

LUCIANO FARIAS SOUZA

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MAPEAMENTO FÍSICO DE
MARCADORES MOLECULARES NO CARIÓTIPO DE *Rhinoclemmys*
punctularia (TESTUDINES, GEOEMYDIDAE)

Belém – PA

2016

LUCIANO FARIAS SOUZA

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MAPEAMENTO FÍSICO DE
MARCADORES MOLECULARES NO CARIÓTIPO DE *Rhinoclemmys*
punctularia (TESTUDINES, GEOEMYDIDAE)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao colegiado do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Renata Coelho Rodrigues Noronha

Laboratório de Citogenética – ICB - UFPA

Belém – PA

2016

LUCIANO FARIAS SOUZA

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MAPEAMENTO FÍSICO DE
MARCADORES MOLECULARES NO CARIÓTIPO DE *Rhinoclemmys*
punctularia (TESTUDINES, GEOEMYDIDAE)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao colegiado do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a Dr^a. Renata Coelho Rodrigues Noronha

Laboratório de Citogenética, UFPA

Avaliador: Prof^a. Msc. Stella Miranda Malcher

Laboratório de Citogenética, UFPA

Avaliador: Prof^a. Msc. Thayse Cristine Melo Benathar

Laboratório de Citogenética, UFPA

Belém – PA

2016

“Se você não sabe aonde quer ir
qualquer caminho serve”

Lewis Carroll

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as graças conquistadas durante a minha jornada até aqui.

A minha orientadora Prof^a Dr^a. Renata Coelho Rodrigues Noronha pela oportunidade de estágio já no primeiro ano de graduação e por todos os ensinamentos, orientação e colocações que só enriqueceram o meu trabalho e contribuíram para o meu amadurecimento na pesquisa.

Aos professores coordenadores do laboratório de citogenética Prof^a Dr^a. Cleusa Yoshiko Nagamachi e Prof. Dr. Julio Cesar Pieckzarka pelo apoio e infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora Msc. Talita Fernanda Ribas “*primer*” por ensinar os princípios das técnicas empregadas no laboratório e por toda ajuda intelectual.

Ao médico Aldomar Monteiro *in memoriam* por ter possibilitado a coleta de sangue dos animais em seu parque zootônico.

Ao Msc. Jorge Rissino por me ajudar na parte de cultura de células proporcionando todo conhecimento necessário para a pesquisa direcionada ao cultivo celular.

Aos meus queridos colegas da sala de cultura celular: Carlos Eduardo Bastos, Karina Mota, Clara Porfírio (Cormura), Tássia Alana, Luana Calandrini (sempre antiga) e Vinicius Carvalho que foram pessoas com as quais pude contar durante a realização deste trabalho e que me proporcionaram muitos momentos divertidos.

A todos os colegas do laboratório de citogenética que me ajudaram de alguma maneira: Conceição, Shirley, Willam, Marlyson, Jéssica, Monique, Vergiana, Manoella entre outros.

A toda a minha família, em especial a minha mãe Maria de Assunção e a minha irmã Lohanna Souza que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida me dando apoio e acreditando em mim desde sempre.

A minha amiga de graduação Paula Machado pelo aprendizado mútuo e companheirismo.

Aos meus professores da graduação que contribuíram para a minha formação profissional e ética.

A todos os órgãos de apoio e financiamento envolvidos durante a realização desse trabalho: UFPA, FADESP, FAPESPA, Vale do Rio Doce, CAPES, CNPQ.

Sumário

RESUMO.....	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A ORDEM TESTUDINES.....	1
1.2 A FAMÍLIA GEOEMYDIDAE	3
1.3 ESTUDOS CITOGENÉTICOS NO GÊNERO <i>Rhinoclemmys</i>	3
1.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS DNAs REPETITIVOS.....	5
1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE <i>Rhinoclemmys punctularia</i>	6
2. JUSTIFICATIVA	7
3. OBJETIVOS	8
3.1 OBJETIVO GERAL	8
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	8
4.1. COLETA DA AMOSTRA	8
4.2. CULTURA TEMPORÁRIA DE LINFÓCITOS	9
4.3. CITOGENÉTICA CLÁSSICA.....	9
4.3.1. Preparação citológica das lâminas	9
4.3.2. Técnica de coloração convencional.....	10
4.3.3. Técnica de bandeamento G.....	10
4.3.4. Técnica de Bandeamento C	11
4.3.5. Técnica de detecção da NOR por AgNO ₃	11
4.5. CITOGENÉTICA MOLECULAR.....	12
4.5.1. Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH) com sondas de DNA repetitivo	12
4.5.2. Lavagem de estringência.....	13
4.5.3. Detecção.....	13
4.5.4. Captura de imagens e montagem dos cariótipos.....	14
5. RESULTADOS	14
6. DISCUSSÃO	18
7. CONCLUSÃO.....	22
8. REFERÊNCIAS.....	22

RESUMO

O gênero *Rhinoclemmys* pertence à família Geoemydidae e é o único dessa família que ocorre na América Central e do Sul. Atualmente é composto por 9 espécies das quais 7 foram analisadas citogeneticamente. Estudos de elementos de DNA repetitivo vêm auxiliando na compreensão da evolução genômica de determinadas espécies. Assim, a análise desses elementos e sua distribuição nos cromossomos pode favorecer a compreensão da diversidade e evolução cariotípica de quelônios, bem como elucidar problemas taxonômicos. No presente trabalho foi realizado um estudo citogenético da espécie *Rhinoclemmys punctularia* por meio de técnicas de citogenética clássica e molecular (bandeamentos G, C, Ag-NOR e hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) com sondas de famílias multigênicas: DNA ribossomal 45S e histona H3; sondas teloméricas (TTAGGG)_n e elementos transponíveis: transposon *Mariner* e retrotransposon *Rex1*. *R. punctularia* apresentou um cariótipo com 2n=56 e NF= 72. O padrão de bandeamento G permitiu a identificação precisa dos homólogos e revelou um heteromorfismo no segundo par do grupo A de um dos espécimes. A Heterocromatina Constitutiva (HC) foi observada em três pares de cromossomos (na região terminal de 2 macrocromossomos e em 1 par de microcromossomos). A FISH com rDNA 45S evidenciou sinais coincidentes com a NOR, marcando 1 par de microcromossomos. As sondas com sequências teloméricas (TTAGGG)_n hibridizaram nas extremidades de todos os cromossomos. A sequência *Mariner* hibridizou na maior parte dos macrocromossomos e foi evidenciada no par 2 heteromórfico. *Rex1* apresentou-se distribuído em blocos na região centromérica de 3 cromossomos e a histona H3 mostrou um padrão de marcação disperso ao longo dos cromossomos. A análise citogenética de *R. punctularia* mostra pela primeira vez a organização de elementos transponíveis por FISH nessa espécie. Essa dinâmica organizacional pode contribuir para a compreensão da regulação gênica do grupo. Sugerimos que o processo de rearranjo do tipo inversão pericêntrica pode ter levado à variação intraespecífica (par heteromórfico) da espécie.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A ORDEM TESTUDINES

A ordem Testudines é considerada uma das mais antigas linhagens entre os vertebrados atuais com a mais remota evidência fóssil datada no período Permiano há aproximadamente 280 milhões de anos atrás (Ferri, 2002). Atualmente encontra-se dividida em duas subordens: Cryptodira e Pleurodira, que diferem por características morfológicas e funcionais. O clado Cryptodira inclui a maior parte das espécies, no qual os animais retraem a cabeça para o interior do casco por meio de uma flexão vertical das vértebras do pescoço, enquanto que os representantes da subordem Pleurodira realizam essa flexão de forma lateral e horizontal em relação ao casco (Fig.1)

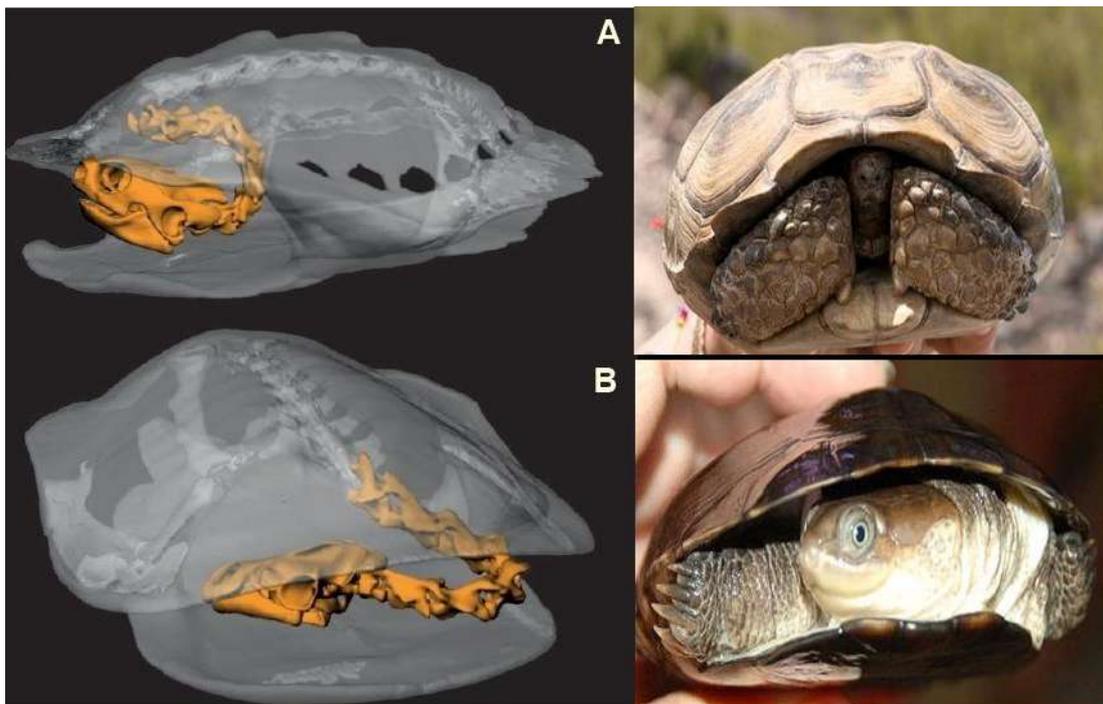


Figura 1 - A) Cryptodira B) Pleurodira. Adaptado de Werneburg et al. (2014).

Entre suas principais características os quelônios apresentam órgãos corporais internos a uma carapaça, crânio sem fenestras na região temporal (Anapsidas), osso quadrado móvel e boca margeada por um bico córneo com ausência de dentes (Cabrera, 1998). Segundo Gilbert et al. (2001), a presença do

casco é a característica mais distintiva de um quelônio sendo este constituído por uma porção dorsal convexa (carapaça) e uma região ventral geralmente achatada (plastrão). A carapaça é formada a partir da fusão das costelas, vértebras e de diversos elementos de ossificação dérmica ao passo que o plastrão origina-se anteriormente por meio de clavículas e interclavículas e posteriormente por costelas abdominais (Pough et al., 1993).

Testudines abriga 15 famílias e cerca de 320 espécies (Fritz & Havas, 2013), as quais podem ser encontradas em mares e continentes com exceção da Antártida. A fauna de quelônios na América do Sul é bastante rica e diversificada contendo, segundo Iverson (1992), um percentual de 20% do total de quelônios existentes.

O Brasil possui 36 espécies e destas 29 são de água doce, 5 marinhas e 2 terrestres. Na Amazônia brasileira são encontradas 17 espécies que estão distribuídas em cinco famílias. Três são da subordem Cryptodira (Geoemydidae, Kinosternidae e Testudinidae) e duas da subordem Pleurodira (Chelidae e Podocnemidae) (Pough et al., 2001; Vogt, 2008; Van DIJK et al., 2014, RAN-ICMBio, 2009).

Os quelônios apresentam uma grande diversidade de estratégias alimentares, que variam entre as diferentes famílias e espécies (Belkin e Gans, 1968; Pritchard, 1984; Malvasio et al., 2002). Em relação aos aspectos reprodutivos, pode-se destacar que são animais ovíparos (Santos, 1994) e depositam seus ovos em diferentes ambientes terrestres como praias fluviais ou costeiras, solo barroso e areno-argiloso, nas proximidades de corpos d'água ou em meio à vegetação (Ernst e Barbour, 1989; Ferri. 2002). Segundo Ferreira Jr. (2009), os principais fatores ambientais que influenciam na determinação do sexo são a temperatura, umidade e as trocas gasosas.

1.2 A FAMÍLIA GEOEMYDIDAE

A família Geoemydidae compreende 23 gêneros e 73 espécies sendo assim considerada a maior família de quelônios do mundo. Iverson (1992) destaca que essa família reúne cerca de 25% do total de espécies da ordem Testudines e os seus representantes são em sua grande maioria de água doce com espécies aquáticas, semiaquáticas e também terrestres. No entanto, podem ser encontrados em áreas costeiras marinhas e florestas tropicais. A família apresenta uma vasta distribuição pelo “velho mundo” com ocorrência na Europa, Norte de África, Índia, Sul da Rússia e nas Filipinas com apenas o gênero *Rhinoclemmys* presente na América Central e no norte de América do Sul.

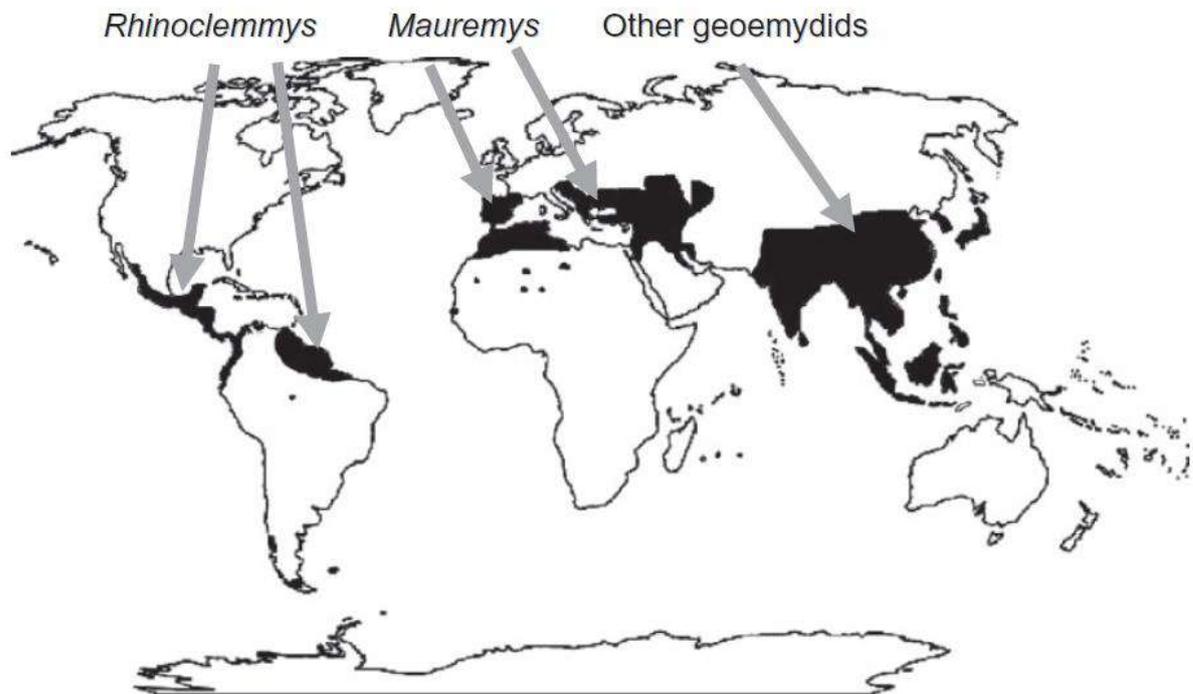


Figura 2 – Distribuição geográfica da família Geoemydidae. Fonte: Le & Meccord (2008).

1.3 ESTUDOS CITOGENÉTICOS NO GÊNERO *Rhinoclemmys*

O gênero *Rhinoclemmys* pertence à família Geoemydidae e é composto por 9 espécies: *R. nasuta*, *R. rubida*, *R. pulcherrima*, *R. anulata*, *R. areolata*, *R.*

melanosterna, *R. funerea*, *R. punctularia* e *R. diademata*. Dentre as quais, apenas sete foram analisadas citogeneticamente, e destas, duas são subespécies de *Rhinoclemmys pulcherrima* (*Rhinoclemmys p. incisa* e *Rhinoclemmys p. manni*). Carr & Bickham (1986) encontraram um número diplóide de $2n=52$ para a maioria das espécies do gênero, exceto *Rhinoclemmys punctularia*, que possui $2n=56$ (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies do gênero *Rhinoclemmys* caracterizadas citogeneticamente.

Espécie	2n	Fonte
<i>Rhinoclemmys annulata</i>	-	-
<i>Rhinoclemmys areolata</i>	52	Carr, 1981
<i>Rhinoclemmys diademata</i>	-	-
<i>Rhinoclemmys funerea</i>	52	Killebrew, 1977a; Carr, 1981
<i>Rhinoclemmys Melanosterna</i>	52	Killebrew, 1977a
<i>Rhinoclemmys nasuta</i>	-	-
<i>Rhinoclemmys punctularia</i>	56	Barros et al., 1975; Bickham and Baker, 1976a, b
<i>Rhinoclemmys pulcherrima</i>		
<i>Rhinoclemmys p. incisa</i>	52	Carr & Bickham, 1986
<i>Rhinoclemmys p. manni</i>	52	Carr & Bickham, 1986
<i>Rhinoclemmys rubida</i>	52	Carr, 1981

Estudos citogenéticos no gênero *Rhinoclemmys* ainda são escassos e parte dos trabalhos encontrados na literatura limita-se a análises por citogenética clássica. Guerra (2004) ressalta que no grupo dos répteis dados de bandeamento cromossômico clássico e molecular ainda não desempenham papel relevante na literatura, devido às dificuldades em se obter bons índices mitóticos e problemas na padronização das técnicas. Análises citogenéticas são de grande importância para a

compreensão da evolução de um grupo, podendo atuar em conjunto ou de forma complementar na sistemática e taxonomia (Viana, 2015).

1.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS DNAs REPETITIVOS

O genoma de eucariotos é composto, em grande parte, por DNAs repetitivos, que são segmentos de DNA de tamanhos variados e que se repetem em dezenas ou milhares de vezes pelo genoma (Griffiths et al, 2006). Os DNAs repetitivos incluem as famílias multigênicas, as sequências organizadas *in tandem* e as sequências dispersas. As famílias multigênicas são sequências compostas por DNAs codificantes como as famílias de DNAs ribossomais e os genes das histonas (Sumner, 2003). As sequências de DNA ribossomal (rDNA) são amplamente utilizadas em diversos estudos e na maioria dos eucariotos são organizadas *in tandem* em dois grupos distintos, são eles: rDNA 45S e rDNA 5S. Guerra (2004) destaca que o rDNA 45S, que compreende a unidade transcricional maior, é uma sequência moderadamente repetida que forma blocos com muitas repetições em um ou mais pares cromossômicos. Cada unidade de repetições possui três cistrons (rDNA 18S+5,8S+28S) com seus espaçadores intergênicos sempre transcritos juntos em um único mRNA. Ao passo que o rDNA 5S forma a unidade transcricional menor que transcreve para o rRNA 5S onde cada unidade é separada das demais pelo espaçador não transcrito (Long & Dawid, 1980).

A família multigênica que codifica as proteínas histônicas, de maneira geral, pode ser organizada em um único *cluster* formado por todas as sequências histônicas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) espaçadas por sequências de DNA não-codificante como encontrado no genoma de *Drosophila melanogaster*. Estes mesmos genes podem apresentar uma distribuição de forma individual, como já foi observado em *Gallus domesticus*, ou formando um grupo de genes (humanos e roedores). Porém, esses dois tipos de organização podem ser encontrados no mesmo organismo como observado em *Xenopus laevis* (Lifton et al., 1977; Engel e Dodgson, 1981; Ruberti et al., 1982; Cabral-de-Melo & Martins, 2010).

Outro grupo de DNAs repetitivos são os telômeros, os quais são formados por sequências especializadas localizadas na região terminal dos cromossomos, que têm como finalidade preservar a integridade e estabilidade do genoma (Blackburn, 2001). Sob o ponto de vista citogenético as sondas teloméricas podem ser úteis para testar hipóteses de evolução cromossômica em diversos casos, mais precisamente, naqueles onde se verificam rearranjos entre cromossomos (Phillips e Reed, 1996).

Com relação ao DNA repetitivo disperso sabe-se que os elementos transponíveis compreendem boa parte do genoma de eucariotos. Em humanos, por exemplo, estes representam 40% do genoma (Böhne et al., 2008). Os elementos transponíveis são classificados em duas principais classes de acordo com seu mecanismo de transposição: elementos que transpõem através de uma cópia de RNA (retrotransposons ou elementos de classe I) e elementos que transpõem através de uma cópia de DNA (transposons ou elementos de classe II) (Charlesworth et al., 1994). O mapeamento de sequências de DNA repetitivos em quelônios pode fornecer importantes informações acerca da organização genômica desses animais, sendo esta abordagem ainda insipiente para esses organismos.

1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE *Rhinoclemmys punctularia*

A espécie *Rhinoclemmys punctularia*, popularmente conhecida como perema ou aperema, é um quelônio semiaquático que possui os membros do corpo de cor amarela com pontos pretos espalhados e um padrão de listras que ficam localizadas atrás da região occipital que podem ser vermelhos ou laranjas podendo apresentar variações de coloração. A carapaça tem coloração escura e o plastrão é preto com as bordas amarelas (Fretey, 1977; Fretey et al, 1977; Ernest, 1978).



Figura 3 - À esquerda: *Rhinoclemmys punctularia*. À direita: vista ventral (plastrão) (Fonte: www.google.com.br/research).

A espécie apresenta uma ampla distribuição ocorrendo no extremo leste da Venezuela, em Trinidad, nas Guianas exceto em regiões montanhosas, no Suriname e na bacia amazônica, tendo registros também no leste do Rio Grande do Norte (Pritchard & Trebbau, 1984; Baía Júnior & Guimarães, 2004; Rueda-Almoxid et al., 2007). *Rhinoclemmys punctularia* possui poucos dados citogenéticos descritos na literatura e nenhuma análise utilizando marcadores moleculares.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos sobre a ecologia e taxonomia de quelônios têm sido realizados. No entanto, poucos são os trabalhos desenvolvidos nesse grupo sob o ponto de vista citogenético. Desse modo, são limitados os dados publicados sobre a morfologia dos cromossomos e a evolução cariotípica entre os Testudines. A citogenética é capaz de fornecer dados que podem levar a possíveis conclusões sobre os mecanismos cromossômicos, como inversões (pericêntricas e paracêntricas), translocações, fusões e fissões, capazes de esclarecer aspectos evolutivos das espécies (Guerra, 1988). Portanto, estudos citogenéticos em quelônios visam contribuir para a compreensão de possíveis mudanças estruturais (que levariam a eventos como rearranjos cromossômicos) e auxiliar na construção de filogenias para um melhor entendimento da história evolutiva do grupo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Mapear por citogenética clássica e molecular a espécie *Rhinoclemmys punctularia* com enfoque na organização e evolução de famílias multigênicas (rDNA e genes de histona) e elementos de transposição.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a cultura temporária de linfócitos para análise de células mitóticas de *Rhinoclemmys punctularia* e padronizar a metodologia para quelônios.
- b) Estabelecer o padrão de bandas G e C e localizar as NORs.
- c) Analisar famílias multigênicas (rDNA 45S e genes de histona H3) e elementos de transposição (*Rex1* e *Mariner*) para compreensão da dinâmica de organização genômica.
- d) Identificar a distribuição de sequências teloméricas (TTAGGG)_n.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados cinco exemplares da espécie *Rhinoclemmys punctularia* provenientes do Parque Zoobotânico do município de Capitão Poço-Pa com a autorização do SISBIO (Nº 42642 – 1).

4.1. COLETA DA AMOSTRA

Para a obtenção de células para o cultivo celular foi realizada a coleta de sangue periférico das amostras por meio de punção venosa da região caudal.

4.2. CULTURA TEMPORÁRIA DE LINFÓCITOS

A obtenção dos cromossomos metafásicos deu-se pela técnica de cultura temporária de linfócitos segundo Moorhead et al (1960). Primeiramente fez-se a coleta de 5 mL de sangue do animal com o auxílio de uma seringa previamente heparinizada. Logo após, foram semeadas de 18-23 gotas de sangue total em alíquotas contendo 5 mL de meio RPMI 1640 para posterior encubação em estufa de CO₂ à 37°C por um período de 72 horas. Após 71 horas de cultivo adicionou-se 100 µL de colchicina (Gibco® KaryoMAX® Colcemid™ 10 µg/mL) nas alíquotas que logo em seguida retornaram à estufa para completar o tempo do cultivo celular. Encerrado esse tempo, o meio foi transferido para tubos de centrifuga e submetido a uma centrifugação de 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 mL de solução hipotônica (KCl) previamente aquecida à 37°C. O material foi submetido à ressuspensão com o auxílio de uma pipeta Pasteur e encubado na estufa de CO₂ à 37°C por 45 minutos. Após esse tempo, adicionou-se imediatamente 1 mL de Fixador Carnoy na proporção 4:1 para cessar a ação do KCl. O material, então, foi ressuspendido e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. Descartou-se novamente o sobrenadante e foi acrescentado 5 mL de Fixador Carnoy 4:1, em seguida o material foi submetido a uma última ressuspensão e armazenado em *freezer* a -20°C.

4.3. CITOGENÉTICA CLÁSSICA

4.3.1. Preparação citológica das lâminas

As lâminas para microscopia passaram por uma limpeza rigorosa em ultrassom (para remover partículas), foram previamente mantidas em solução de etanol e éter etílico (na proporção 1:1) e armazenadas em *freezer* a -20°C. No momento do uso essas lâminas foram colocadas para secar e, logo após, expirou-se o ar dos pulmões sobre as mesmas e com auxílio de uma micropipeta, pingou-se 10 µl de suspensão celular gelada. O ar que é expirado sobre a lâmina permite um leve

aquecimento que forma uma camada sobre a mesma e no momento que a suspensão celular gelada entra em contato com essa camada, ocorre um choque térmico, proporcionando um melhor espalhamento das metáfases e alongamento dos cromossomos. Ao fim, as lâminas foram postas para secar em temperatura ambiente e armazenadas em *freezer* a -20°C até o momento da aplicação das diferentes técnicas.

4.3.2. Técnica de coloração convencional

A coloração convencional foi realizada utilizando-se Eosina Azul Metileno, Giemsa (Merck) a 5% diluído em tampão fosfato (pH 6,8) durante 5 minutos.

4.3.3. Técnica de bandeamento G

O bandeamento G seguiu o protocolo descrito por Seabright (1971) com modificações. O material ficou em solução de tripsina a 0,1% por um período de 30 a 60 segundos seguido de coloração com corante Wright preparado na proporção 3:1 (3 mL de tampão fosfato (pH 6,8) + 1 mL de Wright) por 2 minutos. Essa técnica seguiu também o protocolo de Verma & Babu (1995), com modificações. As lâminas foram imersas em solução salina 2xSSC em banho-maria à 60°C por 15 minutos e após esse tempo foram mergulhadas em cubetas contendo água destilada gelada e na sequência agitadas em água para a retirada do excesso de sal. Ao final, as lâminas foram postas para secar e coradas com corante Wright na proporção 3:1 por 2 minutos.

4.3.4. Técnica de Bandeamento C

O bandeamento C seguiu o protocolo descrito por Sumner (1972) com algumas modificações. Inicialmente as lâminas ficaram imersas em solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2N por 15 minutos em temperatura ambiente. Após isso, foram lavadas em água destilada e postas para secar. Em seguida foram colocadas em solução aquosa de Hidróxido de Bário (Ba(OH)_2) a 5% entre 30 a 35 segundos em banho-maria a 60°C e na sequência passaram rapidamente pela solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1N. Com o auxílio de uma pisseta, fez-se a lavagem das lâminas com água destilada gelada e as mesmas foram postas para secar à temperatura ambiente. Posteriormente foram mergulhadas em 2xSSC por 10 a 15 minutos em banho-maria a 60°C. Ao fim, as lâminas foram postas para secar novamente e coradas com corante Wright na proporção 3:1 por 1 minuto.

4.3.5. Técnica de detecção da NOR por AgNO_3

As Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) foram detectadas por intermédio de impregnação pelo Nitrato de Prata segundo o protocolo de Howell & Black (1980). Sobre a preparação citológica foram pingadas uma gota de gelatina (preparada com 0,2g de gelatina + 8 mL de água deionizada aquecida a 60°C + 0,20 μL de ácido fórmico) e duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO_3) a 50%. Após a adição dessa solução, o material foi coberto com uma lamínula e as lâminas foram rapidamente invertidas e colocadas em uma câmara úmida devidamente fechada que ficou em banho-maria a 60°C por 2 a 5 minutos até o momento em que a solução na lamínula apresentou uma coloração castanho-dourado. Após isso, as lâminas foram lavadas, postas para secar ao ar e coradas por 1 minuto com o corante Giemsa diluído em tampão fosfato (pH 6,8) na proporção de 3:1 durante 1 minuto.

4.5. CITOGENÉTICA MOLECULAR

Para a Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) utilizou-se sondas teloméricas (TTAGGG)_n segundo o protocolo descrito pelo fabricante (ONCOR), sondas de rDNA 45S (obtidas a partir do genoma de *Triticum aestivum*), Histona H3, *Rex1* e *Mariner*. Foram utilizados *primers* para amplificação (por PCR), de genes ribossomais, sequências parciais dos genes de histona e elementos transponíveis. A amplificação da histona H3 foi realizada por meio de *primers* e metodologia descritos por Colgan (1998). Para o elemento transponível *Rex1* os *primers* foram (RTX1-F1 5'TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC e RTX1-R3 5'TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC). A sequência parcial do transposon *Mariner* foi amplificada com os *primers* MAR-188F (5' ATC TGR AGC TAT AAA TCA CT) e MAR-251R (5' CAA AGA TGT CCT TGG GTG TG) descritos por Lampe et al (2003).

4.5.1. Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) com sondas de DNA repetitivo

As lâminas previamente marcadas em microscópio de contraste de fase foram encubadas em solução de pepsina a 1% (50 mL de HCl 4,8 N para 0,5 mL de pepsina) durante 10 minutos. Esse tratamento é realizado para a retirada de resquícios citoplasmáticos bem como outras impurezas que podem prejudicar o processo de hibridização. Em seguida fez-se a lavagem das lâminas em solução salina 2xSSC por três vezes, deixando-as por 1 minuto em cada vez. Logo em seguida os cromossomos foram submetidos ao processo de desidratação em uma bateria de álcool (70%, 70%, 90%, 90% e 100%) passando 2 minutos em cada álcool, exceto no último álcool da série, onde permaneceram por 20 minutos. Na sequência, as lâminas foram postas para secar ao ar e posteriormente encubadas em estufa a 65°C durante 1 hora. Após a encubação, os cromossomos foram desnaturados em solução de formamida 70% a 62°C durante um tempo de 50 segundos. Após esse tempo, as lâminas foram colocadas em solução de etanol 70% previamente gelado durante 4 minutos para bloquear a ação da formamida. Em seguida, essas lâminas foram novamente imersas em uma bateria de álcool,

desconsiderando o primeiro álcool 70% da série (substituído pelo etanol gelado). As sondas passaram por desnaturação em banho-maria a 70°C durante 15 minutos. Após a desnaturação fez-se a aplicação da solução contendo as sondas sobre os cromossomos desnaturados e estes foram cobertos por lamínulas que foram vedadas com cola PVC. As lâminas foram armazenadas em câmara úmida e encubadas em estufa a 37° durante três dias.

4.5.2. Lavagem de estringência

Após os três dias de encubação seguiu-se a lavagem de estringência que consiste na retirada de marcações inespecíficas. Desse modo, as lâminas foram encubadas em banho-maria a 38°C em solução de formamida 50% por 2 min e 30 segundos, logo após foram imersas em solução salina 2xSSC durante 5 minutos e em seguida foram postas em solução de 4xSSC / Tween por 4 minutos. Em temperatura ambiente, as lâminas passaram por três cubetas contendo a solução de 4xSSC / Tween e ficaram por 3 minutos em cada.

4.5.3. Detecção

As sondas foram marcadas com moléculas repórteres (biotina e digoxigenina), sendo expostas a uma solução de detecção (0,3 µl de CY3 + 200 µl de 4xSSC/Tween para sondas marcadas com biotina e 0,2 µl de FITC + 200 µl de 4xSSC/Tween para sondas marcadas com digoxigenina) e encubadas a 37°C durante 20 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram encubadas em solução de 4xSSC/Tween à temperatura ambiente por três vezes durante 3 minutos cada. Posteriormente pingou-se sobre as lâminas 7 µl de DAPI Antifade Vectashield H-1000 (Vector), colocando-se uma lamínula sobre as lâminas e realizando a retirada do excesso de Antifade com papel absorvente. Em seguida, a lamínula foi selada e levada para observação em microscópio de fluorescência com auxílio do programa

Nis-Elements em microscópio Nikon H550S em objetiva de imersão (aumento de 100x).

4.5.4. Captura de imagens e montagem dos cariótipos

As metáfases convencionais e com bandeamentos foram fotografadas em microscópio Olympus BX41 com a máquina fotográfica Cannon Power Shot acoplada ao microscópio e o *software* utilizado foi o *Applied Spectral Imaging*. Os cariótipos foram montados com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS5 e para a organização dos cromossomos foi adotada a divisão proposta por Bickham (1975) com base no tamanho e posição do centrômero (Grupo A: Macrocromossomos metacêntricos e submetacêntricos; Grupo B: Macrocromossomos subtelocêntricos e telocêntricos; Grupo C: Microcromossomos). As lâminas contendo as preparações cromossômicas utilizadas para FISH foram detectadas a partir de diferentes filtros (Chroma Technology) correspondentes ao comprimento de onda, no espectro da luz visível, que cada um possui. A captura de imagens deu-se por meio da câmera CCD (Axiocam Mm) e a edição dessas imagens (brilho, contraste, sobreposição das camadas etc.) foi realizada com auxílio do programa Adobe Photoshop CS5.

5. RESULTADOS

A partir de análises cariotípicas dos cinco espécimes de *Rhinoclemmys punctularia* foi possível observar que dois indivíduos apresentaram o segundo par do grupo A (2A) heteromórfico composto por um cromossomo subtelocêntrico e o outro metacêntrico e três exemplares não continham esse heteromorfismo, com o 2A formado apenas por cromossomos metacêntricos. O cariótipo com o heteromorfismo (Fig 4. 4A e 4C) apresentou um número diplóide de $2n=56$ e número fundamental $NF=72$, possuindo 24 macrocromossomos e 32 microcromossomos, com fórmula cariotípica de 10 cromossomos metacêntricos, 6 subtelocêntricos, 6 acrocêntricos,

32 microcromossomos e um par heteromórfico (10M : 6ST : 6A : 32m + Heteromórfico 1M+1ST). O cariótipo sem o heteromorfismo (Fig 4. 4B e 4D) diferiu apenas em relação à fórmula cariotípica (12M: 6ST: 6A: 32m). O padrão de bandeamento G possibilitou a identificação das homologias cromossômicas (Fig 4. 4C e 4D).

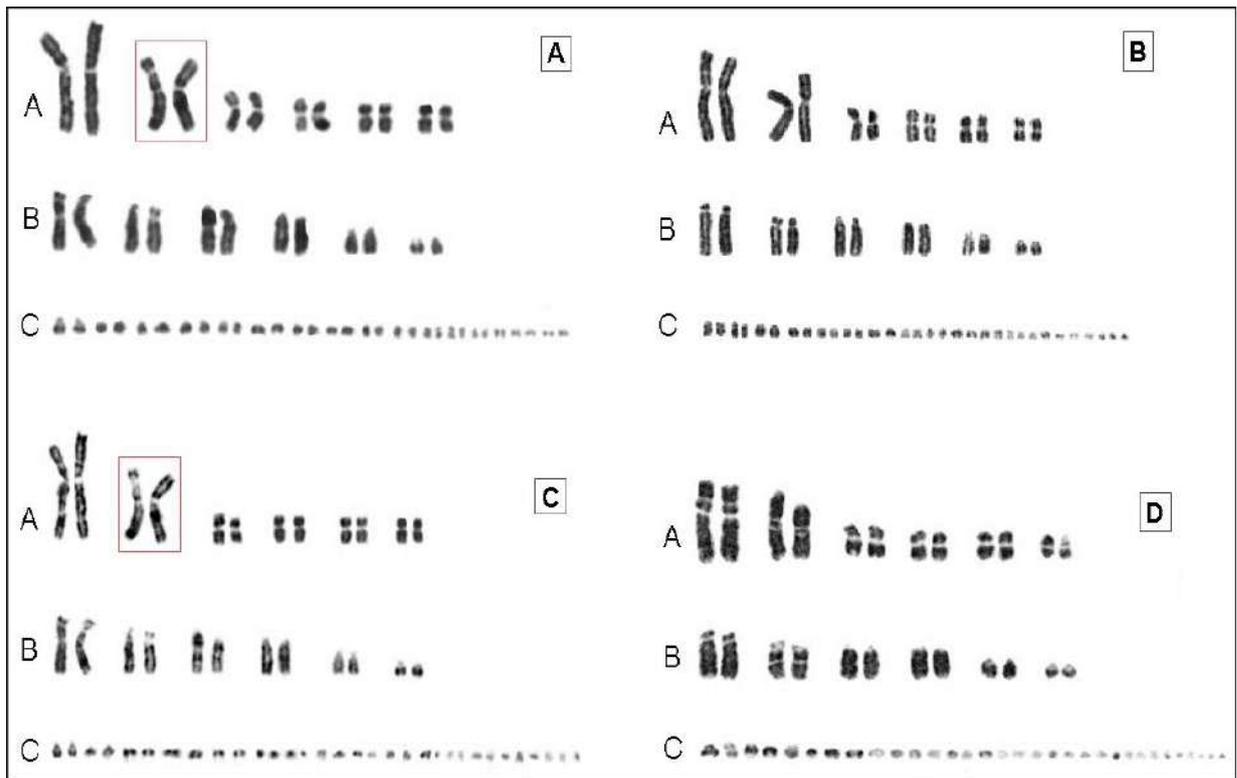


Figura 4 – A) Coloração convencional do cariótipo com o heteromorfismo; B) Coloração convencional do cariótipo sem o heteromorfismo; C) Bandejamento G do cariótipo com o heteromorfismo; D) Bandejamento G do cariótipo sem o heteromorfismo.

O bandejamento C revelou a presença de Heterocromatina Constitutiva (HC) nas regiões terminais de dois macrocromossomos (terceiro par do grupo B e terceiro par do grupo A) e um microcromossomo (Fig. 5A). As regiões organizadoras de nucléolo foram localizadas em dois pares de microcromossomos sendo que uma dessas marcações provavelmente é inespecífica (Fig. 5B).

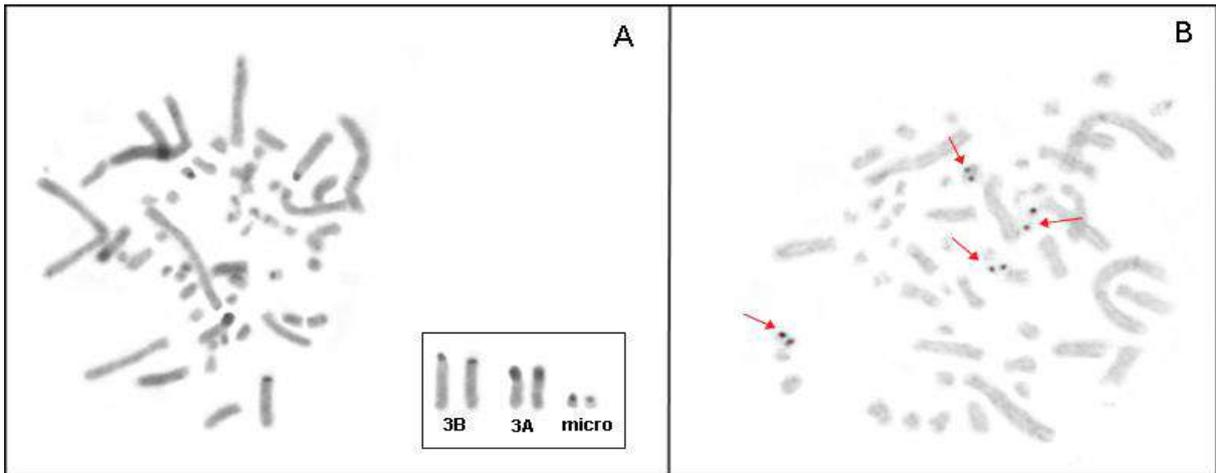


Figura 5 – A) Bandejamento C; B) Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR).

A hibridização com sondas teloméricas evidenciou marcações nas extremidades de todos os cromossomos (Fig. 6B).

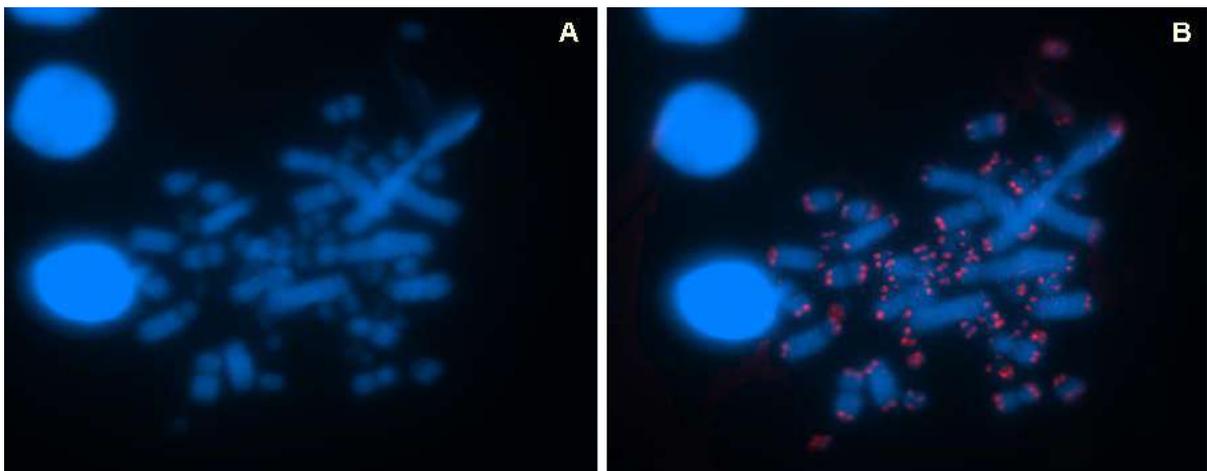


Figura 6 - A) Padrão do corante base específico DAPI; B) FISH com sondas teloméricas (TTAGGG)_n.

Os resultados da FISH com sondas de DNA ribossomal 45S mostraram sinais coincidentes com as marcações da NOR com sítios presentes em apenas um 1 par de microcromossomos (Fig. 7B)

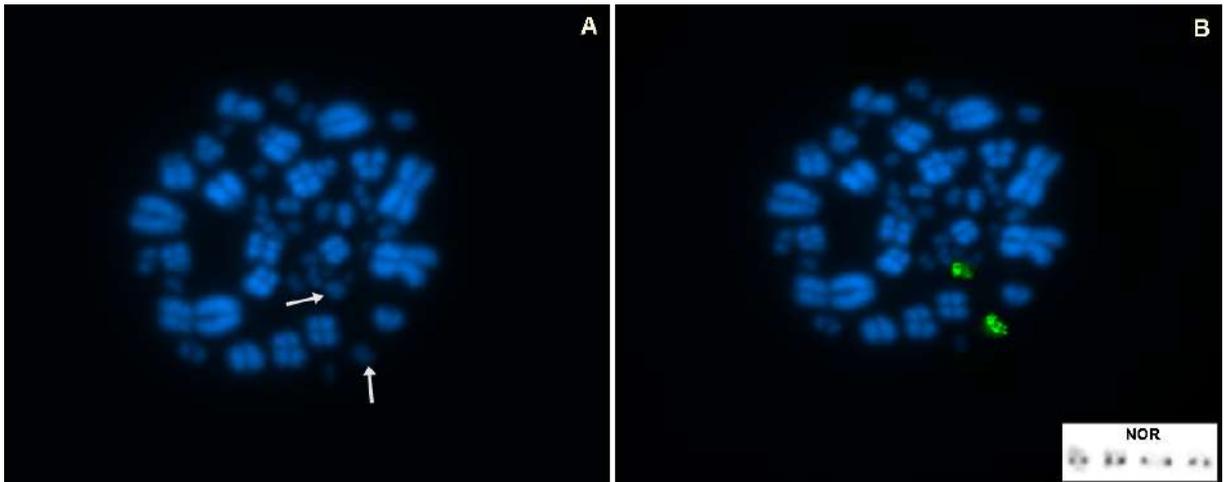


Figura 7 - A) Padrão da DAPI; B) FISH evidenciando os cístrons de rDNA 45S.

A hibridização com a sonda *Mariner* revelou grandes marcações no conjunto dos macrocromossomos com destaque para a ampla distribuição dessas sequências ao longo dos dois braços cromossômicos do segundo par do grupo A (Fig. 8A). A sonda de histona H3 apresentou padrão de marcação disperso ao longo dos cromossomos (Fig. 8B). A hibridização do *Rex1* evidenciou sequências organizadas em grandes blocos em 3 cromossomos (Fig. 8C).

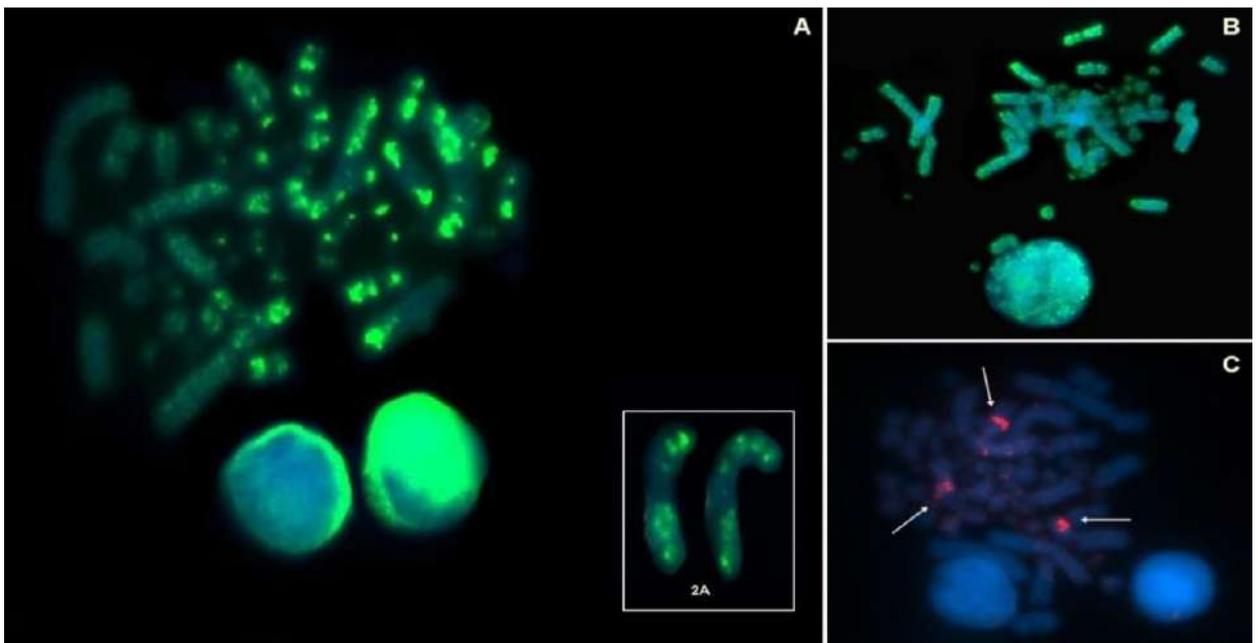


Figura 8 – A) FISH com a sonda *Mariner*; B) FISH com sondas de histona H3; C) FISH com sondas do retroelemento *Rex1*.

6. DISCUSSÃO

A análise citogenética de *Rhinoclemmys punctularia* mostrou que a espécie apresenta um número diplóide de $2n=56$ e número fundamental com $NF=72$ (Fig. 4A e 4B). Esses dados estão de acordo com estudos anteriores realizados por Barros et al (1975) e Bickham & Baker (1976). No entanto, no cariótipo de dois exemplares foi identificado um par heteromórfico constituído por um cromossomo metacêntrico e o outro subtelocêntrico correspondendo ao segundo par do grupo A (Fig. 4A e 4C).

É pouco provável que o heteromorfismo encontrado esteja associado a um par sexual heteromórfico, pois Barros et al (1975) realizaram a análise meiótica de indivíduos machos de *R. punctularia* e não encontraram diferenciação morfológica de cromossomos sexuais para essa espécie. A ausência de cromossomos sexuais heteromórficos é bastante comum neste grupo de vertebrados, tendo em vista que o sistema sexual na maioria das espécies é definido pela temperatura em que os ovos são incubados (Alho et al., 1984, Souza & Vogt, 1994). Sugerimos que o heteromorfismo tenha sido resultado de um rearranjo do tipo inversão pericêntrica, que ocorre a partir de duas quebras envolvendo os dois braços cromossômicos dando origem a um segmento que inclui o centrômero. Em seguida, esse segmento sofre uma rotação de 180° e se religa aos pontos de quebra (fig. 9).

Segundo Kasahara (2009), é muito provável que o rearranjo encontrado em um indivíduo possa ter origem na gametogênese de um dos seus parentais, ambos normais do ponto de vista cariotípico. Através de um único portador o rearranjo pode se dispersar pela população por meio de cruzamentos com o aparecimento de indivíduos igualmente portadores heteromórficos e por meio do cruzamento de dois portadores existe a possibilidade de surgir na descendência indivíduos com ambos os homólogos rearranjados, além dos que não carregam o rearranjo ou que o tenham na condição heteromórfica. Outra hipótese proposta para explicar esse rearranjo estrutural é a ocorrência de um reposicionamento centromérico que se dá pela amplificação e ativação de um novo centrômero ou pela inativação e eliminação do antigo centrômero (Wong and Choo 2001).

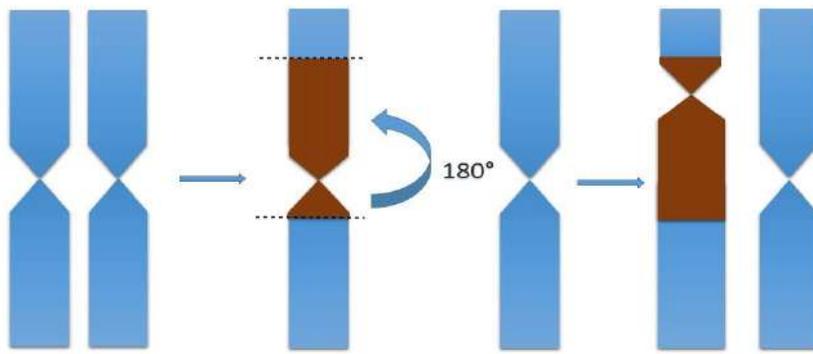


Figura 9. Representação esquemática do processo de inversão pericêntrica provavelmente envolvido na origem de um dos cromossomos do par heteromórfico de *Rhinoclemmys punctularia*.

Por bandeamento G foi possível caracterizar e classificar os cromossomos com base nas homologias destacadas pelo padrão de bandas, o que facilitou a visualização da inversão do par 2 (Fig. 4C e 4D). Entre os répteis os quelônios representam um grupo considerado altamente conservado cariotipicamente quando comparado com lagartos e cobras em termos de número, morfologia e padrão de bandeamento G de seus cromossomos (Bickham 1981; Olmo 2008).

O bandeamento C revelou um reduzido conteúdo heterocromático presente em apenas três pares cromossômicos ocorrendo na região terminal de dois pares de macrocromossomos (terceiro par do grupo A e terceiro par do grupo B) e em um par de microcromossomos (grupo C) (Fig. 5A). Esse resultado divergiu dos dados encontrados na literatura para essa espécie, como nos estudos de Bickham e Baker (1976) que identificaram regiões heterocromáticas em somente um par do conjunto dos macrocromossomos, correspondendo ao braço curto do terceiro par do grupo B. Sabe-se que a identificação dos sítios de Heterocromatina Constitutiva (HC), tamanho e composição de DNA são aspectos essenciais na caracterização cariotípica de diversos organismos, uma vez que blocos de heterocromatina podem variar entre as espécies, ou mesmo entre indivíduos da mesma espécie (Sumner, 2003).

Por meio da técnica de Ag-NOR visualizamos marcações em dois pares de microcromossomos (Fig. 5B), contrariando o resultado da FISH com rDNA 45S

que evidenciou sítios em apenas um par (Fig. 7B). Atribuímos essa divergência a marcações inespecíficas onde proteínas não-histônicas podem apresentar afinidade pela prata e revelar sítios Ag-positivos (Kasahara, 2009). A maioria dos quelônios apresenta conservadorismo no número de NORs, no entanto, encontra-se um alto nível de variabilidade no tamanho e localização cromossômica, e essa variação pode levar a mutações cromossômicas resultando em duplicações e/ou deleções que ocorreram durante o processo evolutivo das tartarugas (Shaffer et al., 1997; Bickham, 1981).

A análise por citogenética molecular com Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) foi realizada pela primeira vez em *Rhinoclemmys punctularia*. A FISH com sondas teloméricas (TTAGGG)_n mostrou sinais de hibridização nas extremidades de todos os cromossomos (Fig. 6B). Nos dois cariótipos analisados nesse estudo (com o heteromorfismo e sem o heteromorfismo) não foram identificados sítios teloméricos intersticiais (ITS).

Nagamachi et al (2013) ao perceberem a ausência de ITS na espécie de roedor *Hylaeamys megacephalus* propuseram que possa ter ocorrido a perda de repetições teloméricas durante os rearranjos cromossômicos. Resultado semelhante já foi observado em algumas espécies da subordem Cryptodira como no trabalho de Martinez et al (2009), que realizaram a análise das espécies *Trachemys dorbigni* e *Chelonoidis donosobarrosi* nas quais não foram identificados sítios teloméricos intersticiais sugerindo que além da possível perda de repetições teloméricas os sítios de ITS podem estar em um número muito reduzido tornando-se difícil a sua detecção por meio da técnica de FISH. Estudos cromossômicos em répteis revelam que tartarugas e crocodilos tendem a preservar e acumular DNAs repetitivos, como sequências teloméricas, DNAs satélites, centroméricas e transposons, inclusive aqueles com a função genética desconhecida (Coyne, 1984; Olmo, 1986).

A hibridização com sequências do transposon *Mariner* apresentou-se amplamente distribuída em grande parte dos cromossomos com algumas marcações em *cluster* (Fig. 8A). Um dado interessante é que esse marcador mostrou-se distribuído ao longo do segundo par cromossômico do grupo A, o mesmo que apresentou o heteromorfismo em dois exemplares. Com isso, sugerimos que estas sequências podem estar envolvidas no processo de inversão pericêntrica discutido

no presente estudo. Segundo Kapitonov & Jurka (2007), durante o movimento de transposição esses elementos podem causar mutações afetando a expressão ou alterando a estrutura de genes podendo levar a uma perda de função no organismo. Porém, mutações causadas por transposons muitas vezes podem ser favoráveis e acabam, portanto, contribuindo para aumentar a diversidade existente na natureza, impulsionando a força evolutiva (Maside et al., 2001).

As sequências de histona H3 mostraram um padrão de marcação disperso formando pequenos *clusters* ao longo do complemento cromossômico (Fig. 8B). Assim como a histona H4, a histona H3 é considerada uma proteína bastante conservada evolutivamente e suas sequências de aminoácidos são praticamente idênticas em diferentes organismos. Dessa forma, os genes dessas proteínas mostram-se marcadores ideais em estudos de evolução cromossômica dentro de um grupo e entre diferentes grupos de organismos. Cabrero et al. (2009) destaca que a família das histonas é considerada um excelente modelo para estudos de mapeamento cromossômico, no entanto, a mesma tem sido utilizada em poucos organismos por meio da técnica de FISH. Somente em alguns mamíferos, anfíbios, peixes, moluscos e insetos (Graves et al., 1985; Tripputi et al., 1986; Turner et al., 1988; Hankeln et al., 1993; Pendás & García-Vásquez., 1994; Ranz et al., 2003; Zhang et al., 2007; Cabrero et al., 2009; Cabral-de-Mello et al., 2010a, 2011a, 2011b).

As sondas do retrotransposon *Rex1* mostraram-se distribuídas em grandes blocos ou *clusters* na região centromérica de três cromossomos (Fig. 8C). Voltolin (2012) analisou espécies de peixes do gênero *Prochilodus* e também verificou a presença de pequenos blocos de *Rex1* em regiões centroméricas em alguns pares cromossômicos. Chalopin et al. (2005), ao discutirem sobre o conteúdo, diversidade evolução de elementos móveis em diferentes linhagens de vertebrados observaram que grandes divergências genômicas podem surgir pela atividade dessas sequências e isso pode contribuir para um melhor entendimento da regulação gênica e de que forma ocorre a aquisição de novas características genéticas. A principal função desses elementos móveis de DNA é o papel estrutural e funcional que desempenham na evolução genômica dos organismos (Böhne et al, 2008).

7. CONCLUSÃO

- 1- Sugerimos que um processo de inversão cromossômica no par 2 levou ao heteromorfismo intraespecífico em *Rhinoclemmys punctularia*. Análises meióticas futuras serão feitas para compreender a viabilidade gamética.
- 2- As sondas das famílias multigênicas de sequências de histona H3 mostraram um padrão de marcação disperso ao longo de todos os cromossomos, e de 45S marcam um par de microcromossomos, em *Rhinoclemmys punctularia*. Essas informações irão podem corroborar estudos de evolução cromossômica.
- 3- Primeiro mapeamento físico de elementos transponíveis em *Rhinoclemmys* mostra uma dinâmica organizacional diversificada para o grupo. *Mariner* com distribuição dispersa e *Rex1* em *cluster*. Dados importantes na inferência de regulação gênica.

8. REFERÊNCIAS

ALHO, C.J.R.; DANNI, T.M.S. & PADUA, L.F.M. Influência da temperatura de incubação na determinação do sexo da tartaruga da Amazônia *Podocnemis expansa* (Testudinata, Pelomedusidae). **Revista Brasileira de Biologia**, **44**: 305 - 311. 1984.

AYALA V.F. **Manual de Zoologia de Vertebrados** – Diversidade de répteis. 2005.

BAÍA JÚNIOR, P.C. & GUIMARÃES, D.A. Parque ambiental de Belém: um estado de conservação da fauna silvestre local e a interação desta atividade com a comunidade do entorno. **Revista Científica da UFPA**, **4**: Disponível em: <http://www.ufpa.br/revistaic>. Acesso em: 5 mar. 2015.

BARROS, R.M.; M.M. SAMPAIO, M.M.; ASSIS, M.F.; AYRES, M. & CUNHA, O.R. A karyological study of *Geomyda punctularia punctularia* (Daudin, 1802) from the Amazon region of Brazil (Chelonia, Emydidae). **Acta Amazônica**, **5 (1)**: 95 – 96. 1975.

BELKIN, D.A. & GANS, C. An unusual chelonian feeding niche. **Ecology**, **49** (4): 768 - 769. 1968.

BICKHAM, J.W. A cytosystematic study of turtles in the genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. **Herpetologica**, **31**: 198 – 201. 1975.

BICKHAM, J.W & BAKER, R.J. Chromosome homology and evolution of Emydid turtles. **Chromosoma**, **54**: 201-219. 1976a.

BICKHAM, J.W & BAKER, R.J. Karyotypes of some Neotropical turtles. **Copeia**: 703-708. 1976b.

BICKHAM, J.W. Two-Hundred-Million-Year-Old Chromosomes: Deceleration of the Rate of karyotypic evolution in turtles. **Science**, **212**: 1291-1293. 1981.

BLACKBURN, E.H.; Switching and signalling at the telomere. **Cell**, **106**: 661-673. 2001.

BOHNE, A.; BRUNET, F.; GALIANA-ARNOUX, D.; SCHULTHEIS, C. & VOLFF, J.N. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromosome Research**, **16**: 203 - 215. 2008.

CABRAL-DE-MELLO, D.C. & MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, **104**: 393 – 400. 2010a.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C.; SOUZA, M.J. & MOURA, R.C. Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient *Proscopiidae* grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. **Cytogenet Genome Res**, **132**: 89–93. 2011a.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MELO, A.S. & MARTINS, C. Evolutionary dynamics of heterochromatin in the genome of *Dichotomius* beetles based on chromosomal analysis. **Genetica**, **139**: 315–325. 2011b.

CABRERA, M. **Las Tortugas Continentales de Sudamerica Austral**. BR Copias, Córdoba, Rep. Argentina. 1998.

CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; TERUEL, M.; CAMACHO, J.P.M. Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of *Acrididae* grasshoppers. **Chromosome Research**, **17**: 397– 404. 2009.

CARR, J.L. **Phylogenetic implications of chromosomal variation in the Batagurinae (Testudines: Emydidae)**. Unpubl. MS Thesis, Texas A&M Univ., College Station. 1981.

CARR, J.L. & BICKHAM, J.W. Phylogenetic implications of karyotypic variation in the Batagurinae (Testudines: Emydidae). **Genetica**, **70**: 89 – 106. 1986.

CHALOPIN, D.; NAVILLE, M.; PLARD, F, GALIANA, D. & Volff, J.N. Comparative analysis of transposable elements highlights mobilome diversity and evolution in vertebrates. **Genome Biol Evol.**: 567–80. 2005.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P. & STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, **371**: 215-220. 1994.

COLGAN, D.J.; McLAUCHLAN A, WILSON GDF, LIVINGSTON SP, EDGECOMBE GD, MACARANAS J, CASSIS G. & GRAY MR. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Australian Journal of Zoology**, **46**: 419–437. 1998.

COYNE, J.A. Correlation between heterozygosity and rate of chromosome evolution in animals. **Am. Nat.**, **123**: 725 –729. 1984.

ENGEL, J.D. & DODGSON, J.B. Histone genes are clustered but not tandemly repeated in the chicken genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **78**: 2856 - 2860. 1981.

ERNST, C. H. & BARBOUR, R. W. **Turtles of the World**. Washington, Smithsonian Institution Press. 313p. 1989.

ERNST, C.H.A. Revision of the neotropical turtle genus *Callopsis* (TESTUDINES: EMYDIDAE: BATAGURINAE). **Herpetologica**, **34** : 113-134. 1978.

FERREIRA JÚNIOR, P. D. Aspectos Ecológicos da determinação sexual em tartarugas. **Acta Amazonica**, **39 (1)**: 139-154. 2009.

FERRI, V. **Turtles & Tortoises: A Firefly Guide**. Firefly Books. p. 256. 2002.

FRETEY, J. Les Chelonies de Guyane Française, um estudo preliminar. Paris, 1977: 202p.

FRETEY, J.; HOOGMOED, M.S.; LESCURE, J. Etude taxinomique de *Rhinoclemmys punctularia punctularia* (Daudin) (Testudinata, Emydidae). **Zoologische Mededelingen**, **52 (6)**: 63 – 80. 1977.

FRITZ, U. & HAVAS, P. Order Testudines. **Zootaxa**, **3703 (1)**: 12–14. 2013

GILBERT, S.F.; LOREDO, G.A.; BRUKMAN, A.; BURKE, A.C. Morphogenesis of the turtle shell: the development of a novel structure in tetrapod evolution. **Evolution & Development**, **3**:47-58. 2001.

GRAVES, R.A.; MARZLUFF, W.F.; GIEBELHAUS, D.H.; SCHULTZ, G.A. Quantitative and qualitative change in histone gene expression during early mouse embryo development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**: 5685-5689. 1985.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R; LEWONTIN, R.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T.; MILHER, J.H. **Introdução à genética**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 743 p.

GUERRA, M. Hibridização *in situ*. In: **Marcelo Guerra. (Org.)**. FISH - Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto: SBG, 2004. p. 01-32.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1988. p.13-35.

HANKELN, T.; KEYL, H.G.; ROSS, R. & SCHMIDT, E.R. Evolution of histone gene loci in *chironomid midges*. **Genome**, **36**: 852 – 862. 1993.

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

IVERSON, J.B. **A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world**. Richmond, Indiana, 363. 1992.

KAPITONOV, V.V. & JURKA, J. Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposon. **Trends Genet.**, **23**: 521 – 529. 2007.

KASAHARA, S. **Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados**. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto. 2009.

KILLEBREW, F.C. Mitotic chromosomes of turtles IV. The Emydidae. **Texas J.Sci**, **29**: 245 – 253. 1977a.

LAMPE, D.J.; WITHERSPOON D.J.; SOTO-ADAMES, F.N. & ROBERTSON, H.M. Recent horizontal transfer of mellifera subfamily Mariner transposons into insect lineages representing four different orders shows that selection acts only during horizontal transfer. **Mol. Biol. Evol.**, **20**: 554–562. 2003.

Le, M. & McCord, W.P. (2008) Phylogenetic relationships and biogeographical history of the genus *Rhinoclemmys* Fitzinger, 1835 and the monophyly of the turtle family Geoemydidae (Testudines: Testudinoidea). **Zoological Journal of the Linnean**

Society, **153**: 751–767. 2008

LIFTON, R.P.; GOLDBERG, M.L.; KARP, R.W.; HOGNESS, D.S. The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*. Functional and evolutionary implications. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, **42**: 1047 – 1051. 1977.

LONG, E.O. & DAWID, I.D. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, **49**: 727-764. 1980.

MALVASIO, A.; SOUZA, A.M.; FERREIRA Jr., P.D.; REIS, E.S. & SAMPAIO, F.A.A. Temperatura de incubação dos ovos e granulometria dos sedimentos das covas relacionadas à determinação sexual em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). São Paulo. **Publicações Avulsas do Instituto Pau Brasil de História Natural**, **05**: 11-25p. 2002.

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**, **137 (3)**: 277-283..2009.

MASIDE, X.; BARTOLOMÉ, C.; ASSIMACOPOULOS, S. & CHARLESWORTH, B. Rates of movement and distribution of transposable elements in *Drosophila melanogaster*: in situ hybridization vs Southern blotting data. *Genetical research* **78**: 121–36. 2001.

MOORHEAD, O.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, W.J., BATTIPS, D.M. & HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res.**, **20**: 613-616. 1960.

NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; O'BRIEN, P.C.; PINTO, J.A.; MALCHER, S.M.; PEREIRA, A.L.; RISSINO, J.D.; MENDES-OLIVEIRA, A.C.; ROSSI, R.V. & FERQUSON-SMITH, M.A. FISH with whole chromosome and telomeric probes demonstrates huge karyotypic reorganization with ITS between two species of *Oryzomyini* (Sigmodontinae, Rodentia): *Hylaeamys megacephalus* probes on *Cerradomys langguthi* karyotype. **Chromosome Research**, **21**: 107–119. 2013.

OLMO, E. "Reptilia," in: **John (ed.), Animal Cytogenetics**. 4. Chordata. 3, Gebrueder Borntraeger, Berlin – Stuttgart. 1986.

OLMO, E. Trends in the evolution of reptilian chromosomes. **Integr Comp Biol**, **48 (4)**: 486–493. 2008.

PENDÁS, A.M.; MORÁN, P. & GARCÍA-VÁZQUEZ, E. Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. **Chromosoma**, **103**: 147- 152. 1994.

PHILIPS, R.B. & REED, K.M. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. **Aquaculture**, **140**: 197- 216. 1996.

POUGH, F.H.; ROBIN, M.A.; JOHN, E.C.; MARTHA, L.C.; ALAN, H.S. & KENTWOOD, D.W. **Herpetology, Second Edition**. New York: Prentice Hall, 2001. 612 pp.

POUGH, F.H.; HEISER, J.B. & McFARLAND, W.N. **A Vida dos Vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1993. 839p.

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

RAN/ICMBio. **Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios/ Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/ran>. Acesso em: 8 set. 2016.

RANZ, J.M.; GONZÁLEZ, J. & CASALS F. & RUIZ, A. (2003) Low occurrence of gene transposition events during the evolution of the genus *Drosophila*. **Evolution**, **7**: 1325 - 1335. 2003.

RUBERTI, I.; FRAGAPANE, P.; PIERANDREI-ALMADI, P.; BECCARI, E.; ALMADI, F. & BOZZONI, I. Characterization of histone genes isolated from *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* genomic libraries. **Nucleic Acids Research**, **10**: 1544 – 1550. 1982.

RUEDA-ALMONACID, J.V.; CARR, J.L.; MITTERMEIER, R.A.; RODRÍGUEZ-MAHECHA, J.V.; MAST R. B.; VOGT R.C.; RHODIN, A.G.J.; OSSA-VELÁSQUEZ, J. DE LA.; RUEDA, J.N.; MITTERMEIER, C.G. **Las tortugas y los crocodilianos de los países andinos del trópico**. Serie de guías tropicales de campo n°6. Conservación Internacional. Editorial panamericana, formas e impresos . Bogotá, Colombia. 2007. 538 p.

SANTOS, E. **Anfíbios e Répteis do Brasil (Vida e Costumes)**. Villa Rica, 4a Edição Revista e Aumentada, 263p.1994.

SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, **2**: 971–972. 1971.

SHAFFER, H.B.; MEYLAN P. & MCKNIGHT M.L. Tests of turtle phylogeny: Molecular, morphological and paleontological approaches. **Syst. Biol.**, **46**: 235-268. 1997.

SOUZA, R.R.; VOGT, R.C. Incubation temperature influences sex and hatchling size in the neotropical turtle *Podocnemis unifilis*. **J. Herpetol.**, **28 (4)**: 453-464. 1994.

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

SUMNER, A.T. **Chromosomes: Organization and Function**. Blackwell Publishing, North Berwick, United Kingdom, 287p. 2003.

TRIPPUTI, P.; EMANUEL, B.S.; CROCE, C.M.; GREEN, L.G.; STEIN, G.S. & STEIN, J.L. Human histone genes map to multiple chromosomes. **Proc Natl Acad Sci USA**, **83**: 3185 – 3788. 1986.

TURNER, P.C.; BAGENAL, E.B.D.; VLAD, M.T. & WOODLAND, H.R. The organization and expression of histone genes from *Xenopus borealis*. **Nucl Acids Res**, **16**: 3471 – 3485. 1988.

VAN DIJK, P. P. V.; IVERSON, J. B.; RHODIN, A.G. J.; SHAFFER, H. B.; BOUR, R. Turtles of the World, 7th Ed. Annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution with maps, and conservation status. **Chelonian Research Monographs**, **5**: 329-479. 2014.

VERMA, R.S.; BABU, A. **Human Chromosomes**. Principles and Techniques, 2 ed., New York: McGraw-Hill, 1995.

VIANA, P.F. **Citogenética clássica e molecular de espécies neotropicais de serpentes da família Boidae (Gray, 1825)**. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus. 2015. 7p.

VOGT, R.C. **Tartarugas da Amazônia**. Lima, Peru: Gráfica Biblos, 2008. 104p.

VOLTOLIN, T.A. **Origem, herança e estrutura dos cromossomos supranumerários no gênero *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae)**. Tese (Doutorado em Zoologia). Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2002. 122p.

WERNEBURG, I.; WILSON, L.A.B. & JOYCE, W.G. Evolution of neck vertebral shape and neck retraction at the transition to modern turtles: an integrated geometric morphometric approach. **Systematic Biology**: syu072v1-syu072. 2014.

WONG, L.H., CHOO, K.H.A. Centromere on the move. **Genome Res**, **11**:513–516. 2001.

ZHANG, L.; BAO, Z.; WANG, S.; HUANG, X. & HU, J. Chromosome rearrangements in Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorpha) implied based on chromosomal localization of histoneH3 gene in four scallops. **Genetica**, **130**: 193 –198. 2007.