, existem somente poucos dados na literatura sobre estudos citogenéticos em Testudines como, por exemplo, a caracterização do número de cromossomos em algumas espécies de quelônios na América do Sul, na Austrália e na África (BULL; LEGLER, 1980; Mc BEE et al., 1985).

Considerando-se a escassez de trabalhos sobre estudos citogenéticos em quelônios brasileiros e a importância biológica desses animais, no presente estudo foi realizada uma análise da estrutura cromossômica, em duas espécies distintas: *Chelonoidis carbonaria* e em *Phrynops geoffroanus*. Os resultados obtidos nesse estudo poderão ser usados como referências para outras espécies.

2 - OBJETIVOS

Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Analisar o cariótipo e a estrutura cromossômica de *Chelonoidis carbonaria* e *Phrynops geoffroanus*, por técnicas de citogenética clássica e molecular, com ênfase à identificação das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs).

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o cariótipo de *Chelonoidis carbonaria* e *Phrynops geoffroanus*, por meio de técnicas convencionais;
- Analisar a estrutura cromossômica, com base nas técnicas de citogenética clássicas pelo bandamento (C, G, Ag-Nor) e pela citogenética molecular com a técnica de FISH;
- Localizar as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) de cada espécie.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1 Amostras

Foram analisados 12 exemplares de cada espécie, sendo seis machos e seis fêmeas de *Chelonoidis carbonaria* e *Phrynops geoffroanus*. Os animais foram coletados no criatório comercial “Reginaldo Uvo Leone”, registrado no IBAMA sob o N°. 167525, localizado na cidade de Tabapuã–SP, (20° 59’ 47.4”S, 49° 07’16.6”W, elevação 419m, posição atual SW 2m) e os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal (nº 50/07-CEEA – Botucatu – SP) e pelo IBAMA/RAN (nº 14729-1).

3.2. Montagem do Cariograma (SILVA; SANTOS, 2005)

3.2.1. Colheita de Sangue

O sangue foi colhido pela veia margino-costal em *Chelonoidis carbonaria* (Figura 4: A) e por cardiocentese em *Phrynops geoffroanus* (Figura 4: B), acondicionado em tubos contendo o anticoagulante heparina (Roche®), e mantido sob refrigeração até sua utilização, que não excedeu 24 horas, evitando a coagulação da amostra. Foram colhidos 3 a 5mL de sangue total em frasco devidamente identificado.

O local de coleta em *Chelonoidis carbonaria* foi devidamente higienizado com álcool 70% e foi utilizada seringa de 5 mL com agulha 25:8 (BD Precision Glide®). Em *Phrynops geoffroanus*, o animal foi lavado em água corrente para que as impurezas presentes no casco fossem eliminadas. O animal foi colocado em decúbito dorsal para a correta assepsia com álcool 70%. O orifício foi

realizado entre as placas umerais e peitorais, no plastrão. O sangue foi coletado diretamente do coração usando uma agulha com calibre 40:12 (*BD Precision Glide*[®]) acoplada a uma seringa de 5mL (*BD Precision Glide*[®]) para animais menores (BRITES; RANTIN, 2004; ZAGO, 2007; ZAGO et al., 2010). Em animais maiores foram utilizadas agulhas de aço com calibre 50:12. O orifício foi vedado com cola cirúrgica (*Vetband*[®]) e o animal foi mantido em observação por 24 horas antes de retornar ao seu ambiente (ZAGO, 2007; ZAGO et al., 2010).

Após a coleta, o frasco contendo o sangue foi mantido na estufa a 37° C para que ocorra a sedimentação em duas fases distintas: a superior, amarelada, que constitui o plasma, e a inferior, vermelha, com as hemácias sedimentadas. Sobre a superfície da camada vermelha observamos um delgado filamento esbranquiçado que corresponde à deposição dos leucócitos.



Figura 4: Coleta de sangue. **A:** Punção da veia margino-costal em *Chelonoidis carbonaria*. **B:** Cardiocentese em *Phrynops geoffroanus*.

3.2.2. Montagem da cultura

Em uma câmara de fluxo laminar, todo o plasma foi transferido para um tubo Falcon estéril, juntamente com três ou quatro gotas de hemácias, para garantir a transferência dos linfócitos depositados sobre elas. O material foi novamente suspenso com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Em um tubo Falcon estéril, etiquetado com a identificação do animal, contendo 7,5mL de meio de

cultura (*RPMI 1640-GIBCO*[®]) (solução preparada com soro fetal bovino, penicilina/quemeticina e RPMI 1640), foi adicionado 0,3 a 0,5mL de plasma e 0,2mL a 0,3mL de fitohemaglutinina (*GIBCO*[®]), um mitogênico específico para linfócitos, extraído do feijão (*Phaseolus vulgaris*). O tempo de incubação foi de 72 horas, período que permitiu uma obtenção maior de metáfases.

3.2.3. Bloqueio

O bloqueio da cultura foi realizado pela adição de colchicina, inibidora da formação das fibras do fuso. Tal inibição impede que as células completem o ciclo mitótico e permaneça em metáfase, o que melhora o índice mitótico.

Após 71 horas de incubação foi adicionado em cada frasco 0,1mL de colchicina e estes foram reincubados por 60 minutos.

3.2.4. Hipotonização e fixação

O agente hipotônico usado (solução hipotônica de cloreto de potássio, KCl – 0,075M) facilitou o espalhamento dos cromossomos nas lâminas, e o fixador (metanol – acético, na proporção de 3:1) preservou sua estrutura. Estas etapas foram realizadas pelos seguintes procedimentos:

- a) Centrifugar a 900-1000 rpm por 5 minutos. Aspirar e descartar o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta Pasteur;
- b) Colocar 1mL de KCL 0,075 M a 37°C e agitar. Ao completar 2 minutos, acrescentar mais 2mL e, aos 5 minutos, completar para 5mL e marcar mais 45 minutos completando este tempo em banho-maria a 37°C;
- c) Ressuspender sempre que acrescentar o KCL. Após este tempo colocar 0,5ml de fixador para começar a interrupção da hipotonização. Agitar e centrifugar;
- d) Centrifugar e aspirar o sobrenadante;

- e) Colocar o tubo no agitador ou ressuspender manualmente e adicionar 5mL de fixador novo, lentamente no primeiro mL;
- f) Centrifugar e aspirar o sobrenadante como nos passos anteriores;
- g) Adicionar 5 mL do segundo fixador, com o tubo no agitador;
- h) Centrifugar e aspirar o sobrenadante. Adicionar o terceiro fixador, centrifugar e aspirar;
- i) Adicionar 1,0mL de fixador;
- j) Manter os tubos em refrigeração até sua utilização.

3.2.5. Preparo das lâminas

- a) As lâminas previamente lavadas foram estocadas em cuba com água destilada e guardadas na geladeira;
- b) Foi ressuspendido levemente o material com pipeta Pasteur de ponta fina e pingado 3-4 gotas, em regiões diferentes de uma lâmina já codificada, com uma altura de 30 cm aproximadamente;
- c) A lâmina foi flambada rapidamente em lamparina a álcool e, posteriormente, enxugada na sua parte posterior com papel absorvente, e inclinada para secar;
- d) As lâminas foram envelhecidas em estufa a 50-60°C “*over night*”.

3.2.6. Coloração usual: Giemsa

A coloração convencional de Giemsa foi realizada pelo seguinte protocolo:

- a) Colocar as lâminas em cuba de vidro com berço e hidrolisá-las em HCl 1N, a 60°C, por 7 minutos;
- b) Interromper a hidrólise mergulhando as lâminas em outra cuba com água destilada gelada;

- c) Lavar em água corrente por 10 minutos, na própria cuba;
- d) Cobrir as lâminas com um filme de solução tampão fosfato por 30 segundos e deixar escorrer;
- e) Corar com Giemsa tamponado (pH 6,8) a 4% por 5 minutos;
- f) Lavar em água destilada corrente;
- g) Escorrer e secar com papel de filtro ou secador;
- h) Montar as lâminas com lamínulas 24x50mm, usando uma gota de Entelan, Bálsamo do Canadá.

3.3. Técnicas de Bandamento Cromossômico

3.3.1. Bandamento C (Sumner, 1972, com modificações)

As lâminas com metáfases processadas por essa técnica tiveram, no mínimo, sete dias e, no máximo, dois meses para ficarem envelhecidas. A técnica utilizada foi a seguinte:

- a) Mergulhar a lâmina no HCl 0,2N por 5 minutos;
- b) Lavar em água deionizada gelada e secar;
- c) Mergulhar a lâmina em uma cuba contendo solução de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) aquecido a 37°C e recém-filtrado por 10 minutos;
- d) Mergulhar a lâmina por 30 segundos em Ácido Acético Glacial a 3%, para eliminar a película de Bário precipitado que pode aderir à lâmina;
- e) Dar dois banhos de água deionizada gelada, no mínimo 5 minutos cada. Secar ao ar livre ou com secador;
- f) Incubar em 2xSSC à temperatura ambiente por 10 minutos;
- g) Incubar em 2xSSC a 60°C por uma hora;
- h) Lavar em água deionizada gelada e secar. Mergulhar em álcool 70% (Duas cubas), por 5 minutos;

- i) Mergulhar em álcool 95% (2 cubas), por 5 minutos;
- j) Corar com solução tamponada de Giemsa a 4%, por 4 minutos;
- k) Lavar em água deionizada e secar.

3.3.2. Bandamento G (Seabright, 1971 com modificações)

Os melhores resultados desta técnica foram obtidos com lâminas de 5 a 10 dias envelhecidas “*over night*”, em estufa a 60°C. Foram montados cinco boréis sendo um com tripsina, dois com tampão Sorensen, um com Giemsa a 4% e um com água deionizada. A técnica consiste em:

- a) Pesar 12 mg de tripsina em um borel e diluir com 50ml de tampão Sorensen. Colocar 50 ml de tampão Sorensen em dois outros boréis;
- b) Diluir 2 mL de Giemsa (Solução Mãe) em 48mL de tampão Sorensen. Com exceção da solução de Giemsa, as demais soluções podem ser preparadas pela manhã e usadas ao longo do dia;
- c) Colocar a lâmina por 12 a 15 segundos na solução de tripsina (o tempo depende da idade da lâmina);
- d) Dar um banho rápido no tampão Sorensen;
- e) Passar a lâmina para o próximo borel de tampão e deixar 2 minutos;
- f) Guardar a solução de tripsina na geladeira até a próxima utilização. Deixar a lâmina no Giemsa durante 4 minutos, agitando de vez em quando;
- g) Passar na água deionizada e secar.

3.3.3. Impregnação por íons prata (Ag-NOR) (Howell; Black, 1980, com modificações)

Para a marcação das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) foi utilizada a seguinte técnica:

- a) Pipetar uma gota de solução reveladora e uma gota de solução aquosa de nitrato de prata em cada metade da lâmina;
- b) Misturar as gotas assoprando com pipeta Pasteur e cobrir com lamínula;
- c) Incubar em chapa aquecedora ou em estufa a 55 - 60°C, por cerca de 5 a 10 minutos, até que a solução adquira uma coloração castanho-dourada;
- d) Lavar em água corrente;
- e) Corar em solução tamponada de Giemsa a 4%, por cerca de 4 minutos;
- f) Lavar em água corrente e secar.

3.3.4. Análise Cromossômica ao microscópio

As análises das lâminas obtidas a partir de culturas de linfócitos foram feitas ao microscópio de luz (*Olympus BX 60*), acoplado a um analisador de imagens *AXIOCAM ICc 3*. Inicialmente as metáfases foram localizadas usando objetivas de 10x ou 20x e a análise foi realizada em objetiva de 100x. As metáfases escolhidas foram arredondadas, apresentando cromossomos espalhados sem sobreposição, mostrando-se alongados o suficiente para uma análise adequada. Os cromossomos foram classificados, pareados e identificados com base na sua morfologia e posição do centrômero.

3.4. FISH (LEITCH et al., 1994)

3.4.1. Hibridação *In Situ* com Fluorocromos

A técnica de FISH utilizada seguiu o protocolo descrito abaixo:

1ª Etapa: Tratamento das lâminas e hibridação *in situ*

- a) Colocar 50 µL de RNase diluída (1:100) em cada lâmina plástica e levar para a estufa a 37°C, por 1 hora;
- b) Lavar as lâminas em 2x SSC por 10 minutos, a temperatura ambiente, no agitador;
- c) Descartar o 2x SSC e, na mesma cubeta, colocar o paraformaldeído 4% a temperatura ambiente, por 10 minutos, no agitador;
- d) Descartar o paraformaldeído no vidro de descarte apropriado e colocar novamente 2x SSC, por 10 minutos, no agitador;
- e) Descartar o 2x SSC e colocar álcool etílico 70%, por 5 minutos, no agitador;
- f) Descartar o álcool 70% e colocar álcool 100%, por 5 minutos no agitador;
- g) Descartar o álcool 100% e deixar as lâminas secando por 1 a 3 horas;
- h) Neste intervalo preparar a mistura de hibridação (30 µL por lâmina);

Mistura de Hibridação:

1- Formamida 100%	15 µL
2- Dextran 50%	06 µL
3- 20xSSC	03 µL
4- DNA de bloqueio (timo de bezerro)	01 µL
5- SDS 10% (triton ou detergente neutro)	01 µL
6- Sonda (28S de anfíbio: <i>Xenopus laevis</i>)	05 µL
7- Água	30-31 µL

- i) Desnaturar a mistura de hibridação a 70°C, por 10 minutos, em banho-maria;
- j) Incubar no gelo por, no mínimo, 5 minutos e, no máximo, 2 horas, para que o DNA (sonda) não renature no tubo;
- k) Colocar 30 µL da mistura de FISH em cada lâmina, cobrir com lamínulas plásticas e levar para o termociclador a 90°C, por 10 minutos, 48°C, por 10 minutos; 38° C, por 5 minutos e 37°C, por 10 minutos;
- l) Transferir as lâminas para a câmara úmida a 37 °C, durante a noite;
- m) Retirar as soluções de 2x SSC, 0,1x SSC e 4x SSC 0,2% *Tween* da geladeira e colocá-las na bancada para os banhos pós – hibridação no dia seguinte.

2ª Etapa: Banhos pós – hibridação (estringência de 80-85%)

- a) Ligar o banho-maria e ajustar para 42 °C. Colocar as soluções para aquecer e preparar a formamida deionizada 20% em 0,1x SSC;
Formamida deionizada 20%: 20 mL de formamida deionizada diluída em 80 mL de 0,1xSSC.
- b) Retirar as lâminas da estufa, deixando a câmara úmida, e colocar em um jarro de Coplin pré – aquecido (cerca de 42°C). Agitar em um *shaker* por 5 minutos;
- c) Descartar 2x SSC na pia e, na mesma cubeta, colocar formamida 20%, a 42°C, por 10 minutos em agitação;
- d) Descartar a formamida em vidro apropriado e colocar na cubeta 0,1x SSC, a 42°C, por 5 minutos em agitação;
- e) Descartar o 0,1x SSC e, na mesma cubeta, colocar o 2x SSC, a 42°C, por 5 minutos sem agitação;
- f) Descartar o 2x SSC e colocar o 4x SSC 0,2% *tween*, a 42°C, por 5 minutos em agitação;
- g) Descartar o 4x SSC 0,2% *tween* e colocar o 4x SSC 0,2% *tween*, por 5 minutos no agitador, a temperatura ambiente. Colocar lamínula.

3ª Etapa: Detecção da hibridação (sistema biotina – avidina)

a) Antes de terminar o último banho pós – hibridação, retirar o BSA 5% do *freezer*. Após o último banho, manter as lâminas dentro do jarro de Coplin até que o BSA esteja descongelado. Em seguida, retirar a lâmina do jarro, bater cuidadosamente no papel de filtro para escorrer o 4x SSC e, com ela molhada, pingar 50 µL de BSA 5% e cobrir com lamínula plástica. Deixar 5 a 10 minutos em temperatura ambiente;

Preparo de 50 µL de BSA 5%:

- | | |
|-----------------|-------|
| 1- Avidina-FITC | 1 µL |
| 2- BSA 5% | 99 µL |

b) Retirar a lamínula cuidadosamente, bater a lâmina em um papel de filtro para escorrer o BSA e colocar a solução de detecção, cobrir com lamínula plástica e incubar a 37°C, por 1 hora, em câmara úmida;

c) Lavar as lamínulas em 4x SSC 0,2% *Tween* por 10 minutos a temperatura ambiente no agitador, no escuro. Retirar a lamínula no primeiro minuto;

d) Descartar o 4x SSC 0,2% *Tween* e repetir a mesma lavagem.

4ª Etapa: Coloração

Retirar as lâminas do 4x SSC 0,2% *Tween*, bater cuidadosamente no papel de filtro para escorrer o 4x SSC e colocar 25 µL de meio de montagem (solução de iodeto de propídio), cobrir com lamínula de vidro e retirar o excesso entre um pedaço de papel de filtro. Observar ao microscópio de fluorescência.

Solução de iodeto de propídio:

- 1- 25 µL de antifading
- 2- 01 µL de iodeto de propídio (50 µg/mL)

3.4.2. Nick Translation

As sondas utilizadas na técnica de FISH foram marcadas utilizando a técnica de *Nick Translation*, segundo o protocolo a seguir:

- a) Retirar todos os reagentes do *freezer* e colocá-los no gelo. Colocar os microtubos da reação também no gelo. As enzimas degradam se estiverem acima de 16°C. Colocar 5 µL de dNTP (10x), 1µg de DNA (sonda) e H₂O destilada ultra – pura, até completar 45 µL de solução;
- b) Após adicionar cada reagente, agite levemente até homogeneizar a solução. As enzimas (DNase e DNA polimerase) são estocadas em glicerol, e os componentes não se misturam sozinhos na temperatura da reação (16°C). Após agitar, centrifugue por cinco segundos (spin);
- c) Incubar a 16°C, por duas horas, no termociclador;
- d) Ao final, precipite a sonda marcada com acetato de sódio 3 M (1:10, v:v) e 2 volumes de etanol 100% gelado, para 45 µL de solução de reação contendo o DNA, colocar 4,5 µL de acetato e 100 µL de etanol;
- e) Homogeneizar levemente e colocar no *freezer* por, no mínimo, duas horas;
- f) Centrifugar a 12.000 rpm, por dez minutos. Retirar o sobrenadante e deixar o *pellet* secar um pouco;
- g) Lavar com álcool 70%, centrifugar novamente e deixar o *pellet* secar;
- h) Adicionar 50 µL de TE e deixar na geladeira *overnight*;
- i) No dia seguinte estocar no *freezer*.

3.4.3. Dot Blot

A técnica de *dot blot* foi utilizada para conferir se a marcação da sonda foi eficiente para realizar o FISH. A técnica segue o protocolo descrito abaixo:

- a) Separar três placas de Petri limpas e secas;

- b) Cortar uma membrana de nylon carregada positivamente, de modo que comporte todas as amostras;
- c) Colocar a membrana no tampão 1 por 15 minutos;
- d) Retirar a membrana do tampão 1 e secá-la entre duas folhas de papel de filtro, por dez minutos
- e) Adicionar 2µL da amostra a uma distância razoável uma das outras para que não ocorra sobreposição dos *blots*;
- f) Secar a membrana por dez minutos, à temperatura ambiente;
- g) Colocar a membrana com as amostras no tampão 1, por um minuto. Em seguida, transferi-la para o tampão 2, por 30 minutos, sob agitação;
- h) Para uma membrana de 1,5x1, 5 cm colocar 2,5 µL de streptavidina-AP (geladeira), em 5 mL de solução tampão 1. Mergulhar a membrana com a amostra voltada para baixo na solução de detecção. Levar para estufa a 37°C, por 30 minutos;
- i) Lavar a membrana em tampão 1, por 15 minutos, e preparar a solução da fosfatase alcalina:
Solução da fosfatase alcalina:
 - 1- 11,25µL de NBT (75mg/mL de 4 nitro *blue tetrazolium chloride* em 70% de dimetilformamida);
 - 2- 8,75µL de BCIP (50mg/mL de 5-bromo-fenol-chloro-2-*indolyl-phosphate* em 70% de dimetilformamida).
- j) Transferir a membrana para o tampão 3, por dois minutos;
- k) Transferir a membrana para uma placa de Petri limpa, envolta por papel alumínio, e colocar a solução de fosfatase alcalina por dez minutos, no escuro, sem movimentá-la;
- l) Lavar a membrana em água destilada e secá-la.

Tampão 1:

Preparar 100 mL de uma solução contendo Tris HCl (0,1 M, pH 7,5) e NaCl 0,15M

- 1- 10 mL de Tris HCl (solução estoque a 1 M);
- 2- 5 mL de NaCl (solução estoque a 3 M);
- 3- Completar para 100 mL de água destilada em balão volumétrico;
- 4- Verificar e ajustar o pH.

Tampão 2:

Preparar pouco antes do uso, por ser uma solução bloqueadora de anticorpos, contendo 5% de leite em pó desnatado (*Molico - Nestle*[®]).

- 1- 0,5 gramas de leite em pó;
- 2- 10 mL de Tampão 1.

Tampão 3:

Preparar 100 mL de uma solução contendo Tris HCl (0,1M, pH 9,5), NaCl (0,1M) e MgCl₂ (0,05M).

- 1- 10 mL de Tris HCl (solução estoque a 1 M);
- 2- 0,33 de NaCl (solução estoque a 3 M);
- 3- 5 mL de MgCl₂ (solução estoque a 1 M);
- 4- completar para 100 mL de água destilada em balão volumétrico;
- 5- Verificar e ajustar o pH.

4- Resultados

Os resultados foram escritos na forma de artigos científicos a serem submetidos para publicação em revistas especializadas, são eles:

- 4.1. Karyotypic characterization of *Chelonoidis carbonaria* (Testudinidae).
- 4.2. Description of *Phrynops geoffroanus* karyotype (Testudines: Chelidae).

4.1. Karyotypic characterization of *Chelonoidis carbonaria* (Testudinidae)

Carlos Eduardo Saranz Zago¹

Luiz Dino Vizotto¹

Tiago Lucena Silva¹

Josué Rodrigues dos Santos¹

Maria Isabel Afonso Silva¹

Claudia Regina Bonini-Domingos¹

Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira¹

1. UNESP-IBILCE Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Quelônios (CEQ) – São José do Rio Preto - SP.

Running Title: Karyotypic of *Chelonoidis carbonaria* (Testudines: Testudinidae)

Key Words: *Chelonoidis carbonaria*; Karyotype; G-banding; C-banding; Ag-NOR banding; Nucleolar Organizer Regions

Correspondence to: Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira, Departamento de Biologia IBILCE-UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265; Jd. Nazareth; CEP: 15054-000; (17)3221-2392;
E-mail: tercilia@ibilce.unesp.br

Resumo

Os répteis sofreram redução do número de espécies desde a época em que dominavam a Terra até os dias atuais. O Brasil possui uma diversidade de quelônios enorme e muitos estão ameaçados de extinção. Os quelônios são pouco estudados, principalmente quanto à sua caracterização citogenética. O presente trabalho objetivou a análise, pelas técnicas de citogenética clássica, dos cromossomos de *Chelonoidis carbonaria*. As amostras de sangue foram coletadas de animais do criatório “Reginaldo Uvo Leone”, em Tabapuã-SP, com a autorização da Comissão de Ética na Experimentação Animal de Botucatu-SP e do IBAMA/RAN. Foram avaliados seis fêmeas e seis machos de *Chelonoidis carbonaria*, que apresentaram número de cromossomos igual a $2n = 52$, distribuídos em três grupos diferentes dos encontrados na literatura. Pela metodologia de bandamento G, foi possível identificar os pares de cromossomos homólogos e, pela técnica de bandamento C, a presença de regiões de heterocromatina constitutiva em macrocromossomos e em microcromossomos. Por bandamento Ag- NOR foram observadas Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) em dois microcromossomos, nos machos, e em apenas um microcromossomo, nas fêmeas. Com os resultados obtidos, conclui-se que os pares de cromossomos de *Chelonoidis carbonaria* são similares aos descritos para as espécies terrestres e não similares quando comparados com outras famílias de quelônios.

Palavras Chaves: *Chelonoidis carbonaria*; Cariótipo; Bandamento G; Bandamento C; Bandamento Ag-NOR; Regiões Organizadoras Nucleolares

Abstract

The reptiles were reduced in number of species from the time that ruled the Earth until the present day. Brazil has an enormous diversity of turtles, and many are threatened with extinction. The turtles are poorly studied, mainly from their cytogenetics. The present work aims at the analysis, the techniques of classical cytogenetics, chromosomes of *Chelonoidis carbonaria*. Blood samples were collected from animals in the breeding "Reginaldo Uvo Leone", in Tabapuã-SP, with the permission of the Ethics Committee in Animal Experimentation of Botucatu-SP and IBAMA/RAN. We evaluated six female and six male *Chelonoidis carbonaria*, which showed the same chromosome number $2n = 52$, divided into three different groups of literature. By G banding methodology, it was possible to identify pairs of homologous chromosomes, and the C banding technique, the presence of regions of constitutive heterochromatic in macrochromosomes and microchromosomes. By Ag-NOR banding, were observed Nucleolar Organizer Regions (NORs) in two microchromosomes, in males, and in only one microchromosome for females. With these results, we conclude that the pairs of chromosomes *Chelonoidis carbonaria* are similar to those described for terrestrial species and not similar when compared with other families of turtles.

Key Words: *Chelonoidis carbonaria*; Karyotype; G-banding; C-banding; Ag-NOR banding; Nucleolar Organizer Regions

Introdução

A ordem Testudines está dividida em duas subordens: Pleurodira e Cryptodira. A subordem Cryptodira possui três superfamílias: Testudinoidea,

Trionychoidea e Chelonioidea, que incluem tartarugas, cágados e jabutis encontrados, em sua maioria, no hemisfério sul, com formas terrestres e aquáticas na América do Sul, terrestres na África e sem representantes na Austrália e na Antártica. (AUFFENBERG, 1974; BICKHAM; CARR, 1983; ZUG, 1993; POUGH et al., 2003; GOULART, 2004; SHAFTER, 2009).

A família Testudinidae está representada exclusivamente por espécies terrestres, incluindo mais de duzentas formas fósseis e aproximadamente quarenta espécies viventes, que ocorrem em quase todos os continentes, exceto Austrália e Antártica (AUFFENBERG, 1974; ZUG, 1993; POUGH et al., 2002). O gênero *Chelonoidis* (Spix, 1824) possui quatro espécies na América do sul, sendo: *Chelonoidis carbonaria*, *Chelonoidis denticulata* e *Chelonoidis chilensis* no continente, e *Chelonoidis nigra*, exclusiva das Ilhas de Galápagos (AUFFENBERG, 1974; POUGH et al., 2002).

Chelonoidis carbonaria, Jabuti piranga ou jabuti de patas vermelhas foi descrito pela primeira vez por Spix, em 1824. São animais terrestres, com hábito diurno e alimentação variada com parte da sua dieta composta por frutas, folhas e animais mortos. O jabuti piranga é encontrado na área de cerrado em quase todos os países da região norte da América do Sul, com exceção do Peru e do Equador (PRICHARD, 1979; GANS, 1980; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989; GOULART, 2004; JEROZOLIMSKI, 2005).

Os cromossomos de aves, peixes e répteis apresentam uma grande variabilidade em relação ao tamanho e a morfologia, sendo formados por macro e microcromossomos (NOLETO et al., 2006). Para estudar os cromossomos de répteis e outros animais foram utilizadas técnicas clássicas de citogenética, como a coloração convencional de Giemsa e os bandamentos G, C e Ag-NOR. (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

A identificação citogenética é um importante parâmetro para o conhecimento dos cromossomos auxiliando na preservação da espécie (ROHILLA; TIWARI, 2008). O objetivo deste trabalho foi, portanto, identificar, por meio de técnicas clássicas de citogenética, o cariótipo de *Chelonoidis carbonaria*, contribuindo para o conhecimento da biologia dessa espécie.

Material e Método

Foram coletados 4 ml de sangue da veia margino costal, utilizando heparina sódica como anticoagulante de 12 exemplares de *Chelonoidis carbonaria*, separados por sexo, sendo seis fêmeas e seis machos provenientes do criatório comercial Reginaldo Uvo Leone em Tabapuã –SP (20° 59' 47.4"S, 49° 07' 16.6"W) (MADER, 1996; ROHILLA; TIWARI, 2008).

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal nº 50/07-CEEA – Botucatu – SP e pelo IBAMA nº 14729-1 (Apêndice A).

Os leucócitos foram inoculados em meio de cultura de tecido (solução preparada com soro fetal bovino, penicilina/quemeticina, e RPMI 1640), e estimulados a se dividirem pela adição de fitohemaglutina. O tempo de incubação foi de 72 horas. Após esse procedimento, a colchicina foi adicionada para inibir a formação das fibras do fuso, mantendo as células em metáfase.

Os protocolos seguiram o padrão recomendado por Silva e Santos (2005), para a montagem do cariótipo e para os bandamentos G, C e Ag-NOR, com adaptações para os quelônios nos tempos das colorações.

Resultados

A coloração de Giemsa mostrou número diplóide de cromossomos para fêmeas e machos de *Chelonoidis carbonaria* de $2n = 52$, distribuídos em três grupos (A, B e C), sendo 28 macrocromossomos dispostos no grupo A (três metacêntricos, um acrocêntrico e dez submetacêntricos), grupo B, com sete pares acrocêntricos e grupo C, com cinco pares de microcromossomos (Figuras 1: A e B).

A metodologia de bandamento G auxiliou no pareamento dos macrocromossomos homólogos, indicando que o tamanho e o número de bandas

(Figura 2: A e B e Figura 3: A e B), foram constantes em todas as metáfases analisadas.

Pelo método de bandamento C, foi observada a presença de heterocromatina constitutiva nas fêmeas em um par de microcromossomos e em um par de macrocromossomos marcados na região centromérica (Figura 4: A). Nos machos as regiões heterocromáticas (Banda C +) foram encontradas em um par de microcromossomos e em dois pares de macrocromossomos, sendo um na região centromérica e outro na região telomérica (Figura 4: B).

A identificação das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) com íons prata (Ag-NOR), nas fêmeas, mostrou impregnação em um único cromossomo acrocêntrico no décimo par na região telomérica do braço curto (Figura 4: C), já nos machos, os dois cromossomos acrocêntricos, do décimo par, na região telomérica do braço curto foram marcados (Figura 4: D).

Discussão

O número diplóide de cromossomos de fêmeas e machos de *Chelonoidis carbonaria* ($2n = 52$) encontrados nesse estudo foi observado em outros quelônios, como na família Testudinidae, em *Chelonoidis donosobarrosi*, *Chelonoidis denticulata*, *Chelonoidis elephantopus*, *Chelonoidis pardalis*, *Chelonoidis gigantea* e *Chelonoidis chilensis*, na família Bataguridae, em *Sacalia bealei* e em *Mauremys mutila*, sugeridos na literatura como grupo basal de testudines (BICKHAM; BAKER, 1976; MARTINEZ et al., 2009).

Outros cryptodíros apresentam números diplóides de cromossomos diferentes dos encontrados em Testudinidae como em animais da família Emydidae, em *Trachemys dorbigni* ($2n = 50$); na família Kinosternidae, em *Kinosternon flavescens* e *Kinosternon scorpioides* ($2n = 56$); na família Carettochelyidae, em *Carettochelys insculpta* ($2n = 68$); na família Trionychidae, em *Trionyx ferox* e em *Lissemys punctata* ($2n = 66$) e na família Cheloniidae, em *Chelonia mydas* e em *Caretta caretta* ($2n = 56$), observados na tabela 1

(BICKHAM et al., 1980; BICKHAM; CARR, 1983; ROHILLA et al., 2006; LÓPEZ et al., 2008; MARTINEZ et al., 2009).

Bickham e Baker, em 1976, apresentaram um agrupamento do cariótipo de *Chelonoidis carbonaria* semelhante aos cariótipos da família Bataguridae com 9:5:12. O mesmo agrupamento foi descrito por Bickham e Carr, em 1983, para a família Emydidae. No presente estudo encontramos uma formulação diferente para *Chelonoidis carbonaria*, com 14:7:5, sugerindo uma variação evolutiva dessa família.

A técnica de bandamento G foi utilizada para parear macrocromossomos de *Chelonoidis carbonaria*, sendo constante em todas as metáfases analisadas. Outros autores utilizaram esta técnica para auxiliar na formação dos pares homólogos e na localização de patologias genéticas associadas aos cromossomos em outros quelônios como em *Chelonia mydas*, *Platysternon megacephalum* e em outros répteis como em *Gehyra purpurascens* (BICKHAM et al., 1980; HAIDUK; BICKHAM, 1982; BICKHAM; CARR, 1983; MORITZ, 1984).

Em *Trachemys dorbigni* e *Trachemys scripta elegans* ocorreu a marcação da heterocromatina constitutiva em vários cromossomos, sendo o par 1 e 2 com bandas largas bem evidentes na região centromérica (FANTIN; GIULIANO-CAETANO, 2008). No presente estudo, em *Chelonoidis carbonaria* a técnica de bandamento C indicou marcação na região centromérica em dois pares de macrocromossomos das fêmeas, e nos machos nas regiões centromérica e telomérica, em dois diferentes pares de macrocromossomos.

Em *Pelodiscus sinensis*, a técnica de bandamento C marcou a região centromérica do par de cromossomos 1 e 2 e em dois pares de microcromossomos (YAMADA et al., 2005). Nas fêmeas de *Chelonoidis carbonaria*, destacou apenas um par de macrocromossomos na região centromérica e um par de microcromossomos e nos machos que apresentaram marcação em dois pares de macrocromossomos, sendo um na região centromérica e outro na região telomérica e um par de microcromossomos.

Chelonoidis carbonaria apresentou marcação com íons prata nos cromossomos do par 10, o mesmo não foi observado em outros estudos, diferindo da localização dessas marcações quando comparados com outros quelônios, como

em *Trachemys dorbigni*, cryptodira aquático, cuja marcação ocorreu no braço longo do macrocromossomo número 15, e em *Chelonoidis donosobarrosi*, que marcou um par de microcromossomos (MARTINEZ et al., 2009).

Os estudos com a técnica de bandamento Ag-NOR em quelônios ainda são incipientes e os resultados são contraditórios entre os autores como, por exemplo, em *Trachemys dorbigni*, os autores Fantin e Giuliano-Caetano (2008) observaram a marcação no interstício do braço longo, do 14º par de cromossomos, entretanto, Martinez et al. (2009) verificaram, nessa mesma espécie, uma marcação no braço longo de um cromossomo acrocêntrico do 15º par, em *Chelonoidis carbonaria* todas as metáfases analisadas tiveram o mesmo padrão marcado no par 10.

Em *Geochelone elongata* e em *Geochelone pardalis* em um par de macrocromossomo, metacêntrico, no braço longo na região telomérica. Nas espécies *Kinosternon subrubrum* e *Kinosternon flavescens*, foi um par de microcromossomos acrocêntrico, no braço curto, e em *Chelydra serpentina*, em um par de macrocromossomos acrocêntrico, no braço curto. Em *Trionyx sinensis* a Região Organizadora Nucleolar (RON) foi identificada em um par de macrocromossomo metacêntrico, no braço longo, na região telomérica (BICKHAM; ROGERS, 1985; FANTIN; GIULIANO-CAETANO, 2008; MARTINEZ et al., 2009). Esses estudos mostram que há uma grande variabilidade da localização das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), verificada por meio do bandamento Ag-NOR, entre os cryptodiros, não existindo uma padronização entre os animais dessa subordem.

Em outros répteis, podemos verificar a presença das RON(s), em regiões iguais as encontradas em *Chelonoidis carbonaria*. Em *Cnemidophorus littoralis*, lagartos da família Teiidae, o bandamento Ag – NOR indicou que a região telomérica do par 8, era portadora da Região Organizadora Nucleolar (RON), semelhante ao que ocorre nos machos de *Chelonoidis carbonaria* (PECCININI-SEALE et al., 2004). Em representantes da família Gekkonidae (*Gehyra purpurascens*) um cromossomo do par 10 foi considerado portador da RON, semelhante às fêmeas de *Chelonoidis carbonaria* estudadas no presente trabalho (MORITZ, 1984).

O presente estudo caracterizou os cromossomos de *Chelonoidis carbonaria*, visando contribuir para o conhecimento do cariótipo dos cryptodíros. No entanto, novos estudos serão necessários para viabilizar um banco de informações sobre as espécies de quelônios, possibilitando conhecer melhor a estrutura cromossômica desse grupo.

Agradecimentos

Os autores agradecem especialmente ao Senhor Reginaldo Uvo Leone, proprietário do criatório comercial em Tabapuã-SP, pelo fornecimento do material biológico. O presente estudo recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação da Universidade Estadual Paulista (FUNDUNESP/ Processo nº 1098/2007-DFP).

Referências

AUFFENBERG, W. Checklist of fossil land tortoises (Testudinidae). **Bulletin of the Florida State Museum, Biological Sciences** n.18, p.122-251, 1974.

BICKHAM, J.W.; BAKER, R.J. Karyotype of Neotropical Turtles. **Copeia**. n. 4, p. 703-708, 1976.

BICKHAM, J.W.; BJORNDALE, K.A.; HAIDUK, M.W.; RAINEY, W.E. The karyotype and chromosomal banding patterns of the green turtle (*Chelonia mydas*). **Copeia**. v. 3, p. 540-543, 1980

BICKHAM, J.W.; CARR, J.L. Taxonomy and Phylogeny of the higher categories of cryptodiran turtles based on a analysis of chromosomal data. **Copeia**. n. 4, p. 918-932, 1983.

BICKHAM, J.W.; ROGERS D.S. Struture and variation of the Nucleolus Organizer Region in turtles. **Genetica**. n. 67, p. 171-184, 1985.

ERNEST,C.H.; BARBOUR, R.W. **Turtles of the World**, Washington D.C.: Smithsonian Institution Press p. 29-30, 182-183, 209-210, 1989.

FANTIN, C.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of two turtle species: *Trachemys dorbigni* and *Trachemys scripta elegans*. **Caryologia**. v. 61, n. 3, p. 1-5, 2008.

GANS, C. **Répteis do Mundo**, São Paulo: Universidade de São Paulo, p.8- 41, 1980.

GOULART, C.E.S. **Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis**. Ed. L.F.Livros de Veterinária LTDA, 1 ed., p.21-56, 99-108, 131-144,2004.

HAIDUK, M.W.; BICKHAM, J.W. Chromosomal homologies and evolution of testudinoid turtles with emphasis on the systematic placement of *Platysternon*. **Copeia**. v 1, p. 60-66, 1982.

JEROZOLIMSKI, A. **Ecologia de populações silvestres dos jabutis *Geochelone denticulata* e *G. carbonaria* (Cryptodira: Testudinidae) no território da aldeia A`Ulkre, TI Kayapó, sul do Pará**. Tese de Doutorado pelo Instituto Biociências, Universidade de São Paulo p.242, 2005.

LEICH, A.R.; SCHWARZACHER, D.; JAKSON and LEITCH, I.J. ***In Situ Hybridization: A Practical Guide***, In association with Royal Microscopical Society, p. 19-108, 1994.

LÓPEZ, E.A.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.; BERNAL-VILLEGAS, J. Condiciones óptimas de cultivo de linfócitos y análisis parcial del cariótipo de la tortuga cabezona, *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae) en Santa Marta, Caribe Colombiano. **Rev. Biol. Trop.** v. 56, n. 3, p. 1459-1469, 2008.

MADER, D.R. **Reptile Medicine and Surgery**, W.B. Saunders Company, p.68-69, 1996.

MARTINEZ, P.A.; BOERIS, J.M.; SÁNCHEZ, J.; PASTORI, M.C.; BOLZÁN, A.D.; LEDESMA, M.A. Karyotypic characterization of *Trachemys dorbigni* (Testudines: Emydidae) and *Chelonoidis* (Geochelone) *donosobarrosi* (Testudines: Testudinidae), two species of Cryptodiran turtles from Argentina. **Genetica** v. 137, n. 3, p. 277-283, 2009.

MORITZ, C. The evolution of a highly variable sex chromosome in *Gehyra purpurascens* (Gekkonidae). **Chromosoma**. v. 90, p. 90-111, 1984.

NOLETO, R.B.; KANTEK, D.L.Z.; SWARÇA, A.C.; DIAS, A.L.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M. Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 263-266, 2006.

PECCININI-SEALE, D.; ROCHA, C.F.D.; ALMEIDA, T.M.B.; ARAÚJO, A.F.B.; SENA, M.A.. Cytogenetics of the brazilian whiptail lizard *Cnemidophorus littoralis* (Teiidae) from a restinga área (Barra de Maricá) in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v. 64, n. 3B, p. 661-667, 2004.

POUGH, F.H.; ANDREWS, M.R.; SAVITKY, H.A.; WELLS, D.K. **Herpetology**. 2. ed. Prentice Hall, Inc. New Jersey, 2002.

POUHG, F.H.; JANIS, M.C.; HEISER. B.J. **A Vida dos Vertebrados**. 3ª ed. Atheneu SP. p. 270-290, 2003.

PRITCHARD, P.C.H. **Encyclopedia of Turtle**, ed. T. F. H. Publication Ltda., p. 179-183, 752-755, 1979.

PRITCHARD, P.C.H.; TREBBAU, P. **The Turtles of Venezuela**, Fundación de Internados Rurales (Venezuela), Society for the study of Amphibians and Reptiles. p.111-117, 1984.

ROHILLA, M.S.; TIWARI, P.K.. Simple method of blood sampling from Indian freshwater turtles for genetic studies. **Acta Herpetologica**. v. 3, n. 1, p. 65-69, 2008.

ROHILLA, M.S.; RAO, R.J.; TIWARI, P.K. Use of peripheral blood lymphocyte culture in the karyological analysis of Indian freshwater turtles, *Lissemys punctata* and *Geoclemys hamiltoni*. **Current Science**. v. 90, n. 8, p. 1130-1134, 2006.

SHAFTER, H. B. Turtles (Testudines). In: HEDGES, S. B.; KUMAR, S. **The Timetree of Life**. 1.ed. New York, United States: Eds. Oxford University Press, v. 55, p. 398-401, 2009.

SILVA, A.E.; SANTOS, J.R, **Manual de Segurança e de Procedimentos do Laboratório de Citogenética Humana**, São José do Rio Preto – SP, Brasil, 2005.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos da Genética**, 2. ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. p. 122, 2001.

YAMADA, K.; NISHIDA-UMEHARA; MATSUDA, Y. Molecular and cytogenetic characterization of site – specific repetitive DNA sequences in the Chinese soft – shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*, Trionychidae). **Chromosome Research**. v. 13, p. 33-46, 2005.

ZUG, G.R. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. **Herpetology**. Academic Press, New York, NY, 1993.



Figura 1: *Chelonoidis carbonaria*: Coloração convencional: Giemsa. **A:** Cariograma de fêmea. **B:** Cariograma de macho. Barra: 5 μm.

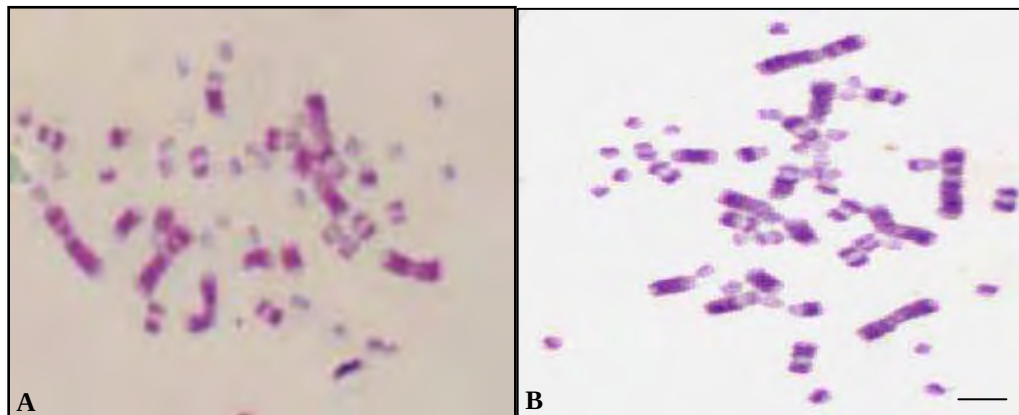


Figura 2: Metáfases de *Chelonoidis carbonaria* submetidas à técnica de bandamento G. **A:** Fêmea. **B:** Macho. Barra: 10µm.



Figura 3: Pareamento dos macrocromossomos homólogos de *Chelonoidis carbonaria* pela técnica de bandamento G: **A:** Fêmea. **B:** Macho. Barra: 5 µm.

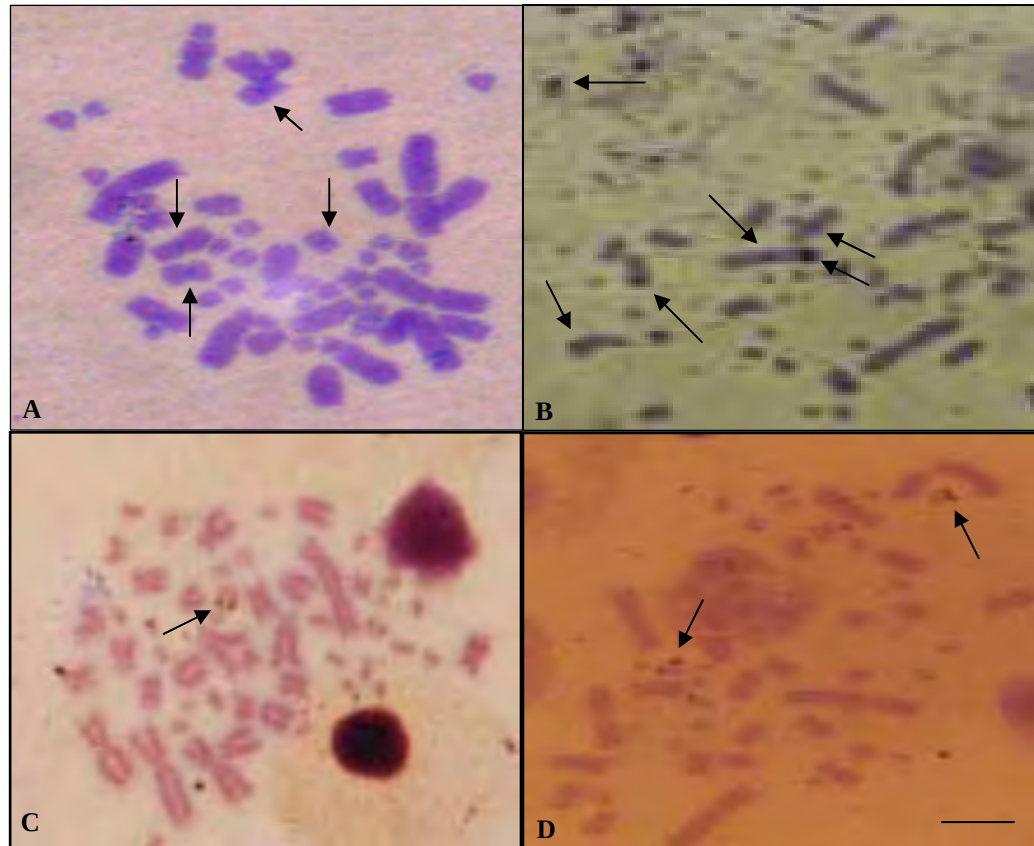


Figura 4: Metáfases de *Chelonoidis carbonaria* submetidas às técnicas de bandamento cromossômico; **A e B**- Bandamento C; **C e D** – Bandamento Ag-NOR. **Fêmeas:** A e C. **Machos:** B e D. As setas em A e B indicam regiões heterocromáticas constitutivas (banda C+) e em C e D indicam as RONS impregnadas por íons prata. Barra: 10μm.

Tabela 1: Comparação entre o número de cromossomos dos quelônios cryptodiras.

Espécie	2n=	Referência
<i>Chelonoidis carbonaria</i>	52	-----
<i>Chelonoidis donosobarrosi</i>	52	Martinez et al., 2009
<i>Chelonoidis denticulata</i>	52	Bickham and Baker, 1976
<i>Chelonoidis elephantopus</i>	52	Bickham and Baker, 1976
<i>Chelonoidis pardalis</i>	52	Bickham and Baker, 1976
<i>Chelonoidis gigantea</i>	52	Bickham and Baker, 1976
<i>Chelonoidis chilensis</i>	52	Bickham and Baker, 1976
<i>Sacalia bealei</i>	52	Bickham and Baker, 1976
<i>Mauremys mutila</i>	52	Bickham and Baker, 1976
<i>Trachemys dorbigni</i>	50	Martinez et al., 2009
<i>Kinosternon flavescens</i>	56	Bickham and Carr, 1983
<i>Kinosternon scorpioides</i>	56	Bickham and Carr, 1983
<i>Carettochelys insculpta</i>	68	Bickham and Carr, 1983
<i>Trionys ferox</i>	66	Bickham and Carr, 1983
<i>Lissemys punctata</i>	66	Rohilla et al., 2006
<i>Chelonia mydas</i>	56	Bickham et al., 1980
<i>Caretta caretta</i>	56	López et al., 2008

4.2. Description of *Phrynops Geoffroanus* karyotype (Chelidae)

Carlos Eduardo Saranz Zago¹

Luiz Dino Vizotto¹

Tiago Lucena Silva¹

Josué Rodrigues dos Santos¹

Maria Isabel Afonso Silva¹

Claudia Regina Bonini-Domingos¹

Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira¹

1. UNESP-IBILCE, Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Quelônios –
-São José do Rio Preto - SP.

Running Title: Karyotypic of *Phrynops Geoffroanus* (Chelidae)

Key Words: Banding, Citogenetic, Chromosomes, *Phrynops Geoffroanus*, Turtles

Correspondence to: Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira, Departamento de Biologia, IBILCE-UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265; Jd. Nazareth; CEP: 15054-000; (17)3221-2392.

E-mail: tercilia@ibilce.unesp.br

Resumo

A biodiversidade dos quelônios brasileiros é muito rica, porém muitos estão na lista de animais ameaçados de extinção. Os quelônios são pouco estudados, principalmente quanto à sua caracterização citogenética. O presente trabalho objetivou a análise, pelas técnicas de citogenética clássica e molecular, dos cromossomos de *Phrynops geoffroanus*. As amostras de sangue foram coletadas de animais do criatório “Reginaldo Uvo Leone,” em Tabapuã-SP, com a autorização da Comissão de Ética na Experimentação Animal de Botucatu-SP e do IBAMA/RAN. Os resultados foram descritos pela primeira vez separando os sexos e indicaram um número diferente de cromossomos entre machos com $2n=57$ e fêmeas com $2n=58$. Por meio do bandamento G, foi possível identificar os pares homólogos dos macrocromossomos. O bandamento C indicou a presença de regiões de heterocromatina constitutiva em macrocromossomos e em um par de microcromossomos. Com a técnica de bandamento Ag- NOR foram identificadas as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) em dois microcromossomos nos machos, e apenas em um nas fêmeas. A técnica de FISH indicou a presença de sítios de hibridação, confirmando os cromossomos portadores da Região Organizadora Nucleolar (RON), sendo dois microcromossomos nos machos e nas fêmeas. O presente estudo contribuiu para a identificação dos cromossomos de fêmeas e machos de *Phrynops geoffroanus*, permitindo conhecer os cromossomos de uma espécie aquática para atuar como modelo para as outras espécies da família.

Palavras Chaves: *Phrynops geoffroanus*; Cariótipo; Bandamento C; Região Organizadora Nucleolar; FISH.

Abstract

The biodiversity of turtles in Brazil is very rich, but many are listed as endangered species. The turtles are poorly studied, mainly from their cytogenetic. The present work aims at the analysis, the techniques of classical cytogenetics and molecular chromosomes of *Phrynops Geoffroanus*. Blood samples were collected from the animals breeding "Reginaldo Uvo.Leone" in Tabapuã-SP with the permission of the Ethics Committee in Animal Experimentation of Botucatu-SP and IBAMA/RAN. The results were first described by separating the sexes and indicated a different number of chromosomes from males with $2n = 57$ and females with $2n = 58$. Through the G-banding, it was possible to identify the homologous pairs of macrochromosomes. The C-banding indicated the presence of constitutive heterochromatin regions in macrochromosomes and in a pair of microchromosomes. With the technique of Ag-NOR banding were identified Nucleolar Organizer Regions (NORs) in two microchromosomes in males, and only one in females. The FISH technique indicated the presence of hybridization sites, confirming the chromosomes carrying the Nucleolar Organizer Region (NOR), and two microchromosomes in males and females of *Phrynops Geoffroanus*, thus allows the chromosomes of an aquatic species to act as a model for other species of the family.

Key Words: *Phrynops Geoffroanus*; Karyotype; G-banding; C-banding; Nucleolar Organizer Regions; FISH.

Introdução

A ordem Testudines está dividida em duas subordens: Pleurodira e Cryptodira. A subordem Pleurodira está representada pela família Chelidae e pela superfamília Pelomedusoidea que apresenta duas famílias: Pelomedusidae e Podocnemididae, encontradas apenas no hemisfério sul. (BULL; LEGLER, 1980; ZUG, 1993; POUGH et al., 2003; GOULART, 2004). A família Chelidae está representada por 23 espécies, das quais 19 ocorrem no Brasil, distribuído em cinco gêneros: *Achantochelys* sp, *Chelus* sp, *Hydromedusa* sp, *Phrynops* sp e *Platemys* sp (SOUZA, 2004). O gênero *Phrynops* apresenta a mais complexa e diversificada taxonomia (MITTERMEIER et al., 1980; MOLINA, 1998).

Phrynops geoffroanus, foi descrito pela primeira vez no Brasil, por Schweigger, em 1812. São animais com hábitos diurnos, encontrados em rios, lagos e lagoas de correnteza lenta, na América do Sul. Têm hábito alimentar predominantemente carnívoro (PRITCHARD, 1979; GANS, 1980; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; POUGH et al., 2003; GOULART, 2004).

Os cromossomos de peixes, aves e répteis apresentam uma grande variabilidade em relação ao tamanho e a morfologia, sendo formados por macro e microcromossomos (NOLETO et al., 2006). Para estudar esses cromossomos, foram utilizadas técnicas de citogenética clássicas como a coloração convencional com Giemsa e os bandamentos G, C e Ag-NOR. A técnica de impregnação por íons prata foi confirmada com o advento da citogenética molecular com a técnica de FISH (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

A identificação citogenética é um importante parâmetro para o conhecimento dos cromossomos auxiliando na preservação da espécie que estão desaparecendo (ROHILLA; TIWARI, 2008). O objetivo deste trabalho foi, portanto, identificar, pelas técnicas de citogenética clássica e molecular, o cariótipo de *Phrynops geoffroanus*, contribuindo para o conhecimento da estrutura cromossômica dessa espécie.

Material e Método

Foram utilizadas amostras sanguíneas de 12 exemplares de *Phrynops geoffroanus*, separados por sexo, sendo seis fêmeas e seis machos provenientes do criatório “Reginaldo Uvo Leone,” localizado no município de Tabapuã-SP (20° 59’ 47.4”S, 49° 07’ 16.6”W). O sangue foi coletado por cardiocentese, entre as placas umerais e peitorais no plastrão de *Phrynops geoffroanus*, utilizando-se agulha com calibre de 40:12 (BD Precision Glide®) e heparina sódica como anticoagulante. Após a coleta do sangue, o orifício foi vedado com cola cirúrgica (Vetband®) e o animal mantido em observação por 72 horas antes de retornar ao seu ambiente (MADER, 1996; BRITES; RANTIN, 2004; MANS, 2008; ROHILLA; TIWARI, 2008; ZAGO, 2007; ZAGO et al., 2010).

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal nº 50/07-CEEA – Botucatu – SP e pelo IBAMA nº 14729-1 (Apêndice A).

Os leucócitos foram inoculados em meio de cultura de tecido (solução preparada com soro fetal bovino, penicilina/quemeticina, e RPMI 1640), e estimulados a se dividirem pela adição de fitohemaglutina. O tempo de incubação foi de 72 horas.

Os protocolos seguiram o padrão recomendado por Silva e Santos (2005), para a montagem do cariótipo e para os bandamentos G, C e Ag-NOR, com adaptações para os quelônios nos tempos das colorações, e pelo protocolo de Leitch et al. (1994), para técnica de FISH, utilizando sonda ribossomal 28S de anfíbios (*Xenopus laevis*), marcadas com FITC (*fluorescein Isothiocyanate*) e contracoradas com DAPI.

Resultados

O presente trabalho reporta pela primeira vez a descrição do número de cromossomos e sua morfologia em ambos os sexos de *Phrynops geoffroanus*. A

coloração convencional de Giemsa possibilitou conhecer o número diplóide dos cromossomos em fêmeas com $2n = 58$, dispostos em três grupos distintos. O grupo A apresentou dez pares de macrocromossomos com a seguinte distribuição: um par de metacêntricos; dois pares de submetacêntricos e sete pares de acrocêntricos. No grupo B foram verificados 13 pares de macrocromossomos acrocêntricos, e no grupo C, seis pares de microcromossomos (Figura 1: A). Os machos apresentaram $2n = 57$, sendo sete pares de macrocromossomos dispostos no grupo A, com um par metacêntrico, dois pares submetacêntricos e quatro pares acrocêntricos, e no grupo B com 13 pares de acrocêntricos. O grupo C apresentou oito pares de microcromossomos e um microcromossomo ímpar (Figura 1: B). A técnica convencional de Giemsa evidenciou uma diferença no número de cromossomos entre machos e fêmeas, mas não foi possível determinar o par de cromossomos sexuais.

O bandamento G auxiliou na identificação e no pareamento dos macrocromossomos apresentando um padrão constante em todas as metáfases analisadas (Figura 2: A e B e Figura 3: A e B).

A técnica de bandamento C, revelou presença de heterocromatina constitutiva em dois microcromossomos nas fêmeas (Figura 4: A e B). Nos machos foram identificadas bandas C positivas em dois microcromossomos e na região centromérica dois pares de macrocromossomos (Figura 4: C e D).

A impregnação com íons prata (bandamento Ag-NOR) marcou um único macrocromossomo do par 10, no braço longo na região telomérica, nas fêmeas (Figura 5: A e B). Nos machos a marcação ocorreu nos dois macrocromossomos acrocêntricos do par 10, no braço longo, na região telomérica (Figura 5: C e D).

A técnica de hibridização *in situ* identificou sinais positivos nos dois cromossomos do par 10, verificados com a utilização dos filtros vermelho e verde com FITC (*fluorescein Isothiocyanate*), e com sondas para anfíbios DNAr 28S, em ambos os sexos de *Phrynops geoffroanus* (Figura 6: A e C e Figura 7: A e B), indicando serem esses os cromossomos portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONS). Esse resultado foi confirmado usando a marcação de DAPI (Figura 6: B e D e Figura 7: C e D) e colocando as imagens em sobreposição (Figura 7: E e F).

Discussão

O número diplóide encontrado em fêmeas de *Phrynops geoffroanus* foi o mesmo descrito por Bull e Legler (1980), que analisaram apenas um indivíduo não especificando o sexo. No presente estudo, *Phrynops geoffroanus* apresentou número diplóide de cromossomos diferente em fêmeas e machos. O mesmo não foi observado em outros pleurodiros, que apresentaram o mesmo número diplóide para fêmeas e machos, como em animais da família Chelidae; em *Hydromedusa tectifera* ($2n = 58$); *Chelus fimbriatus* ($2n = 50$); animais Sul Americanos; em *Chelodina longicollis* ($2n = 54$); *Emydura australis* ($2n = 50$), animais Australianos; em animais da família Podocnemididae, como *Podocnemis vogli* ($2n = 28$) e *Podocnemis expansa* ($2n = 28$) e em animais da família Pelomedusidae como *Pelomedusa subrufa* ($2n = 36$) e *Pelusios niger* ($2n = 34$) (RHODIN, 1978; BULL; LEGLER, 1980; ORTIZ et al., 2005; NOLETO et al., 2006).

Bull e Legler, em 1980, apresentaram um agrupamento do cariótipo para *Phrynops geoffroanus* (11:14:4) diferente do proposto nesse estudo com (10:13:6), sugerindo uma variação evolutiva dessa espécie.

A técnica de bandamento G foi utilizada para parear e identificar os pares homólogos dos macrocromossomos de *Phrynops geoffroanus*, sendo constante em todas as metáfases analisadas. Esta técnica foi utilizada para outros autores para auxiliar na formação dos pares homólogos e identificar patologias genéticas associadas aos cromossomos como em *Hydromedusa tectifera*; *Chelus fimbriatus*; *Platysternon* sp; *Podocnemis vogli*; e em outros répteis como *Gehyra purpurascens* (BULL; LEGLER, 1980; MORITZ, 1984; ORTIZ et al., 2005; NOLETO et al., 2006).

Estudos em *Hydromedusa tectifera* e em *Gehyra purpurascens* (Gekkonídeo) mostraram bandas C positivas em regiões centroméricas de vários cromossomos. Em *Podocnemis vogli*, a heterocromatina constitutiva foi observada em regiões centroméricas, pericentroméricas e teloméricas de vários cromossomos (MORITZ, 1984; ORTIZ et al., 2005; NOLETO et al., 2006). No presente estudo, em *Phrynops geoffroanus*, podemos observar bandas C positivas na região

centromérica de dois pares de macrocromossomos nos machos e em um par de microcromossomos e nas fêmeas em um par de microcromossomos.

Em *Chelodina longicollis*, a presença de heterocromatina constitutiva em um par de microcromossomos mostrou dois microcromossomos marcados na região centromérica, determinando o sexo para as fêmeas, e nos machos foi observado um bloco largo de heterocromatina constitutiva neste par de microcromossomos, determinando o sexo (EZAZ et al., 2006). No entanto, no presente estudo, o mesmo não foi observado em *Phrynops geoffroanus*.

A Região Organizadora Nucleolar (RON) foi identificada nos cromossomos de quelônios em várias posições, como em *Hydromedusa tectifera*, em um microcromossomo acrocêntrico no braço longo na região telomérica (NOLETO et al., 2006). Outras espécies apresentam as marcações em outras regiões, como em *Podocnemis vogli* com a marcação ocorrendo em um par de cromossomos, no braço curto da região telomérica (ORTIZ et al., 2005). Esses estudos mostram que há uma variabilidade cromossômica nos quelônios, identificada por meio do bandamento Ag-NOR.

Nos quelônios encontrados na literatura, a impregnação dos íons prata foi identificada em apenas um par de cromossomos. Em outros grupos, como em *Pheucticus aureoventris*, ave da ordem Passeriforme, as marcações positivas de Ag-NOR foram evidenciadas em dois pares de microcromossomos (LEDESMA et al., 2006). Em *Cnemidophorus littoralis*, lagartos da família Teiidae, a técnica de Ag-NOR marcou o par oito de cromossomos, na região telomérica, como ocorre nos machos de *Phrynops geoffroanus*. Nos representantes da família Gekkonidae (*Gehyra purpurascens*) um cromossomo no par dez, foi considerado como portador da RON, semelhante às fêmeas de *Phrynops geoffroanus* estudadas no presente trabalho (MORITZ, 1984; PECCININI-SEALE et al. 2004).

Ezaz et al. (2006), utilizando a técnica de FISH, marcaram vários sítios de hibridização nos cromossomos sexuais de *Chelodina longicollis*. No presente estudo, em *Phrynops geoffroanus*, utilizando sondas DNAr 28S, também foram marcados dois microcromossomos portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares, em ambos os sexos. No entanto, a fêmea apresentou somente um

cromossomo impregnado pelos íons prata, sugerindo que apenas esse estava em atividade nucleolar. A técnica de FISH é uma técnica mais precisa, pois identifica o sítio da região do RNA ribossômico 28S, em ambos os cromossomos do par, independentemente da atividade nucleolar.

O presente trabalho caracterizou os cromossomos de *Phrynops geoffroanus*, ampliando o conhecimento do cariótipo dessa espécie, o que poderá originar futuros estudos sobre a evolução dos grupos de quelônios, contribuindo, para a preservação desses importantes répteis.

Agradecimentos

Os autores agradecem especialmente ao Senhor Reginaldo Uvo Leone, proprietário do criatório em Tabapuã-SP, pelo fornecimento do material biológico. O presente estudo recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação da Universidade Estadual Paulista (FUNDUNESP/Processo nº 1098/2007-DFF).

Referências

BRITES, V.L.C.; RANTIN, F.T. The Influence of agricultural and urban contamination on leech infestation of freshwater turtles, *Phrynops geoffroanus*, taken from two areas of the Uberabinha river. **Environmental Monitoring and Assessment**, Holanda, v. 96, p. 273-281, 2004.

BULL, J.J.; LEGLER, J.M. Karyotypes of side – necked turtles (Testudines: Pleurodira) **Canadian Journal of Zoology**. v. 58, p 828-841, 1980.

EZAZ, T.; VALENZUELA, N.; MIURA, I.; GEORGES, A.; BURKE, R.L.; GRAVES, J.A.M.. An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination. **Chromosome Research**. v. 14, p. 139-150, 2006.

GANS, C. **Répteis do Mundo**, São Paulo: Universidade de São Paulo, p.8- 41, 1980.

GOULART, C.E.S. **Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis**. Ed. L.F.Livros de Veterinária LTDA, 1º ed., p.21-56, 99-108, 131-144, 2004.

LEDESMA, M.A.; MARTINEZ, P.A.; CALDERÓN, P.S.; BOERIS, J.M.; MERILES, J.M. Descrição do cariótipo e padrões de banda C e NOR em *Pheucticus aureoventris* (Emberizidae, Cardinalinae). **Revista Brasileira de Ornitologia**. v. 14, n. 1, p. 59-62, 2006.

LEICH, A.R.; SCHWARZACHER, D.; JAKSON and LEITCH, I.J. **In Situ Hybridization: A Practical Guide**, In association with Royal Microscopical Society, p. 19-108, 1994.

MADER, D.R. **Reptile Medicine and Surgery**, W.B. Saunders Company, p.68-69, 1996.

MANS, C. Venipuncture techniques in chelonian species. **Lab. Animal - Clinical Techniques**. v. 37, n. 7, p. 303-304, 2008.

MITTERMEIER, R.A.; RHODIN, A.G.J.; SILVA, R.; ARAÚJO de OLIVEIRA, N. Rare Brazilian sideneck turtle. **Oryx**, v. 15, n. 5, p. 473-475, 1980.

MOLINA, F. B. Comportamento e biologia reprodutiva dos cágados *Phrynops geoffroanus*, *Acanthochelys radiolata* e *Acanthochelys spixii* (Testudines, Chelidae) em cativeiro. **Revista de Etologia**, p. 25-40, 1998.

MORITZ, C. The evolution of a highly variable sex chromosome in *Gehyra purpurascens* (Gekkonidae). **Chromosoma**. v. 90, p. 90-111, 1984.

NOLETO, R.B.; KANTEK, D.L.Z.; SWARÇA, A.C.; DIAS, A.L.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M. Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 263-266, 2006.

ORTIZ, M.L.; RODRÍGUEZ, P.A.; BUENO, M.L. Caracterización citogenética de la tortuga sabanera *Podocnemis vogli* (Reptilia: Testudinata: Podocnemididae) **Acta Biológica Colombiana**. v. 10, n. 1, p. 19-33, 2005.

PECCININI-SEALE, D.; ROCHA, C.F.D.; ALMEIDA, T.M.B.; ARAÚJO, A.F.B.; SENA, M.A. Cytogenetics of the brazilian whiptail lizard *Cnemidophorus littoralis* (Teiidae) from a restinga área (Barra de Maricá) in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**.v. 64, n. 3B, p. 661-667, 2004.

POUHG, F.H.; JANIS, M.C.; HEISER. B.J. **A Vida dos Vertebrados**. 3ª ed. Atheneu SP. p. 270-290, 2003.

PRITCHARD, P.C.H. **Encyclopedia of Turtle**, ed. T. F. H. Publication Ltda., p. 179-183, 752-755, 1979.

PRITCHARD, P.C.H.; TREBBAU, P. **The Turtles of Venezuela**, Fundación de Internados Rurales (Venezuela), Society for the study of Amphibians and Reptiles. p.111-117, 1984.

ROHILLA, M.S.; TIWARI, P.K.. Simple method of blood sampling from Indian freshwater turtles for genetic studies. **Acta Herpetologica**. v. 3, n. 1, p. 65-69, 2008.

RHODIN, A.G.J.; MITTERMEIER, R.A.; GARDNER, A.L.; MEDEM, F. Karyotypic analysis of the *Podocnemis* Turtles. **Copeia** v. 4 p. 723-728, 1978.

SILVA, A.E.; SANTOS, J.R, **Manual de Segurança e de Procedimentos do Laboratório de Citogenética Humana**, São José do Rio Preto – SP, Brasil, 2005.

SOUZA, F.L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, v. 3, n. 1, p. 15-27, 2004.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos da Genética**, 2. ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. p. 122, 2001.

ZAGO, C.E.S. **Anatomia do aparelho reprodutor e hematologia de *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae)**. Tese de Mestrado pelo Departamento de Biologia, UNESP, p.92, 2007.

ZAGO, C.E.S.; LUCENA DA SILVA, T.; AFONSO DA SILVA, M.I.; VENANCIO, L.P.R.; MENDONÇA, P.P.; FALHEIROS-JUNIOR, L.R.; VIZOTTO, L.D.; TABOGA, S.R.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.R.V.; OLIVEIRA, C. Morphological, morphometrical and ultrastructural characterization of blood cells of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae), in two different environments. **Micron**. p. 1-19, DOI: 10.1016/j.micron.2010.06.006, 2010.

ZUG, G.R. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. **Herpetology**. Academic Press, New York, NY, 1993.

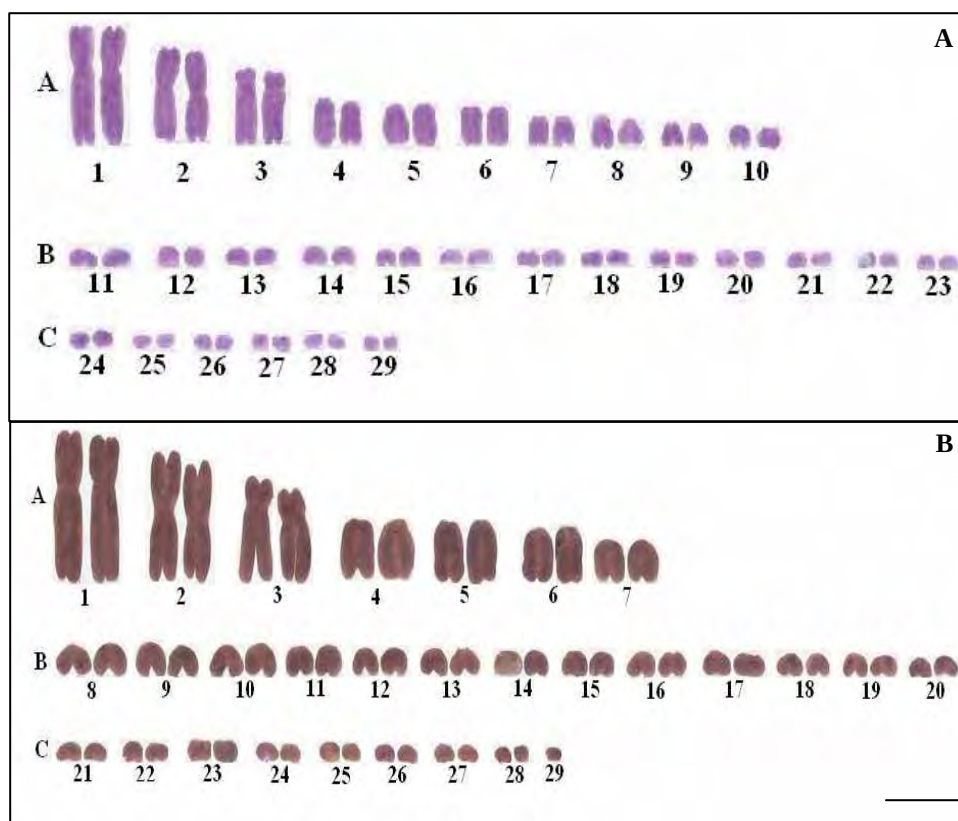


Figura 1: *Phrynops Geoffroanus*: Coloração convencional: (Giemsa). **A:** Cariograma de fêmea. **B:** Cariograma de macho. Barra: 5 μm .

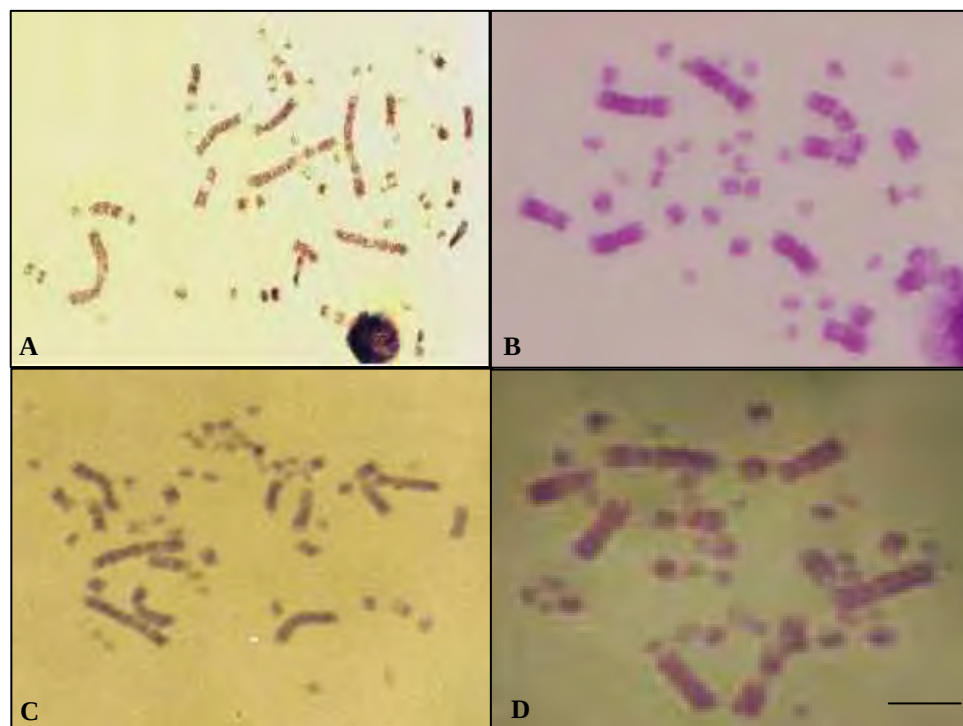


Figura 2: Metáfases de *Phrynops Geoffroanus* submetidas à técnica de Bandamento G, **A** e **B** – Fêmeas; **C** e **D** – Machos. Barra: 10 μ m.

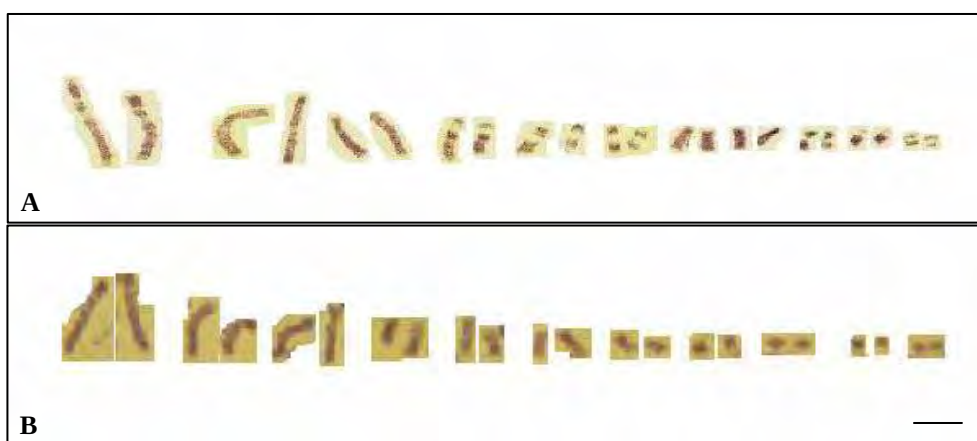


Figura 3: Pareamento dos macrocromossomos homólogos de *Phrynops Geoffroanus* pela técnica de bandamento G. **A:** Fêmea. **B:** Macho. Barra: 5 μ m.

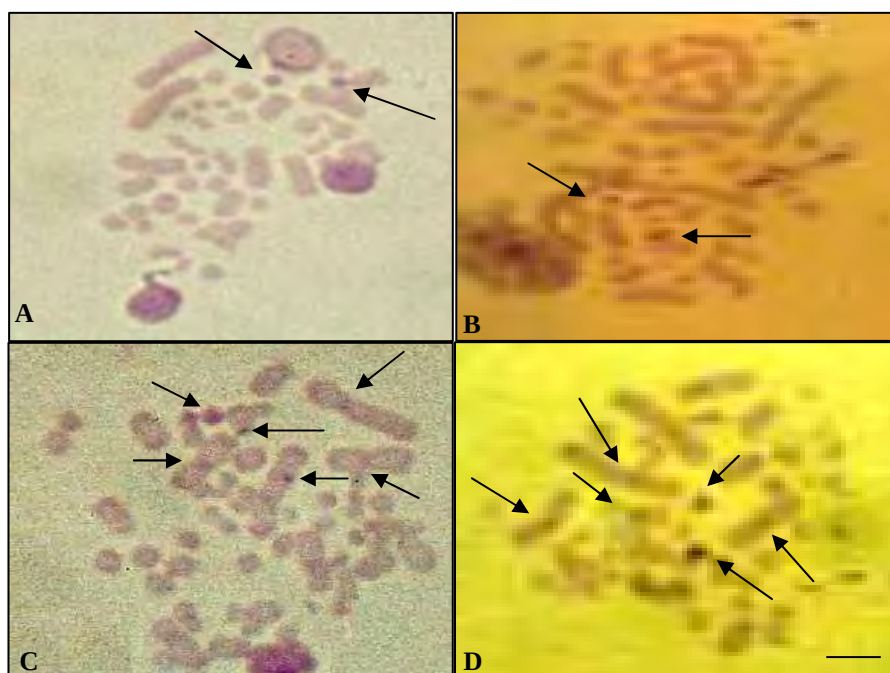


Figura 4: Metáfases de *Phrynops Geoffroanus* submetidas à técnica de Bandamento C. **A e B** – Fêmeas; **C e D** – Machos. As setas indicam regiões heterocromáticas constitutivas (Banda C positiva). Barra = 10 μ m.

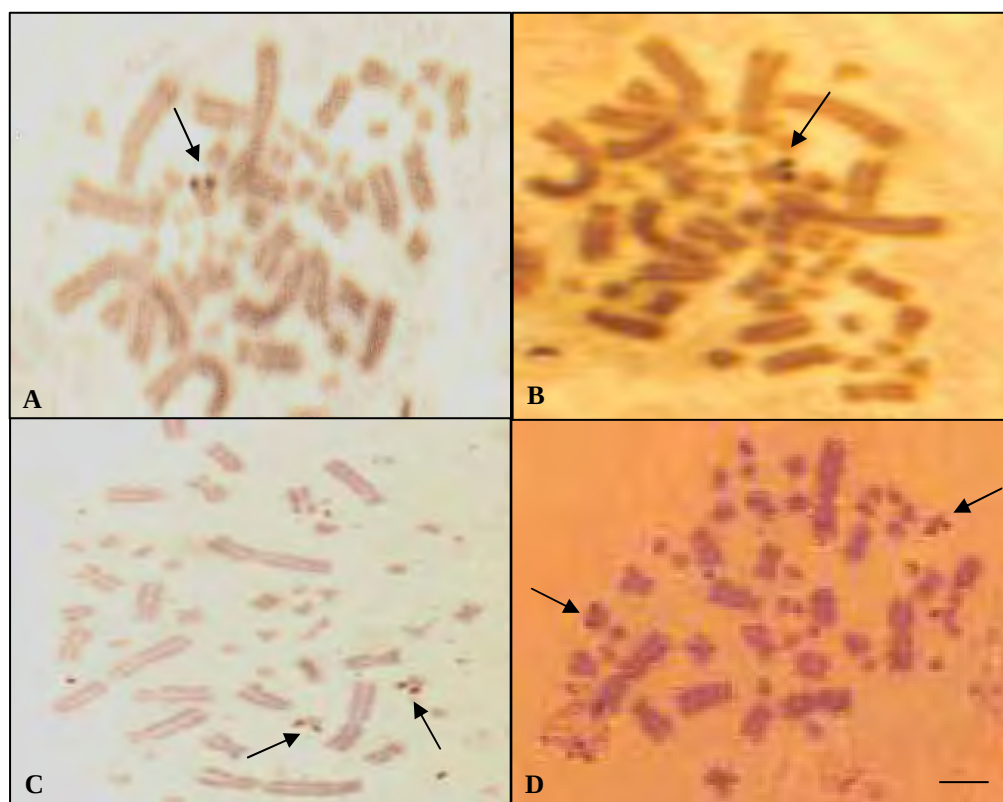


Figura 5: Metáfases de *Phrynops Geoffroanus* submetidas à técnica de Impregnação por íons pratas (Bandamento Ag-NOR). **A** e **B** – Fêmeas; **C** e **D** – Machos. As setas indicam um único cromossomo marcado, nas fêmeas, e um par de cromossomos portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares, nos machos. Barra = 10µm.

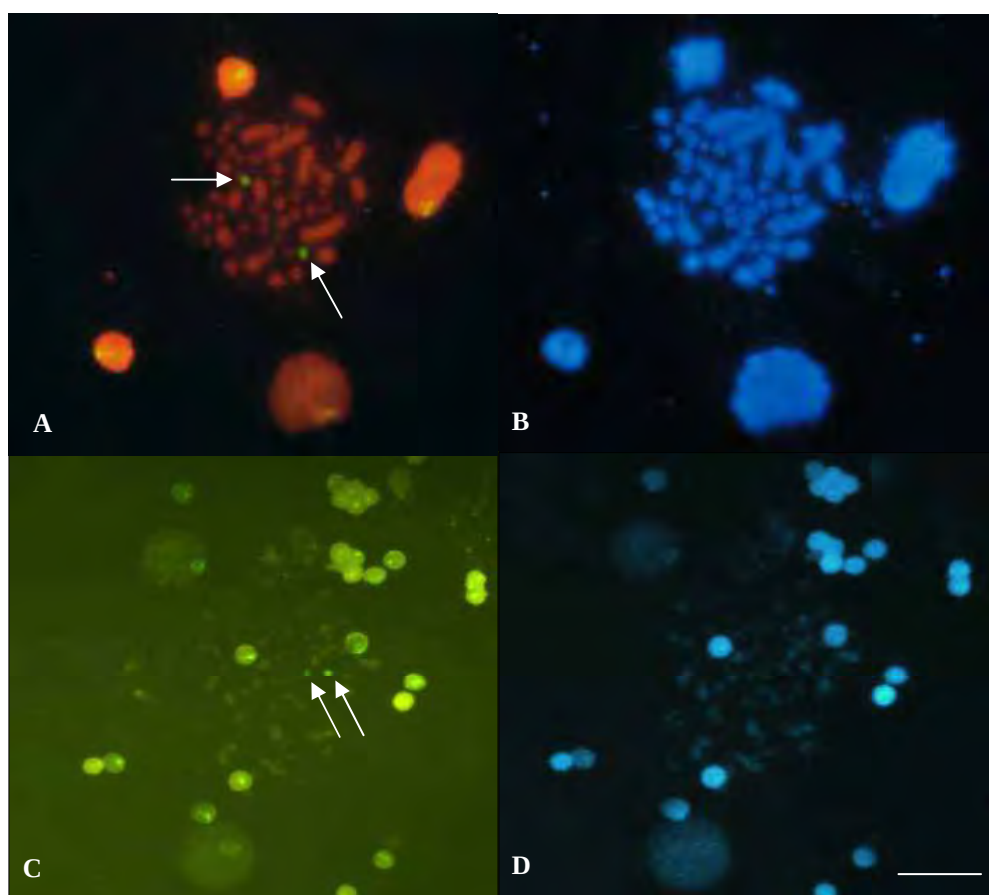


Figura 6: Metáfases de *Phrynops Geoffroanus* submetidas à técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). **A e B** – Fêmeas; **C e D** – Machos. **A:** Filtro vermelho com FITC; **B e D:** Coloração com DAPI; **C:** Filtro verde com FITC. As setas indicam os sinais positivos de hibridização nos cromossomos portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs). Barra = 10 μ m

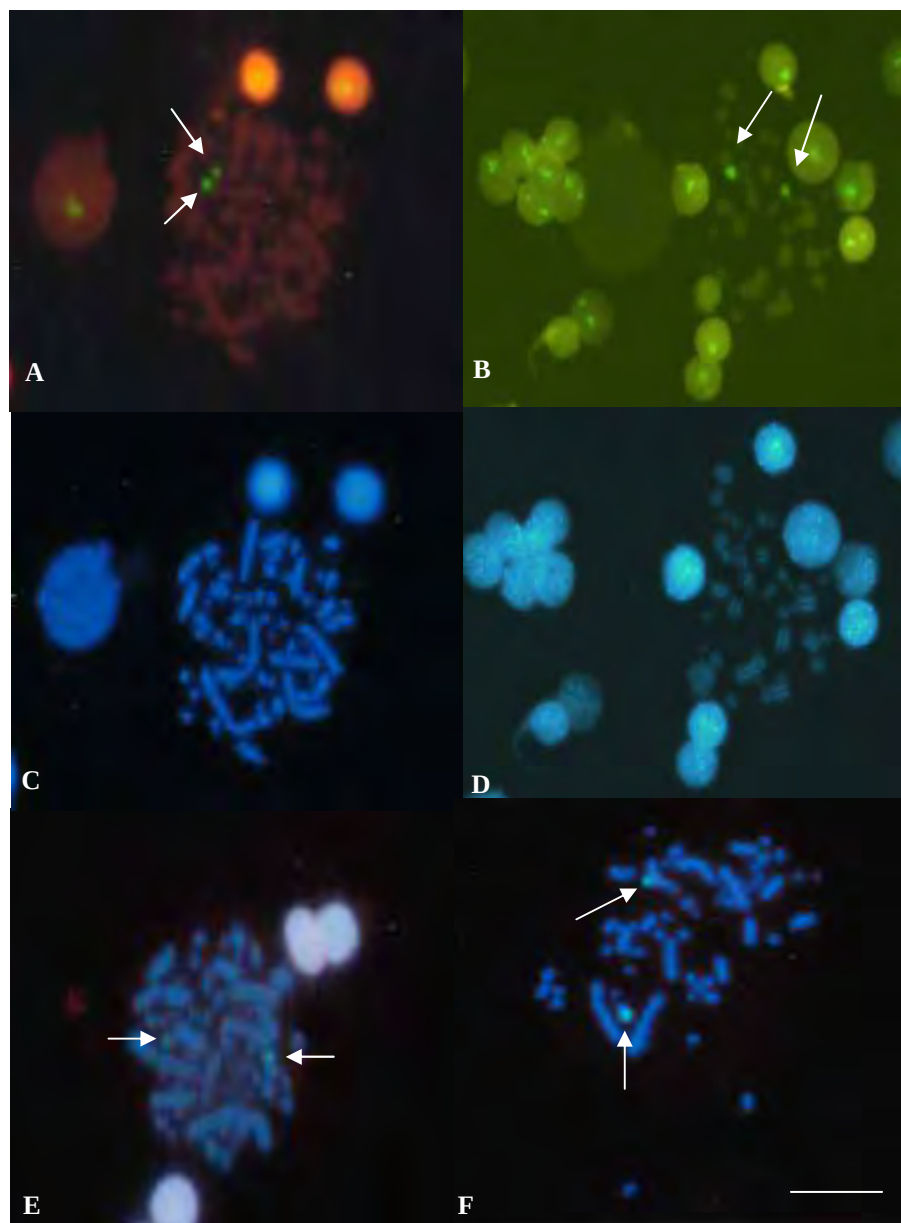


Figura 7: Metáfases de *Phrynops Geoffroanus* submetidas à técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). **A, C e E** – Fêmeas; **B, D e F** – Machos. **A-** Filtro vermelho com FITC; **B-** Filtro verde com FITC; **C e D-** Coloração com DAPI; **E e F-** Imagem com sobreposição. As setas indicam os sinais positivos de hibridização nos cromossomos portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs). Barra = 10µm.

Tabela 1: Comparação entre o número de cromossomos dos quelônios pleurodiras.

Espécie	2n=	Referência
<i>Phrynops geoffroanus</i> fêmea	58	-----
<i>Phrynops geoffroanus</i> macho	57	-----
<i>Hydromedusa tectifera</i>	58	Noieto et al., 2006
<i>Chelus fimbriatus</i>	50	Bull and Legler, 1980
<i>Chelodina longicollis</i>	54	Bull and Legler, 1980
<i>Emydura australis</i>	50	Bull and Legler, 1980
<i>Podocnemis vogli</i>	28	Ortiz et al., 2005
<i>Podocnemis expansa</i>	28	Rhodin et al., 1978
<i>Pelomedusa subrufa</i>	36	Bull and Legler, 1980
<i>Pelusios niger</i>	34	Bull and Legler, 1980

Conclusões

Com base nos resultados do presente estudo apresentamos as seguintes considerações:

- ✓ Caracterização do kariograma de *Chelonoidis carbonaria* e *Phrynosoma geoffroanus*;
- ✓ *Chelonoidis carbonaria* segue o padrão descrito na literatura apresentando mesmo número de cromossomos ($2n = 52$), para fêmeas e machos;
- ✓ *Phrynosoma geoffroanus* difere dos resultados da literatura apresentando números de cromossomos diferentes em fêmeas ($2n=58$) e machos ($2n=57$);
- ✓ Os cromossomos de *Chelonoidis carbonaria* são semelhantes quanto ao número de cromossomos de outros jabutis, já os cromossomos de *Phrynosoma geoffroanus* não apresentaram similaridade com outras espécies de *Phrynosoma*;
- ✓ O bandamento G foi importante para conhecer os cromossomos nas duas espécies;
- ✓ O bandamento C demonstrou a presença de heterocromatina constitutiva em ambas as espécies, porém cada espécie apresenta marcações em cromossomos diferentes;
- ✓ Nas duas espécies foi verificado um padrão semelhante para os cromossomos portadores da Região Organizadora Nucleolar com a técnica de impregnação por íons prata: um cromossomo nas fêmeas e dois cromossomos nos machos;
- ✓ A técnica de citogenética molecular (FISH) foi importante para indicar que nas fêmeas há um par de cromossomos portadores das RONS, corroborando que a técnica de íons prata marca apenas as regiões ativas na interfase anterior.

Os dados obtidos no presente trabalho ampliaram a compreensão das características citogenéticas dessas espécies, colaborando para o conhecimento sobre os quelônios, uma vez que a literatura deste importante grupo de animais é escassa.

6 – REFERÊNCIAS

Referências

AUFFENBERG, W. Checklist of fossil land tortoises (Testudinidae). **Bulletin of the Florida State Museum, Biological Sciences** n.18, p.122-251, 1974.

BICKHAM, J.W.; BAKER, R.J. Karyotype of Neotropical Turtles. **Copeia**. n. 4, p. 703-708, 1976.

BICKHAM, J.W.; BJORNDAL, K.A.; HAIDUK, M.W.; RAINEY, W.E.. The karyotype and chromosomal banding patterns of the green turtle (*Chelonia mydas*). **Copeia**. v. 3, p. 540-543, 1980.

BICKHAM, J.W.; CARR, J.L. Taxonomy and phylogeny of the higher categories of cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. **Copeia**. n. 4, p. 918-932, 1983.

BICKHAM, J.W.; ROGERS D.S. Structure and variation of the Nucleolus Organizer Region in turtles. **Genetica**. n. 67, p. 171-184, 1985.

BRITES, V.L.C.; RANTIN, F.T. The Influence of agricultural and urban contamination on leech infestation of freshwater turtles, *Phrynops geoffroanus*, taken from two areas of the Uberabinha river. **Environmental Monitoring and Assessment**, Holanda, v. 96, p. 273-281, 2004.

BULL, J.J.; LEGLER, J.M. Karyotypes of side-necked turtles (Testudines: Pleurodira) **Canadian Journal of Zoology**. v. 58, p. 828-841, 1980.

CENSKY, E. J. *Geochelone carbonaria* (Reptilia: Testudines) in the west indies. **Biological Sciences** v.51, p.108-114, 1988.

CONGDON, J. D., DUNHAM, A. E., VAN LOBEN SEALS, R. C. Delayed sexual maturity and demographics of Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*): implications for conservation and management of long-lived organisms. **Conservation Biology**, v.7, p.826-833, 1993.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron.**, v.31, p.117-120, 2000.

ERNEST, C.H.; BARBOUR, R.W. **Turtles of the World**, Washington D.C.: Smithsonian Institution Press p. 29-30, 182-183, 209-210, 1989.

EZAZ, T.; VALENZUELA, N.; MIURA, I.; GEORGES, A.; BURKE, R.L.; GRAVES, J.A.M.. An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination. **Chromosome Research**. v. 14, p. 139-150, 2006.

FANTIN, C.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of two turtle species: *Trachemys dorbigni* and *Trachemys scripta elegans*. **Caryologia**. v. 61, n. 3, p. 1-5, 2008.

FEITOSA, L.L. **Alismatales sensu stricto: Análise citogenética com técnica convencional, bandamento e sítio de DNAr 45S**, Tese apresentada a Universidade Federal de Pernambuco- Brasil, p. 24-34, 2008.

GANS, C. **Répteis do Mundo**, São Paulo: Universidade de São Paulo, p.8- 41, 1980.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**, 1. ed. São Paulo: Livraria Varela Ltda., p. 69-71, 123-132, 1994.

GIBBONS, J. W. Why do turtles live so long? **BioScience**, v.37,262-269, 1987.

GOULART, C.E.S. **Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis**. Ed. L.F.Livros de Veterinária LTDA, 1. ed., p.21-56, 99-108, 131-144, 2004.

GREWAL, S. I.; ELGIN, S. C. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. **Current Opinion Genetic.**, v.12, p.178–187, 2002.

GUIX, J. C.; SALVATTI, M.; PERONI, M.A.; LIMA-VERDE, J.S. Aspectos da reprodução de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Testudines, Chelidae). **Grupo de Estudos Ecológicos, Série Documentos**, v. 1, p. 1–19, 1989.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**, Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro-RJ. Cap 4, p. 142, 1988.

GUERRA, M. **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética**, Sociedade Brasileira de Genética. p. 176, 2004.

HAIDUK, M.W.; BICKHAM, J.W. Chromosomal homologies and evolution of testudinoid turtles with emphasis on the systematic placement of *Platysternon*. **Copeia**. v 1, p. 60-66, 1982.

HIGHFIELD, A.C. **Encyclopedia of Keeping and Breeding Tortoises and Freshwater Turtles**, London ,Carapace Press, 1. ed., p.173-184, 1996.

HOWELL, W. M. Visualization of ribossomal gene activity: Silver stains proteins with RNA-r transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, New York, v.62, p.361-367, 1982.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. **Experientia**. v. 36, p. 104-105, 1980.

JACKSON, D. C., RAUER, E. M., FELDMAN, R. A., REESE, S. A. Avenues of extrapulmonary oxygen uptake in western Painted Turtles (*Chrysemys picta bellii*) at 10uC. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.139, p.221–227, 2004.

JEROZOLIMSKI, A. **Ecologia de populações silvestres dos jabutis *Geochelone denticulata* e *G. carbonaria* (Cryptodira: Testudinidae) no território da aldeia A`Ulkre, TI Kayapó, sul do Pará**. Tese de Doutorado pelo Instituto Biociências, Universidade de São Paulo p.242, 2005.

LEDESMA, M.A.; MARTINEZ, P.A.; CALDERÓN, P.S.; BOERIS, J.M.; MERILES, J.M. Descrição do cariótipo e padrões de banda C e NOR em *Pheucticus aureoventris* (Emberizidae, Cardinalinae). **Revista Brasileira de Ornitologia**. v. 14, n. 1, p. 59-62, 2006.

LE, M.; CHRISTOPHER J. R., WILLIAN M., LISA M. A molecular phylogeny of tortoises (Testudines: Testudinidae) based on mitochondrial and nuclear genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 2, n. 450, p. 517-531, 2006.

LEICH, A.R.; SCHWARZACHER, D.; JAKSON and LEITCH, I.J. **In Situ Hybridization: A Practical Guide**, In association with Royal Microscopical Society, p. 19-108, 1994.

LÓPEZ, E.A.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.; BERNAL-VILLEGAS, J. Condiciones óptimas de cultivo de linfócitos y análisis parcial del cariótipo de la tortuga cabezona, *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae) en Santa Marta, Caribe Colombiano. **Rev. Biol. Trop.**v. 56, n. 3, p. 1459-1469, 2008.

Mc BEE, K.; BICKHAM, J.W.; RHODIN, A.G.J.; MITTERMEIER, R.A. Karyotypic variation in the genus *Platemys* (Testudines: Pleurodira). **Copeia**, n.2, p. 445-449, 1985.

MADER, D.R. **Reptile Medicine and Surgery**, W.B. Saunders Company, p.68-69, 1996.

MANS, C. Venipuncture techniques in chelonian species. **Lab. Animal - Clinical Techniques**. v. 37, n. 7, p. 303-304, 2008.

MARTINEZ, P.A.;BOERIS, J.M.; SÁNCHEZ, J.; PASTORI, M.C.; BOLZÁN, A.D.; LEDESMA, M.A. Karyotypic characterization of *Trachemys dorbigni* (Testudines: Emydidae) and *Chelonoidis* (Geochelone) *donosobarrosi* (Testudines: Testudinidae), two species of Cryptodiran turtles from Argentina. **Genetica**. v. 137, n. 3, p. 277-283, 2009.

MATSUDA, Y.; NISHIDA-UMEHARA, C.; TARUI,H.; KUROIWA, A.; YAMADA, K.; ISOBE,T.; ANDO, J.; FUGIWARA, A.; HIRAO, Y.; NISHIMURA, O.; HAYASHI, A.; SAITO, T.; MURAKAMI, T.; MURAKAMI, Y.; KURATANI, S.; AGATA,K.; Highly conserved linkage between birds and turtles: Bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. **Chromosome Research**, v. 13, n. 6, p. 601-615, 2005.

MITTERMEIER, R.A.; RHODIN, A.G.J.; SILVA, R.; ARAÚJO de OLIVEIRA, N. Rare Brazilian sideneck turtle. **Oryx**, v. 15, n. 5, p. 473-475, 1980.

MOLINA, F. B. Comportamento e biologia reprodutiva dos cágados *Phrynops geoffroanus*, *Acanthochelys radiolata* e *Acanthochelys spixii* (Testudines, Chelidae) em cativeiro. **Revista de Etologia**, p. 25-40, 1998.

MORITZ, C. The evolution of a highly variable sex chromosome in *Gehyra purpurascens* (Gekkonidae). **Chromosoma**. v. 90, p. 90-111, 1984.

MOSKOVITS, D. K.; BJORNDALE, K.A. Diet and Food Preferences of the Tortoises *Geochelone carbonaria* and *G. denticulata* in Northwestern Brazil. **Herpetologica** v. 46, p.207-218, 1990.

MURUGESAN, R.; CHANDRA, N.; SANTHIYA, S. T.; GOPINATH, P. M.; MARIMUTHU, K. M. Nucleolar behaviour in a few legumes. **Caryologia, Florence**, v. 54, n.1, p. 17-21, 2001.

NITTA, H. **Estudo das técnicas de identificação dos cromossomos metafásicos humanos**. Tese defendida junto a Universidade Federal do Paraná, Brasil p. 88-125, 1980.

NOLETO, R.B.; KANTEK, D.L.Z.; SWARÇA, A.C.; DIAS, A.L.; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M. Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 263 - 266, 2006.

ORTIZ, M.L.; RODRÍGUEZ, P.A.; BUENO, M.L. Caracterización citogenética de la tortuga sabanera *Podocnemis vogli* (Reptilia: Testudinata: Podocnemididae). **Acta Biológica Colombiana**. v. 10, n. 1, p. 19-33, 2005.

PECCININI-SEALE, D.; ROCHA, C.F.D.; ALMEIDA, T.M.B.; ARAÚJO, A.F.B.; SENA, M.A. Cytogenetics of the brazilian whiptail lizard *Cnemidophorus littoralis* (Teiidae) from a restinga área (Barra de Maricá) in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v. 64, n. 3B, p. 661-667, 2004.

POUGH, F.H.; ANDREWS, M.R.; SAVITKY, H.A.; WELLS, D.K. **Herpetology**. 2. ed. Prentice Hall, Inc. New Jersey, 2002.

POUHG, F.H.; JANIS, M.C.; HEISER. B.J. **A Vida dos Vertebrados**. 3ª ed. Atheneu SP. p. 270-290, 2003.

PRITCHARD, P.C.H. **Encyclopedia of Turtle**, ed. T. F. H. Publication Ltda., p. 179-183, 752-755, 1979.

PRITCHARD, P.C.H.; TREBBAU, P. **The Turtles of Venezuela**, Fundación de Internados Rurales (Venezuela), Society for the study of Amphibians and Reptiles. p.111-117, 1984.

RIDLEY, M. **Evolução**. Porto Alegre: Ed. Artmed. p. 752, 2006.

ROHILLA, M.S.; TIWARI, P.K.. Simple method of blood sampling from Indian freshwater turtles for genetic studies. **Acta Herpetologica**. v. 3, n. 1, p. 65-69, 2008.

ROHILLA, M.S.; RAO, R.J.; TIWARI, P.K. Use of peripheral blood lymphocyte culture in the karyological analysis of Indian freshwater turtles, *Lissemys punctata* and *Geoclemys hamiltoni*. **Current Science**. v. 90, n. 8, p. 1130-1134, 2006.

RHODIN, A.G.J.; MITTERMEIER, R.A.; GARDNER, A.L.; MEDEM, F. Karyotypic analysis of the *Podocnemis* Turtles. **Copeia** v. 4 p. 723-728, 1978.

SCHEER, U; THIRY, M; GOESSENS, G. Structure, fuction and assembly of the nucleolus. **Trends in Cell Biology**, v. 3, p. 236-240, 1993.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, New York, v. 58, p.307-324, 1976.

SHAFTER, H. B. Turtles (Testudines). In: HEDGES, S. B.; KUMAR, S. **The Timetree of Life**. 1.ed. New York, United States: Eds. Oxford University Press, v. 55, p. 398-401, 2009.

SILVA, A.E.; SANTOS, J.R, **Manual de Segurança e de Procedimentos do Laboratório de Citogenética Humana**, São José do Rio Preto – SP, Brasil, 2005.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos da Genética**, 2. ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. p.122, 2001.

SOUZA, F.L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, v. 3, n. 1, p. 15-27, 2004.

STRACHAN, T.; READ, A.P. **Genética Molecular Humana**, 2. ed., Porto Alegre: Editora Artmed. p. 43-45, 2002.

STORER, I. S. et al. **Zoologia Geral**. 6. ed, São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2000.

SUMNER, A.T. Chromosome banding. London: Academic Division of Unwin Hyman Ltd, p. 433, 1990.

SUMNER, A.T. Chromosome Organization and Function. **London: Unwin Hyman**, p. 287, 2003.

WEISBLUM, B.; HAENSSLER, E. Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA. **Chromosoma**, New York, v.46, p.255-260, 1974.

YAMADA, K.; NISHIDA-UMEHARA; MATSUDA, Y. Molecular and cytogenetic characterization of site – specific repetitive DNA sequences in the Chinese soft – shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*, Trionychidae). **Chromosome Research**, v. 13, p. 33-46, 2005.

ZAGO, C.E.S. **Anatomia do aparelho reprodutor e hematologia de *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae)**. Tese de Mestrado pelo Departamento de Biologia, UNESP, p.92, 2007.

ZAGO, C.E.S.; LUCENA DA SILVA, T.; AFONSO DA SILVA, M.I.; VENANCIO, L.P.R.; MENDONÇA, P.P.; FALHEIROS-JUNIOR, L.R.; VIZOTTO, L.D.; TABOGA, S.R.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.R.V.; OLIVEIRA, C. Morphological, morphometrical and ultrastructural characterization of blood cells of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae), in two different environments. **Micron**. p. 1-19, DOI: 10.1016/j.micron.2010.06.006, 2010.

ZUG, G.R. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. **Herpetology**. Academic Press, New York, NY, 1993.

APÊNDICE A – COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº **50/07-CEEA**, sobre "Avaliação da estrutura cromossômica de *Phrynops geoffroanus* e *Geochelone carbonaria* (Testudines), com ênfase nas regiões teloméricas", sob a responsabilidade de **MARIA TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO OLIVEIRA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), em reunião de 17/08/2007.

Botucatu, 17 de agosto de 2007.


Prof. Dr. **MARCELO KAZERA BARUFFI**
Presidente - CEEA


NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA

APÊNDICE B – AUTORIZAÇÃO DO IBAMA.

 Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO		
Autorização para atividades com finalidade científica		
Número: 14729-1	Data da Emissão: 24/03/2008 15:24	Data de Validade: 24/03/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2448389	Nome: Carlos Eduardo Sena de Azevedo	CPF: 248.376.238-12
Título do Projeto: "Avaliação Citogenética e de condições ambientais de <i>Phrynosoma macleayi</i> e <i>Geochelone carbonaria</i> (Testudines)", incluindo "Avaliação da estrutura cromossômica de <i>Phrynosoma macleayi</i> e <i>Geochelone carbonaria</i> (Testudines), com ênfase nas regiões teloméricas" e "Influência no perfil hematólogico de Pn"		
Nome da Instituição: UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO		CNPJ: 48.031.918/0011-04
Destino do material biológico coletado		
#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	CEP Centro de Estudos de Genética da UNESP/IBRCE
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou rejeitá-lo deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio). Código de autenticação: 24571845  Página 2/3		