

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ- UFPI
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS-CSHNB
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA PAULA DE ARAÚJO VIEIRA

ESTUDO CITOGENÉTICO EM *Tropidurus hispidus*
(SPIX, 1825) (SQUAMATA, TROPIDURIDAE) DA REGIÃO DE
PICOS, PIAUÍ

PICOS - PI

2016

ANA PAULA DE ARAÚJO VIEIRA

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM *Tropidurus hispidus*
(SPIX, 1825) (SQUAMATA, TROPIDURIDAE) DA REGIÃO DE
PICOS, PIAUÍ**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Tamaris Gimenez Pinheiro

Picos - PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca José Albano de Macêdo

V658e Vieira, Ana Paula de Araújo.
Estudo citogenético em *Tropidurus hispidus* (SPIX, 1825)
(SQUAMATA, TROPIDURIDAE) da região de Picos-Piauí/
Ana Paula de Araújo Vieira – 2016.
CD-ROM: il.; 4 ¾ pol. (45f.)

Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) -
Universidade Federal do Piauí, Picos, 2016.
Orientadora: Profª. Dra. Tamaris Gimenez Pinheiro.

1. Caatinga 2. Lagartos 3. Marcadores Citogenéticos 4.
Tropidurus hispidus. I. Título.

CDD 598.1

ANA PAULA DE ARAÚJO VIEIRA

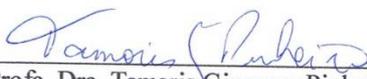
**ESTUDO CITOGENÉTICO EM *Tropidurus hispidus* (SPIX,
1825) (SQUAMATA, TROPIDURIDAE) DA REGIÃO DE
PICOS, PIAUÍ**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

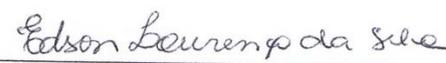
Orientadora: Profa. Dra. Tamaris Gimenez Pinheiro

Aprovado em 02 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Tamaris Gimenez Pinheiro (ORIENTADORA)



Primeiro avaliador: Prof. Dr. Edson Lourenço da Silva
IFPI – Picos



Segundo avaliador: Profa. Dra. Ana Carolina Landim Pacheco
UFPI – CSHNB

Suplente: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa
UFPI - CSHNB

Dedico esse trabalho aos meus pais Francisca Araújo e Nilo Vieira, pelo amor, apoio e confiança que me deram para concretizar e encerrar mais uma caminhada da minha vida; meus irmãos André, Adriano e Anderson (*in memoriam*), e a toda minha família que de alguma forma me ajudaram, acreditaram e foram importantes para a concretização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde, perseverança e força para superar as dificuldades, sem ele não teria traçado meu caminho e feito esta escolha de cursar Ciências Biológicas.

A minha mãe, pessoa mais importante da minha vida, que mesmo com tantas dificuldades sempre me ajudou e esteve tão presente, mesmo de longe, me aconselhando, brigando quando necessário. Sem ela não teria conseguido chegar até aqui e, foi por ela que, mesmo em momentos difíceis, de perdas e de dificuldades eu me mantive forte para a conclusão deste curso, sabendo que ao fim tudo valeria muito à pena.

Aos meus irmãos pelo amor e apoio durante esses longos cinco anos, que mesmo distantes, foram essenciais. Minha maior dor durante este curso foi não poder conviver mais com vocês e nossos pais, principalmente você meu irmão Anderson, me perdoe por ter ficado tão ausente. Agora só me resta saudades eternas de você.

A meu noivo Eduardo Leal pelo companheirismo, pelo amor, pela paciência nos meus piores momentos. Você foi um dos melhores presentes que ganhei em minha vida durante essa graduação. Obrigada também a sua família, que me acolheu tão bem.

As minhas tias, tios, primos e todos da minha família, pelo incentivo e apoio durante a graduação. Sou grata por ter me recebido em suas casas e me dado o espaço e oportunidade para vivenciar esses momentos tão gratificantes e de muito aprendizado.

A todos meus professores pelos ensinamentos e conhecimentos repassados com tanto amor e dedicação, e todos os profissionais da Universidade Federal do Piauí – *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, que estiveram direto ou indiretamente contribuindo para essa conquista.

Aos meus orientadores Edson Lourenço da Silva e Tamaris Gimenez Pinheiro pela colaboração na realização desta pesquisa, pela paciência que tiveram comigo, por terem acreditado que eu poderia realizar este trabalho tal como eles queriam. Enfim por todo apoio durante esse tempo de pesquisas.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI), por disponibilizar o Laboratório de Biologia para realização das técnicas citogenéticas.

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC) – Belém (PA), em nome do Prof. Dr. Edivaldo H. C. de Oliveira, Ivonete Furo (Nete) e toda equipe pela ajuda e ensinamentos durante a realização das técnicas de FISH.

Aos meus grandes amigos de curso, de pesquisa, de luta diária, Flávia Cipriano, Marcelo João e Maria Rita Cândido, que me ajudaram muito durante este trabalho, e também no meu cotidiano. Vocês mais que ninguém, conhecem todas as barreiras que tive que vencer ao longo dessa caminhada. Cada sorriso, lágrimas, brincadeiras, viagens e momentos compartilhados foram essenciais para a conclusão desse trabalho. Amigos para a vida toda!

Aos meus colegas de graduação pela amizade, aprendizado e convivência, que levarei pra vida toda, Amanda Macêdo, Edeilma Barros, Clarissa Lessa, Marielly Souza, Marília Borges, Sebastião Almeida, e toda a turma. Aprendi muito com todos vocês.

Enfim, a todos que direto ou indiretamente ajudaram, acreditaram e torceram por essa vitória.

Obrigada!

*O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.*

José de Alencar

RESUMO

A família Tropiduridae possui 128 espécies de lagartos, distribuídas em seis gêneros. Representantes do gênero *Tropidurus*, o mais representativo da família, são encontrados na América do Sul continental com ampla distribuição no Brasil. A espécie *Tropidurus hispidus*, objeto deste estudo, é considerada a maior espécie do gênero. Dentre o grupo dos lagartos neotropicais, os representantes da família Tropiduridae são os melhores estudados do ponto de vista citogenético. Este trabalho tem como objetivo descrever o conjunto cariotípico de *T. hispidus*, provenientes da região de Picos-Piauí, buscando marcadores citológicos que possam caracterizar a espécie. Para isto foram instaladas armadilhas do tipo *pitfall* em diferentes pontos da referida região, que foram revistadas três vezes ao dia. Os animais capturados foram transportados ao laboratório de Biologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, *campus* Picos, onde foram realizados os procedimentos de coleta de material citogenético, catalogação, registro, fixação e preservação dos animais. Diferentes técnicas de análises como coloração convencional, detecção da heterocromatina constitutiva, localização das regiões organizadoras de nucléolo, hibridização fluorescente *in situ* com sondas ribossomais, teloméricas e de microssatélites foram utilizadas. Os exemplares de *T. hispidus* analisados apresentaram cariótipo com número diplóide de $2n=36$, compostos por seis pares de macrocromossomos do tipo metacêntricos e submetacêntricos e 12 pares de microcromossomos. A heterocromatina constitutiva foi evidenciada através de blocos heterocromáticos conspícuos em regiões teloméricas e pericentromérica em ambos os sexos. As regiões organizadoras de nucléolos localizam-se na região terminal de um único par cromossômico do tipo metacêntrico. Esta região foi coincidente com sinais de hibridação das sondas de DNAr 18S. Sinais positivos com sondas telomérica foram evidenciados nas regiões teloméricas e pericentroméricas, enquanto que as sondas de microssatélite CA, CAA, CAC, GA, GAA e GAG mostraram padrões distintos de distribuição os quais mostraram-se dispersos ao longo dos cromossomos para as sequências CA, CAC e GAG e sinais mais fortes em regiões cromossômicas específicas para as sequências CAA, GA e GAA. Estes resultados mostram semelhanças com outros estudos citogenéticos realizados com *T. hispidus*, assim como também com espécies e gêneros distintos, oriundos de outras regiões do país.

Palavras-Chave: Caatinga; Cariótipo; FISH; Lagartos; Marcadores Citogenéticos

ABSTRACT

The Tropicidae family has 128 species of lizards, distributed in six genera. Representatives of *Tropidurus* genus are distributed in all continental South America widely dispersed in Brazil. The *T. hispidus* species are considered the largest species of the genus. Among the group of Neotropical lizards, Tropicidae family species are the most cytogenetically studied. This work aims to describe the karyotype set of *T. hispidus* from the Picos municipality, Piauí looking for cytological markers that can characterize this species. For this, pitfall traps were installed at different points of the Picos region and were searched three times a day. The caught animals were transported to the Biology Laboratory of the Federal Institute of Science Education and Technology of Piauí, campus Picos, in which were carried out the procedures for preparing of cytogenetic material, cataloging, record, and animals preservation. Different techniques of analysis like conventional staining, detection of constitutive heterochromatin, location of the nucleolar organizer regions, fluorescent *in situ* hybridization with ribosomal, telomeric and microsatellite probes were used. The *T. hispidus* specimens analyzed showed a diploid number of $2n = 36$, composed of six pairs of macrochromosomes of metacentric and submetacentrics types and 12 pairs of microchromosomes. The constitutive heterochromatin was evidenced through conspicuous heterochromatic blocks in both telomeric and pericentromeric regions. The nucleolar organizer regions are located in the terminal region of a single chromosome metacentric pair. This region was coincident with hybridization signals using the probes of 18S DNA. Positive signs with telomeric probes were evidenced in the telomeric regions and pericentromeric, whereas probes microsatellite CA, CAA, CAC, GA, GAA and GAG showed distinct patterns of distribution: signs scattered along the chromosomes, observed in CA sequences, CAC and GAG CAA and specific signals in sequence, and GA GAA. These results show similarities with other cytogenetic studies with *T. hispidus*, as well as with different species and genera, from other regions of the country.

Keywords: Caatinga; Cytogenetic Markers; FISH; Karyotype; Lizards

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da espécie <i>Tropidurus hispidus</i>	17
Figura 2 – (A) <i>Tropidurus hispidus</i> ; (B) Armadilha do tipo <i>pitfall</i> utilizado nas coletas.....	23
Figura 3 - Cariótipo de <i>Tropidurus hispidus</i> em coloração convencional com Giemsa. (A) Metáfase de indivíduo macho; (B) Metáfase de indivíduo fêmea.....	30
Figura 4 - Metáfase de <i>Tropidurus hispidus</i> em coloração convencional com Giemsa após técnica de Bandamento C. (A) Indivíduo macho; (B) Indivíduo fêmea. Setas: Blocos heterocromáticos mais evidentes.....	30
Figura 5 - Metáfase de <i>Tropidurus hispidus</i> . (A) Indivíduo macho em Coloração convencional com Giemsa após técnica de NOR; (B) Indivíduo fêmea em coloração DAPI após técnica de hibridização fluorescente <i>in situ</i> com sonda 18S. Setas: marcações mais evidentes.....	31
Figura 6 - Metáfase de <i>Tropidurus hispidus</i> em coloração DAPI após técnica de hibridização fluorescente <i>in situ</i> com sondas teloméricas.....	31
Figura 7 - Metáfase de <i>Tropidurus hispidus</i> em coloração DAPI após técnica de hibridização fluorescente <i>in situ</i> com sondas de microssatélites. Setas: marcações mais evidentes.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BaOH – Hidróxido de Bário

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNAr – Ácido desoxirribonucléico Ribossomal

FISH – Hibridização fluorescência *in situ*

GSD – Determinação do sexo genotípica

HCL – Ácido Clorídrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IEC – Instituto Evandro Chagas

IFPI – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí

ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

NOR – Regiões Organizadoras de Nucléolos

PBS – Tampão Fosfato Salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PI – Piauí

RNA - Ácido Ribonucléico

RNAr –Ácido Ribonucléico Ribossomal

SAMAM – Seção de Meio Ambiente

SatDNA – Ácido desoxirribonucléico satélites

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SSC – Solução Citrato Salino

SSS – Repetições de sequências simples

STI – Sequências Teloméricas Intersticiais

STR – Repetições curtas em tandem

TSD – Determinação do sexo pela temperatura de incubação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 Classificação dos lagartos.....	15
3.2 A família Tropiduridae.....	16
3.3 Citogenética de lagartos com ênfase na família Tropiduridae.....	17
3.4 Marcadores citogenéticos em lagartos.....	18
3.4.1 Regiões organizadoras de nucléolos.....	18
3.4.2 Heterocromatina constitutiva.....	19
3.4.3 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> – FISH.....	20
3.4.4 Mecanismos cromossômicos de determinação do sexo.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Área de estudo.....	22
4.2 Procedimentos em campo.....	22
4.3 Procedimentos em laboratório.....	23
4.3.1 Obtenção de cromossomos mitóticos.....	23
4.3.2 Detecção da heterocromatina constitutiva.....	24
4.3.3 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos.....	25
4.3.4 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> – FISH.....	25
4.3.4.1 DNAr, Sondas Teloméricas.....	25
4.3.4.1.1 Tratamento das lâminas.....	26
4.3.4.1.2 Hibridização.....	26
4.3.4.1.3 Lavagens e detecção.....	27
4.3.4.2 Microssatélites.....	27
4.4 Análises de dados.....	28
5 RESULTADOS.....	28
6 DISCUSSÃO.....	33
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação quanto a sua variação e evolução (GUERRA, 1988). Nas últimas décadas, a citogenética vem se destacando por uma abordagem eficiente na caracterização de grupos naturais, utilizando dados cariotípicos para identificação de espécies (citotaxonomia) e na elaboração de padrões de relacionamento e ou filogenias (citossistemática) (MOLINA; JACOBINA, 2013). Além disso, estudos cromossômicos também permitem detectar polimorfismos e heteromorfismos envolvendo cromossomos sexuais e autossomos além de mecanismos de determinação do sexo, tendo grande importância para a compreensão dos mecanismos de evolução cromossômica das espécies (BERTOLOTTI, 2006).

No que se referem aos grupos dos lagartos, no Brasil os primeiros registros ocorreram na década de 60 com a descrição de cariótipos em coloração convencional (BEÇAK; BEÇAK; DENARO, 1972). Já na década seguinte houve um aumento na produção de trabalhos que incluíram várias famílias de lagartos brasileiros, com ênfase principalmente em espécies de Teiidae e Iguanidae (PECCININI -SEALLE, 1976).

Dados não atualizados indicam que das 4100 espécies de lagartos reconhecidas (POUGH et al., 2001), cerca de 20% tem seus cariótipos descritos (SANTOS, 2007). Segundo este autor os registros indicam variação no número diploide de $2n=16$ a $2n=62$ nas espécies neotropicais de geonídeos e microteídeos, respectivamente, como a maioria dos trabalhos apresentam descrições cariotípica em coloração convencional, é permitido uma análise menos detalhada dos conjuntos cromossômicos, havendo dificuldade no estabelecimento de homologias ou diferenças entre cariótipos, dificultando o emprego desses dados em estudos filogenéticos e sistemáticos bem como em estudos citogenéticos comparativos neste grupo (OLMO, 1986).

Segundo Olmo (1986) os estudos citogenéticos em lagartos são importantes por diversas razões: a) foram os primeiros vertebrados a se libertarem do meio aquático, sendo descendentes diretos do tronco do qual os amniotas vivos derivam; b) sua história evolutiva é mais conhecida que a maioria dos grupos animais, principalmente pela riqueza de formas fósseis; c) exibem uma grande diversidade morfológica e ecológica e d) existe uma grande diversidade de dados biológicos, ecológicos e biogeográficos. Além dessas vantagens, possuem facilidade na captura, transporte e uma diversidade de grupos de pesquisa que atuam na taxonomia destes animais.

Dentre o grupo dos lagartos neotropicais, os representantes da família Tropiduridae são os melhores estudados do ponto de vista citogenético (BERTOLOTTI, 2006). Esse representativo número de trabalhos é reflexo da diversidade de espécies presentes na família. Atualmente, são reconhecidas 128 espécies distribuídas em seis gêneros (UETZ, 2016). Somente para o gênero *Tropidurus* Wied-Neuwied, 1825 são descritas 26 espécies (BÉRNILS; COSTA, 2012) encontradas em todos os biomas terrestres (RODRIGUES, 1987). Este gênero por sua vez, concentra a maioria dos trabalhos envolvendo aspectos citogenéticos.

De acordo com Gorman (1973), há algumas espécies do gênero *Tropidurus* que exibem cariótipos altamente conservados enquanto outras apresentam cariótipos distintos, revelando a presença de rearranjos cromossômicos posteriores a diversificação do gênero. Kasahara; Yonenaga-Yassuda; Rodrigues, (1987a) observaram variações quanto à localização das NORs e o padrão de bandas C em espécies de *Tropidurus* do grupo Nanazae, além de indícios de heteromorfismo sexual, no qual, as fêmeas apresentaram $2n=36$ e os machos $2n=35$. Beçak; Beçak; Denaro, (1972) detectaram variações interindividuais e entre populações de *T. torquatus* (Wied-Neuwied, 1820) provenientes de diferentes regiões brasileiras quanto ao número de cromossomos que variou entre $2n=36$, 37 e 38. Já Northland et al. (1987) encontraram um cariótipo com $2n=38$ cromossomos distribuídos em 14 macro e 24 microcromossomos em uma espécie de *Tropidurus* do norte do Chile, além disso, verificaram também variações na morfologia dos macrocromossomos.

Em um levantamento da fauna herpetológica na região de Picos – PI, realizado por Benicio; Fonseca (2011) foi encontrado somente a espécie *Tropidurus hispidus*, objeto deste estudo, como representante de Tropiduridae. Indivíduos desta espécie apresentam um número diploide com 36 cromossomos divididos em seis pares de macrocromossomos metacêntricos e submetacêntricos e 12 pares de microcromossomos acrocêntricos (PELLEGRINO, 1993). Essa espécie apresenta distribuição uniforme e aparentemente contínua nas áreas da caatinga do Nordeste do Brasil (RODRIGUES et al., 2005).

Considerando a representatividade da família Tropiduridae em número de espécies dentre os Squamata, bem como ao fato de ser conhecida somente uma espécie para a Caatinga da região de Picos, este trabalho tem como finalidade identificar a constituição cariotípica de indivíduos da espécie *T. hispidus* dessa região e procurar identificar a existência de algum marcador citogenético que define esta espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever o conjunto cariotípico de *T. hispidus*, provenientes da região de Picos-PI, buscando marcadores citológicos que possam caracterizar a espécie.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o padrão de distribuição das regiões organizadoras de nucléolos nas espécies.
- Verificar o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva nas espécies.
- Averiguar a presença de marcadores sexuais específicos na espécie estudada.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Classificação dos lagartos

No mundo existem 10.032 espécies de répteis com mais de 100 novas sendo descritas a cada ano (UETZ, 2015). Os répteis são animais descendentes de um grande grupo de vertebrados, predominantes durante a Era Mesozoica. São distribuídos em seis subclasses: Anapsida, Synaptosauria, Ichthyopterygia, Lepidosauria, Archosauria e Synapsida (ORR, 1986).

A subclasse Lepidosauria abriga as ordens Squamata e Sphenodonta, da qual os representantes são lagartos e serpentes, que ocupam os mais diferentes ambientes desde marinhos até água doce, além dos habitats terrestres, fossoriais e arborícolas (ORR, 1986). A sua diversidade permitiu a distribuição de seus integrantes em duas subordens: Lacertilia e Serpentes (ORR, 1986).

A subordem Lacertília agrupa os lagartos dos mais variados tamanhos, variando desde três centímetros, nas minúsculas lagartixas (Gekkonidae), até três metros de comprimento como no dragão de Komodo (Varanidae) (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Em geral possuem corpo alongado, pares de membros presentes, podendo ser encontrados em todo mundo, porém são mais abundantes em regiões mais quentes (ORR, 1986). Várias espécies são arborícolas e, frequentemente, são achatados lateralmente possuindo projeções peculiares do crânio e do dorso (POUGH; JANIS; HEISER et al., 2008).

Atualmente no Brasil existem 14 famílias de Lacertilia: Gymnophthalmidae representado por 84 espécies, Tropiduridae com 35 espécies, Teiidae com 34 espécies,

Dactyloidae com 18 espécies, Sphaerodactylidae com 17 espécies, Mabuyidae com 14 espécies, Leiosauridae com 13 espécies, Phyllodactylidae com 12 espécies, Gekkonidae com seis espécies, Diploglossidae com cinco espécies, Liolaemidae, Hoplocercidae e Polychrotidae com três espécies e Iguanidae com uma espécie (BÉRNILS; COSTA, 2014).

No semiárido são conhecidos 47 espécies de lagartos (RODRIGUES, 2003). Para o município de Picos - Piauí foram registrados 26 espécies de répteis, destas, 12 são de lagartos (BENÍCIO; FONSECA, 2011). Neste estudo as famílias representadas foram Gekkonidae com *Hemidactylus mabouia* (Moreau De Jonnès, 1818) e *Lygodactylus klugei* (Smith, Martin & Swain, 1977); Gymnophthalmidae com *Vanzosaura rubricauda* (Boulenger, 1902); Iguanidae com *Iguana iguana* (Linnaeus, 1758); Phyllodactylidae com *Gymnodactylus geckoides* Spix, 1825 e *Phyllopezus pollicaris* (Spix, 1825); Polychrotidae com *Polychrus acutirostris* Spix, 1825; Scincidae com *Mabuya heathi* Schmidt & Inger, 1951; Teiidae com *Ameiva ameiva* (Linnaeus, 1758), *Ameivula ocellifera* (Spix, 1825) e *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) e Tropiduridae representada somente por *Tropidurus hispidus* (BENÍCIO; FONSECA, 2011).

3.2 A família Tropiduridae

Estudos indicam a existência de 128 espécies em Tropiduridae (UETZ, 2016), constituindo uma das famílias mais numerosa de répteis neotropicais (CARVAJAL-TORRES, 2004). Nesta família estão distribuídos seis gêneros: *Eurolophosaurus* Frost, Rodrigues, Grant & Titus, 2001, *Microlophus* Duméril & Bibron, 1837, *Plica* Gray, 1831, *Stenocercus* Duméril & Bibron, 1837, *Uranoscodon* Kaup, 1825 e *Tropidurus* (UETZ, 2016).

Representantes do gênero *Tropidurus* encontram-se na América do Sul continental com ampla distribuição no Brasil (FIG. 1), sendo observados em áreas de Caatinga, Cerrado, Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Restinga (VITT; CALDWELL, 1993). Segundo Rodrigues (1987) estes lagartos são diurnos, extremamente abundantes, heliófilos, ocorrendo predominantemente em formações abertas.

Tropidurus hispidus é considerada a maior espécie do gênero (RODRIGUES, 1987), alimentando-se principalmente de pequenos artrópodes, sendo formigas e cupins os principais itens de sua dieta (FREITAS; SILVA, 2007). É encontrada principalmente sobre a superfície de rochas, no solo, em áreas de borda da mata, bem como em árvores, sobre troncos de árvores caídas, chão arenoso, cercas e paredes de casas, dentre outros tipos de substrato (FREITAS; SILVA, 2007).

Figura 1- Distribuição da espécie *Tropidurus hispidus*.



Fonte: Adaptado de The Reptile Database (2016)

3.3 Citogenética de lagartos com ênfase na família Tropiduridae

A citogenética constitui uma ferramenta adicional aos estudos dos mecanismos envolvidos nos processos evolutivos das espécies (GOMES, 1995). Segundo este autor sua aplicação é considerada cada vez mais importante para estudos de filogenia, taxonomia, mecanismos de especiação e da variabilidade genética. De acordo com extensas revisões publicadas sobre as fórmulas cariotípicas de lagartos, características importantes foram reveladas tais como: a) cariótipos com clara distinção entre macrocromossomos e microcromossomos; b) predominância do número diplóide com 36 cromossomos; c) e cariótipos compostos por uma série gradual de cromossomos acrocêntricos sem distinção entre macro e micro cromossomos (SANTOS, 2007).

A década de 80 ficou marcada por uma nova etapa nos estudos citogenéticos dos lagartos, representando um salto qualitativo nas análises cromossômicas, com vários trabalhos apresentando cromossomos com boa definição morfológica, submetidos a diferentes técnicas de coloração diferencial (PELLEGRINO, 1998). Nestas novas publicações, as espécies mais exploradas foram aquelas pertencentes às famílias Tropiduridae, Teiidae, Gekkonidae e Gymnophthalmidae.

Ainda que muitos aspectos citogenéticos, como polimorfismos, heteromorfismos de cromossomos autossômicos e sexuais, cariótipos conservados, variabilidade inter e intraespecíficas da heterocromatina constitutiva e das NORs, já terem sido elucidados em lagartos, com a diversidade do grupo e ampla distribuição das espécies, é preciso que haja

sempre mais estudos que visem outras espécies do grupo, já que muitas delas ainda têm suas características genéticas desconhecidas (BERTOLOTO, 1999). Os estudos citogenéticos têm contribuído bastante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na evolução cromossômica dos diversos grupos de lagartos, no estabelecimento de relações filogenéticas entre as espécies e na descrição de novos cariótipos (SANTOS, 2007).

Apesar de algumas espécies da família Tropiduridae apresentarem variações cariotípicas importantes quanto ao número de cromossomos, por exemplo, ela demonstra ser um clássico exemplo de conservação no número de cromossomos em lagartos (PELLEGRINO; YONENAGA-YASSUDA; RODRIGUES, 1994). A maioria de suas espécies apresenta número diplóide de 36 cromossomos com um cariótipo básico agrupado em 12 macrocromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 24 microcromossomos (PELLEGRINO; YONENAGA-YASSUDA; RODRIGUES, 1994) apresentando assim um cariótipo considerado primitivo (GORMAM, 1973; PAUL; WILIAMS; HALL, 1976).

Extensos trabalhos mostram que diversas espécies de tropidurídeos foram estudadas citogeneticamente através de bandas C e das NORs (KASAHARA et al., 1983; KASAHARA; YONENAGA-YASSUDA; RODRIGUES 1987 a, b; YONENAGA-YASSUDA et al., 1988; RODRIGUES, 1989). Para o gênero *Tropidurus* os resultados mostram diferenças cromossômicas envolvendo mecanismos de determinação de sexo, variabilidade na quantidade e distribuição de heterocromatina constitutiva e com relação à localização e número de Ag-NORs (KASAHARA et al., 1983; KASAHARA; YONENAGA-YASSUDA; RODRIGUES, 1988; PELLEGRINO; YONENAGA-YASSUDA; RODRIGUES, 1994).

3.4 Marcadores citogenéticos em lagartos

3.4.1 Regiões organizadoras de nucléolo (NORs)

As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) são sequências de DNA dispostas *in tandem* com genes ribossomais. As regiões cromossômicas com DNAr ativo durante a interfase possuem proteínas não histônicas que tem afinidade pelo nitrato de prata. Essa afinidade favorece sua ligação aos íons de prata, corando diferencialmente estas estruturas, permitindo a identificação indireta das regiões organizadoras de nucléolos. Segundo Porter et al. (1991) a localização das NORs evidencia caracteres importantes para a compreensão das relações filogenéticas nos diversos grupos de répteis.

Segundo Bertolotto (1999) nos lagartos as NORs têm apresentado grande variabilidade com relação ao número e localização, estando presente tanto em macrocromossomos como em

microcromossomos. Em algumas espécies, por exemplo, portadoras do cariótipo $2n=36$, sua localização é muito conservada, estando localizadas na região distal do braço longo do par 2 de macrocromossomos; já em outros grupos essa localização pode ser utilizada, em alguns casos, como marcador espécie específico (SOLA; MONACO; RASCH, 1990) distinguindo os cariótipos semelhantes em coloração convencional (BERTOLOTTI, 1999), podendo ajudar a elucidar os padrões de evolução do genoma (PORTER et al. 1991) e ainda ser um método confiável para detectar relações de parentesco (BERTOLOTTI, 1999).

3.4.2 Heterocromatina Constitutiva

A heterocromatina constitutiva é a região de DNA altamente repetitivo, que geralmente se encontram distribuídas em regiões pericentroméricas, teloméricas ou intersticiais e, em alguns casos, próximas as regiões organizadoras de nucléolo (SANTOS, 2007). De acordo com Kasahara (2009) as regiões heterocromáticas dos cromossomos podem ser visualizadas de maneira fácil utilizando as técnicas simples de Bandamento C, na qual os cromossomos são tratados com uma solução alcalina e corados com Giemsa.

O estudo envolvendo a detecção das regiões de heterocromatinas constitutivas nos cromossomos possibilita uma série de comparações entre grupos de espécies ou populações da mesma espécie (KASAHARA, 2009). Além disso, os trabalhos sobre a origem e diferenciação dos cromossomos sexuais envolvem a relação destes cromossomos sexuais com regiões cromossômicas heterocromáticas, ricas em sequências de DNA repetitivo (KASAHARA, 2009).

Segundo Bertolotto (1999) trabalhos que descrevem a heterocromatina constitutiva em lagartos, mostram em geral, pequenas regiões de heterocromatina pericentroméricas, teloméricas e próximas das NORs. De acordo com esta autora, os grupos de lagartos iguanídeos e os geconídeos são os mais estudados quanto o padrão de Bandas C. Nos iguanídeos ocorre pouca heterocromatina, com pequenas marcações pericentroméricas, tanto nos macros como nos microcromossomos e próximas às NORs (BERTOLOTTI et al., 1996; PELLEGRINO, 1993), enquanto que nos geconídeos a heterocromatina se localiza em regiões teloméricas (PELLEGRINO, 1993). De acordo com Kasahara et al. (1983) variações inter e intraespecíficas nos padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva foram observadas em espécies de tropidurídeos.

3.4.3 Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

A técnica de hibridização *in situ* (FISH) consiste basicamente no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA com uma sequência de nucleotídeos complementares situadas dentro da célula, visando verificar a presença desta e qual a sua exata localização (GUERRA, 2004). Segundo este autor para visualizar o segmento de DNA ou RNA hibridizado é necessário que ele esteja marcado com alguma molécula de fácil identificação (isótopos ou fluorocromos), funcionando como uma sonda para detectar a sequência complementar de nucleotídeos chamada sequência-alvo. A técnica de FISH baseia-se no fato de que o DNA é formado por duas fitas complementares que podem ser facilmente separadas em fitas simples, ou desnaturadas, e posteriormente renaturadas, voltando ao estado de fita dupla. Se, durante a renaturação do DNA cromossômico, houver sonda disponível no meio em torno do cromossomo, as cópias da sonda competirão com as fitas do DNA cromossômico e poderão ser hibridizadas *in situ*, isto é, no sítio exato onde aquela sequência ocorre naturalmente (GUERRA, 2004).

Uma das vantagens do FISH procede do fato de que praticamente qualquer sequência pode ser identificada nos cromossomos, como a de DNA satélite ou de DNA repetitivo em geral, de genes ribossômicos 45S ou 5S, de telômeros, de centrômeros, de DNA relacionado à diferenciação de cromossomos sexuais Y ou W, de gene estrutural e até cromossomos inteiros (GAZONI, 2011).

As sondas de DNAr 18S são bastante usadas para se complementar as informações obtidas pela técnica de NOR, uma vez a hibridização se dá na própria sequência gênica, independentemente de sua atividade (GAZONI, 2011). Portanto é mais seguro decidir sobre a ocorrência de NORs múltiplas e NORs inativas, afastarem como NORs verdadeiras as marcações eventuais de sequências repetitivas pela prata e esclarecer se os heteromorfismos das NOR são decorrentes de atividade diferencial ou se são resultado de um número maior de unidades de repetição (SIQUEIRA et al., 2009).

Quanto às sequências teloméricas, mesmo que os sinais de hibridação esperados sejam os localizados na região dos telômeros, estas sequências podem ser localizadas em regiões não terminais dos cromossomos, formando sequências teloméricas intersticiais (STI). Estas sequências são tradicionalmente consideradas relíquias de rearranjos cromossômicos e, portanto, importante na reconstrução da história evolutiva da formação do cariótipo (ROVATSOS et al., 2015).

Segundo Rovatsos (2015) os telômeros são complexos de nucleoproteínas que protegem as extremidades físicas, eucarióticas e lineares dos cromossomos, e desempenham um papel

crucial na manutenção da estabilidade e integridade dos cromossomos. A sequência de DNA dos telômeros consiste em uma região não codificante (TTAGGG), que produzem repetições em tandem de comprimento que varia muito em tamanho entre as espécies, indivíduos e até mesmo nos tipos de células (ROVATSOS et al., 2015).

Em répteis Squamata, a identificação precisa de sequências teloméricas provou ser uma ferramenta valiosa para revelar a topologia nos cariótipos. Isso porque puderam ser observados sinais positivos de hibridização nas posições terminais e centroméricas dos cromossomos, revelando que apesar dos seus cariótipos conservados existem rearranjos cromossômicos imperceptíveis, frequentes e independentes neste grupo de vertebrados (ROVATSOS et al., 2015).

Os microssatélites, conhecidos como repetições de sequências simples (SSR) ou repetições curtas em tandem (STR), são regiões de DNA repetitivos não codificantes compostos de um a seis nucleotídeos repetidos em conjunto, que são comuns em genomas tanto em procariotas e eucariotas (TÓTH; GÁSPARIZ; JURKA, 2000). Amplamente usados como marcadores genéticos, os microssatélites têm uma característica especial, pois sofrem taxas de mutação mais elevadas do que o restante do genoma (JARNE; LAGODA, 1996). DNAs satélite (satDNAs) representam uma das principais classes de sequências repetitivas em quase todos os genomas (ROJO et al., 2015). Eles consistem em sequências *in tandem* de DNA repetido não codificante, tipicamente dispostas em grandes aglomerados de centenas ou milhares de cópias, localizado, geralmente, nas regiões heterocromáticas de cromossomos, perto dos centrômeros e dos telômeros (CHARLESWORTH; SNIÉGOWSKI; STEPHAN, 1994).

Embora tivessem sido idealizadas para a pesquisa em seres humanos, as análises de microssatélites tornaram-se uma importante ferramenta para a pesquisa em animais (SCHLOTTERER; AMOS; TAUTZ, 1991), pois fornecem informações relevantes por identificar unidades conservadas, bem como por investigar sobre os processos populacionais como padrões de fluxo gênico e incidência de deriva genética (HEYWOOD; IRIONDO, 2003).

3.4.4 Mecanismos cromossômicos de determinação do sexo

Muitos répteis têm determinação do sexo genotípica (GSD), mas o sexo também pode ser determinado pela temperatura de incubação (TSD), independentemente dos genes ou cromossomos específicos (BULL, 1983; CHARNIER, 1966). Em outros, o sexo é determinado pela interação entre influências ambientais e fatores genéticos (QUINN et al., 2007; RADDER et al., 2008). Porém, dependendo da situação, esses sistemas de determinação sexual não devem ser mutuamente exclusivos (BULL, 1980).

Em lagartos há diversos modos de determinação do sexo, dentre estes GSD, TSD e cromossomos sexuais heterogaméticos masculino (XX/XY) e feminino (ZZ/ZW) (EZZAZ et al., 2009). De acordo com estes autores os lagartos com GSD apresentam várias diferenciações cromossômicas relacionadas a um dos sexos, desde cromossomos homomórfico a altamente diferenciados, podendo ocorrer dentro das famílias, em espécies intimamente relacionadas e até mesmo dentro de várias populações da mesma espécie.

Estudos citogenéticos em lagartos mostram que várias espécies são desprovidas de cromossomos sexuais heteromórficos, e os cariótipos dos machos são iguais aos das fêmeas; e os microcromossomos são os que dificultam essa detecção de cromossomos sexuais (BERTOLOTTI, 1999). Quando dados de cromossomos sexuais de espécies aparentadas são comparadas, inferências podem ser feitas a respeito da história evolutiva do mecanismo de determinação do sexo (BULL, 1980).

Alguns estudos realizados em indivíduos da espécie *T. hispidus* evidenciaram a presença de um sistema de determinação do sexo tipo XX: XY. Nestes indivíduos o cromossomo Y é um microcromossomo diminuto e o X um microcromossomo acrocêntrico, ambos foram identificados através de preparações mitóticas usando coloração diferencial com Giemsa a partir de técnicas de bandas C (KASAHARA et al., 1987b; PELLEGRINO et al., 1994).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O município de Picos, que se localiza na região Centro Sul do Estado do Piauí, à margem direita do rio Guaribas, a uma latitude 7°04'37" Sul e a uma longitude 41°28'01" Oeste, com uma área aproximada de 803 km² e uma população de 71.020 habitantes, é cercado por montes e picos, e dista 316 km da capital Teresina, pela BR-316, e suas condições climáticas (com altitude da sede a 190 m acima do nível do mar), apresentam temperaturas mínimas de 22° C e máximas de 39° C, com clima semiárido e quente (BARBOSA et al. 2007).

4.2 Procedimentos em campo

Os procedimentos de coleta foram devidamente autorizados pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – ICMBio/ SISBIO sob número 47710-1. As coletas foram realizadas no período de setembro de 2014 a setembro de 2015. Assim, os exemplares de *T. hispidus* foram capturados utilizando armadilhas de queda tipo *pitfalls*, montadas aleatoriamente em locais definidos na região de Picos, Piauí, levando em conta a visualização de presença de lagartos (FIG.2). As armadilhas foram revisadas três vezes ao dia

e os animais capturados foram coletados para evitar que morressem devido ao calor. Os animais foram transportados ao Laboratório de Biologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, *campus* Picos, onde foram realizados todos os procedimentos obtenção de material citogenético, catalogação, registro e posterior fixação e preservação dos espécimes.

Figura 2: (A) *Tropidurus hispidus*; (B) Armadilha do tipo *pitfall* utilizada na coleta.



Fonte: Elaborado pela autora (2016)

4.3 Procedimentos em laboratório

4.3.1 Obtenção de cromossomos mitóticos

Para a obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a técnicas de *air-drying* (BERTOLLO et al., 1978) com algumas modificações para lagartos. Essa técnica foi realizada no Laboratório de Biologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, *campus* Picos.

Primeiramente injetou-se solução de colchicina na concentração entre 0,01% a 0,1%, na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso do animal. Esperou um tempo variável, entre 12 a 26 horas antes do sacrifício, dependendo do animal, mantendo-o à temperatura aproximada de 30° C. Após esse tempo o animal foi sacrificado com substância anestésica para retirada dos fêmures, dissecando-se a musculatura e, depois de limpos, cortando-se as epífises. Com auxílio de uma seringa, fez-se lavagens sucessivas dos fêmures com solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075M até a retirada total da medula óssea que foi recolhida em uma placa de Petri. Parte do intestino e pulmão foram utilizados nas preparações seguindo os mesmos procedimentos. A solução foi então transferida para um tubo de centrífuga e incubada a 37° C, durante 45 minutos.

Decorrido esse tempo, procedeu-se a pré-fixação, na qual foram adicionadas à suspensão seis gotas de fixador Carnoy (metanol/ácido acético na proporção 3:1, respectivamente), e esperado cinco minutos. Decorrido esse tempo, adicionou-se mais seis gotas de fixador, homogeneizado levemente e esperado mais cinco minutos. Logo após, centrifugou-se entre 900 a 1000 rpm, durante 10 minutos, e depois o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o *pellet* foi desmanchando com ajuda de uma pipeta Pasteur ao adicionar vagarosamente 5 mL de fixador. A solução foi novamente homogeneizada, lavando bem as células. Estes procedimentos foram repetidos por pelo menos mais duas vezes dependendo da quantidade de material retirado. Após a última centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se uma quantidade de fixador suficiente para o preparo das lâminas.

Sobre uma lâmina limpa e seca, mantida horizontalmente sobre um suporte colocado em banho-maria a 60° C, a 0,5 cm do nível de água, pingou-se uma ou duas gotas da suspensão. Logo em seguida, retirou-se a lâmina e a mesma foi deixada para secar ao ar. Ao secar, as preparações fixadas nas lâminas foram coradas com solução de Giemsa diluída em água destilada, durante 10 minutos. Transcorrido esse tempo, as lâminas foram lavadas com água destilada ou água corrente e secas ao ar para posterior análise do material.

4.3.2 Detecção da heterocromatina constitutiva

Para a detecção da heterocromatina constitutiva utilizou-se a técnica de bandamento C, descrita por Sumner (1972), com algumas modificações no tempo de exposição de acordo com a qualidade do material citológico. Essa técnica foi realizada no Laboratório de Biologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, *campus* Picos.

As lâminas com os cromossomos mitóticos foram tratadas com HCl 0.2 N à temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar ao ar. As lâminas foram colocadas em solução salina 2xSSC, a 60° C, por 15 minutos, e em seguida lavadas e deixadas secar ao ar. Após a secagem foram colocadas em solução aquosa de hidróxido de bário (Ba(OH)₂·8H₂O) a 5%, recém- preparada e filtrada, a 42° C, durante 15 segundos. A ação do hidróxido de bário foi interrompida submergindo as lâminas rapidamente na solução de HCl 0,2 N. As lâminas foram incubadas em solução salina de 2xSSC, a 60° C durante 45 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar. Para a análise, as preparações das lâminas foram coradas com solução de Giemsa a 3% durante 10 minutos, lavadas com água destilada e secas ao ar.

4.3.3 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NORs)

Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolos, foi utilizada basicamente a técnica descrita por Howell e Black (1980). Essa técnica foi realizada no Laboratório de Biologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, *campus* Picos.

Sobre uma lâmina pingou-se uma gota de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1 ml para cada 100 ml de solução). Em seguida foi adicionada, sobre a gota anterior, uma gota de água destilada e duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% mantida em frasco escuro e em geladeira. A mistura foi homogeneizada com uma Pipeta Pasteur e cobertas com uma lamínula.

Depositadas sobre um suporte as lâminas foram incubadas em estufa a 60° C, por um período de aproximadamente três minutos. Este tempo foi variável, dependendo da velocidade de mudança de cor da lâmina e dos cromossomos ao microscópio. O tempo apropriado correspondeu aquele em que os cromossomos assumiram uma tonalidade amarelada e as NORs e os nucléolos uma coloração preta ou marrom. Em seguida as lâminas foram lavadas em água deionizada, possibilitando a retirada da lamínula pela própria água. O material foi corado com Giemsa a 5% durante 20 a 30 segundos, lavadas e secas ao ar.

4.3.4 Hibridização fluorescente *in situ* - FISH

4.3.4.1 DNAr e Sondas Teloméricas

A sonda de sequências de DNA ribossomal (DNAr) 18S foi obtida a partir do DNA genômico de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces: Erythrinidae) utilizando o seguinte conjunto de *primers* 18SF: CCGAGGACCTCACTAAACCA e 18SR: CCGCTTTGGTGACTCTTGAT. Para a obtenção da sonda telomérica foram usados os seguintes *primers*; (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ em reação de PCR sem adição de DNA molde. Estas técnicas foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética (SAMAM), Instituto Evandro Chagas (IEC), Belém, Pará.

Estas sondas foram marcadas por PCR e/ou *Nick translation*, utilizando os compostos biotina-14-dATP (Invitrogen), disponíveis no Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética (SAMAM) - IEC, Belém, Pará, segundo a metodologia de Pinkel et al., (1986) com algumas adaptações propostas por Oliveira et al. (2010) nos tempos de desnaturação e lavagens pós hibridação, e ao término das preparações foi adicionado o fluorocromo DAPI acrescido de *Antifading* (Vectashield).

4.3.4.1.1 Tratamento das lâminas

As preparações cromossômicas foram colocadas sobre lâminas previamente limpas, as quais foram mantidas em estufa a 60° C por uma hora para total fixação do material. Para dar prosseguimento às técnicas de hibridização fluorescente *in situ* as lâminas foram tratadas com solução de pepsina e RNase com o intuito de proporcionar um meio adequado para a hibridação. Para o tratamento com pepsina incubou-se as lâminas por 10 minutos em uma solução contendo 99 mL de água destilada, 1 mL de HCl 1M e 50 µl de pepsina 10%.

Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes, por dois minutos cada lavagem, em 2xSSC e incubadas em 100 µl de RNase (5 µl de solução aquosa de RNase 10 mg/mL acrescida de 995 mL de 2xSSC) a 37° C por 1 hora em câmara úmida. Após a incubação, outras três lavagens, de 5 minutos cada, em 2xSSC foram efetuadas. Um último ciclo de lavagem foi realizado em Triton por cinco minutos, uma única vez. As lâminas foram desidratadas em série etílica 70, 90 e 100% por cinco minutos respectivamente.

4.3.4.1.2 Hibridização

As lâminas foram retiradas da estufa e deixadas atingir temperatura ambiente para dar início ao processo de desnaturação. Para tanto as mesmas foram submersas em uma solução de Formamida a 70% em 2xSSC em banho Maria 72° C, por um minuto e 20 segundos. Transcorrido esse tempo, foram colocadas em etanol a 70% gelado e desidratadas por quatro minutos. Em seguida, foram desidratadas em série alcoólica a 70% e 90% por dois minutos e 100% por quatro minutos. As lâminas foram deixadas para secar em temperatura ambiente, enquanto as sondas eram preparadas.

Para a preparação das sondas, 2 µL da sonda marcada foram adicionadas a 10 µL do tampão de hibridização (formamida 50% em 2xSSC e sulfato dextrano 10%) por lâmina em um micro tubo. A solução de hibridização foi desnaturada em bloco aquecedor a 75° C por 15 minutos. Ao final da desnaturação, os tubos foram colocados imediatamente em gelo enquanto as lâminas secavam. A solução de hibridização de cada tubo foi colocada sobre a lâmina com os cromossomos desnaturados, coberta com lamínula, impermeabilizada com cola de PVC e mantida *overnight* a 37° C em câmara úmida.

4.3.4.1.3 Lavagem e detecção

Decorrido o tempo de hibridização, as lâminas montadas com a solução de hibridização e mantidas úmidas a temperatura constante foram submetidas aos processos de lavagem e detecção dos sinais de hibridização utilizando anticorpos e haptenos específicos. Para isso as

lamínulas foram retiradas com cuidado e o material lavado duas vezes, cinco minutos cada, com solução de estringência (50 mL de formamida acrescida de 50 mL de 2xSSC) a 45° C. Em seguida as lâminas foram lavadas duas vezes com 1xSSC a 45° C por também cinco minutos cada. Outra lavagem de cinco minutos foi realizada com 4xT (20 mL de 2xSSC, 5 µL de Triton e 75 mL de água) em temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas por 20 min com anticorpos (40 min) (0,2 µl AVID/CY3, Alexa em 200 µl em 4xSST), 100 µl por lâmina. Em seguida foi despejado sobre a lâmina, coberta com parafilme e colocada em estufa 37°C em câmara úmida. As lâminas foram coradas com DAPI, mais solução de *antifading* (Vectashield), montadas com lamínulas e guardadas em caixas ao abrigo da luz.

4.3.4.2 Microsatélites

Para a obtenção da FISH com sondas de microsatélite seguiu-se o protocolo de Kubat et al., (2008), com algumas modificações, marcadas diretamente com avidina – CY3, utilizando as sequências: CA, CAA, CAC, GA, GAA e GAG, disponíveis no IEC – Belém-PA. Essa técnica foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética (SAMAM) - IEC, Belém, Pará.

As sondas foram previamente marcadas por PCR e/ou *nick translation*, utilizando o composto de biotina-14-dATP (Invitrogen).

No primeiro dia colocou-se as lâminas com material fixado por uma hora em estufa a 37° C. Em seguida foram colocadas por 25 minutos na estufa a 60° C e foi aspergido sobre as lâminas 200µL de ribonuclease 10 µg/mL e colocado o parafilme. Em seguida incubou-se em câmara úmida por uma hora na estufa a 37° C. Após retirar as lâminas da câmara úmida, incubou-se três vezes em 2xSSC por cinco minutos. Em seguida incubou-se as lâminas por 10 minutos na pepsina 0,005% e três vezes em 2xSSC por cinco minutos cada, em temperatura ambiente. Feito isso, incubou-se em formaldeído a 1% por 10 minutos e três vezes em 2xSSC por cinco minutos cada, em temperatura ambiente.

Após isso, as lâminas foram desidratadas em etanol 50%, 70% e 100% por dois minutos cada, em temperatura ambiente. Em seguida, esperou-se que as lâminas secassem em temperatura ambiente e depois foram desnaturadas em formamida a 70% por três minutos a 72° C e desidratadas em etanol 70%, 90% e 100% por dois minutos cada (ao mesmo tempo as sondas foram desnaturadas a 80° C por 10 minutos e transferidas imediatamente para o gelo). Feito isso aspergiu a sonda sobre as lâminas, colocou-se a lamínula, vedou-se com cola e foram colocadas em câmara úmida na estufa a 37° C *overnight* por 16 horas.

No segundo dia, as lâminas foram colocadas duas vezes em 2xSSC por cinco minutos cada, em temperatura ambiente. Depois duas vezes em 1xSSC por cinco minutos cada, em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas uma vez em PBS e desidratadas em etanol 70%, 90% e 100% por dois minutos cada, em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se DAPI com *Antifading*, colocou a lamínula, pressionou com papel toalha para retirar o excesso e vedou-se com esmalte.

4.4 Análises de dados

As melhores metáfases foram fotografadas ao microscópio de luz *Nikon eclipse* e montadas os cariótipos para análises comparativas dos indivíduos encontrados. Os cromossomos foram organizados em metacêntricos, submetacêntricos, subtelo-cêntricos, e acrocêntricos dependendo da razão de braços e arranjados em decréscimo de tamanho nos respectivos cariótipos (LEVAN et al., 1964). A captura das imagens da FISH foi realizada utilizando-se um microscópio *Zeiss-Axiophot* acoplado a um sistema de fluorescência e as imagens foram processadas com o auxílio do programa *Axionvisione* posteriormente combinadas e otimizadas com brilho e contraste pelo programa *Adobe Photoshop CS6*.

5 RESULTADOS

Foram analisados 10 indivíduos de *T. hispidus* provenientes da região de Picos - PI. Deste total, quatro foram selecionados e as melhores metáfases puderam ser observadas em preparações diretas de medula óssea, intestino e pulmão dos exemplares. Dos indivíduos analisados três eram machos e uma era fêmea. O número diplóide registrado para a espécie foi de $2n=36$ cromossomos distribuídos em seis pares de macrocromossomos metacêntricos e submetacêntricos e 12 pares de microcromossomos (FIG. 3). Não foi observado presença de cromossomos sexuais na espécie estudada.

A heterocromatina constitutiva evidenciada pela técnica de Banda C foi confirmada através de blocos heterocromáticos conspicuos nas regiões teloméricas e pericentroméricas dos cromossômicos, em ambos os sexos (FIG. 4AB).

A impregnação com nitrato de prata, evidenciou regiões organizadoras de nucléolos localizadas na região terminal do braço longo do par 2 (FIG 5A). Esta região foi coincidente com sinais de hibridação das sondas de DNAr 18S (FIG 5 B). Na espécie em estudo não foi evidenciado presença da constrição secundária em ambos os sexos.

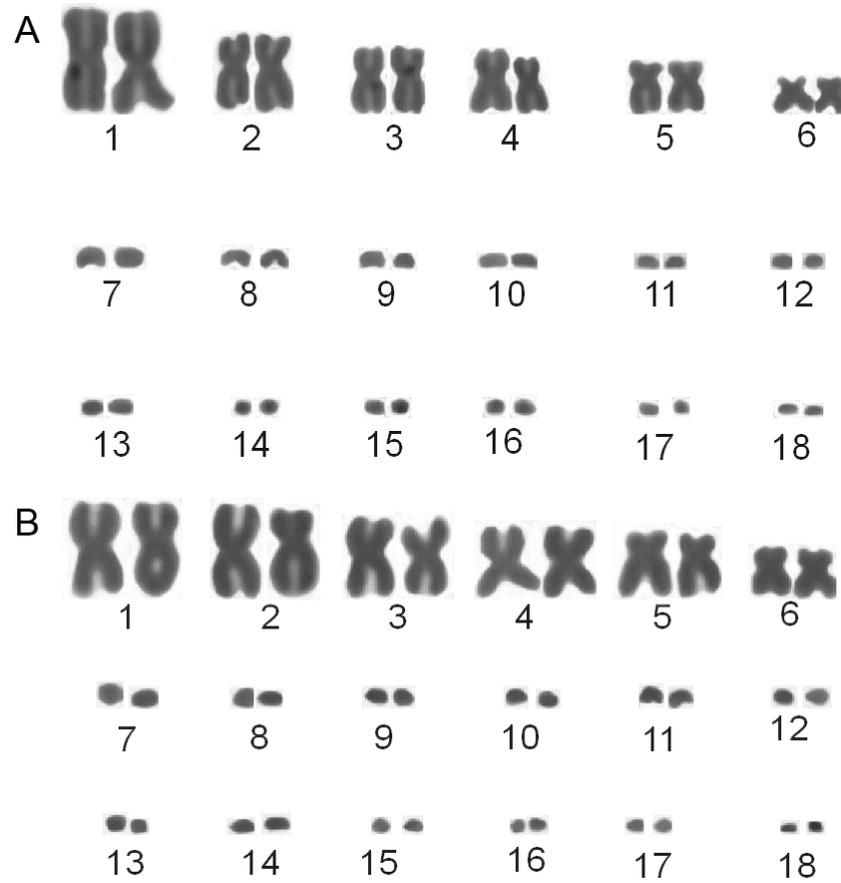
Foram vistos sinais de hibridização positivos com sondas teloméricas em regiões teloméricas dos cromossomos e sinais intersticiais nas regiões pericentroméricas de alguns cromossomos (FIG. 6).

As análises com sondas de sequências de microssatélites mostraram sinais de hibridização positivos para as sequências CA, CAA, CAC, GA, GAA e GAG (FIG. 7). Estas sequências mostraram dois padrões de distribuição distintas dos microssatélites: (I) Sinais fracos de hibridização dispersos ao longo dos cromossomos, observados nas sequências CA, CAC e GAG e (II) Sinais específicos formando blocos evidentes nas sequências CAA, GA e GAA (FIG. 7).

A sequência CA marcou vários macrocromossomos com distribuição de sinais ao longo de todo cromossomo e em alguns houve sinais com menos intensidade. O mesmo resultado foi obtido para a sequência GAG, enquanto que a sequência CAC marcou poucos macrocromossomos com fortes sinais de hibridização positivos em toda região destes cromossomos e em alguns houve sinais positivos com menos intensidade nas regiões terminais dos cromossomos (FIG. 7).

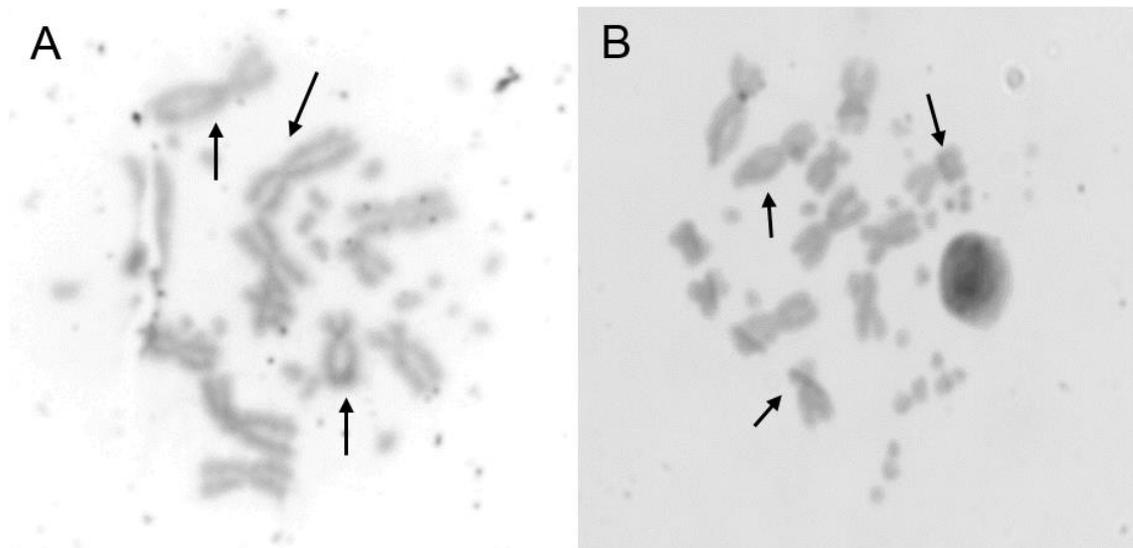
Com a sequência CAA obteve-se marcações específicas com pouca intensidade de nas regiões terminais de macrocromossomos, enquanto que a sequência GA houve fortes sinais de hibridização em muitos cromossomos, tanto em macro como em microcromossomos. Estes sinais ocorreram principalmente em regiões centroméricas, teloméricas e, em alguns cromossomos em regiões pericentroméricas. A sequência GAA evidenciou fortes sinais de hibridização positivos na grande maioria dos cromossomos, marcando com maior intensidade, principalmente as regiões terminais destes. Houve também marcações ao longo de alguns microcromossomos (FIG. 7).

Figura 2- Cariótipo de *Tropidurus hispidus* em coloração convencional com Giemsa. Em A) metáfase de indivíduo macho e em B) metáfase de indivíduo fêmea.



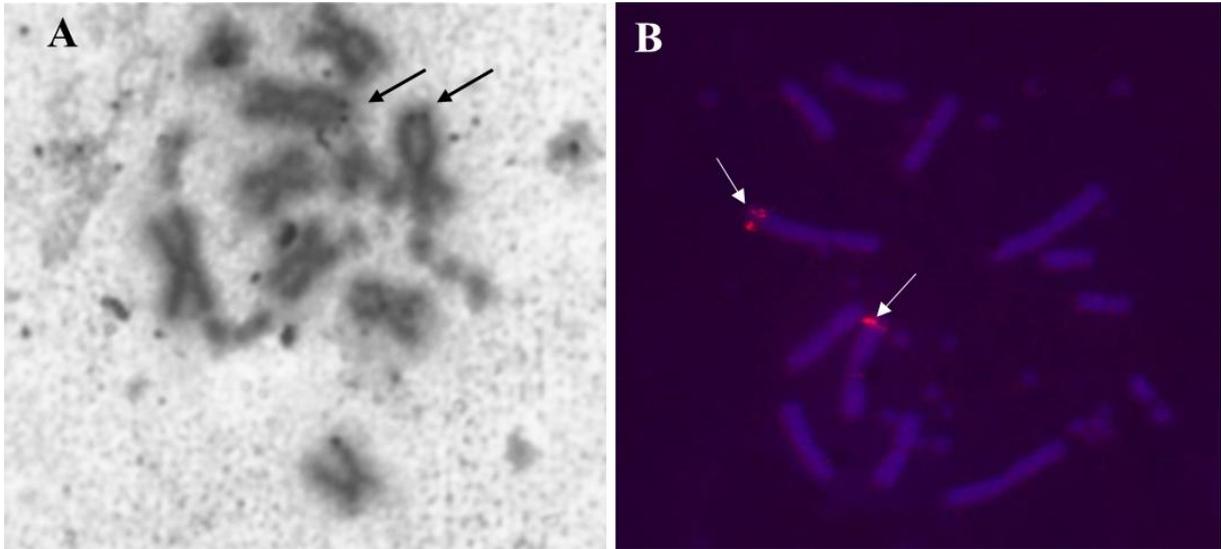
Fonte: Elaborada pela autora (2016)

Figura 3 - Metáfase de *Tropidurus hispidus* em coloração convencional com Giemsa após técnica de Bandamento C. Em A) Indivíduo fêmea e em B) Indivíduo macho. Blocos heterocromáticos mais visíveis indicados pela seta.



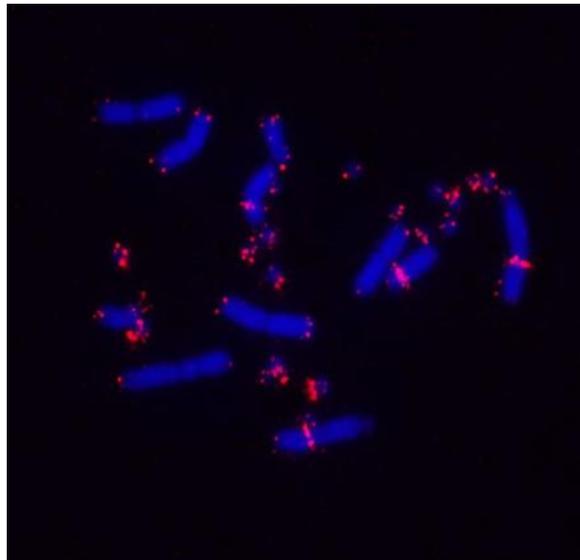
Fonte: Elaborada pela autora (2016)

Figura 5 - Metáfase de *Tropidurus hispidus*. (A) Indivíduo macho em Coloração convencional com Giemsa após impregnação por Nitrato de Prata; (B) Indivíduo fêmea em coloração DAPI após técnica de hibridização *in situ* fluorescente com sonda 18S. Setas: marcações evidentes.



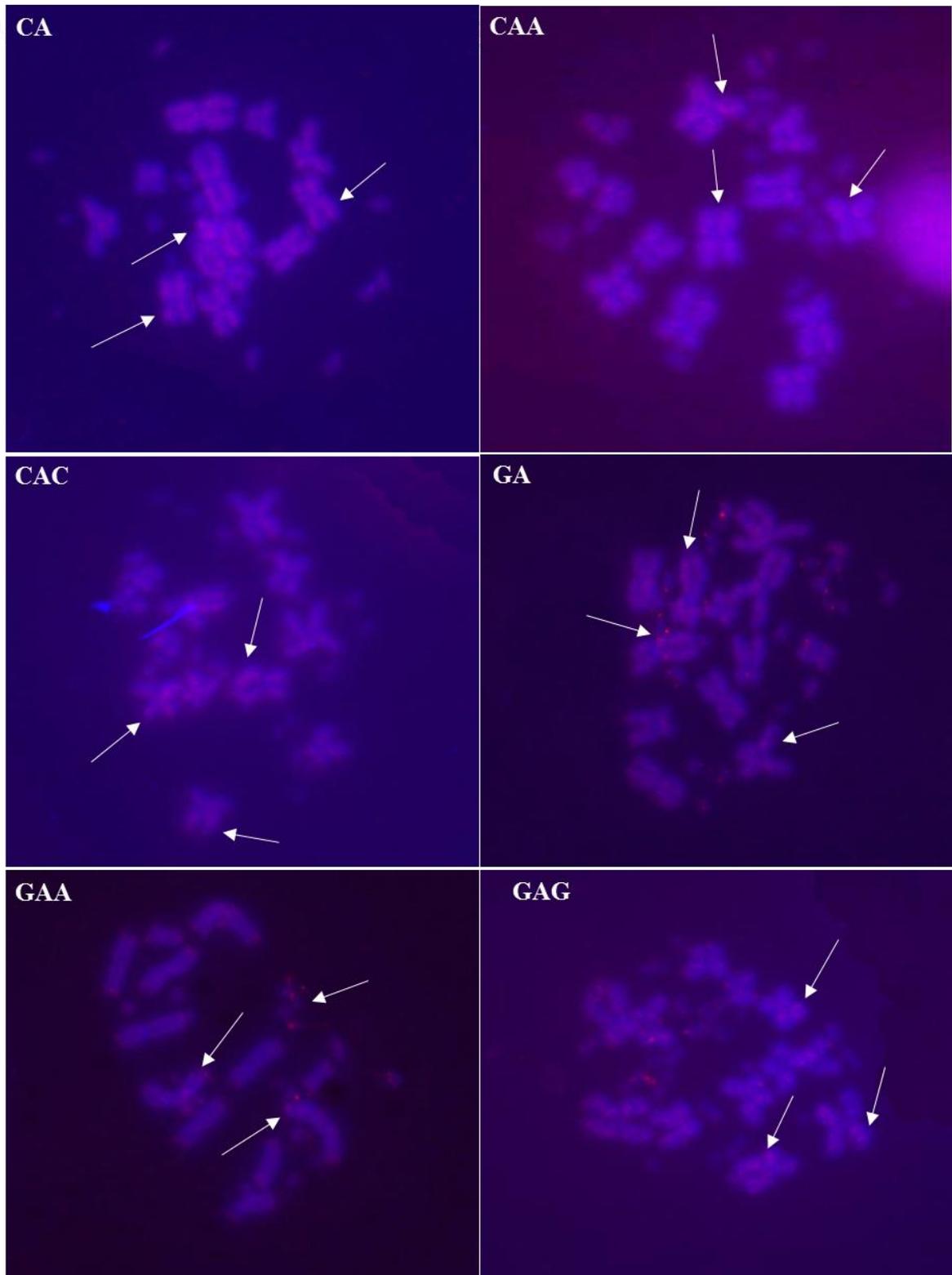
Fonte: Elaborada pela autora (2016)

Figura 6 – Metáfase de *Tropidurus hispidus* em coloração DAPI após técnica de hibridização *in situ* fluorescente com sondas teloméricas.



Fonte: Elaborada pela autora (2016)

Figura 7 – Metáfase de *Tropidurus hispidus* em coloração DAPI após técnica de hibridização in situ fluorescente com sondas de microssatélites. Setas: marcações evidentes.



Fonte: Elaborada pela autora (2016)

6 DISCUSSÃO

O número diploide $2n=36$ cromossomos distribuídos em 6 pares de macrocromossomos e 12 pares de microcromossomos observados em *T. hispidus*, no presente trabalho, parece ser uma característica conservada em populações distribuídas em diferentes regiões do Brasil, e tem sido apontada por diversos autores como um evento relacionado à estabilidade cromossômica da macroestrutura cariotípica desses organismos (PELLEGRINO, 1993; GONZALEZ; BONILLA; VELASQUEZ, 2011). Segundo Gorman et al. (1967) este padrão é considerado primitivo para as espécies da família Tropiduridae. Porém, alguns autores não aceitam a condição primitiva do cariótipo de $2n=36$ (12M+24m) e consideram os cariótipos com número diploides mais elevados, constituídos de acrocêntricos, como a configuração mais primitiva (KING, 1981).

Em trabalhos realizados com espécies da família Tropiduridae, Pellegrino (1993) observou esse número na maioria das espécies: *T. mucujensis* Rodrigues, 1987, *T. hispidus*, *T. nanuzae* Rodrigues, 1981, *T. montanus* Rodrigues, 1987, *T. itambere* Rodrigues, 1987 (somente na fêmea), *T. semitaeniatus* (Spix, 1825), *T. spinulosus* (Cope, 1862) e *Uronoscodon superciliosus* (Linnaeus, 1758). Contudo houve distinção quanto à fórmula cariotípica, sendo que as espécies *T. mucujensis*, *T. nanuzae* e *T. spinulosus* apresentaram seis pares de macrocromossomos metacêntricos ou submetacêntricos, enquanto que as espécies *T. hispidus* e *T. Montanus* tiveram seis pares de macrocromossomos e 11 pares de microcromossomos acrocêntricos autossomos, havendo ainda cromossomos sexuais nos quais o X era um microcromossomo acrocêntrico e o Y um microcromossomo puntiforme.

As demais espécies deste trabalho citado tiveram fórmula cariotípica bem diferente da obtida para a espécie de *Tropidurus* da região de Picos - Piauí, como por exemplo, *T. semitaeniatus* possuem seis pares de macrocromossomos metacêntricos e submetacêntricos, nove pares de microcromossomos acrocêntricos e três pares de microcromossomos metacêntricos (pares 8, 13 e 15). Outra distinção bem interessante entre essas espécies diz respeito à localização da constrição secundária, nas quais essas estruturas foram visíveis no par cromossômico 11 em *T. mucujensis*, no par 6 em *T. nanuzae*, par 9 em *T. Montanus*, no par 12 em *U. superciliosus* enquanto que na espécie estudada no presente trabalho não houve presença da constrição secundária (PELLEGRINO, 1993).

Indivíduos de *T. hispidus* já tiveram seus padrões de bandamento descritos anteriormente (KASAHARA et al., 1996; YONENAGA-YASSUDA et al., 1988; PELLEGRINO, 1993). Para Pellegrino (1993), *T. hispidus* apresentou blocos heterocromáticos bem marcados na região centromérica dos pares 2, 5 e 6, sendo que no par 2 os blocos apresentaram-se de igual tamanho,

já nos pares 5 e 6 foram heteromórficos. Entretanto, Kasahara et al. (1996) observou bandas com muitos blocos conspícuos em *T. hispidus* de modo que as duas classes de microcromossomos, com ou sem banda C foram facilmente identificadas, e nos macrocromossomos foram observados blocos grandes na região centromérica no par 5 e menos frequente no par 2. A pequena quantidade de heterocromatina constitutiva restrita às regiões centroméricas e terminais parece ser uma condição comum para o gênero, no qual foi observado este mesmo padrão também para a espécie *T. hispidus* da região de Picos-Piauí.

Em um estudo citogenético comparativo realizado com 11 espécies de *Tropidurus* do grupo *Torquatus* foram observadas diferenças interespecíficas e algumas intra específicas nos padrões de Bandas C e das NORs, ocorrendo também dois mecanismos de determinação do sexo do tipo XX:XY e X1X2X2X2:X1X2Y (KASAHARA et al., 1996).

Análises da heterocromatina através de Bandas C com cinco espécies da família Tropiduridae, mostraram em todas, marcações nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos, com distinções quanto aos pares que apresentavam essas marcações e quanto a Bandas C positivas presentes em alguns na região distal do braço longo e nas regiões da constrição secundária do par 9 (PELLEGRINO, 1993). Assim, blocos heterocromáticos conspícuos nas regiões teloméricas e pericentromérica dos cromossomos em ambos os sexos observados no presente estudo para *T. hispidus* mostra a característica conservada para o gênero *Tropidurus*.

Em lacertílios, dentre todas as técnicas de coloração diferencial dos cromossomos, a coloração das NORs pelo nitrato de prata é a mais facilmente obtida, sendo que os estudos das NORs se tornam mais úteis do que os padrões de Bandas C na caracterização das espécies, pelo fato de que as NORs constituem regiões ativas dos cromossomos, o que não ocorre nas regiões de heterocromatina constitutiva (PELLEGRINO, 1993).

No presente trabalho, espécimes de *T. hispidus* apresentaram as NORs localizadas em macrocromossomos conforme descrito em diversos trabalhos. Já em outras espécies do gênero as NORs foram localizadas na região da constrição secundária do par 11 (*T. mucujensis*); na região da constrição secundária proximal do braço longo do par 6 (*T. nanuzae*); na região da constrição secundária do par 9 (*T. montanus*); e em um par de microcromossomos metacêntricos (*T. semitaeniatus*) (PELLEGRINO, 1993). Quanto aos resultados de Hibridização fluorescente *in situ*, com as sondas de DNAr 18S, sondas teloméricas e sondas de microssatélites, esse estudo revela a primeira análise para a espécie *T. hispidus*.

A hibridização fluorescente *in situ* do gene rissossomal 18S corroborou com os resultados obtidos com a impregnação do nitrato de prata, confirmando, assim, a existência deste gene em

um único par de cromossomos (par 2). Estudos com outras espécies de lagartos obteve hibridização positiva da sonda DNAr 18S localizada na região terminal do braço longo do par 7 em *Ameiva ameiva* (Teiidae), enquanto que nas espécies *Cnemidophorus sp.1* Wagler, 1830, *Kentropyx calcarata* Spix, 1825 e *K. pelviceps* (Cope, 1868) (Teiidae) evidenciaram sinais positivos de hibridização na região distal do braço longo no par 1 e no par 2 em *Tupinambis teguixin* (Linnaeus, 1758) (Teiidae) (CARVALHO et al., 2015). Estes resultados se assemelham aos obtidos para a espécie *T. hispidus* da região de Picos-Piauí.

Em um estudo com as espécies de lagartos *Cordylus tropidosternum* (Cope, 1869) (Cordylidae), *Correlophus ciliatus* Guichenot, 1866, *Oedura monilis* De Vis, 1888 (Diplodactylidae), *Aeluroscalabotes felinus* (Günther, 1864), *Goniurosaurus lichtenfelderi* (Mocquard, 1897), *G. luyi* Grismer, Viets & Boyle, 1999, *G. splendens* (Nakamura & Uéno, 1959) (Eublepharidae), *Bunopus spatulurus* Anderson, 1901, *Homopholis fasciata* (Boulenger, 1890), *Stenodactylus sthenodactylus* (Lichtenstein, 1823) (Gekkonidae), *Eremias velox* (Pallas, 1771) (Lacertidae), *Asaccus elisae* (Werner, 1895), *Tarentola annularis* (Geoffroy-st-hilaire, 1827) (Phyllodactylidae), *Varanus Acanthurus* Boulenger, 1885 (Varanidae) e *Lepidophyma smithii* Bocourt, 1876 (Xantusiidae), Rovatsos et al. (2015) mostraram sinais de hibridização positivos de sequências teloméricas apenas nas posições terminais dos cromossomos. Esse resultado difere do obtido neste estudo na qual a espécie estudada, *T. hispidus*, evidenciou marcações positivas de hibridizações de sequências teloméricas tanto nas regiões teloméricas como também em regiões pericentroméricas, formando, assim, sequências teloméricas intersticiais (STI).

As STI estão presentes em membros de todas as linhagens principais de Squamata (ROVATSOS et al., 2015). Segundo estes autores, tendo em vista outros trabalhos publicados e comparando com seus resultados, apenas 48,5% dos Squamata demonstraram distribuição normal das sequências teloméricas, ou seja, marcações na região dos telômeros dos cromossomos, enquanto que 51,5% das espécies apresentam STI em regiões centroméricas, pericentroméricas e/ou dentro de braços cromossômicos (ROVATSOS et al., 2015). Assim, a existência de STI em espécies de Squamata mostra-se como um evento comum.

Estes mesmos autores obtiveram resultados de sequências teloméricas intersticiais (STI) detectadas nos centrômeros nas espécies de lagartos *Anguis fragilis* Linnaeus, 1758 (Anguidae) em três pares submetacêntricos, *Anolis equestris* Merrem, 1820 (Dactyloidae) em cinco pares de cromossomos e *Latastia longicaudata* (Reuss, 1834) (Lacertidae) em cinco pares de cromossomos. Enquanto que em duas espécies de *Chamaeleo calyptratus* Duméril & Duméril, 1851 (Chamaeleonidae) e *Cordylus berarducci* Broadley & Branch 2002 (*Cordylus*) detectaram

STI em posições terminais de todos os cromossomos, e na região pericentromérica do maior par de cromossomos metacêntricos. Observa-se uma semelhança com os resultados obtidos para a espécie em estudo da região de Picos-Piauí.

Espécies macho e fêmea de *Aprasia parapulchella* Kluge, 1974 (Pygopodidae), possuem sistema de determinação sexual do tipo XX:XY, e, em um estudo com mapeamento de microssatélites através das sequências (GTAA)⁸, (AGAT)⁸ e (AC)¹⁵, Matsubara et al., (2013) obtiveram resultados importantes quanto ao padrão de distribuição destas sequências. A sequência (GTAA)⁸ não mostrou sinal específico nas metáfases tanto de macho quanto de fêmea, enquanto que (AGTA)⁸ mostraram sinais de hibridização intenso na região centromérica de um microcromossomo na metáfase de macho, e não hibridizou na metáfase fêmea. Já a sequência (AC)¹⁵ também hibridizou somente na metáfase de macho, porém ao mesmo tempo foram observados sinais em um par de macrocromossomos em ambos os sexos, inferindo assim que (AC)¹⁵ é também amplificado em Y e não em X, mas pode ocorrer repetições em outros pares de cromossomos (MATSUBARA, et al., 2013). Estes autores afirmam que esses sinais intensos com DNA genômico em um único cromossomo revela que Y é altamente diferenciado do cromossomo X não só em morfologia, mas em teor de DNA, assim o cromossomo Y nesta espécie tem grandes quantidades de DNA específico do sexo masculino, sendo susceptível de ser repetitivo.

Mesmo não terem sido identificados cromossomos sexo-específicos nos indivíduos de *T. hispidus* analisados no presente trabalho, os resultados com sonda GA de microssatélites em metáfase fêmea mostraram que os sinais de hibridização positivos foram vistos tanto em regiões centroméricas, quanto em pericentroméricas e teloméricas, o que se assemelha com o resultado de Matsubara et al. (2013). Outra semelhança refere-se a marcações em microcromossomos, mostrado nas sequências GA e GAA.

Um extenso trabalho realizado com espécies de lagartos do gênero *Iberolacerta* Arribas, 1999 (Lacertidae), utilizando iniciadores específicos de satDNA (HindIII e TaqI), mostrou padrões de distribuição semelhantes, típicos de DNA satélites (ROJO et al., 2015). Os resultados deste trabalho mostraram que nas espécies *Iberolacerta monticola* (Boulenger, 1905), *Iberolacerta galani* Arribas, Carranza & Odierna, 2006 e *Iberolacerta bonnali* (Lantz, 1927) as sondas de DNA HindIII obtiveram sinais de hibridização nas regiões centroméricas de todos os cromossomos, variando apenas quanto à intensidade de sinais em diferentes pares de cromossomos. Quanto à sonda TaqI, as espécies *I. monticola*, *I. galani* e *I. bonnali* evidenciaram sinais luminosos em posições intersticiais em 20, 18 e 10 de cromossomos meta e submetacêntricos, respectivamente. Já na espécie *Iberolacerta horvathi* (Méhely, 1904) fortes

sinais de hibridização foram observados em posições intersticiais em apenas seis cromossomos (ROJO et al., 2015). O presente trabalho corroborou com os resultados obtidos para a espécie *T. hispidus* utilizando sondas de microssatélites.

Em espécies de peixes do gênero *Leporinus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Amostomidae) sinais de hibridização positivos foram observados nas regiões telômericas dos cromossomos quando utilizadas as sequências de microssatélites GA, CA e GAA, enquanto que a sequência CAG mostrou sinais fracos, acumulados em alguns telômeros (POLTRONIERI et al., 2013). Para a espécie *Abracris flavolienata* (De Geer, 1773) (Orthoptera, Acridoidea) foram observados sinais de hibridização positiva de sondas de microssatélites mostrando tanto espalhados quanto específicos em vários cromossomos, formando blocos evidentes, como também sinais exclusivamente dispersos (MILANI; CABRAL DE MELO, 2014). Conforme observado, o presente estudo fornece dados semelhantes ao já visto neste grupo de invertebrados.

Estas semelhanças entre os resultados mostram que o padrão de distribuição dos sinais de hibridização de microssatélites é comum, uma vez que são indivíduos de grupos bastante distintos, mostrando essas sequências em telômeros, centrômeros e blocos geralmente relacionados à heterocromatina constitutiva, reforçando a ideia de que, independentemente do grupo, as regiões heterocromáticas apresentam sequências de DNA repetitivo de diferentes classes, dentre essas sequências de microssatélites.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse trabalho demonstram a diversidade de caracteres presentes em espécies comuns da caatinga brasileira. As informações coletadas de indivíduos de *T. hispidus* permitiram concluir que as espécies de proveniência da região de Picos, Piauí, apresentam:

- cariótipo estável, reforçando a ideia de conservação cromossômica, divergindo de outros estudos quanto a evidência de cromossomos sexuais heteromórficos e quanto à presença da constrição secundária.
- o padrão de heterocromatina constitutiva foi o mesmo relatado em outros estudos, assim como também a distribuição das regiões organizadoras de nucléolos, continuando estável para a espécie estudada, confirmada através da sonda DNAr 18S.
- quanto as sondas teloméricas, DNAr 18S e de microssatélites seus resultados obtidos foram de suma importância por ser o primeiro registro para a espécie em estudo.

- os resultados com as sondas teloméricas demonstraram a efetividade destes marcadores em registrar eventos passados da história evolutiva do grupo, corroborando trabalhos desenvolvidos com outros grupos de lagartos do velho mundo.
- estudos com microssatélites mostram se promissores neste grupo de lagartos. As sequencias utilizadas evidenciaram resultados com sinais específicos em regiões teloméricas e pericentroméricas dos macrocromossomos e em alguns microcromossomos, semelhantes a outros estudos com grupos diferentes.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, M. P. et al. **Estudo da degradação das terras - município de Picos – PI.** In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, n. 13., 2007, Florianópolis. Anais. Florianópolis: INPE, 2007. p. 4357-4363.
- BEÇAK, M. L.; BEÇAK, W.; DENARO, L. Chromosome polymorphism, geographical variation and karyotypes in Sauria. **Caryologia**, v. 25, p 313-326, 1972.
- BENÍCIO, R. A.; FONSECA, M. G. **Herpetofauna do município de Picos, estado do Piauí, nordeste brasileiro.** In: IX Congresso Latino Americano de Herpetologia / V Congresso Brasileiro de Herpetologia, 16 a 22 de julho de 2011. Curitiba, Paraná, Brasil.
- BÉRNILS R. S.; COSTA H. C. **Répteis brasileiros: Lista de espécies.** 2012. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acessado em: 27 jan. 2015.
- _____. **Répteis brasileiros: Lista de espécies.** 2014. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acessado em: 21 out. 2015.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 1, p. 103-120, 1978.
- BERTOLOTTO, C. E. V. **Uniformidade e Variabilidade cariotípica em 14 espécies de lagartos das famílias Polychrotidae e Tropicuridae.** 1999. 177 f. Dissertação (mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- _____. **Enyalius (Leiosauridae, Squamata):** O que os dados moleculares e cromossômicos revelam sobre esse gênero de lagartos endêmicos do Brasil? 2006. 139 f. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Biologia e Genética Evolutiva, São Paulo, 2006.
- BERTOLOTTO, C.E.V. et al. Comparative cytogenetic analysis with differential staining in three species of *Liolaemus* (Squamata, Tropicuridae). **Hereditas**, v. 125, p. 257–264, 1996.
- BULL, J. J. Sex determination in reptiles. **The quarterly review of biology**, v. 55, p. 3-21, 1980.
- _____. Evolution of Sex Determining Mechanisms. **Benjamin/Cummings**, Menlo Park, California, 1983.
- CARVAJAL - TORRES, O. The abdominal skeleton of Tropicuridae lizards (Squamata: Tropicuridae). **Herpetologica**, v. 60, p. 75-83, 2004.
- CARVALHO, N. D. M. et al. Cytogenetic analyses of five amazon lizard species of the subfamilies Teiinae and Tupinambinae and review of karyotyped diversity the family Teiidae. **Comparative Cytogenetics**, v. 9 (2), p. 625–644, 2015.
- CHARLESWORTH, B.; SNIÉGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215- 220, 1994.

CHARNIER, M. Action of temperature on the sex ratio in the *Agama agama* (Agamidae, Lacertilia) embryo. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales**, v. 160, p. 620–622, 1966.

EZAZ, T. et al. Sex Chromosome Evolution in Lizards: Independent Origins and Rapid Transitions. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 127, p. 249-260, 2009.

FREITAS, M. A.; SILVA, T. F. S. Guia ilustrado: **A herpetofauna das caatingas e áreas de altitudes do nordeste brasileiro**. Pelotas, USEB, p. 384, 2007.

GAZONI, T. **Marcadores citológicos no cariótipo de espécies de *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) analisado com técnicas de citogenética clássica e molecular**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, São Paulo, 2011.

GOMES, L. F. 1995. **Estudos citogenéticos em vespas do gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae, Trypoxylonini)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 80, 1995.

GONZALEZ, L. A.; BONILLA, A.; VELASQUEZ, J. Cariotipo del lagarto *Tropidurus hispidus* (Sauria: Tropiduridae) em el Oriente de Venezuela. **Acta Biológica Colombiana**. Colombia, v. 16, n. 2, p. 121-133, 2011.

GORMAN, G. C.; ATKINS, L. HOLZINGER, T. New karyotypic data on 15 genera of lizards in the family Iguanidae, with a discussion of taxonomic and cytological implications. **Cytogenetics**, v. 6, p. 286-299, 1967.

GORMAN, G. C. The chromosomes of the Reptilia, a cytotaxonomic interpretation. In: A. B. Chiarelli & Capanna (eds), **Cytotaxonomy and vertebrate evolution**. Academic Press, New York, p. 349-424, 1973.

GUERRA, M. **Introdução a Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.

_____. **Fish. Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

HEYWOOD, V. H.; IRIONDO, J. M. Plant conservation: old problems, new perspectives. **Biological Conservation**, v. 113, p. 321-335, 2003.

HOWELL, W. M., BLACK, D. A. Controlled silver staining of the nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, p. 424–429, 1996.

KASAHARA, S. Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. **Sociedade Brasileira de Genética**. Ribeirão Preto. 1 ed., p.160, 2009.

KASAHARA, S.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M.T. Karyotype and evolution of the *Tropidurus nanuzae* species group (Sauria, Iguanidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 10, p. 185-197, 1987a.

_____. Geographical karyotypic variations and chromosome banding patterns in *Tropidurus hispidus* (Sauria, Iguanidae). **Caryologia**, v. 40, p. 43-57, 1987b.

KASAHARA, S.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Variabilidade no número de regiões organizadoras de nucléolos em *Tropidurus torquatus* (Sauria, Iguanidae). **Ciência e Cultura**, v. 40, p. 761, 1988.

KASAHARA, S.; PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Comparative cytogenetic studies of eleven species of the *Tropidurus torquatus* group (Sauria, Tropiduridae), with banding patterns. **Hereditas**, v. 125, p. 37–46, 1996.

KASAHARA, S. et al. Chromosome mechanisms of sex determination, G- and C band patterns and nucleolus organizer regions in *Tropidurus torquatus* (Sauria: Iguanidae). **Genetica**, v. 60, p. 151-156, 1983.

KING, M. Chromosome change and speciation in lizards. In: ATCHLEY, W. R.; WOODRUFF, D. S. **Evolution and Speciation**, University Press, Londn, Cambridge p. 262-285, 1981.

KUBAT, Z; HOBZA, R; VYSKOT, B; KEJNOVSKY, E. Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene Latifolia*. **Genome**, v. 51, p. 350-356, 2008.

LEVAN A., et al. Nomenclature of centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

MATSUBARA, K. et al. Karyotypic analysis and FISH mapping of microsatellite motifs reveal highly differentiated XX/XY sex chromosomes in the pink-tailed worm-lizard (*Aprasia parapulchella*, Pygopodidae, Squamata). **Bio Med. Molecular Cytogenetics**, p.7, 2013.

MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Microsatellite Organization in the Grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) Revealed by FISH Mapping: Remarkable Spreading in the A and B Chromosomes. **PLoS ONE**, v. 9(5), e97956, 2014.

MOLINA, W. F.; JACOBINA, U. P. Protocolos citogenéticos e perspectivas biotecnológicas voltadas à piscicultura marinha e conservação. **Biota Amazônia**, v. 3, n.2, p. 155-168, 2013.

NORTHLAND, I.; CAPETILLO, J.; ITURRA, P.; VELOSO, A. Estudios morfológicos y cromosomicos em el género *Tropidurus* (Iguanidae) del norte del Chile. **American Museum of Natural History**, v. 18, p. 115-222, 1987.

OLIVEIRA, E. H. C. et al. Reciprocal chromosome painting between white hawk (*Leucopternis albicollis*) and chicken reveals extensive fusions and fissions during karyotype evolution of Accipitridae (Aves, Falconiformes). **Chromosome Research**, v. 18, p. 349–355. 2010.

- OLMO, E. Reptilia. In: Animal Cytogenetics (ed. B. Jounh) Berlim, Gebruder, **Borntraeger**, p. 1-100, 1986.
- ORR, R. T. **Biologia dos vertebrados**. Répteis. Classificação dos Répteis. São Paulo: Roca, ed. 5, p. 508, 1986.
- PAULL, D.; WILLIAMS, E. E.; HALL, P. Lizard Karyotypes from the Galapagos Islands: Chromosomes in phylogeny and evolution. **Breviora, Museum of Comparative Zoology**, Cambridge. n. 441, 31 f., 1976.
- PECCININI- SEALLE, D. Chromosome variation in populations of *Cnemidophorus lemniscatus* in the Amazonas Valey. **Ciência e Cultura**, v. 23(2), p. 133-136, 1976.
- PELLEGRINO, K. C. M. **Caracterização cromossômica em 16 espécies das famílias Tropiduridae, Polychrotidae e Gekkonidae (Sauria) pela aplicação de técnicas de coloração diferencial**. São Paulo, 172. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1993.
- _____. **Diversidade cariotípica e evolução cromossômica em lagartos das famílias Gymnophthalmidae e Gekkonidae (Squamata): Evidencias baseadas em coloração diferencial e hibridização in situ fluorescente (FISH)**. São Paulo, 137p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1998.
- PELLEGRINO, K. C. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Cytogenetic studies in six species of Tropiduridae (Sauria). **Revista Brasileira de Genética**, v. 17, p. 401-408, 1994.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.
- POLTRONIERI, J. et al. Comparative Chromosomal Mapping of Microsatellites in *Leporinus* Species (Characiformes, Anostomidae): Unequal Accumulation on the W Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**. DOI: 10.1159/000355908, 2013
- PORTER, C. A.; MEREDITH, J. H.; SITES, J. W. JR.; BAKER, R. J. Location of ribosomal DNA in chromosomes of squamate reptiles: systematic and evolutionary implications. **Herpetologica**, v. 27, p. 271–280, 1991.
- POUGH, H. F. et al. **Herpetology**. 2 ed., New Jersey, Prentice Hall, 2001.
- POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. Os Lepidosauria: Tuatara, Lagartos e Serpentes. A irradiação dos Squamata. São Paulo: Atheneu. ed. 4, p. 684, 2008.
- QUINN, A. E. et al. Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. **Science**, v. 316, p. 411, 2007.
- RADDER, R. S. et al. Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. **Biology Letters**, v. 4, p. 176–178, 2008.

RODRIGUES, M. T. Sistemática, Ecologia e Zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo *torquatus* ao sul do Rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). **Arquivos de Zoologia**, v. 31, p. 105-230, 1987.

_____. **Herpetofauna da Caatinga**. Ecologia e Conservação da Caatinga. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, n. 56, 1989.

_____. **Herpetofauna da Caatinga**. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e Conservação da Caatinga. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 181–236, 2003.

RODRIGUES, M.T. et al. Phylogenetic relations hips of a new genus and species of microteiid lizard from the Atlantic forest of north-eastern Brazil (Squamata, Gymnophthalmidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**. n. 144, p. 543–557, 2005.

ROJO, V. et al. Evolutionary dynamics of two satellite DNA families in rock lizards of the genus *Iberalacerta* (Squamata, Lacertidae): different histories but common traits. **Chromosome Research**, 2015.

ROVATSOS, M. et al. Interstitial Telomeric Motifs in Squamate Reptiles: When the Exceptions Outnumber the Rule. **PLoS ONE**, v. 10(8): e0134985, 2015.

SANTOS, R.M.L. **Estudos evolutivos em espécie de lagartos da família Teiidae (Squamata) com base em dados citogenéticos e moleculares**. 2007. 191 f. Tese (Doutorado) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia e Genética Evolutiva, São Paulo, 2007.

SCHLOTTERER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. **Nature**, v. 354, p. 63-65, 1991.

SIQUEIRA, S. et al. Unusual intra-individual karyotypical variation and evidence of cryptic species in Amazonian populations of *Pristimantis* (Anura, Terrarana). **Hereditas**, v. 146, p. 141-151, 2009.

SOLA, L.; MONACO, P. J.; RASCH, E. M. Cytogenetic of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. I. C-bands, Ag-NOR polymorphisms, and sex chromosomes in three populations of *Poecilia latipinna*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 53, p. 148-154, 1990.

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

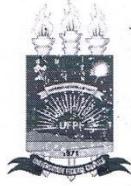
TÓTH, G; GÁSPARIZ; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-981, 2000.

UETZ, P. 2015. **The Reptile Database**. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acessado em 20 mai. 2015.

_____. 2016. **The Reptile Database**. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acessado em 21 jan. 2016.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. 1993. Ecological observations on Cerrado Lizards in Rondônia, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 27, p.46-52, 1993.

YONENAGA-YASSUDA, Y. et al. High-resolution RBG-banding pattern in the genus *Tropidurus* (Sauria, Iguanidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 48, p. 68-71, 1988.



TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
 “JOSÉ ALBANO DE MACEDO”

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
 () Dissertação
 (X) Monografia
 () Artigo

Eu, Ana Paula de Araújo Vieira,
 autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de
 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar,
 gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação
Estudo Citogenético em Trepidurus hispidus
(Spix, 1825) (Squamata, Trepideridae) da região de Picos, PI.
 de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título
 de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI 06 de Abril de 2016.

Ana Paula de Araújo Vieira
 Assinatura
Ana Paula de Araújo Vieira
 Assinatura