

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

MARCELO JOÃO DA SILVA

**ANÁLISE CARIOTÍPICA DE *Salvator merianae* (DUMÉRIL &
BIBRON, 1839) (SQUAMATA, TEIIDAE) PROVENIENTE DA
REGIÃO DO VALE DO RIO GUARIBAS, PIAUÍ**

**PICOS - PI
2016**

MARCELO JOÃO DA SILVA

**ANÁLISE CARIOTÍPICA DE *Salvator merianae* (DUMÉRIL &
BIBRON, 1839) (SQUAMATA, TEIIDAE) PROVENIENTE DA
REGIÃO DO VALE DO RIO GUARIBAS, 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

PICOS - PI

2016

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

S586a Silva, Marcelo João da.
Análise cariotípica de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata, Teiidae) proveniente da Região do Vale do Rio Guaribas, Piauí. / Marcelo João da Silva – 2016.
CD-ROM: il.; 4 ¾ pol. (48 f.)

Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas)-
Universidade Federal do Piauí, Picos, 2016.

Orientadora: Prof^a. Dra. Tamaris Gimenez Pinheiro

1. *Salvator merianae* - Cariotípica. 2. Família Teiidae.
3. Marcadores Citogenéticos. I. Título.

CDD 598.1

MARCELO JOÃO DA SILVA

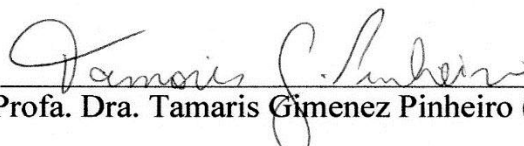
ANÁLISE CARIOTÍPICA DE *Salvator merianae* (DUMÉRIL & BIBRON, 1839) (SQUAMATA, TEIIDAE) PROVENIENTE DA REGIÃO DO VALE DO RIO GUARIBAS, PIAUÍ

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.

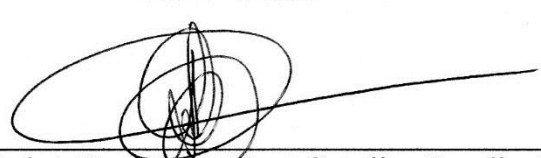
BANCA EXAMINADORA



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 primeiramente a Deus, fonte de sabedoria e refúgio, e à minha família, em especial à minha mãe Inês, ao meu pai João, aos meus irmãos Mara e Marlon e ao meu avô Cícero, pelo apoio e compreensão. Sem vocês jamais teria alcançado essa vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e pela inspiração.

À minha família, que sempre me apoiou e acreditou no meu sonho. Minha mãe Inês, meu pai João, meus irmãos Mara e Marlon, eu amo vocês. Obrigado pela compreensão, paciência e por estar sempre ao meu lado, mesmo distante, mesmo sem conhecer a realidade da vida acadêmica, vocês foram muito importantes e imprescindíveis para minha formação.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Edson Lourenço da Silva, pela oportunidade de aprendizado nesse mundo da citogenética, pela confiança em mim depositada, pela amizade e paciência que teve no desenvolvimento do trabalho. Muito obrigado.

À professora Dra. Tamaris Gimenez Pinheiro, pela indicação, por todo o incentivo, amizade, pelas cobranças construtivas para o desenvolvimento do trabalho, enfim, por todo o apoio.

À Universidade Federal do Piauí – CSHNB e ao curso de Ciências Biológicas, bem como a todos os meus professores, que de forma significativa, contribuíram para o meu aprendizado e desenvolvimento acadêmico. Obrigado a todos.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, *Campus Picos*, por disponibilizar o laboratório de Biologia com a estrutura para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Evandro Chagas em Belém – PA, em especial ao Dr. Edivaldo Herculano, por oferecer o laboratório de citogenética e cultura de tecidos para o desenvolvimento das técnicas de hibridização fluorescente *in situ*; à Ivonete Furo pelo apoio, incentivo e auxílio no desenvolvimento das técnicas e a Fábio, também pelo apoio.

À Flávia Cipriano, minha princesa, uma pessoa que vou levar no coração para toda vida. Você entrou na minha vida no decorrer do curso e a cada dia eu lhe admirava mais, pelo seu sorriso (com covinhas), pela sua alegria, pelo seu jeito espontâneo e pela sua personalidade. O que seria da descontração no laboratório se não fosse nós dois? O laboratório não seria o mesmo. Vivemos momentos maravilhosos, seja em campo nas coletas, no laboratório compartilhando ideias ou tomando aquela cervejinha. Obrigado por tudo.

À Ana Paula Araújo (plebeia), minha parceira de todas as horas, que sempre estive do meu lado, compartilhando vitórias, momentos difíceis, choros e risos. Nas aulas, nos corredores, no laboratório, nas coletas de campo, nas caronas, enfim, você sempre estava comigo, e foi isso que te tornou tão especial. Obrigado por toda ajuda no laboratório com os experimentos e também pelas palavras de apoio. Você sempre estará no meu coração.

À Maria Rita, minha parceira de curso e de laboratório, uma amiga que aprendi a admirar, por seu caráter admirável, pelo ser humano que você é, a nossa amizade vai permanecer para sempre. Passamos por muitos momentos felizes e tristes, e sempre você estava com uma palavra de apoio pronta para dizer quando precisar. Obrigado pelas palavras, pela ajuda no laboratório e por estar sempre pronta para ajudar quando precisei. Você se tornou especial, agradeço muito a Deus por ter te conhecido.

Aos meus amigos colegas da Biologia, Cleidson, Marília, Aparecida, Edeilma, Auricélia, Sebastião, Marielly, Manoel Barbosa, pela amizade, pelos momentos que passamos juntos, além do aprendizado e descontração.

A meus avós, Cícero, Anunciada, Nazaré e Francisco (*in memoriam*) pelo apoio e compreensão durante essa caminhada. A todos os meus tios, tias, primos, primas e amigos, muito obrigado pelo apoio.

Aos professores Dra. Ana Carolina e Dr. João Marcelo pela constituição da banca examinadora, pelo apoio e contribuições para o trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuiu para a realização desse trabalho.

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!*

(Fernando Sabino)

RESUMO

A família Teiidae (Squamata) possui cerca de 120 espécies de lagartos, distribuídas em três subfamílias e dezesseis gêneros. As espécies do gênero *Salvator* correspondem aos maiores lagartos da família podendo atingir até 614 mm de comprimento rostro-cloacal. Dentre todas as espécies do gênero, *S. merianae* possui a maior distribuição, ocorrendo desde o Brasil até a Argentina, Uruguai e Paraguai, ocupando uma diversidade de biomas. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo, descrever e analisar o cariótipo de lagartos da espécie *S. merianae* capturados na região do Vale do Rio Guaribas, semiárido piauiense. Para isto foram instaladas armadilhas de gaiolas com iscas que foram revistadas uma vez 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. Já os experimentos de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foram realizados no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos do Instituto Evandro Chagas em Belém, Pará. As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células da medula óssea e pulmão. Para detecção da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica de bandamento C e para localizar as NORs utilizou-se a impregnação por nitrato de prata. Os experimentos com FISH foram realizados com sondas de rDNA 18S, sondas teloméricas e de microssatélites. A morfologia cromossômica foi determinada com base na razão entre os braços cromossômicos. Os exemplares de *S. merianae* analisados apresentaram um número diplóide de $2n=38$, compostos por 10 macrocromossomos do tipo metacêntricos e submetacêntricos e 28 microcromossomos. Não foram observados cromossomos sexuais heteromórficos. Segmentos heterocromáticos discretos foram visualizados principalmente próximos à região centromérica dos cromossomos. A NOR localiza-se na porção terminal de um único par cromossômico do tipo metacêntrico coincidente com a FISH rDNA 18S. Foi possível observar também uma constrição secundária à qual a NOR está associada. Com sondas telomérica, além de regiões típicas, houve sinais de hibridização em regiões pericentroméricas. As sondas de microssatélites hibridizaram de forma uniforme em todos os cromossomos, além de sinais específicos mais evidentes em regiões telomérica e pericentroméricas de alguns cromossomos. Estudos citogenéticos envolvendo indivíduos de *S. merianae* oriundos de outras regiões do país, e também da Argentina, já haviam mostrados resultados semelhantes ao observados para indivíduos do Vale do Rio Guaribas. O número diplóide encontrado em *S. merianae* corrobora estudos prévios em indivíduos da espécie provenientes de outras regiões do país. Esta é a primeira vez que se tem registro do uso de sondas de DNA ribossômicos neste grupo, e as mesmas não revelaram marcações crípticas e nenhuma evidência de rearranjo recente que tenha envolvido a NOR em *S. merianae*. Com sequências de microssatélites observaram-se sinais específicos mais evidentes em regiões teloméricas, pericentroméricas e em alguns microcromossomos. Apesar da ampla distribuição da espécie, a macroestrutura cariotípica permanece sem modificações evidenciando a estabilidade no número diplóide do grupo.

Palavras-chave: Banda C; FISH; Microssatélites; NOR.

ABSTRACT

The Teiidae family (Squamata) has about 120 species of lizards, divided into three subfamilies and sixteen genus. The species in the genus *Salvator* corresponds to the larger of the family of lizards, can reach up to 614 mm of snout-vent length. Among all species of the genus, *S. merianae* has the largest distribution, occurring from Brazil to Argentina, Uruguay and Paraguay, covering a variety of biomes. Thus, this study aimed to describe and analyze the karyotype of *S. merianae* individuals caught in the region of Vale do Rio Guaribas, Piauí semiarid. For this, cage traps were placed with baits, and, examined once daily. Captured animals were transported to the Biology Laboratory of the Federal Institute of Science, Education and Technology of Piauí, *campus* Picos, which were carried out the procedures for collection of cytogenetic material, cataloging, and preservation. The experiments of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) were performed in the Cytogenetics Laboratory of Tissue Culture in the Evandro Chagas Institute, Belém, Pará. The chromosome preparations were obtained from bone marrow, liver and kidney. For detection of constitutive heterochromatin, it was used C banding technique and to locate the nucleolar organizer regions (NOR) were used the impregnation with silver nitrate. In the FISH experiments were used 18S rDNA, telomeric and microsatellites probes. The chromosome morphology was determined using the ratio of the chromosome arms. The *S. merianae* individuals analyzed showed a diploid number of $2n=38$, composed of 10 macrochromosomes of metacentric and submetacentrics types and 28 microchromosomes. There were no heteromorphic sex chromosomes. Discrete heterochromatic segments were seen mainly near the centromeric region of chromosomes. The nucleolar organizer regions are located in the terminal portion of a single chromosome pair of metacentric type coincident with the FISH 18S rDNA. It was also possible to observe a secondary constriction at which the host region of the nucleolus is associated. With the telomeric probes, in addition to characteristic regions of hybridization signals in pericentromeric regions were observed. The microsatellite probes hybridized uniformly in all chromosomes, and most obvious signs in specific telomere and pericentromeric regions of some chromosomes. Cytogenetic studies involving individuals of *S. merianae* from other regions of the country, and from Argentina, had already shown results similar to those observed for individuals from Vale do Rio Guaribas. The diploid number found in *Salvator merianae* corroborates previous studies of individuals of the species from other parts of the country. This is the first time on record the use of ribosomal DNA probes in this group, and the results do not reveal cryptic markings and no evidence of recent rearrangement that involved the NOR. Regarding microsatellite sequences, specific and more evident signals were recorded to telomeric regions, and in some pericentromeric microchromosomes. Despite the wide distribution of the species, the karyotype macrostructure remains unchanged showing stability in diploid number of the group.

Keywords: C Band; FISH; microsatellites; NOR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Distribuição geográfica das espécies do gênero *Salvator* **17**
- Figura 2** – A: Indivíduo de *Salvator merianae*; B: Armadilha de gaiola para captura dos animais **22**
- Figura 3** – Cariótipo de *Salvator merianae* com coloração convencional em Giemsa mostrando $2n = 38$ cromossomos. (A) macho, (B) fêmea. **29**
- Figura 4** – Metáfases de *Salvator merianae*. (A, B) evidência da heterocromatina constitutiva em indivíduo macho e fêmea respectivamente, (C) Coloração com fluorocromo DAPI, (D) FISH com sonda telomérica, (E) Impregnação com nitrato de prata evidenciando regiões organizadoras de nucléolos, e (F) FISH com sonda de rDNA 18S. Setas: marcações mais evidentes **30**
- Figura 5** – Metáfases de *Salvator merianae* evidenciando sinais de hibridização com sondas de microssatélites. Setas: marcações mais evidentes **31**

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Número diplóide (2n), fórmulas cariotípicas, posição da NOR, e padrão de bandamentos nos cromossomos de espécies dos gêneros *Tupinambis* e *Salvator*.
2n= número diploide; C: tipo de bandamento; M: macrocromossomo; m: microcromossomo; NOR : região organizadora de nucléolo..... **32**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CSHNB – *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros
DAPI – 4’6-diamidino-2-phenylindole
DNA – Ácido desoxirribonucleico
FISH - Hibridização *in situ* Fluorescente
HCl – Ácido Clorídrico
ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IEC – Instituto Evandro Chagas
KCL – Cloreto de potássio
NOR – Regiões Organizadoras de Nucléolos
PBS – Tampão Fosfato Salino
PCR – Polymerase Chain Reaction
PI – Piauí
rDNA – DNA ribossômico
RNA – Ácido ribonucleico
SAMAM – Setor de Meio Ambiente
SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
2xSSC – Solução Citrato Salino
SSR – Repetições de sequências simples
STI – Sequências Teloméricas Intersticiais
STR – Repetições curtas em *tandem*
UFPI – Universidade Federal do Piauí

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 A família Teiidae	16
3.2 Citogenética de Teiidae	18
3.3 Marcadores citogenéticos	19
3.3.1 Regiões organizadoras de nucléolos (NORs)	19
3.3.2 Identificação de regiões de heterocromatina pelas Bandas C	20
3.3.3Hibridização fluorescente in situ (FISH) na investigação de sequências repetitivas.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Área de estudo.....	22
4.2 Procedimentos em campo.....	23
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 NORs	25
4.3.4 Hibridização fluorescente <i>in situ</i>	25
4.3.4.1 Sondas Telomérica e rDNA	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	26
4.3.4.2 Microssatélites	27
4.3.4.3 Detecção do conteúdo molecular de regiões repetitivas por fluorocromos base-específicos (coloração DAPI)	28
4.4 Análise de dados	28
5 RESULTADOS	29
6 DISCUSSÃO	33
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Os estudos citogenéticos permitem detectar polimorfismos e heteromorfismos tanto em cromossomos autossomos quanto sexuais, mecanismos cromossômicos de determinação do sexo, ocorrência de poliploidia, cromossomos supranumerários e em casos específicos, identificar espécies (VIÑA-BERTOLOTTI, 2006). Ainda segundo esse mesmo autor, detectar essas variações permite fazer comparações entre espécies, identificando homologias e possibilita compreender os mecanismos cromossômicos responsáveis pela variação cariotípica existente.

Em uma revisão de estudos citogenéticos em lagartos na década de 80, Olmo (1986) afirma que estudos citogenéticos em lacertílios ainda eram poucos, com trabalhos limitados principalmente a animais de algumas regiões como Austrália e Europa, permanecendo subexplorada a fauna do restante do mundo. Os primeiros dados cromossômicos obtidos em lagartos no Brasil ocorreram na década de 60 com a descrição de cariótipos em coloração convencional (BEÇAK et al., 1964; PECCININI, 1969). Na década seguinte houve um aumento na produção de trabalhos em espécies de várias famílias de lagartos brasileiros, com ênfase na família Teiidae e Iguanidae (PECCININI-SEALLE, 1976).

Os lagartos estão distribuídos em seis infraordens nas seguintes proporções: Iguania, com quatorze famílias; Gekkota, com sete famílias; Scincomorpha, com sete famílias; Diploglossa com quatro famílias; Dibamia, com uma família; e Platynota (Varanoidea), com três famílias (THE REPTILE DATABASE, 2015). Essas seis infraordens reunidas constituem o grupamento parafilético Lacertilia ou Sauria composto por cerca de 4100 espécies, e juntamente com as serpentes, anfisbenas e dibamídeos formam a ordem monofilética Squamata (POUGH et al., 2001).

Dados não atualizados sobre aspectos citogenéticos de lagartos indicam que cerca de 20% das 4.100 espécies têm seus cariótipos descritos (SANTOS et al., 2003). Nestas espécies, o número diploide varia desde $2n=16$ no geconídeo *Gonatodes taeniae* Roze, 1963 a $2n=64$ no gimnofitalmídeo *Nothobachia ablephara* Rodrigues, 1984. Contudo, o cariótipo com $2n=36$ cromossomos contendo 12 macros e 24 microcromossomos é muito conservado em várias famílias, principalmente dentre aquelas espécies pertencentes à Iguania. Por esse motivo muitos autores o consideram o cariótipo ancestral do grupo (BICKHAM, 1984).

Registros sobre diversidade da fauna de lagartos realizado no município de Picos, em região de Caatinga arbustiva e arbórea do Piauí, demonstram a presença de 12 espécies pertencentes às famílias Gekkonidae, *Hemidactylus mabouia* (Moreau De Jonnés, 1818),

Lygodactylus klugei (Smith, Martin & Swain, 1977), Gymnophthalmidae, *Vanzosaura rubricauda* (Boulenger, 1902), Iguanidae, *Iguana iguana* (Linnaeus, 1758), Phyllodactylidae, *Gymnodactylus geckoides* Spix, 1825, *Phyllopezus pollicaris* (Spix, 1825), Polychrotidae, *Polychrus acutirostris* Spix, 1825, Scincidae, *Mabuya heathi* Schmidt & Inger, 1951, Teiidae, *Ameiva ameiva* (Linnaeus, 1758), *Ameivula ocellifera* (Spix, 1825) e *Salvator merianae*, Tropicuridae, *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825) (BENÍCIO; FONSECA, 2011). Ainda de acordo com estes autores, a herpetofauna estudada na região de Picos é constituída, principalmente, por espécies típicas das formações abertas e espécies de ampla distribuição geográfica.

Estudos mais recentes em uma região ecotonal entre Caatinga, Cerrado, Cocais, Floresta Estacional Semidecidual e Mata Ciliar no estado do Piauí registraram-se 25 espécies de répteis, sendo 22 Squamata (11 serpentes, 10 lagartos e uma anfisbena), dois Testudines e um Crocodiliano. As espécies de lagartos *I. iguana*, *A. ocellifera*, *T. hispidus* e *S. merianae* foram as mais frequentes nas áreas amostradas (BENÍCIO et al. 2015).

Diversos trabalhos tem demonstrado a necessidade de estudos citogenéticos mais detalhados sobre a ampla distribuição geográfica observada em muitas espécies de lagartos, em especial as Neotropicais que permanecem pouco conhecidas. Dessa forma, informações sobre a constituição cariotípica em nível celular e molecular de indivíduos da espécie *S. merianae*, bem como a investigação da existência de algum marcador citogenético que defina a espécie, permitirá elevar o conhecimento sobre a biologia do grupo, auxiliando no reconhecimento dos fatores que influenciam na determinação e diferenciação cromossômica dos mesmos em relação às espécies de outras regiões já estudadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever o cariótipo de indivíduos de *S. merianae* coletados na região de Picos – PI, procurando marcadores citológicos que possam caracterizar a espécie.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva;
- Investigar a existência de influência dos segmentos heterocromáticos na diversificação dos sistemas de cromossomos sexuais;
- Verificar o padrão de distribuição das regiões organizadoras de nucléolos.

- Verificar o padrão de distribuição de sequências repetitivas microssatélites no cariótipo da espécie;
- Investigar o modo de distribuição de sequências teloméricas em indivíduos de *S. merianae*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A família Teiidae

A classe Reptilia é representada pelos lagartos, serpentes, jacarés, crocodilos e tartarugas. São animais descendentes de um grande grupo de vertebrados, predominantes durante a Era Mesozóica, com 6000 espécies estimadas (ORR, 1986). Compreende animais ectotérmicos, com desenvolvimento sem estágio larval, possuindo crânio ossificado e pele seca recoberta por escamas epidérmicas (ORR, 1986).

A ordem Squamata constitui o maior e mais diversificado grupo de répteis, apresentando uma alta diversidade ecológica, com espécies terrestres, fossoriais, arborícolas e aquáticas, que ocorrem em uma extensa variedade de habitats, como desertos, florestas, rios e oceanos, podendo ser encontrado em todos os continentes, com exceção da Antártida (SANTOS, 2007). A família Teiidae anteriormente conhecidos como macroteídeos, pertence à infra-ordem Scincomorpha e possui cerca de 120 espécies (GIUGLIANO; COLLEVATTI; COLLI, 2007; HARVEY; UGUETO; GUTBERLET, 2012). Suas espécies estão restritas ao continente americano, sendo encontrada desde o nordeste dos Estados Unidos até a Argentina, em uma ampla variedade de ecossistemas (SANTOS, 2007).

Diversos trabalhos foram feitos para esclarecer as relações filogenéticas do grupo, sobretudo com relação à subfamília Tupinambinae, que recebeu considerável interesse nas últimas décadas, contudo a sistemática da família ainda é bastante conflitante (HARVEY; UGUETO; GUTBERLET, 2012).

Gorman (1970) propôs inicialmente a divisão dos teídeos atuais em dois grupamentos a partir de caracteres citogenéticos. No primeiro, conhecido como grupo Dracaena, os indivíduos de suas espécies possuem cariótipo apresentando de 34 a 38 cromossomos com uma clara distinção entre macro e microcromossomos. Atualmente, Dracaena corresponde à atual subfamília Tupinambinae. O segundo grupo denominado Ameiva apresenta espécies com um número diploide mais elevado (de 46 a 56 cromossomos) e sem distinção entre macro e microcromossomos, este grupo atualmente corresponde à subfamília Teiinae.

Pough et al. (2001) dividiu as espécies de Teiidae em duas subfamílias e dez gêneros: a subfamília Teinae, agrupando os gêneros *Ameiva* (Meyer, 1795), *Aspidoscelis* (Fitzinger,

1843), *Cnemidophorus* (Wagler, 1830), *Dicrodon* (Duméril e Bibron, 1839), *Kentropix* (Spix, 1825) e *Teius* (Merrem, 1820), e a subfamília Tupinambinae, com os gêneros *Callopiastes* (Gravenhorst, 1837), *Crocodylurus* (Spix, 1825), *Dracaena* (Daudin, 1801) e *Tupinambis* (Daudin, 1802).

Recentemente em uma ampla revisão da família Teiidae, Harvey; Ugueto; Gutberlet (2012) dividiram-na em três subfamílias: (1) Teiinae, incluindo os gêneros *Ameiva*, *Ameivula* (Spix, 1825), *Aurivela* (Bell, 1843), *Aspidoscelis*, *Contomastix* (Dumésil e Bibron, 1839), *Cnemidophorus*, *Dicrodon*, *Holcosus* (Cope, 1862), *Kentropyx*, *Medopheos* (Bocourt, 1874) e *Teiús*; (2) Tupinambinae, incluindo os gêneros *Crocodylurus*, *Dracaena*, *Salvator* (Dumésil & Bibron, 1839) e *Tupinambis*; e (3) Callopiastinae, que contém o único gênero *Callopiastes*.

Nas análises de Harvey; Ugueto; Gutberlet (2012), Tupinambinae é consistentemente parafilético, enquanto Teiinae é monofilético. Os gêneros *Tupinambis* e *Crocodylurus* parecem ser táxons irmãos, enquanto *Dracaena* e *Salvator* ocupam posições mais basais na filogenia. No trabalho, os autores reconheceram Tupinambinae para *Crocodylurus*, *Dracaena*, *Salvator* e *Tupinambis*.

Peters; Donoso-Barros (1970) reconheceram quatro espécies para o gênero *Tupinambis*: *T. duseni*, *T. nigropunctatus*, *T. rufescens* e *T. teguixin*. Mais tarde, Presch (1973) analisando sinônimos mais antigos, reconheceu apenas *T. rufescens* e *T. teguixim* como válido. Este mesmo autor refere-se à maioria das espécies de *T. merianae* como sendo *T. rufescens*. Em uma revisão Ávila-Pires (1995) fez comparações morfológicas detalhadas e rejeitou os resultados de Presch (1973) reconhecendo as quatro espécies mencionadas por Peters; Donoso-Barros (1970) além de redescreverem *T. merianae*. Porém, muitos problemas com a taxonomia de espécies do gênero *Tupinambis* ainda persistiam. A partir de 1995, novas espécies foram descritas: *T. longilineus* Ávila- Pires, 1995, *T. palustris* Manzani & Abe, 2002 e *T. quadrilineatus* Manzani & Abe, 1997.

Harvey; Ugueto; Gutberlet (2012) realocaram três espécies do gênero *Tupinambis* para o gênero *Salvator*. As espécies *T. merianae*, *T. duseni* e *T. rufescens* foram alocadas ao gênero, no qual passaram a ser chamadas *Salvator merianae*, *S. duseni* Lönnberg, 1910 e *S. rufescens* (Günther, 1871). A partir de então, o gênero *Tupinambis* passou a possuir apenas quatro espécies: *T. quadrilineatus*, *T. longilineus*, *T. palustris* e *T. teguixin* (Linnaeus, 1758).

Quanto aos aspectos morfológicos o gênero *Salvator* é o único de Teiidae com a combinação de duas loreais, ventrais lisas, e uma cauda subcilíndrica alternada com anéis. Ao contrário do gênero superficialmente semelhante *Tupinambis*, *Salvator* também tem uma pupila redonda (reniforme), linha completa de grânulos supraocular laterais (ausentes), um

sulco intertimpânico incompleto ou ausente, e subcaudal proximais (liso) (HARVEY; UGUETO; GUTBERLET, 2012). São lagartos grandes alcançando até 614 milímetros de comprimento rostro-cloacal (HARVEY; UGUETO; GUTBERLET, 2012). As espécies do gênero *Salvator* estão distribuídas no Sopé dos Andes orientais e planícies ao sul do rio Amazonas, na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (HARVEY; UGUETO; GUTBERLET, 2012) (FIG. 1).

FIGURA 1 – Distribuição geográfica das espécies do gênero *Salvator*



Fonte: Adaptado de THE REPTILE DATABASE (2016).

Já as espécies do gênero *Tupinambis* podem ser distinguidas de todos os outros teídeos pela combinação de dorsais lisas, uma loreal, uma diferença de escalas granulares que separam femoral de poros abdominais e uma cauda cilíndrica alternando anéis com anéis divididos em dorsal e os lados laterais da cauda. As espécies do gênero são encontradas do noroeste da Colômbia para o leste e para o norte da Venezuela, Trinidad-Tobago, e as terras baixas úmidas da Amazônia e as Guianas. Outras espécies ocorrem sul da Amazônia nos Cerrados da Bolívia e sul do Brasil (HARVEY; UGUETO; GUTBERLET, 2012).

3.2 Citogenética de Teiidae

As espécies da subfamília Tupinambinae apresentam cariótipo que varia de $2n=34$ a 38 compostos por 10 ou 12 macromossomos metacêntricos e submetacêntricos e por 22 a 26 micromossomos (GORMAN, 1973). Para diversas espécies da subfamília, é descrita também uma constrição secundária na região subtelomérica do braço longo do par 2. Diferentemente de Tupinambinae, os indivíduos da subfamília Teiinae apresentam uma

constituição cariotípica maior, com um número diploide variando de $2n=46$ a 56 cromossomos, geralmente acrocêntricos e sem distinção clara entre macro e microcromossomos (GORMAN, 1973).

O emprego de coloração diferencial em cromossomos mitóticos possibilitou estabelecer diferenças entre os cariótipos que apresentavam o mesmo padrão em coloração convencional (BERTOLOTTO et al., 1996; KASAHARA et al., 1996). Várias espécies da família Teiidae foram analisadas citogeneticamente, por técnicas de coloração convencional e diferencial como a detecção de regiões organizadoras de nucléolos (NOR) e distribuição da heterocromatina constitutiva, bem como mapeamento cromossômico físico de sequências de DNA (BICKHAM; MCKINNEY; MICHAEL, 1976; PECCININI-SEALE; ALMEIDA 1986; PORTER et al., 1991; ROCHA; BERGALLO; PECCININI-SEALLE, 1997; VERONESE; FREITAS; KRAUSE, 2003; PECCININI-SEALE et al., 2004; SANTOS et al., 2007; SANTOS et al., 2008; CARVALHO et al., 2015).

Com relação a dados citogenéticos moleculares envolvendo hibridização fluorescente *in situ* (FISH) em Teiidae, as espécies *Ameiva ameiva*, *Cnemidophorus* sp.1 Wagler, 1830, *Kentropyx calcarata* Spix, 1825, *Kentropyx pelviceps* (Cope, 1868) e *Tupinambis teguixin* coletados no estado do Amazonas, Brasil, foram analisadas por Carvalho et al. (2015), no qual utilizaram sequências rDNA 18S, que revelou um par de cromossomos portadores deste sítio, coincidente com os sítios NOR em todas as cinco espécies analisadas. Para *Salvator merianae*, o presente trabalho é o primeiro a utilizar FISH com sonda rDNA 18S.

3.3 Marcadores citogenéticos

3.3.1 Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs)

Santos (2007) caracteriza as NORs como sequências de DNA dispostas *in tandem* com genes ribossomais. Estas regiões de síntese de rRNA apresentam proteínas não histônicas relacionadas à síntese destas sequências ribossomais que possuem afinidade com o nitrato de prata. Desta forma, ao colocá-las em contato com uma solução dessa substância, as regiões cromossômicas com rDNA ativo durante a intérfase são evidenciadas. De acordo com esse mesmo autor, as NORs em lagartos geralmente estão presentes em um único par, sendo que em espécies portadoras do cariótipo $2n = 36$ as NORs são encontradas associadas às constricções secundárias localizadas na região distal do braço longo do par 2. Porém, variações na localização e no número foram relatadas fornecendo caracteres importantes para diagnósticos em diversas espécies.

Kasahara; Yonenaga-Yassuda; Rodrigues (1987) relatam que a relevância do marcador Ag-RON não se restringe em diferenciar cariótipos, mas é também muito útil para comprovar, a ocorrência de um rearranjo estrutural, como por exemplo, uma inversão pericêntrica presumida em cromossomos que, além de apresentarem morfologia alterada, exibem NOR em posição invertida, como em alguns lagartos.

3.3.2 Identificação de regiões de heterocromatina pelas Bandas C

As regiões heterocromáticas dos cromossomos podem ser visualizadas de maneira relativamente fácil utilizando uma técnica simples denominada Banda C, na qual os cromossomos são tratados com uma solução alcalina e corados com Giemsa (KASAHARA, 2009). Segundo a autora, com este método, são coradas regiões específicas em que o cromossomo apresenta DNA altamente repetitivo, como nas regiões dos centrômeros e em outras regiões cromossômicas. Os trabalhos que envolvem discussões sobre a origem e diferenciação de cromossomos sexuais têm partido de pesquisas envolvendo a relação destes cromossomos com regiões cromossômicas heterocromáticas, ricas em sequências de DNA repetitivo (PARISE-MALTEMPI et al., 2007; SILVA; BUSSO; PARISE-MALTEMPI, 2012). Em muitos grupos de peixes, por exemplo, grande parte da diversidade de sistemas sexuais existentes se deve a processos de ganhos de segmentos heterocromáticos em partes de seus cromossomos. Dessa forma, os estudos de regiões heterocromáticas em sistemas de cromossomos sexuais podem fornecer importantes dados para entendermos os processos que levaram à diversificação destes sistemas (ANANIAS et al., 2007).

A coloração por fluorocromos base específicos pode se tornar ainda mais eficiente na busca de marcadores citológicos nos cromossomos, complementando a identificação de regiões de heterocromatina pelo bandamento C, por ser empregada em conjunto com essa técnica (GAZONI, 2011). Além disso, possibilita a caracterização citológica da constituição molecular das sequências repetitivas nos cromossomos por meio de FISH, se rica em bases AT ou GC, pois, quando os fluorocromos são excitados pela radiação UV, emitem fluorescência brilhante de diferentes intensidades, de acordo com a composição das bases nitrogenadas das regiões (GAZONI, 2011).

3.3.3 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) na investigação de sequências repetitivas

DNAs satélites são sequências não codificadoras arranjadas em cadeia que geralmente estão localizadas próximas a regiões heterocromáticas dos cromossomos, nos centrômeros e

telômeros (CHARLESWORTH; SNIÉGOWSKI; STEPHAN, 1994). Os DNAs repetitivos são constituídos por sequências de diferentes comprimentos e composições que aparecem muitas vezes no genoma. Estão incluídos neste grupo os elementos arranjados em cadeia, compostos pelo DNA satélite (DNA altamente repetitivo), as sequências de mini e microssatélites (DNA moderadamente repetitivo) e as sequências repetitivas dispersas no genoma compostas por transposons e retrotransposons (DNA moderadamente repetitivo) (CHARLESWORTH et al., 1994).

Os microssatélites, também conhecidos como repetições de sequências simples (SSR) ou repetições curtas *in tandem* (STR) acumulam-se em regiões típicas tais como heterocromatina, telômeros, centrômeros e cromossomos sexuais (MARTINS, 2007; CIOFFI et al., 2012). São regiões de DNA repetitivos não-codificantes compostos de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em conjunto, comuns em genomas tanto de procaríotos como em eucariotos, (FIELD; WILLS, 1998; TÓTH; GÁSPARIZ; JURKA, 2000).

Esses marcadores de tamanho relativamente pequeno podem ser facilmente amplificados em reação em cadeia da polimerase (PCR), podendo ser aplicados com sucesso numa gama de campos da biologia e da medicina, incluindo genética forense, epidemiologia molecular, parasitologia, genética de populações e de conservação, mapeamento genético e análise genética de características complexas (CHISTIÁKOV et al., 2006).

As sondas de DNA ribossomal 18S têm sido usadas para se complementar as informações obtidas pela técnica de impregnação por nitrato de prata coloidal (Ag-RON), uma vez que a hibridização se dá na própria sequência, independentemente de sua atividade gênica (SILVA et al., 2006). Portanto, com essa marcação é mais seguro decidir sobre a ocorrência de NORs múltiplas e NORs inativas e esclarecer se os heteromorfismos de NOR são decorrentes de atividade diferencial ou resultado de um número maior de unidades de repetição (ANANIAS et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2009).

O marcador 5S, embora seja também um gene ribossômico, sua localização nos cromossomos não é possível pela técnica de Ag-RON. Dessa forma sua identificação fica restrita ao uso da técnica de hibridização *in situ* com os primeiros trabalhos realizados ainda na década de 1980, porém, com sondas marcadas por radioisótopos (VITELLI et al., 1982; SCHMID; VITELLI; BATISTONI, 1987). Atualmente são poucos os trabalhos relacionados à citogenética de lagartos utilizando rDNA 5S. A construção de sondas do gene ribossômico 5S para uso rotineiro em experimentos de FISH tem sido utilizado com frequência em pesquisas de citogenética de peixes (MARTINS; WASKO, 2004) e anfíbios (NASCIMENTO, 2010)

mostrando a localização eventual em sítios distintos nos cromossomos de espécies que mostram cariótipos altamente similares.

Com relação às sequências teloméricas, as marcações são bastante relevantes. Os telômeros são complexos nucleoproteicos que protegem as extremidades dos cromossomos eucariontes, ajudando a garantir a sua estabilidade e integridade (BLACKBURN; GREIDER, 1995). Eventualmente, sequências teloméricas podem ser localizadas em regiões não-terminais dos cromossomos, formando sequências teloméricas intersticiais chamados de STI. Sequências teloméricas intersticiais são tradicionalmente consideradas relíquias de rearranjos cromossômicos e, portanto, muito informativas na reconstrução da história evolutiva do cariótipo (FAGUNDES et al., 1997; VENTURA et al., 2006).

São especialmente ilustrativos dessa situação os trabalhos em roedores em que sequências teloméricas intersticiais (STI) foram observadas nas regiões onde houve quebra e fusão de braços cromossômicos em reordenamentos dos tipos fusão cêntrica ou fusão *in tandem* (FAGUNDES; VIANNA-MORGANTE; YONENAGA-YASSUDA, 1997; VENTURA et al., 2006), correspondendo a remanescentes de telômeros.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O Território do Vale do Rio Guaribas está localizado no sudoeste do Estado do Piauí constituído por 36 municípios. Situado entre 06°49'00" e 08°34'46" de latitude sul e 40°34'45" e 41°31'07" na região semiárida, caracterizado pela baixa precipitação. A área total média corresponde a 20.938 Km² significando 8% da área do Estado. A população do território totaliza 288.915 habitantes, constituído por pequenos municípios sendo que 29 (81%) possuem população de até 10.000 habitantes o que revela ser o território essencialmente rural. Está inserido na região quente e úmida, com alternância dos índices pluviométricos que vão de 500 a 800mm (BRASIL, 2006).

O Bioma predominante é a Caatinga, dominado por tipos de vegetação xerofíticas (formações vegetais secas, que compõem uma paisagem cálida e espinhosa), com extratos compostos por gramíneas, arbustos e árvores de porte baixo ou médio (3 a 7 m), caducifólias (folhas que caem no período seco), com grande quantidade de plantas espinhosas, entremeadas de outras espécies como as cactáceas e as bromeliáceas. A fauna é constituída por uma variedade de espécies como lagartos, anfíbios, serpentes, quelônios, anfíbios, aves,

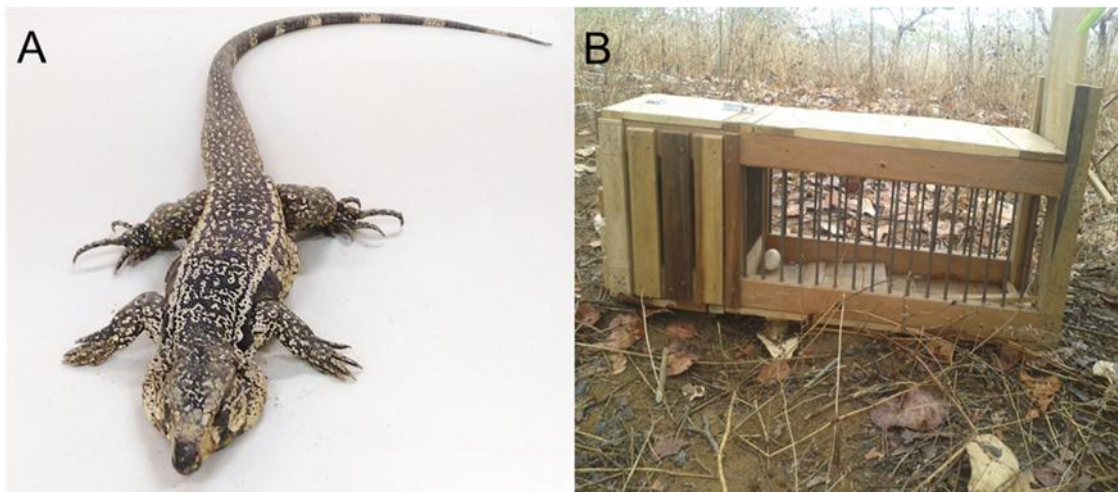
além de outras espécies de animais, como o tatu-peba, o gato-do-mato e o macaco prego (BRASIL, 2006).

4.2 Procedimentos em campo

A coleta dos espécimes se deu no período de fevereiro a dezembro de 2015. Os exemplares foram coletados utilizando armadilhas de gaiolas, colocadas aleatoriamente em locais onde se detectou a presença de lagartos da espécie (FIG. 2). As armadilhas foram revistas uma vez ao dia e os animais capturados foram coletados para evitar que morressem devido ao calor excessivo.

Os animais foram transportados para o laboratório de Biologia do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí, *campus* Picos, e mantidos em caixas de criação, até a realização dos procedimentos de registro, coleta de material citogenético, catalogação, fixação e preservação dos espécimes. Os procedimentos de coleta foram devidamente autorizados pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade- ICMBio/SISBIO sob número 47710-1.

Figura 2 – A: Indivíduo de *Salvator merianae*; B: Armadilha de gaiola para captura dos animais



Fonte: Elaborado pelo autor (2016)

4.3 Procedimentos em laboratório

4.3.1 Obtenção de cromossomos mitóticos

A obtenção de cromossomos mitóticos foi realizada no Laboratório de Biologia do IFPI, utilizando as técnicas de *air-drying* descrita por Bertollo; Takahashi; Moreira-Filho (1978) com algumas modificações para lagartos. Foram injetadas, intraperitonealmente, a solução de colchicina na concentração entre 0,01% a 0,1%, na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso do animal. Esperou-se 24 horas antes do sacrifício, mantendo o animal em

caixas de criação sob temperatura ambiente. Logo em seguida o animal foi sacrificado com substância anestésica e seus fêmures retirados, com dissecação da musculatura e retirada das epífises. Em seguida, com auxílio de uma seringa, foram feitas lavagens sucessivas dos fêmures com solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075M, até a retirada total da medula óssea, recolhida em uma placa de Petri. Como a quantidade de material era grande, o tratamento hipotônico foi feito com 5 ou até 10mL de solução. A suspensão foi transferida para um tubo de centrífuga e incubada a 37°C, durante 45 minutos.

Decorrido esse tempo, procedeu-se a pré-fixação adicionando à suspensão cerca de seis gotas de fixador Carnoy (metanol e ácido acético, na proporção 3:1), gelado, e preparado no momento do uso, com agitação leve e espera de 5 minutos. Continuou-se a pré-fixação adicionando mais seis gotas de fixador, com pipetagem leve e espera de mais cinco minutos. Em seguida a suspensão foi centrifugada entre 900 a 1000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi desmanchado com a pipeta Pasteur e adicionado vagarosamente 3 mL ou mais de fixador. O *pelet* foi dissolvido, lavando bem as células. O procedimento de fixação foi repetido com mais duas lavagens de fixador.

Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado quantidade de fixador suficiente para o preparo das lâminas. A suspensão foi pingada sobre lâminas limpas e secas, mantida horizontalmente sobre um suporte de arame colocado em banho-maria a 60°C, a 0,5cm do nível de água, pingando duas ou mais gotas. Logo em seguida, a lâmina foi retirada do banho-maria e secas ao ar. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa, por um período de 10 minutos e em seguida lavadas com água destilada e secas ao ar.

4.3.2 Detecção da heterocromatina constitutiva

O estudo da heterocromatina constitutiva foi realizado no Laboratório de Biologia do IFPI utilizando-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. O material preparado foi tratado segundo a técnica descrita para cromossomos mitóticos, com HCl 0.2 N à temperatura ambiente por 15 minutos, seguida de lavagem da lâmina em água corrente e seca ao ar. Em seguida a lâmina foi colocada em solução salina 2xSSC, a 60° C, por 15 minutos, com posterior lavagem em água corrente e secagem ao ar.

A lâmina foi tratada em solução aquosa em hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 5%, recém preparada e filtrada, a 42° C, durante 15 segundos precisos. Transcorrido esse tempo, imediatamente, interrompeu-se a ação da solução de hidróxido de bário, submergindo rapidamente a lâmina em solução de HCl 0,2 N, com posterior lavagem em água corrente

secagem ao ar. Em seguida a lâmina foi colocada em solução 2xSSC a 60° C durante 45 minutos. A lâmina tratada foi lavada em água corrente, seca ao ar e corada em solução de Giemsa diluída a 3% em água destilada durante 15 minutos.

4.3.3 Detecção das NORs

Para a visualização das NORs, foi empregada a técnica de impregnação pelo nitrato de prata coloidal, descrita por Howell & Black (1980), com algumas adaptações, realizadas no Laboratório de Biologia do IFPI. Foram colocadas duas gotas de solução de gelatina à 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1 mL para cada 100 mL de solução) em duas regiões diferentes da lâmina com preparações cromossômicas. Em seguida foi acrescentada uma gota de solução aquosa de nitrato de prata 50% sobre cada gota de gelatina.

Na sequência, a lâmina foi coberta com uma lamínula e incubada em câmara úmida a 60°C até que os cromossomos adquirissem uma coloração amarelo escuro e os nucléolos uma coloração quase preta; em geral este tempo variou de 3 a 5 minutos.

Decorrido este tempo, removeu-se a lamínula com jatos de água destilada. As lâminas foram secas ao ar e eventualmente coradas com solução de Giemsa a 5%, durante 20 a 30 segundos, lavadas em água destilada e secas ao ar.

4.3.4 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

4.3.4.1 Sondas Telomérica e rDNA

Os experimentos de FISH foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, do Instituto Evandro Chagas (IEC) – Belém – PA. Todas as sondas utilizadas foram obtidas e disponibilizadas pelo laboratório.

A sonda de rDNA 18S foi obtida por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) 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 sonda telomérica foram usados os *primers* (TTAGGG)⁵ e (CCCTAA)⁵ obtidas por PCR sem DNA molde.

O processo de hibridização e detecção foi conduzido seguindo-se o protocolo de Oliveira et al. (2010), com algumas modificações nos tempos de desnaturação e lavagens pós hibridização. Ao término das preparações foi adicionado o fluorocromo 4'6-diamidino-2-phenylindole (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 reação.

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 2 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. As lâminas foram desidratadas em série etílica 70, 90 e 100% por 5 minutos respectivamente.

4.3.4.1.2 Hibridização

Após pernoitarem em estufa a 37°C, as lâminas previamente tratadas foram submetidas ao processo de desnaturação dos cromossomos que consistiu em submergi-las em solução de formamida 70%, a 72°C (70 mL de formamida PA em 30mL de 2xSSC). As lâminas foram mantidas nessa solução por 1 minuto e 20 segundos, variando de acordo com a qualidade das preparações citogenéticas.

Em seguida, o material foi desidratado em série etílica gelada (-20° C) com diferentes concentrações (70, 90 e 100%) por cinco minutos cada. Após esse procedimento o material foi mantido em temperatura ambiente para secagem. Enquanto as lâminas eram submetidas a série etílica, as sondas foram desnaturadas.

Para a preparação das sondas, 2 µL da sonda marcada foram adicionados a 10 µL do tampão de hibridização (formamida 50% em 2xSSC e sulfato dextrano 10%) por lâmina em um microtubo. 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 Lavagens e detecção

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

Para isso as lâminulas 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 20xSSC, 5 µL de Triton e 75 mL de água) em temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas por 40 minutos com anticorpos (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 lâminulas e guardadas em caixas ao abrigo da luz.

4.3.4.2 Microsatélites

Os experimentos de FISH com sondas de microsatélites seguiram o protocolo de Kubat et al. (2008) com adequações. As sondas foram marcadas diretamente com Avidina-CY3. As sequências utilizadas foram: CA, CAA, GAG, GA, CAC e GAA disponíveis no Instituto Evandro Chagas.

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

No primeiro dia dos experimentos, as lâminas com material fixado foram colocadas por uma hora em estufa a 37° C. Em seguida foram colocadas por mais 25 minutos na estufa a 60° C e foi aspergido sobre as lâminas 200 µL 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. Logo após, incubou 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 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). Logo após, foi aspergido a

sonda sobre as lâminas, colocou-se as lamínulas, 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 5 minutos cada, em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas uma vez em tampão fosfato salino (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.

4.3.4.3 Detecção do conteúdo molecular de regiões repetitivas por fluorocromos base-específicos (coloração DAPI)

Para a detecção das regiões repetitivas ricas em bases GC ou AT, foi empregada a técnica modificada de Christian et al. (1998), a qual dispensa o uso do contracorante distamicina A. A lâmina foi incubada em solução de formamida a 70% em 2xSSC, aquecida a 70°C, por dois minutos. Em seguida, imersa duas vezes em banhos de 2xSSC, à temperatura ambiente, por dois minutos cada e passada em bateria de etanol gelado (70, 85 e 100%) por dois minutos cada banho.

Depois de seca, sobre ela foram colocados 30 µL de *antifading*, preparado em solução do fluorocromo AT-específico 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). O material foi coberto com lamínula e a lâmina permaneceu em câmara escura na geladeira por cerca de 30 minutos. Seguiram-se três banhos de PBS, à temperatura ambiente, por dois minutos cada. Depois de, no mínimo, 10 minutos de coloração, o excesso de líquido foi retirado da lâmina com papel-filtro e observada ao microscópio de fluorescência com uso de filtros adequados.

4.4 Análises de dados

As melhores metáfases da coloração com Giemsa foram fotografadas ao microscópio de luz Nikon Eclipse, acoplado a um sistema de captura de imagens e montados os cariótipos para análises comparativas. Os cromossomos foram organizados em metacêntricos, submetacêntricos, e subteloentrícos, e acrocêntricos, dependendo da razão de braços e arranjados em decréscimo de tamanho nos respectivos cariótipos (LEVAN et al., 1964). A captura das imagens de 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 *Axionvision*. As imagens das metáfases foram posteriormente otimizadas com brilho e contraste pelo programa *Adobe Photoshop CS6*, e montadas em pranchas no programa *Corel Draw X7*.

5 RESULTADOS

Dos indivíduos coletados e analisados foram fotografadas metáfases de dois exemplares machos e uma fêmea de *S. merianae*. Nos exemplares analisados não foram observados cromossomos sexuais heteromórficos. Indivíduos machos e fêmeas apresentaram um número diploide de $2n=38$, compostos por 10 macrocromossomos do tipo metacêntricos e submetacêntricos e 28 microcromossomos (FIG. 3).

A heterocromatina constitutiva visualizada a partir da técnica de bandamento C foi detectada como blocos discretos, principalmente próximos à região centromérica e telomérica de macrocromossomos e alguns microcromossomos em ambos os sexos (FIG. 4 A e B). Cromossomos previamente desnaturados com formamida e corados com DAPI mostraram regiões pericentroméricas de alguns cromossomos ricos em blocos AT (FIG. 4 C).

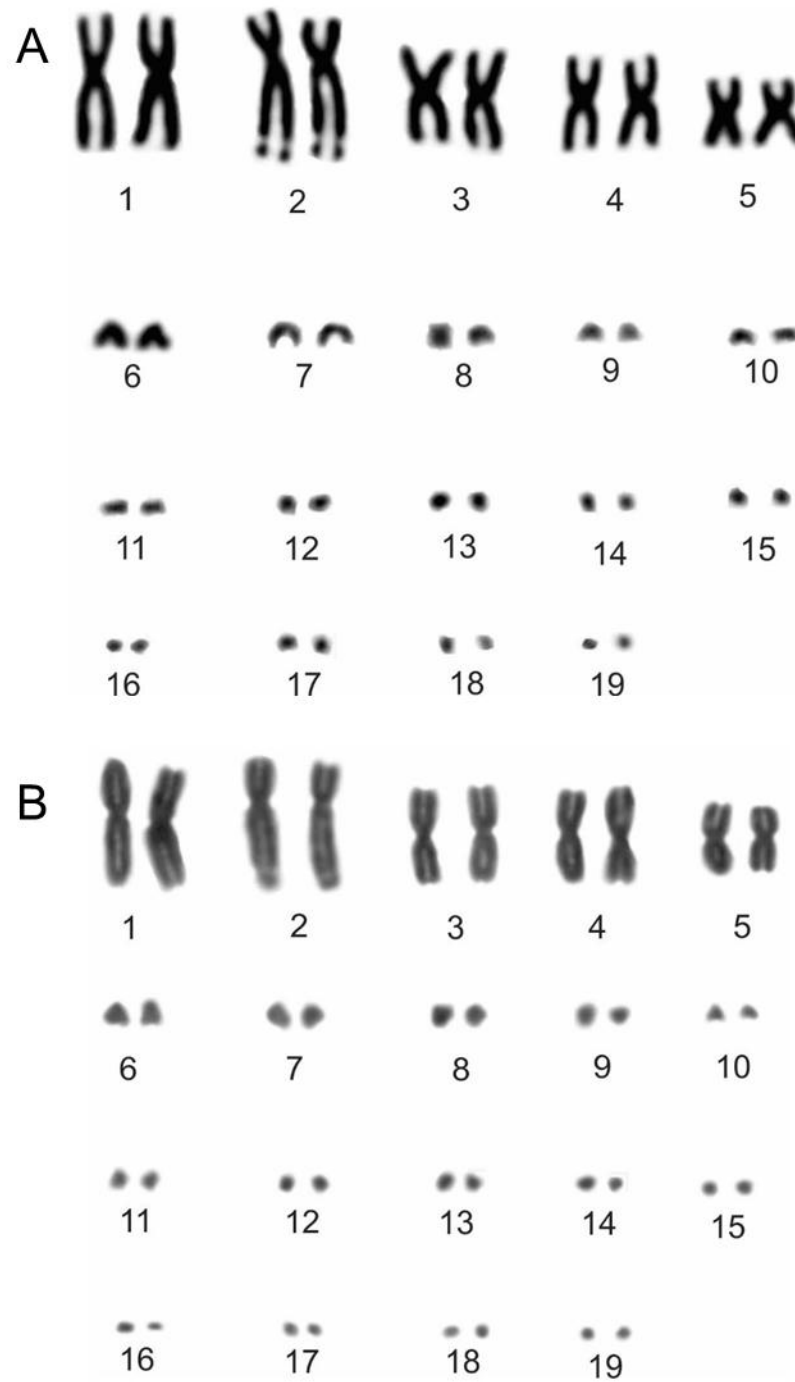
Sinais positivos de hibridização com sondas telomérica foram observados nas posições terminais dos cromossomos, bem como sinais intersticiais em regiões centroméricas de diversos pares de cromossomos (FIG. 4 D).

As regiões organizadoras de nucléolos localizam-se na porção terminal de um único par cromossômico do tipo submetacêntrico em *S. merianae*. Foi possível observar também uma constrição secundária no par 2 dos exemplares à qual a região organizadora de nucléolo está associada (FIG. 4 E).

A técnica de FISH com sonda ribossômica 18S revelou sinais de hibridação nos sítios correspondentes aos das NOR na espécie estudada. Não foram observados heteromorfismos relacionados ao tamanho e posição em ambos os sexos estudados (FIG. 4 F).

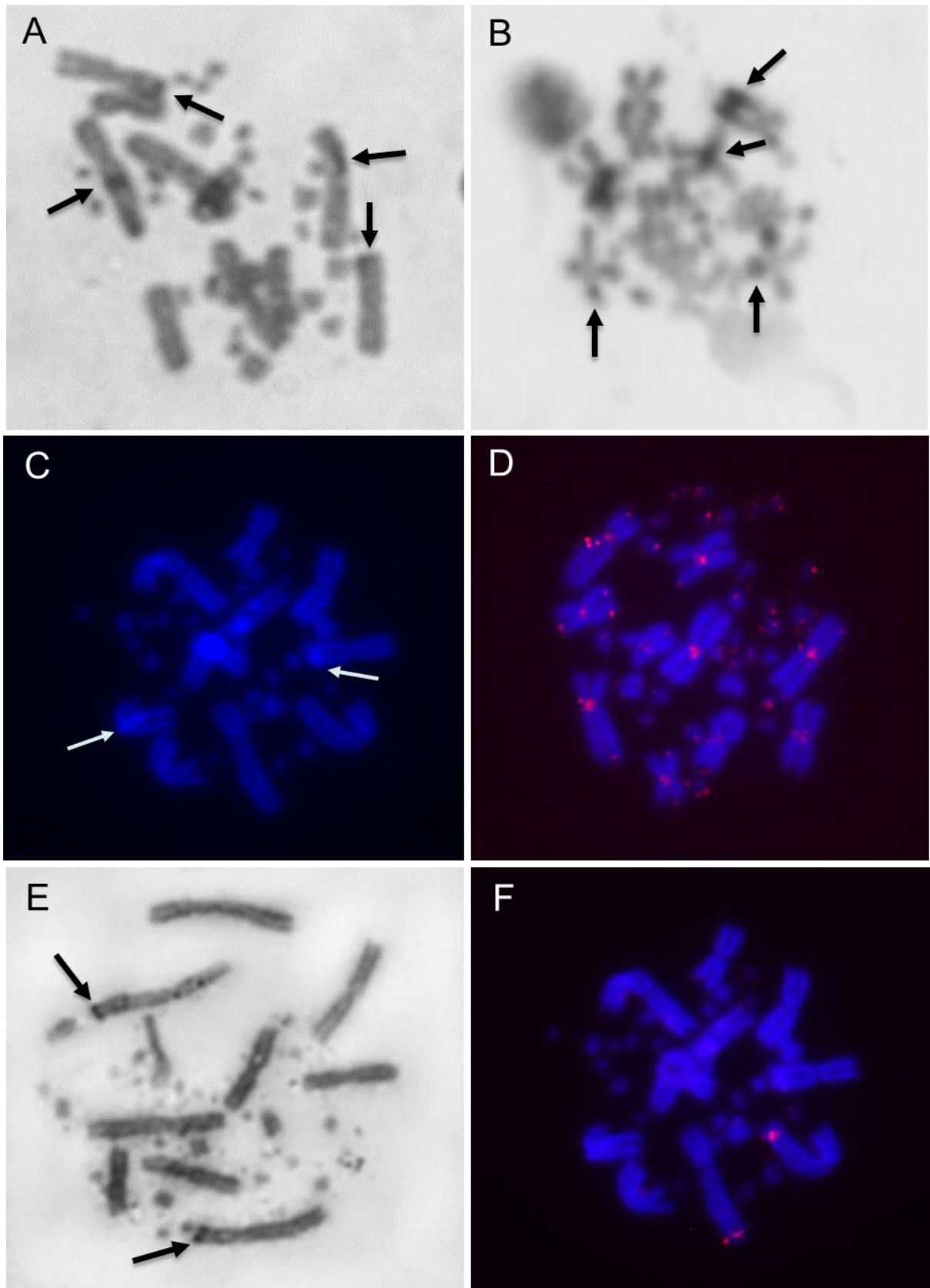
O padrão de distribuição das sequências de microssatélites estudadas em *S. merianae*, evidenciaram dois padrões distintos: (I) sinais fracos de hibridização dispersos ao longo dos cromossomos inteiros, e (II) sinais específicos formando blocos mais evidentes em regiões teloméricas e pericentroméricas de alguns macrocromossomos e em regiões pontuais em alguns microcromossomos (FIG. 5). O padrão I de distribuição foi verificado principalmente pelas sondas CA, CAA, CAC, GAA e GAG, mostrando sinais dispersos e variáveis ao longo dos braços cromossômicos. Já o padrão II foi observado com maior nitidez nos experimentos envolvendo as sondas CA, CAA e CAC. Marcações centroméricas/pericentroméricas foram evidenciadas pela hibridização das sequências CAC, CAA, enquanto que sinais na porção terminal dos cromossomos foram quase que exclusivos das sequências GAA e GAG. Sinais pontuais conspícuos em microcromossomos foram vistos somente com a sequência GA.

Figura 3 – Cariótipo de *Salvator merianae* com coloração convencional em Giemsa mostrando $2n = 38$ cromossomos. (A) macho, (B) fêmea



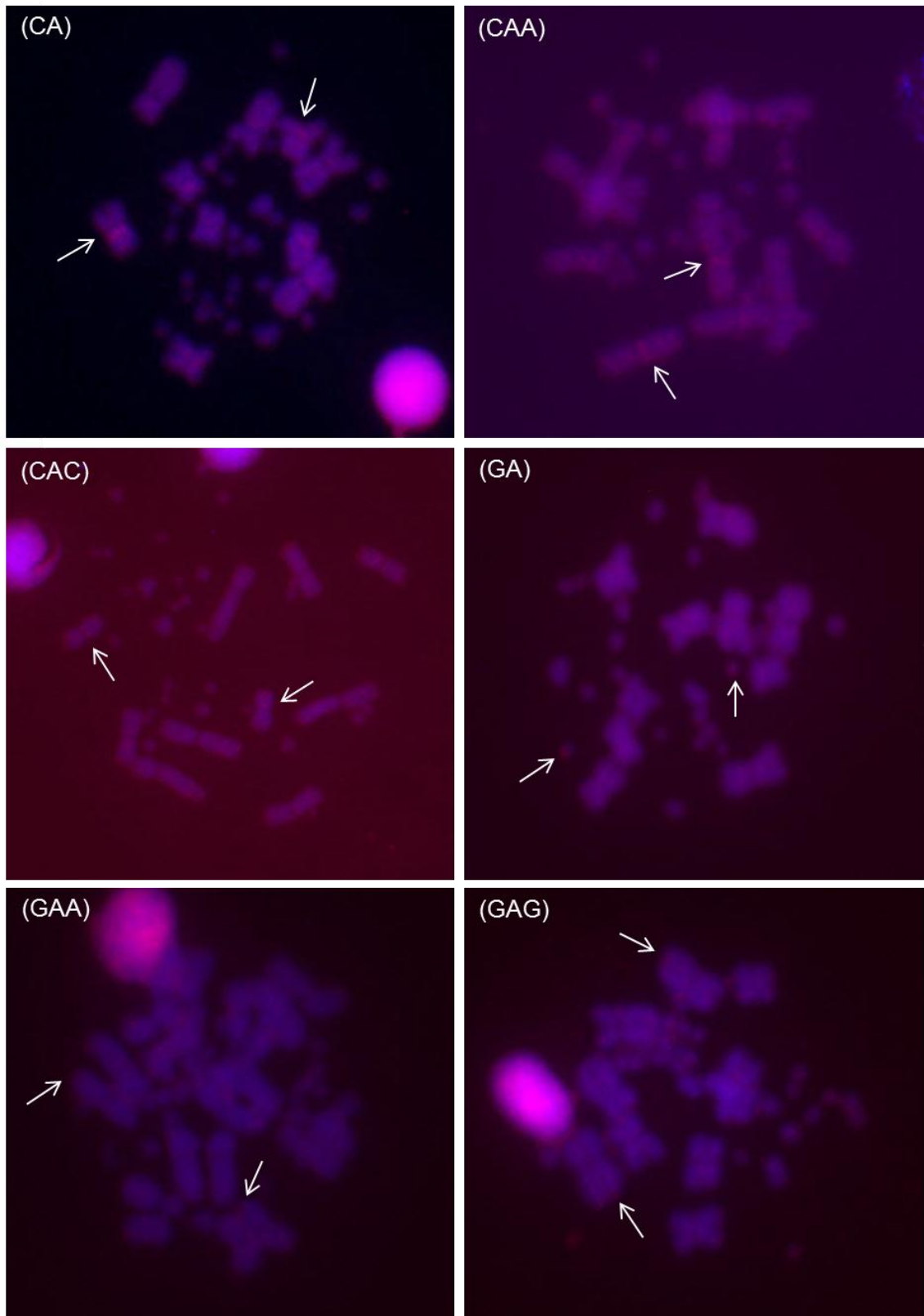
Fonte: Elaborado pelo autor (2016)

Figura 4 – Metáfases de *Salvator merianae*. (A, B) evidência da heterocromatina constitutiva em indivíduo macho e fêmea respectivamente, (C) Coloração com fluorocromo DAPI, (D) FISH com sonda telomérica, (E) Impregnação com nitrato de prata evidenciando regiões organizadoras de nucléolos, e (F) FISH com sonda de rDNA 18S. Setas: marcações evidentes



Fonte: Elaborado pelo autor (2016)

Figura 5 – Metáfases de *Salvator merianae* evidenciando sinais de hibridização com sondas de microssatélites. Setas: marcações evidentes



Fonte: Elaborado pelo autor (2016)

6 DISCUSSÃO

O número diploide $2n=38$ encontrado em *S. merianae* corrobora estudos prévios em indivíduos da espécie provenientes de outras regiões do país (VERONESE; FREITAS; KRAUSE, 2003; SANTOS et al., 2008; HERNANDO; ALEJANDRA, 1999). As pequenas divergências existentes entre os indivíduos estudados no presente trabalho e aqueles provenientes dos estados de Tocantins, São Paulo e Espírito Santo provavelmente estão relacionadas à definição do número de macrocromossomos (TAB. 1). Veronese; Freitas; Krause, (2003) analisando espécimes provenientes do estado do Rio Grande do Sul, também encontraram resultados semelhantes nos quais o cariótipo apresentava 10 macrocromossomos e 28 microcromossomos.

TABELA 1 - Número diplóide ($2n$), fórmulas cariotípicas, posição da NOR, e padrão de bandamentos nos cromossomos de espécies dos gêneros *Tupinambis* e *Salvator*. $2n$ = número diploide; C: tipo de bandamento; M : macrocromossomo; m : microcromossomo; NOR : região organizadora de nucléolo

<i>Espécies</i>	Região	$2n$	Cariótipo	Banda	NOR	Referências
<i>S. merianae</i>	RS	38	10 M + 28 m	C	Par 2	Veronese; Freitas; Krause, 2003
<i>S. merianae</i>	TO, SP e ES	38	12 M + 26 m	C	Par 2	Santos et al., 2008
<i>S. merianae</i>	Corrientes (AR)	38	10 M + 28 m	---	Par 2	Hernando, Alejandra B., 1999
<i>T. quadrilineatus</i>	GO e TO	38	12 M + 26 m	C	Par 2	Santos et al., 2008
<i>T. teguixim</i>	MT,GO e TO	36	12 M + 24m	C	Par 2	Santos et al., 2008
<i>T. teguixim</i>	AM	38	10 M + 28 m	C	Par 2	De Smet, 1981
<i>T. teguixim</i>	AM	36	12 M + 24m	C	Par 2	Carvalho et al., 2015

Fonte: Elaborado pelo autor (2016)

Comparando dados citogenéticos disponíveis para espécies da subfamília é possível verificar certa estabilidade no número cromossômico (TAB. 1). Carvalho et al. (2015) analisaram exemplares de *Tupinambis teguixin* e verificaram a presença de $2n = 36$ cromossomos (12M + 24m) com fórmula cariotípica semelhante à encontrada por outros autores (GORMAN 1970, DE SMET, 1981, SANTOS et al., 2008). A única exceção está em exemplares de em *T. teguixin* de origem não informada examinados por Beçak, M. L; Beçak, W; Denaro, (1972), nos quais existe um par adicional de microcromossomos, totalizando 38 cromossomos (12M + 26m).

Apesar da diversidade de mecanismos de diferenciação sexual existente em lagartos em geral, nenhum sistema tem sido documentado na subfamília Tupinambinae (GORMAN 1970; CARVALHO et al., 2015).

O modo como a heterocromatina constitutiva está distribuída no cariótipo de *S. merianae* evidencia regiões cromossômicas marcadas discretamente nas posições centromérica e telomérica de alguns macromossomos e microcromossomos, sem distinção entre machos e fêmeas. Veronese; Freitas; Krause, (2003) obtiveram resultados semelhantes ao observar exemplares das espécies de *Cnemidophorus lacertóides* Duméril & Bibron, 1839, *Teius oculatus* (D'orbigny & Bibron, 1837), *Ameiva ameiva* e *S. merianae*. Nestas espécies pequenos blocos heterocromáticos presentes nas porções terminais e pericentroméricas foram observados. Semelhantemente, Santos et al. (2008) encontraram em *Crocodilurus amazonicus* Spix, 1825 blocos heterocromáticos na região pericentromérica de todos os macromossomos e alguns micromossomos, bem como em *Tupinambis quadrilineatus* e *S. merianae* de diferentes regiões do país. Recentemente, essas mesmas observações foram feitas por Carvalho et al. (2015) nos cromossomos de indivíduos de *Ameiva ameiva*, *Cnemidophorus* sp. 1, *Kentropyx calcarata*, *K. pelviceps* e *Tupinambis teguixim* provenientes da região Amazônica.

Regiões heterocromáticas são comumente ricas em sequências de DNA repetitivos e normalmente estão localizados nas regiões centroméricas ou terminal de cromossomos. Estas sequências têm sido muitas vezes consideradas importantes marcadores específicos de espécies ou populações (CARVALHO et al., 2012, SCHNEIDER et al., 2013). Contudo em lagartos, a macroestrutura de segmentos heterocromáticos mostrados a partir da técnica de Bandamento C, por si só, não tem distinguido as espécies de lagartos. Dessa forma, detalhes da composição molecular de tais regiões precisam ser acessados, utilizando marcadores mais precisos. Isso se deve ao fato de que embora a heterocromatina possa ser localizada na mesma região cromossômica em diferentes espécies, não significa que ela tenha a mesma composição molecular (CHAIPRASERTSRI et al., 2013). Neste sentido, a coloração com o fluorocromo DAPI em indivíduos de *S. merianae* permitiu evidenciar segmentos heterocromáticos ricos em sequências AT em alguns macromossomos. Da mesma forma, a ausência de sinais brilhantes em regiões como centrômeros, telômeros e constrições secundárias indicaram regiões com prevalência de bases CG.

As NORs de indivíduos de *S. merianae* já analisados não evidenciam polimorfismos de tamanho nem posição cromossômica. Essa mesma constituição pôde ser observada em espécies dos gêneros *Salvator*, *Tupinambis* e *Crocodilurus*: *S. merianae*, *T. teguixim*, *T.*

quadrilineatus e *C. amazonicus* (VERONESE; FREITAS; KRAUSE, 2003; SANTOS et al., 2008). Esta estabilidade parece ter sido mantida evolutivamente também em nível molecular, uma vez que os experimentos de hibridização *in situ* utilizando sonda ribossomal 18S revelaram regiões organizadoras de nucléolos exatamente iguais ao observado nos experimentos com nitrato de prata. Este padrão observado para *S. merianae* no presente trabalho, é muito semelhante às demais espécies já estudadas tanto do gênero *Salvator* como *Tupinambis* (TAB. 1). No caso do gênero *Salvator*, esta é a primeira vez que se tem registro do uso de sondas de DNA ribossômicos neste grupo, e as mesmas não revelaram marcações crípticas e nenhuma evidência de rearranjo recente que tenha envolvido a NOR em *S. merianae*.

Algumas variações como número e posição de NOR têm sido relatadas em outras espécies da família Teiidae. Diferenças regionais, influenciadas principalmente por fusões cêntricas, fissões e inversões pericêntricas tem ocorrido em espécies de *A. ameiva* (PECCININI-SEALE; ALMEIDA, 1986). Segundo as autoras, indivíduos coletados em Capanema, Pará mostraram NORs nos pares cromossomos 1, 2, 7, 16, 18, 19, bem como em um par de microcromossomos. Já no estudo citado, em indivíduos coletados em Santarém, neste mesmo estado e em Urucurituba, no Amazonas, os sítios ribossomais foram verificados nos pares 1 e 2 e em um pequeno microcromossomo. Para esta mesma espécie, provenientes de Manacapuru, Amazonas, Sites et al. (1990) encontraram NORs localizadas nos pares cromossômicos 1, 4 e 9 e em microcromossomos. Recentemente Carvalho et al. (2015) observaram três padrões de distribuição das regiões organizadoras de nucléolos nas espécies (i) *A. ameiva*, par 7, (ii) *Cnemidophorus* sp. 1, *Kentropyx calcarata* e *K. pelviceps*, par 1, (iii) *T. teguixim*, par 2. Essas marcações foram todas confirmadas pela FISH com sondas de rDNA 18S. Tais heteromorfismos são provavelmente associados com mecanismos de *crossing-over* desiguais, rearranjos como transposições, exclusões e/ou duplicações ou variações no número de cópias de rDNA presentes nestes locais e que dariam origem a algumas mudanças na localização de sítios ribossomais (GROSS et al., 2010; RIBEIRO et al., 2008).

A localização das NORs é importante para a caracterização de espécies e estudos evolutivos entre lagartos da família Teiidae (SANTOS et al., 2008). *Salvator merianae* e *Tupinambis teguixim*, por exemplo, são gêneros relacionados e possuem uma NOR simples, evidenciadas pela constrição secundária do braço longo do par 2, este último, confirmado pela hibridização fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 18S (CARVALHO et al., 2015). *Salvator merianae* no presente trabalho evidenciou uma NOR simples e foi possível confirmar a presença e localização por meio da FISH 18S. A presença desta constrição é uma

característica comum entre as espécies da subfamília Tupinambinae (GORMAN, 1970). Estas estruturas estão tipicamente presentes em um único par cromossômico, sendo muito comum em várias espécies de lagartos (BERTOLLOTO et al., 1996; KASAHARA et al., 1996; BERTOLLOTO et al., 2002). Em *Cnemidophorus sp.1*, *Kentropyx pelviceps*, *Kentropyx calcarata* e *Tupinambis teguixin*, a presença de uma constrição secundária localizada na região distal dos pares 1 e 2 foi observada (CARVALHO et al., 2015). No entanto em indivíduos de *A. ameiva* estas estruturas estão ausentes.

Sequências teloméricas têm sido amplamente usadas em estudos com diversos grupos de animais principalmente como forma de mostrar resquícios de rearranjos cromossômicos que possam ter ocorrido ao longo do processo evolutivo da espécie. Contudo, contrariando o senso comum, para a maioria das espécies de lagartos estudadas é comum além das marcações nas extremidades dos telômeros, sinais intersticiais presentes em um grande número de cromossomos, predominantemente em regiões pericentroméricas. Estes sinais têm sido vistos em membros de todas as linhagens principais do grupo caracterizando resto de “velhos” telômeros terminais após eventos de fusão Robertsoniana (ROVATSOS et al., 2015).

Rovatsos et al. (2015), em um extenso trabalho utilizando sondas teloméricas verificaram que *Aspidoscelis deppei* (Wiegmann, 1834), *A. gularis* (Baird & Girard, 1852) e *A. sexlineata* (Linnaeus, 1766) (Teiidae) apresentaram sequências teloméricas intersticiais em regiões centroméricas e pericentroméricas. Neste mesmo trabalho os autores relatam que a espécie *A. tigris* (Baird & Girard, 1852) mostrou STIs apenas na região centromérica e *A. inornata* (Baird, 1859) não apresentou STIs. Este resultado é semelhante ao encontrado em *S. merianae* no presente trabalho, onde foi possível confirmar a presença de STIs no cariótipo, com sinais revelados em porções centroméricas na maioria dos cromossomos metacêntricos, além de regiões pericentroméricas, evidenciando a presença de rearranjos cromossômicos antigos, como esperado para Squamatas.

O presente estudo fornece a primeira análise por mapeamento cromossômico de microssatélites em uma espécie de lagarto brasileiro. Os resultados obtidos indicaram que há uma propagação de todas as sequências no genoma de *S. merianae*, com sinais específicos mais evidentes em regiões teloméricas, pericentroméricas e em alguns microcromossomos. Os sinais foram observados tanto em regiões eucromáticas quanto heterocromáticas.

O resultado das análises com sequências de microssatélites mapeadas no genoma de *S. merianae* foram semelhantes àsquelas observados para grupos distantes de vertebrados como peixes e até mesmo invertebrados como gafanhotos. Nestes organismos sinais espalhados por todos os cromossomos e outros agrupados em regiões terminais e centroméricas foram

notados (CIOFFI; KEIJNOVSKY; BERTOLLO, 2010; MILANI; CABRAL-DE-MELO, 2014). Este resultado permite sugerir que estas sequências podem estar diretamente envolvidas na formação da estrutura do centrômero e dos telômeros. Além disso, DNAs repetitivos como os microssatélites estão envolvidos na formação da heterocromatina, em processos de regulação gênica, organização e funcionalidade dos centrômeros, telômeros, perfeita segregação cromossômica, reparo e replicação do DNA e diferenciação dos cromossomos sexuais (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007, MARTINS, 2007; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012).

Uma notável organização de DNAs repetitivos, como a observada em *S. merianae*, foram relatadas por Milani e Cabral-De-Mello, (2014) na espécie de gafanhoto *Abracris flavolineata* (De Geer, 1773) (Acrididae), revelando um espalhamento das sequências de microssatélites mapeadas em todo o genoma, com sinais específicos mais evidentes em certas regiões cromossômicas, porém prevalecendo hibridização tanto em regiões eucromáticas quanto heterocromáticas.

Pokorná; Kratochvíl; Kejnovský, (2011) analisaram sequências repetitivas em cromossomos sexuais de *Eremias velox* (Pallas, 1771), (Sauria; Lacertidae), e observaram que certas sequências de microssatélites são extensivamente acumuladas ao longo de todo o comprimento ou partes do cromossomo sexual W, enquanto outros, incluindo (GATA)_n, estão ausentes neste cromossomo sexual.

Em peixes, os DNAs repetitivos têm sido amplamente estudados principalmente pelo seu papel importante na diferenciação de cromossomos sexuais. Nestes estudos, frequentemente tem se relacionado o acúmulo de sequências de DNA repetitivos nas regiões heterocromáticas do genoma destes organismos (CIOFFI et al., 2010).

Cioffi et al. (2010) observaram a distribuição de 12 mono, di- e tri-nucleotídeos de microssatélites sobre os cromossomos de 2 cariomorfos de *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae), com dois distintos sistemas de cromossomos sexuais (um simples XX / XY e um múltiplo X₁ X₁ X₂ X₂ / X₁ X₂ Y). Os padrões de distribuição de diferentes microssatélites ao longo dos cromossomos variaram consideravelmente, com sinais de hibridização fortes observados em regiões subteloméricas e em regiões heterocromáticas de vários autossomos, com uma acumulação diferente nos cromossomas sexuais. Para os autores, este padrão de distribuição é provável, de acordo com modelos que preveem a acumulação de sequências de DNA repetitivo em regiões com muito baixa recombinação.

Sinais positivos de hibridização de microssatélites predominantemente em regiões teloméricas foi observado no genoma de quatro espécies de peixes do gênero *Leporinus*

(Anostomidae) tanto em autossomos quanto nos cromossomos Z (POLTRONIERI et al., 2013). *Salvator merianae* apresentou padrão de hibridização semelhantes nos cromossomos autossomos, evidenciando que a localização destas sequências permanece de maneira estável mesmo entre grupos filogeneticamente distantes, com marcações mais evidentes predominantemente em regiões teloméricas, centroméricas e pericentroméricas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho permitiram uma visão mais abrangente sobre a organização cariotípica da espécie *S. merianae*, analisada tanto pela coloração convencional, quanto por meio do mapeamento genômico molecular, permitindo uma série de observações que devem ser ressaltadas:

- Apesar da ampla distribuição da espécie, a macroestrutura cariotípica permanece sem modificações no número diploide do grupo. Este fato reforça a ideia de um certo grau de conservação cromossômica. As pequenas diferenças no tamanho e morfologia dos cromossomos para a espécie de outras regiões devem ter sido originadas, ao longo da evolução, a partir de rearranjos estruturais mínimos, nem sempre de fácil detecção ou comprovação mesmo com o uso de técnicas mais resolutivas.
- Resquícios de rearranjos cromossômicos ao longo da história evolutiva da espécie ficaram evidentes com a hibridização com sondas teloméricas.
- No caso do gênero *Salvator*, esta é a primeira vez que se tem registro do uso de sondas de DNA ribossômicos neste grupo, e as mesmas não revelaram marcações crípticas e nenhuma evidência de rearranjo recente que tenha envolvido a NOR em *S. merianae*, permanecendo estável para a espécie, sendo que o marcador tem localização no cromossomo 2, como o observado com frequência no gênero.
- A localização e a quantidade de heterocromatina constitutiva visualizada pela técnica de bandamento C indicou marcações terminais nos braços cromossômicos e em regiões pericentroméricas do genoma, sem alguma relação sexo-específica.
- O número reduzido de segmentos heterocromáticos observado em *S. merianae* tem sido comum entre os lacertílios, e não se configura como um marcador eficiente para distinção de espécies.

- A coloração com fluorocromo base-específico forneceu informações sobre a natureza molecular de regiões repetitivas indicando a diversidade qualitativa dos segmentos heterocromáticos.
- O presente estudo fornece a primeira análise por mapeamento cromossômico de microssatélites em uma espécie de lagarto brasileiro, e indicaram que há uma propagação uniforme de todas as sequências analisadas no genoma de *S. merianae*, com sinais mais evidentes em regiões teloméricas, pericentroméricas e em alguns microcromossomos, observados em ambas as áreas de regiões eucromáticas e heterocromáticas.

REFERÊNCIAS

- ANANIAS, F.; BOMBEIRO, A. L.; SILVA, C. D. B.; SILVA, A. P. Z.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. Cytogenetics of *Eupemphix nattereri* Steindachner, 1863 (Anura: Leiuperidae) and karyotypic similarity with species of related genera: taxonomic implications. *Acta Zoologica Sinica*, v. 53, p. 285-293, 2007.
- ÁVILA-PIRES, T. C. S. Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). *Zoologische Verhandelingen Leiden*, v. 299, p. 1-706, 1995.
- BEÇAK, M. L.; BEÇAK, W.; DENARO, L. Chromosome polymorphism, geographical variation and karyotypes in Sauria. *Caryologia*, v. 25, p. 313–326, 1972.
- BEÇAK, W.; BEÇAK, M. L.; NAZRETH, H. R.; PECCININI, D. Chromosomes of cold-blood animals from whole blood short-term cultures. Microtechnique. *Mammalian Chromosome Newsletter*, v. 14, p. 55-56, 1964.
- 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.
- BENÍCIO, R. A.; MESQUITA, P. C. M. D.; CAVALCANTE, V. H. G. L.; FONSECA M. G. Répteis de uma região de ecótono no estado do Piauí, Nordeste do Brasil. *Gaia Scientia*, v. 9, n. 1, p. 95-100, 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.; PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; SKUK, G.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Comparative cytogenetics and supernumerary chromosomes in the Brazilian lizard genus *Enyalius* (Squamata, Polychrotidae). *Hereditas*, v. 136, p. 51–57, 2002.
- BERTOLOTTO, C. E. V.; RODRIGUES, M. T.; SKUK, G.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Comparative cytogenetic analysis with differential staining in three species of *Liolaemus* (Squamata, Tropiduridae). *Hereditas*, v. 125, p. 257–264, 1996.
- BICKHAM, J. W. Patterns and modes of chromosomal evolution in reptiles: In Sharma, A.K. & Sharma A. **Chromosomes in evolution of eukaryotic groups**, v. 2, p. 13–39, 1984.
- BICKHAM, J. W.; MCKINNEY, C. O.; MICHAEL, M. F. Karyotypes of the parthenogenetic whiptail lizard *Cnemidophorus laredoensis* and its presumed parental species (Sauria: Teiidae). *Herpetologica*, v. 4, p. 395–399, 1976.
- BLACKBURN, E. H.; GREIDER, C. W. Telomeres. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 1995.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. **PLANO TERRITORIAL DE DESENVOLVIMENTO RURAL SUSTENTAVEL – PTDRS (MDA / EFPT) TERRITÓRIO VALE DO RIO GUARIBAS PIAUÍ.** Piauí, 2006.
- CARVALHO, N. D. M.; ARIAS, F. J.; SILVA, F. A.; SCHNEIDER, C. H.; GROSS, M. C. 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, n. 2, p. 625–644, 2015.

CARVALHO, N. D. M.; GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; TERCENIO, M. L.; ZUANON, J.; FELDBERG, E. Cytogenetics of Synbranchiformes: a comparative analysis of two *Synbranchus* Bloch, 1795 species from the Amazon. **Genetica**, v. 140, p. 149–158, 2012.

CHAIPRASERTSRI, N.; UNO, Y.; PEYACHOKNAGUL, S.; PRAKHONGCHEEP, O.; BAICHARON, S.; CHARERNSUK, S.; NISHIDA, C.; MATSUDA, Y.; KOGA, A.; SRIKULNATH, K. Highly species-specific centromeric repetitive DNA sequences in lizards: molecular cytogenetic characterization of a novel family of satellite DNA sequences isolated from the water monitor lizard (*Varanus Salvator macromaculatus*, Platynota). **Journal of Heredity**, v. 104, p. 798–806, 2013.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215–220, 1994.

CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; HALEY, J.; VOLCKAERT, F. A. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Elsevier Aquaculture**, v. 255, p. 1–29, 2006.

CHRISTIAN, A.; MCNIEL, E.; ROBINSON, J.; DRABEK, J.; LARUE, C.; WALDREN, C.; BEDFORD, J. A versatile image analyses approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 82, p. 172–179, 1998.

CIOFFI M. B.; MOLINA, W. F.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomes as tools for discovering biodiversity— The case of Erythrinidae fish family. In: TIRUNILAI, P. **Recent Trends in Cytogenetic Studies – Methodologies and Applications**. Rijeka: Janeza Trdine, p. 125–146, 2012.

CIOFFI, M. B.; KEJNOVSKY, E.; BERTOLLO, L. A. C. The Chromosomal Distribution of Microsatellite Repeats in the Genome of the Wolf Fish *Hoplias malabaricus*, Focusing on the Sex Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, p. 289–296, 2010.

DE SMET, W. H. Description of the orcein stained karyotypes of 36 lizard species (Lacertilia, Reptilia) belonging to the families Teiidae, Scincidae, Lacertidae, Cordylidae and Varanidae (Autarchoglossa). **Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia**, v. 76, p. 73–118, 1981.

EZAZ, T.; STIGLEC, R.; VEYRUNES, F.; GRAVES J. Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. **Current Biology**, v. 16, p. R736–R743, 2006.

FAGUNDES, V.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* (2n=14, 15 and 16). **Chromosome Research**, v. 5, p. 228–232, 1997.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 331–368, 2007.

FIELD, D.; WILLS, C. Long polymorphic microsatellites in simple organisms. Proceeding of the Royal Society of London, Series B: **Biological Sciences**, v. 263, p. 209–215, 1998.

GALETTI, P. M.; LIMA, N. R. W; VENERE, P. C. A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, v. 60, p. 375- 382, 1994.

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.

GIUGLIANO, L. G.; COLLEVATTI, R. G.; COLLI, G. R. Molecular dating and phylogenetic relationships among Teiidae (Squamata) inferred by molecular and morphological data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, p. 168–179, 2007.

GORMAN G. C. Chromosomes and the systematics of the Family Teiidae (Sauria, Reptilia). **Copeia**, v. 2, p. 230-245, 1970.

GORMAN, G. 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.

GROSS, M. C; SCHNEIDER, C. H; VALENTE, G. T; MARTINS, C; FELDBERG, E. Variability of 18S rDNA locus among Symphysodon fishes: chromosomal rearrangements. **Journal of Fish Biology**, v. 76, p. 1117–1127, 2010.

HARVEY, B; UGUETO, G. N.; GUTBERLET, R. L. Review of Teiid Morphology with a Revised Taxonomy e Phylogeny of the Teiidae (Lepidosauria: Squamata). **Zootaxa**, v. 3459, p. 1-156, 2012.

HERNANDO, ALEJANDRA B. **Estudios Cromosômicos em *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens* (Squamata; Teiidae)**. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE HERPETOLOGIA, 1999, Montevideo. Disponível em: <<http://www.http://zvert.fcien.edu.uy/clh/resumen.PDF>>. Acesso em 01 Fev. 2016.

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.

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

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.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Geographical karyotypic variations and chromosome banding patterns in *Tropidurus hispidus* (Sauria, Iguanidae) from Brazil. **Caryologia**, v. 40, p. 43-57, 1987.

KING, M. Amphibia. In: JOHN, B. **Animal Cytogenetics**. Amphibia, 4. Chordata 2. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1990.

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

KURAMOTO, M. A list of chromosome numbers of anurans amphibians. **Bulletin of Fukuoka University of Education**, v. 39, p. 83-127, 1990.

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

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Genome Dyn**, v. 7 p. 1-28, 2012.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds): **Fish Cytogenetics**. Science Publisher, Inc., Enfield, 2007. p. 421–453.

MARTINS, C; WASKO, A. P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Editor CR Williams. (Org.). **Focus on Genome Research**. Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers, 2004. p. 289-318.

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, n. 5, 2014.

NASCIMENTO, J. **Isolamento, caracterização e localização cromossômica de sequências de DNA repetitivo em *Physalaemus ephippifer***. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2010.

OLIVEIRA, E. H. C.; TAGLIARINI, M. M.; RISSINO, J. D.; PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y.; O'BRIEN, P. C. M.; 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**. 5 ed. São Paulo: Roca, 1986. 508 p.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 116, p. 218-223, 2007.

PECCININI-SEALLE, D. **Cariótipo e determinação do sexo em algumas espécies de lacertílios brasileiros**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1969.

_____. Chromosome variation in populations of *Cnemidophorus lemniscatus* in the Amazonas Valey. **Ciência e Cultura**, v. 23, n. 2, p. 133-136, 1976.

_____. New developments in vertebrate cytotaxonomy. IV. Cytogenetic studies in reptiles. **Genetica**, v. 56, p. 123-148, 1981.

- PECCININI-SEALLE, D.; ALMEIDA, T. M. B. Chromosomal variation nucleolar organizers and constitutive heterochromatin in the genus *Ameiva* and *Cnemidophorus* (Sauria, Teiidae). **Caryologia**, v. 39, p. 227–239, 1986.
- PECCININI-SEALLE, D.; ROCHA, C. F. D.; ALMEIDA, T. M. B.; ARAÚJO, A. F. B.; DE SENA, M. A. Cytogenetics of the Brazilian whiptail lizard *Cnemidophorus littoralis* (Teiidae) from a resting area (Barra de Maricá) in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 661–667, 2004.
- PETERS, J. A.; DONOSO-BARROS, R. Catalogue of the Neotropical Squamata. Part II. lizards and amphisbaenians. **United States National Museum Bulletin**, 297, V: III–293, 1970.
- POKORNÁ, M.; KRATOCHVÍL L.; KEJNOVSKÝ, E. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). **BMC Genetics**, v. 12, p. 90, 2011.
- POLTRONIERI, J.; MARQUIONI, V.; BERTOLLO, L. A. C.; KEJNOVSKY, E.; MOLINA, W. F.; LIEHR, T.; CIOFFI, M. B. Comparative Chromosomal Mapping of Microsatellites in *Leporinus* Species (Characiformes, Anostomidae): Unequal Accumulation on the W Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, 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.; ANDREWS R. M.; CADLE J. E.; CRUMP M. L.; SAVITZKI A. M.; WELLS K. D. **Herpetology**. 2 nd edition Prentice Hall, New Jersey, 2001.
- PRESCH, W. F. A review of the tegu, lizard genus *Tupinambis* (Sauria: Teiidae) from South America. **Copeia**, p. 740–746, 1973.
- RIBEIRO, L. B.; MATOSO, D. A.; ALMEIDA, M. C.; VICARI, M. R.; MORAES-NETO, A.; SVIDINICKI, M. C. C. M.; ARTONI, R. F. Karyotypic variability in *Iheringichthys labrosus* (Teleostei, Pimelodidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 718–724, 2008.
- ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; PECCININI-SEALE, D. Evidence of an unisexual population of the Brazilian whiptail lizard genus *Cnemidophorus* (Teiidae), with description of a new species. **Herpetologica**, v. 53, p. 374–382, 1997.
- ROVATSOS, M.; KRATOCHVÍL, L.; ALTMANOVÁ, M.; JOHNSON POKORNÁ, M. Interstitial Telomeric Motifs in Squamate Reptiles: When the Exceptions Outnumber the Rule. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 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.
- SANTOS, R. M. L.; PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Banding patterns and chromosomal evolution in five species of neotropical Teiinae lizards (Squamata: Teiidae). **Genetica**, v. 131, p. 231–240, 2007.

- SANTOS, R. M. L.; BERTOLOTTI C. E. V.; PELLEGRINO K. C. M.; RODRIGUES M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal studies in on sphaerodactyl lizards on general *Gonatodes* and *Coleodactylus* (Squamata, Gekkonidae) using differential staining and fragile sites analysis. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 103, p. 128-134, 2003.
- SANTOS, R. M. L.; RODRIGUES M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y; PELLEGRINO K. C. M. Differential staining and microchromosomal variation in karyotypes of four Brazilian species of Tupinambinae lizards (Squamata: Teiidae). **Genetica**, v. 134, p. 261–266, 2008.
- SCHMID, M.; VITELLI, L.; BATISTONI, R. Chromosome banding in Amphibia. XI. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizer, 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. **Chromosoma**, v. 95, p. 271-284, 1987.
- SCHNEIDER, C. H.; GROSS, M. C.; TERCENIO, M. L.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Chromosomal evolution of neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, p. 201–214, 2013.
- SILVA, A. P. Z.; HADDAD, C. F. B.; GALASSI, G. G.; KASAHARA, S. Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. **Genetica**, v. 127, p. 35-44, 2006.
- SILVA, E. L.; BUSSO, A. F.; PARISE-MALTEMPI. Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolar organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 2012.
- SIQUEIRA, S.; AGUIAR JR., O.; SOUZA, M. B.; LIMA, A. P.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Unusual intra-individual karyotypical variation and evidence of cryptic species in Amazonian populations of *Pristimantis* (Anura, Terrarana). **Hereditas**, v. 146, p. 141-151, 2009.
- SITES, J. W. JR.; PECCININI-SEALE, D. M.; MORITZ, C.; WRIGHT, J. W.; BROWN, W. M. The evolutionary history of parthenogenetic *Cnemidophorus lemniscatus* (Sauria: Teiidae). I. Evidence for a hybrid origin. **Evolution**, v. 44, p. 906–921, 1990.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.
- THE REPTILE DATABASE – LIZARS. 2015. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/db-info/taxa.html#Sau>> Acesso em: 20 jan. 2016.
- TÓTH, G; GÁSPARIZ; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-981, 2000.
- VENERE, P. C; SOUZA, I. L; SILVA, L. K; ANJOS, M. B; OLIVEIRA, R. R; GALETTI, P. M. Recent chromosome diversification in the evolutionary irradiation of the freshwater fish Curimatidae. **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 1976-1989, 2008.
- VENTURA, K.; SILVA, M. J. J.; FAGUNDES, V.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Nontelomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)_n arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 115, p. 169-175, 2006.

VERONESE, L. B.; FREITAS, T. R. O.; KRAUSE, L. Cytogenetic studies of four Brazilian species of lizards (Squamata, Teiidae). **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 107–114, 2003.

VIÑA BERTOLOTTI, C. E. **Enyalius (Leiosauridae, Squamata): o que os dados moleculares e cromossômicos revelam sobre esse gênero de lagartos endêmico do Brasil**. 2006. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências, área: Biologia/Genética) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, São Paulo, 2006.

VITELLI, L.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F.; NARDI, I.; BARSACCHI-PILONE, G. Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse anuran amphibians. **Chromosoma**, v. 84, p. 475-491, 1982.



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

Identificação do Tipo de Documento

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

Eu, MARCELO JOÃO DA SILVA,
 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
Análise variotípica de *Salvator merianae* (Duméril e Bibron, 1839)
(Squamata, Teiidal) proveniente da Região do Vale do Rio
Guaribas, Piauí
 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.

Marcelo João da Silva
 Assinatura

Marcelo João da Silva
 Assinatura