

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

CAROLINE REGINA DIAS MACHADO

ESTUDO DE MARCADORES CROMOSSÔMICOS EM TARTARUGAS MARINHAS DA  
FAMÍLIA CHELONIIDAE (REPTILIA: TESTUDINES): ÊNFASE NA DIVERSIDADE  
CARIOTÍPICA

PONTA GROSSA

2017

CAROLINE REGINA DIAS MACHADO

ESTUDO DE MARCADORES CROMOSSÔMICOS EM TARTARUGAS MARINHAS DA  
FAMÍLIA CHELONIIDAE (REPTILIA: TESTUDINES): ÊNFASE NA DIVERSIDADE  
CARIOTÍPICA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari  
Co-orientadora: Dra. Camila Domit

PONTA GROSSA

2017

Machado, Caroline Regina Dias

M149            Estudo de marcadores cromossômicos em tartarugas marinhas da família Cheloniidae (Reptilia: Testudines): ênfase na diversidade cariotípica / Caroline Regina Dias Machado. Ponta Grossa, 2017. 79 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari.

Coorientadora: Profa. Dra. Camila Domit.

1. Cheloniomydas. 2. Diversificação cariotípica. 3. Citogenética clássica e molecular. 4. Eretmochelysimbricata. 5. Lepidochelysolivacea. I. Vicari, Marcelo Ricardo. II. Domit, Camila. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. IV.T.

CDD: 574.87



## Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas).



### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 01/2017

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Caroline Regina Dias Machado**.

Aos vinte dias do mês de fevereiro de dois mil e dezessete, no auditório do Programa, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Marcelo Ricardo Vicari em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Caroline Regina Dias Machado**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Marcelo Ricardo Vicari (Orientador UEPG), Dr. Rafael Bueno Noletto (UNESPAR) e Dr<sup>a</sup> Kaline Ziemniczak (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Estudo de marcadores cromossômicos em tartarugas marinhas da Família Cheloniidae (Reptilia: Testudines): Ênfase na diversidade cariotípica**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

Ponta Grossa, 20 de fevereiro de dois mil e dezessete.

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari (UEPG) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Rafael Bueno Noletto (UNESPAR) \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kaline Ziemniczak (UEPG) \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Vera e Antonio por todo o amor durante a minha vida inteira.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por toda a minha fé, por escutar minhas preces, por guiar os meus passos e me dar forças assim como as minhas santinhas Nossa Senhora Aparecida e Nossa Senhora do Perpétuo Socorro.

Às tartarugas marinhas, animais fascinantes que são minha paixão e por elas segui e nunca desisti do meu sonho.

Aos meus pais Vera e Antonio. Papis, obrigada por apoiar, proporcionar meus estudos e desde sempre acreditar na minha capacidade, pelo meu caráter e por tudo me ensinou, tudo isso foi essencial para eu atingir meus objetivos e chegar até aqui. Mãezinha, obrigada por cada dia se importar comigo e com meus experimentos, pelos finais de semana e feriados que me fez companhia no laboratório sem nunca me deixar desistir, essa conquista é tão sua quanto minha. Eu amo muito vocês.

Aos meus irmãos Fernando e Sérgio, por compartilharem comigo o amor pelo mar o qual me inspirou e me trouxe até aqui. Em especial ao Fernando, por todas as caronas e por acompanhar, filmar e se divertir comigo nas minhas coletas, você é demais bro!

À minha cunhada Michele por ser professora e amiga em todas as horas, por todos os conselhos científicos ou não, por me emprestar tantas vezes o seu laboratório e se mostrar sempre presente. À minha sobrinha Sofia, alegria da minha vida por tirar qualquer cara feia com um sorriso fascinante, você é o dengo da tia!

Aos meus avós (*in memoriam*) Cleri, Roque, Ilda e Elvino por estarem presentes espiritualmente quando não mais comigo durante a minha vida inteira.

Ao meu namorado Bernardo, por ser tudo e mais um pouco. Por se preocupar, por acreditar, por estar presente, pela companhia nos finais de semana no laboratório, pela compreensão, pelo amor, pela parceria, por ser demais! Obrigada amor, amo você de todo meu coração Bere. Aos meus sogros, Hécio e Rejane, e às minhas cunhadas Laís e Aline por serem minha segunda família e sempre estarem com as portas de casa abertas para mim.

Às minhas amigas Aline, Isabella, Luiza, Manuela, Melissa e Priscilla por todo o apoio, mas principalmente por toda a alegria, descontração e amor que nossa amizade me traz desde sempre! Aos meus amigos Alex e Lucas Rodrigo por todo apoio e por acreditarem.

Aprendi durante esses dois anos que o Mestrado, assim como outras jornadas de Pós-Graduação, acabam sendo mais uma jornada espiritual do que acadêmica e eu não teria conseguido passar por isso se não fossem todas as pessoas envolvidas a seguir!

Meu orientador Marcelo Ricardo Vicari que aceitou sair da sua zona de conforto e entrar de cabeça na citogenética de tartarugas marinhas e ainda por cima sair do rio e ir coletar no mar comigo. Obrigada por fazer parte do meu sonho e pela confiança ao me permitir realizar ele Doc! Pelos ensinamentos, pela amizade e por tudo que você batalhou não só por mim como por todos os seus alunos. Obrigada Doc, rumo ao Doutorado!

Minha co-orientadora Camila Domit, por me abrir as portas para um estágio que acabou permitindo um mestrado, você é demais Cá! Obrigada por compartilhar e inspirar com sua paixão pelos animais marinhos e se fascinar com cada resultado alcançado, seguimos!

Minha querida amiga Marcela, minha orientadora de coração e mãe científica, por me ensinar tudo que eu sei! Obrigada por cada conselho Marci, por aguentar cada desespero meu, por me orientar, por cada carona, mas principalmente pela amizade que construímos! Você é demais e eu te amo muito!

À professora Viviane Nogaroto Vicari, por todo o conhecimento compartilhado, pela amizade e por todas as conversas descontraídas! Pelo laboratório que você e professor Marcelo batalharam e construíram junto com a gente, por todas as comprinhas que fomos fazer, prof!

Aos meus amigos do laboratório de Biologia Cromossômica: Estrutura & Função, por serem demais! Em especial, Alain e Michele, por serem praticamente meus pais adotivos, por me ajudarem e me alegrarem sempre que possível, por todas as caronas e passeios. Kaline, por aceitar ser banca, comemorar comigo cada resultado, pelos conselhos e ajudas. Viviane, por toda a alegria que você leva por onde passa e por todas as suas ajudas. Michelle, por aceitar ser minha banca desde a graduação e sempre me ajudar com conselhos científicos, por ficar feliz com cada resultado. Rafael por atender cada pedido desesperado meu, obrigada pelo mapa fantástico que fez para mim, Rafo! Lucas, por todas as ajudas e pelas discussões nem sempre científicas. Thais, por se prontificar a me ajudar quando eu mais precisei. Geize e Larissa, minhas irmãs científicas, por entrarem comigo nessa empreitada do mestrado e por todo o apoio de sempre, por todas as vezes que vocês me ajudaram, vamos para o doutorado juntas!

Aos meus amigos que a ciência me trouxe e guardo para sempre comigo, Patrícia, Luiz e Eliza, pela risada diária mesmo quando não estão presentes!

Aos professores fantásticos que me ajudaram sempre emprestando seus laboratórios e aos seus alunos por todos os auxílios e empréstimos, em especial Professora Kátia Sabrina Paludo, Professora Jesiane Batista e Professora Iriane Eger pelos conselhos e ajudas.

À minha querida amiga Fabiane, por toda ajuda, por todos os desabafos e pela amizade que construímos! À minha amiga Vanessa, por todo apoio e amizade. Ao meu amigo Rubens, por me ajudar quando mais precisei e deixar seu laboratório de portas abertas para mim.

Aos meus amigos do Laboratório de Ecologia e Conservação de Mamíferos e Tartarugas Marinhas (CEM-UFPR) por toda a ajuda prestada nas minhas coletas e por serem minha família em Pontal! Em especial, as meninas da Gaiola por me abrigarem sempre que preciso e a Sté (Stefa) por sempre me ajudar e torcer por mim, amo vocês!

A todo o pessoal da Mar Brasil e do Projeto de Monitoramento de Praias – Bacia de Santos pela ajuda durante as capturas intencionais e fazer com que as minhas coletas fossem possíveis. Em especial à equipe da Mar Brasil por emprestar a sua sede para eu fazer um mini-laboratório e a Lalá por ficar comigo até a hora necessária para terminar os experimentos.

A toda a equipe do Projeto TAMAR ICMBio - Base Pipa e Base Florianópolis, pela autorização das coletas e por toda a ajuda prestada, ter vocês como parceiros é um sonho para mim! Em especial à veterinária do TAMAR, Daphne Wrobel por me ajudar em todas as coletas possíveis e estar sempre disposta a ensinar, você é demais Daph! Gratidão em ter te conhecido!

Ao Aquário Natal pela autorização das coletas e pelo suporte.

Aos meus queridos, Layse, Luciano e Gideão, sem os quais não existiria meu mestrado! Layse, obrigada por ter aparecido na minha vida, gata! Ter sua ajuda e amizade foi uma das melhores coisas que me aconteceu, obrigada por passar as madrugadas esperando as tartarugas subirem desovar para coletar para mim! Luciano, obrigada por todos os conselhos e pela ajuda com os protocolos, ter sua amizade e ajuda é bom demais, Lu. Gideão, por dispendir seu tempo cultivando e processando as minhas amostras e me mandar materiais tão bons, obrigada pela ajuda e por sempre responder meus e-mails desesperados!

À professora Mara Cristina de Almeida Matiello, por sempre ajudar quando possível! Por todos os auxílios como coordenadora da Pós. À Zoli, por todo o trabalho na secretaria do mestrado, pelos avisos e também por toda ajuda prestada!

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva e ao Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná, por fornecerem toda a infraestrutura e apoio para a realização desse trabalho.

Aos meus colegas da turma de Mestrado, pela ajuda e torcida com os nossos projetos!

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por conceder a licença para as coletas de material biológico.

À banca por todas as contribuições com o meu trabalho!

Agradeço de todo o meu coração a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho!



*“Escolha um trabalho de que gostes e não terás que trabalhar um único dia em sua vida”.*

(Confúcio)

*“Dou respeito às coisas desimportantes e aos seres desimportantes. Prezo insetos mais que aviões. Prezo a velocidade das tartarugas mais que a dos mísseis. Tenho em mim esse atraso de nascença. Eu fui aparelhado para gostar de passarinhos. Tenho abundância de ser feliz por isso. Meu quintal é maior do que o mundo”.*

(Manoel de Barros)

## RESUMO

As tartarugas marinhas representam um componente primitivo e singular da diversidade biológica, pertencendo à mais antiga linhagem de répteis vivos e sendo parte importante dos ecossistemas marinhos. Neste momento evolutivo são reconhecidas sete espécies de tartarugas marinhas no mundo, sendo que cinco delas ocorrem no litoral brasileiro, as quais são: *Dermochelys coriacea*, única representante da família Dermochelyidae, e as outras quatro espécies pertencem à família Cheloniidae: *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata* e *Lepidochelys olivacea*, sendo as três últimas alvo desse estudo. Nos últimos 20 anos a genética molecular tem desempenhado grande papel na conservação das tartarugas marinhas, porém tem se focado no uso de marcadores moleculares apenas para observar padrões de migração e diversidade genética dos indivíduos. Estudos citogenéticos com espécies de tartarugas são escassos e voltados apenas para tartarugas de água doce com interesse comercial. As espécies de tartarugas marinhas que ocorrem na costa brasileira são todas ameaçadas de extinção e consideradas espécies bandeira para conservação da biodiversidade. No entanto, não existem estudos citogenéticos para *C. mydas*, *E. imbricata* e *L. olivacea* do litoral brasileiro, tornando-se necessário estudos de citogenética clássica e molecular mais aprofundados para essas espécies com foco na evolução cariotípica do grupo, destacando a importância desse estudo como pioneiro para as espécies. Sendo assim, objetivou-se a avaliação dos mecanismos cromossômicos responsáveis pela variação interespecífica em *C. mydas*, *E. imbricata* e *L. olivacea* amostradas em cativeiro e na natureza para o conhecimento da organização, evolução e diversidade cariotípica. Utilizou-se técnicas baseadas na coloração convencional por Giemsa, bandamento G e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 18S e (TTAGGG)*n*. As três espécies estudadas apresentam 2n=56 cromossomos e pequenas variações tanto na fórmula cariotípica quanto na morfologia cromossômica e número de microcromossomos. O uso da sonda de DNAr 18S permitiu a identificação de apenas um par de microcromossomos detentor do sítio de DNAr nas três espécies, o qual está distribuído de maneira desigual entre o par demonstrando que mecanismos de *crossing-over* desigual atuaram na origem do heteromorfismo de tamanho deste cistron. A sonda (TTAGGG)*n* na espécie *C. mydas* permitiu detectar um sítio telomérico intersticial (ITS – *interstitial telomeric sites*) no par microcromossomo 14 em indivíduos capturados em diferentes localidades, o que coincide com a localização do sítio de DNAr 18S. A presença deste ITS sem a alteração do 2n basal sugere que estes foram inseridos durante o reparo de quebras da dupla fita no sítio do DNAr 18S com ação da telomerase durante o curso da evolução. Diante deste contexto, este estudo de citogenética molecular demonstra variações microestruturais nos cromossomos das tartarugas marinhas e auxilia no entendimento da diversificação cariotípica do grupo.

**Palavras-chave:** Citogenética clássica e molecular, *Chelonia mydas*, diversificação cariotípica, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea*.

## ABSTRACT

Sea turtles represent a primitive and particular element of the biological diversity, belonging to the oldest lineage of the living reptiles and being an important part of the marine ecosystem. In this evolutive moment, it is recognized seven species of sea turtles in the whole world, whereas five of them exist in the brazilian coast: *Dermochelys coriacea*, the unique representant of the Dermochelyidae family, and the four other species belonging to the Cheloniidae family: *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata* e *Lepidochelys olivacea*, the last three are the main point of this study. Over the last 20 years, molecular genetic has performed an important role concerning the sea turtles conservation, however it has been focused on molecular markers only to observe patterns of migration and genetic diversity of the individuals. Citogenetic studies with turtles are scarce and they aim only the fresh water turtles, with comercial interest. All sea turtles species of the brazilian coast are under threat of extinction, besides being considered flagship species to the biodiversity conservation. However, there is no citogenetic studies to *C. mydas*, *E. imbricata* and *L. olivacea* of the brazilian coast. Thus, it is necessary to perform classical and molecular citogenetic studies to these species, focusing on the karyotypic evolution of the group, highlighting the importance of this study as pioneer to the sea turtle species. Therefore, the main goal here is the evaluation of the chromosomal mechanisms responsible to the interspecific variation and mechanisms that probable generated interspecific variation in *C. mydas*, *E. imbricata* and *L. olivacea* karyotypes, sampled in captivity and in the nature, in order to know the organization, evolution and diversity of karyotype. Techniques based on conventional Giemsa staining, G-band and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with 18S rDNA and (TTAGGG)*n* probes were performed. The three species studied showed  $2n = 56$  chromosomes and some variations in the karyotypic formula about the chromosomal morphology and number of microchromosomes. The 18S rDNA probe allowed identification of a single pair of microchromosomes with the rDNA site in the three species, which are distributed unequally between the chromosomes of the pair, showing that unequal crossing-over mechanisms were probably acting in the origin of the heteromorphism size of that cistron. The (TTAGGG)*n* probe highlighted one interstitial telomeric site (ITS) in the microchromosome pair 14 of *C. mydas* species of different location, which co-located with the 18S rDNA site. The presence of this ITS, without alteration of the basal  $2n$ , suggests that they were inserted during the repair of double DNA strands breakage in the 18S rDNA site, with telomerase action during the course of evolution. In view of what has been exposed here, this molecular cytogenetic study shows chromosome microstructure variation in sea turtles and helps in understanding the karyotypic diversification of the group.

**Key-words:** Classical and molecular cytogenetic, *Chelonia mydas*, karyotypic diversification, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de identificação de <i>Chelonia mydas</i> .....	18
Figura 2 – Foto de um espécimes de <i>Chelonia mydas</i> .....	18
Figura 3 - Esquema de identificação de <i>Eretmochelys imbricata</i> .....	19
Figura 4 – Foto de um espécime de <i>Eretmochelys imbricata</i> .....	20
Figura 5 - Esquema de identificação de <i>Lepidochelys olivacea</i> .....	21
Figura 6 – Foto de um espécime de <i>Lepidochelys olivacea</i> .....	21
Figura 7 - Locais de coleta de material biológico das espécies: <i>Chelonia mydas</i> , <i>Eretmochelys imbricata</i> e <i>Lepidochelys olivacea</i> .....	29
Figura 8 - Cariótipo de <i>Chelonia mydas</i> (Extremoz – RN) submetido a coloração convencional com Giemsa .....	44
Figura 9 - Cariótipo de <i>Chelonia mydas</i> (Ilha das Cobras - PR) submetido a coloração convencional com Giemsa .....	44
Figura 10 - Cariótipo de <i>Chelonia mydas</i> (Extremoz – RN) submetido ao Bandamento G ....	45
Figura 11 - Cariótipo de <i>Chelonia mydas</i> (Extremoz - RN) submetido a hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 18S .....	46
Figura 12 - Cariótipo de <i>Chelonia mydas</i> (Extremoz - RN) submetido a hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sonda (TTAGGG) <i>n</i> .....	46
Figura 13 - Cariótipo de <i>Chelonia mydas</i> (Ilha das Cobras - PR) submetido a hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sonda (TTAGGG) <i>n</i> .....	47
Figura 14 - Cariótipo de <i>Eretmochelys imbricata</i> (Tibau do Sul - RN) submetido a coloração convencional com Giemsa .....	47
Figura 15 - Cariótipo de <i>Eretmochelys imbricata</i> (Tibau do Sul - RN) submetido ao Bandamento G .....	48
Figura 16 - Cariótipo de <i>Eretmochelys imbricata</i> (Tibau do Sul - RN) submetido a hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 18S .....	49

Figura 17 - Cariótipo de <i>Eretmochelys imbricata</i> (Tibau do Sul - RN) submetido a hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sonda (TTAGGG) <i>n</i> .....	49
Figura 18 - Cariótipo de <i>Lepidochelys olivacea</i> (Extremoz - RN) submetido a coloração convencional com Giemsa .....	50
Figura 19 - Cariótipo de <i>Lepidochelys olivacea</i> (Extremoz - RN) submetido ao Bandamento G .....	51
Figura 20 - Cariótipo de <i>Lepidochelys olivacea</i> (Extremoz - RN) submetido a hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 18S .....	52
Figura 21 - Cariótipo de <i>Lepidochelys olivacea</i> (Extremoz - RN) submetido a hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sonda (TTAGGG) <i>n</i> .....	52
Figura 22 - Comparação dos macrocromossomos de <i>C. mydas</i> (C.M), <i>E. imbricata</i> (E.I) e <i>L. olivacea</i> (L.O) submetidos ao bandamento G.....	53

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 SISTEMÁTICA E CLASSIFICAÇÃO .....	14
1.2 BIOLOGIA DAS ESPÉCIES DE TARTARUGAS MARINHAS .....	16
1.2.1 <i>Chelonia mydas</i> .....	17
1.2.2 <i>Eretmochelys imbricata</i> .....	18
1.2.3 <i>Lepidochelys olivacea</i> .....	20
1.3 DETERMINAÇÃO SEXUAL EM TARTARUGAS .....	21
1.4 ESTUDOS GENÉTICOS EM CHELONIIDAE .....	23
1.5 DNAs REPETITIVOS .....	24
1.6 CITOGENÉTICA DE TARTARUGAS MARINHAS .....	26
<b>2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
3.1 MATERIAL E LOCAIS DE COLETA .....	28
3.2 MÉTODOS .....	29
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>65</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SISTEMÁTICA E CLASSIFICAÇÃO

As tartarugas terrestres, aquáticas e marinhas são répteis pertencentes a grande classe Reptilia, subclasse Anapsida (caracterizada por animais que possuem crânio sem aberturas temporais), se encontram dentro da ordem Testudines e são conhecidas, de maneira geral, como quelônios. Aparecem pela primeira vez no registro fóssil do Triássico Superior, cerca de 200 milhões de anos atrás e desde então as tartarugas sofreram poucas mudanças em sua morfologia (HICKMAN, 2004).

Linnaeus em 1758 criou o gênero *Testudo*, que incluía as tartarugas marinhas, aquáticas e terrestres em um táxon. Nos dias de hoje este gênero está restrito a um grupo pequeno de tartarugas terrestres. Após esse evento, outros taxonomistas do período pré-Darwiniano falharam em identificar características morfológicas que justificassem uma maior divisão dos quelônios. O primeiro grande sistema de classificação das tartarugas foi proposto por Brongniart em 1805, que considerou o habitat desses animais como uma característica chave e reconheceu o gênero *Testudo* para espécies terrestres, *Emys* para espécies aquáticas e *Chelonia* para espécies marinhas (PRITCHARD, 1997).

Com o refinamento das análises foi determinado que os membros e a forma do corpo das tartarugas terrestres eram diferentes das aquáticas e marinhas. Então Wagler, em 1830, propôs uma nova forma de classificação, a qual é utilizada até os dias de hoje e leva em consideração o plano de retração do pescoço, que subdivide a ordem Testudines em duas subordens: Cryptodira e Pleurodira (PRITCHARD, 1997). Os Pleurodira retraem a cabeça para a proteção da carapaça flexionando o pescoço lateralmente enquanto os Cryptodira executam uma flexão sagital (BUJES, 2008). A subordem Cryptodira inclui as tartarugas marinhas, jabutis e algumas espécies de cágados, enquanto a subordem Pleurodira inclui espécies de cágados restritas ao Hemisfério Sul (HICKMAN, 2004).

As tartarugas marinhas representam um componente primitivo e singular da diversidade biológica, pertencendo à mais antiga linhagem de répteis vivos e sendo parte importante dos ecossistemas marinhos (SANTOS et al., 2011). No Cretáceo, estavam presentes quatro famílias de tartarugas marinhas (Toxochelydae, Protostegidae, Cheloniidae e Dermochelydae), sendo que apenas as duas últimas permaneceram até os dias de hoje. Todos os gêneros e espécies existentes atualmente surgiram no período Eocênico e Pleistocênico, entre 60 milhões e 10 milhões de anos atrás (SANTOS et al., 2011).



Neste momento evolutivo são reconhecidas sete espécies de tartarugas marinhas no mundo, sendo que apenas uma pertence à família Dermochelyidae: *Dermochelys coriacea* (tartaruga-de-couro), e as outras seis espécies pertencem à família Cheloniidae: *Lepidochelys olivacea* (tartaruga-oliva), *Lepidochelys kempii* (tartaruga-de-kempii), *Eretmochelys imbricata* (tartaruga-de-pente), *Caretta caretta* (tartaruga-cabeçuda), *Chelonia mydas* (tartaruga-verde) e *Natator depressus* (tartaruga-australiana) (PRITCHARD, 1997), todas ameaçadas de extinção em diferentes níveis (IUCN, 2017). As tartarugas-de-couro, oliva, de-pente, cabeçuda e verde ocorrem em águas brasileiras (BAPTISTOTTE; THOMÉ; BJORN DAL, 2003), as outras duas espécies são endêmicas de diferentes partes do mundo, sendo a tartaruga-de-kempii endêmica do Golfo do México e a tartaruga-australiana endêmica da plataforma continental da Austrália (PRITCHARD, 1997).

Ao longo de sua evolução, várias modificações permitiram a sobrevivência e adaptação das tartarugas a novos ambientes, o número de vértebras foi reduzido, as quais fusionaram-se as costelas e formou-se uma carapaça de revestimento coriáceo ou córneo. No caso das tartarugas marinhas, em particular, ao longo da evolução a carapaça ficou mais achatada, leve e hidrodinâmica, e as patas diferenciaram-se em nadadeiras, as quais são mais eficientes debaixo d'água (LUTZ, 1997).

Dados cariotípicos estão disponíveis para cerca de 55% das espécies de tartarugas da subordem Cryptodira, o que permite estabelecer relações evolutivas entre as famílias dessas espécies e resolve alguns problemas de classificação (BICKHAM; CARR, 1983). Informações citogenéticas são úteis nesse nível por causa do alto grau de conservação expresso nos cariótipos das espécies de tartarugas (BICKHAM, 1981). A aplicação de técnicas de bandamento nos cromossomos soluciona um grande problema na reconstrução da filogenia do grupo, a determinação de homologias. Quando dois cromossomos têm exatamente o mesmo padrão de bandamento pode-se concluir que eles são cromossomos homólogos da mesma forma que são determinadas as homologias considerando características morfológicas (BICKHAM; CARR, 1983). As famílias de tartarugas marinhas Dermochelyidae e Cheloniidae possuem cariótipos idênticos ( $2n=56$ ), o que significa que essas duas famílias são mais relacionadas entre si do que com as outras famílias de tartarugas. Esse cariótipo foi considerado primitivo para a subordem Cryptodira porque essas tartarugas marinhas são ancestrais na subordem (ambas datam do Cretáceo) e, o cariótipo é altamente generalizado, o qual pode ter dado origem aos outros cariótipos da subordem através de alguns poucos eventos de diferenciação cromossômica (BICKHAM; CARR, 1983). No entanto a literatura nos traz, que as tartarugas possuem, sem

exceção, um cariótipo conservado que sugere uma evolução adaptativa eficaz em diferentes níveis (BICKHAM, 1981).

## 1.2 BIOLOGIA DAS ESPÉCIES DE TARTARUGAS MARINHAS

As espécies de tartarugas marinhas ocupam uma diversidade de nichos ecológicos, *D. coriacea* é oceânica, já *L. olivacea*, *E. imbricata*, a herbívora *C. mydas* e *C. caretta* costumam permanecer em ambientes costeiros (BOWEN; KARL, 2007). Distribuem-se amplamente entre as bacias oceânicas, com registros desde o Ártico até a Tasmânia. No entanto, a maior parte das ocorrências reprodutivas está concentrada em regiões tropicais e subtropicais (SANTOS et al., 2011).

As tartarugas marinhas são seres pulmonados com grande capacidade de permanência debaixo d'água, tanto em repouso quanto em busca de alimento (LUTCAVAGE; LUTZ, 1997). Possuem visão, olfato e audição desenvolvidos além de uma excelente capacidade de orientação. São inúmeras teorias para explicar a capacidade das tartarugas marinhas em realizar migrações entre as áreas de alimentação, de repouso e de reprodução e, existem evidências que as fêmeas adultas regressem à praia que nasceram para a reprodução (LOHMANN et al., 1997). Alguns autores sugerem que os filhotes possam memorizar a composição química da água e o campo magnético da terra apresentando no cérebro cristais de magnetita, a pedra-ímã mais magnética da Terra (MUSICK; LIMPUS, 1997).

O período de postura dos ovos varia de acordo com a região e a espécie. No Brasil a temporada de desovas vai de setembro a abril nas praias do continente e de dezembro a junho nas ilhas oceânicas (SANTOS et al., 2011). Apresentam maturação tardia e ciclo de vida longo, demoram de 10 a 50 anos para atingirem a maturidade sexual (MEYLAN; DONNELLY, 1999) e voltarem à mesma praia do nascimento para se reproduzirem pela primeira vez (BJORNDAL; ZUG, 1995). As espécies alvo desse estudo *C. mydas*, *E. imbricata* e *L. olivacea* levam entre 25 e 50 anos (CHALOUPKA; LIMPUS; MILLER, 2004), por volta dos 25 anos (MEYLAN; DONNELLY, 1999) e entre os 10 e 18 anos (ZUG; CHALOUPKA; BALAZS, 2006) para atingirem a maturidade sexual, respectivamente.

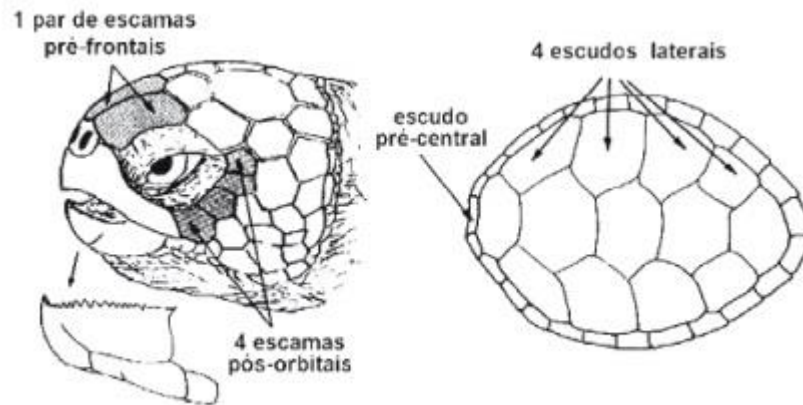
As tartarugas marinhas são animais altamente migratórios, possuem um complexo ciclo de vida e utilizam uma grande área geográfica e múltiplos habitats (MÁRQUEZ, 1990). Nas áreas reprodutivas os filhotes emergem dos ninhos, correm em direção ao oceano e dão início a um frenesi de natação em correntes marítimas em direção a ambientes pelágicos (BOWEN; KARL, 2007). Durante o seu desenvolvimento ocupam a zona pelágica nerítica ou oceânica

dependendo do padrão de desenvolvimento da espécie. Durante um período de aproximadamente 20 anos o habitat onde a tartaruga se desenvolverá e se alimentará é determinante na composição da sua dieta, uma vez que os recursos não se distribuem de forma homogênea nas diferentes zonas do oceano. Quando adultos, entre 20-50 anos, migram para as áreas de reprodução onde, após um intervalo de duas semanas, as fêmeas migram para as áreas de nidificação e os machos retornam às áreas de alimentação (LUTZ, 1997).

### 1.2.1 *Chelonia mydas*

A tartaruga-verde foi descrita por Linnaeus em 1758, que a nomeou como *Testudo mydas*, na localidade tipo da Ilha de Ascensão no Oceano Atlântico. Schweigger em 1812 foi quem aplicou o binomial *Chelonia mydas* usado até hoje (SEMINOFF et al., 2015). Essas tartarugas crescem até um tamanho máximo de 1 metro de comprimento de carapaça e atingem até 200 quilos. A carapaça apresenta cinco escudos vertebrais, quatro pares de escudos laterais e 12 pares de escudos marginais. A cabeça possui um único par de escudos pré-frontais e quatro escudos pós-orbitais sendo que ambas essas características distinguem essa espécie das outras espécies de tartarugas marinhas (Figuras 1 e 2) (PRITCHARD; TREBBAU, 1984). A espécie *C. mydas*, é onívora quando juvenil, entretanto quando adulta é primariamente herbívora, alimentando-se de diferentes espécies de gramas marinhas e macroalgas, havendo também registros de consumo de alguns invertebrados (BJORNDAL, 1997). Tem distribuição circunglobal, ocorrendo nos mares tropicais, subtropicais e até mesmo em águas temperadas em cerca de 140 países ao redor do mundo (SEMINOFF et al., 2015). No Oceano Atlântico, esses animais ocorrem principalmente nos sítios reprodutivos que estão localizados na Costa Rica, na Ilha de Ascensão, Guiné-Bissau, México, Suriname e na Ilha de Trindade no Brasil (BRODERICK et al., 2006). As fêmeas de *C. mydas* migram das áreas de alimentação para as áreas de desova (MEYLAN; BOWEN; AVISE, 1990) em um intervalo de 2 a 4 anos e apresentam alta fidelidade aos sítios de desova (MILLER, 1997). As tartarugas-verde passam o maior período de sua vida nas áreas de alimentação (zona pelágica nerítica), o que configura tais locais como de extrema importância para a conservação da espécie (BARROS et al., 2007). A tartaruga-verde é classificada internacionalmente como uma espécie “em perigo” (IUCN, 2017) e no Brasil é classificada como “vulnerável” (ALMEIDA et al., 2011).

Figura 1 - Esquema de identificação de *Chelonia mydas*



Fonte: MÁRQUEZ, M. R. Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. 11 ed. **FAO Fisheries Synopsis**: Rome. 81 p. 1990.

Figura 2 - Foto de um espécime de *Chelonia mydas*



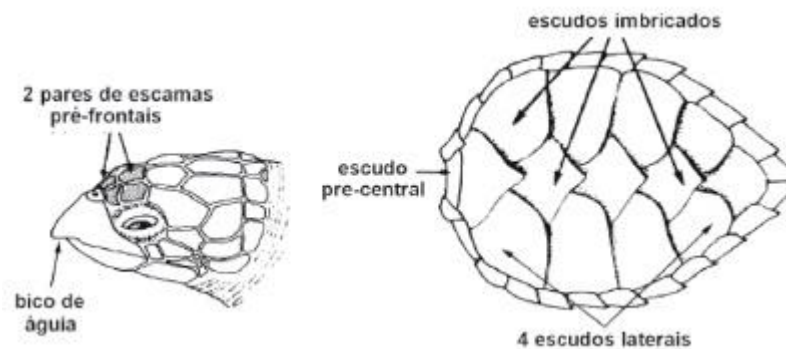
Fonte: PROJETO TAMAR. Tartarugas marinhas. Disponível em: <https://www.tamar.org.br/>. Acesso em: 10 jan. 2017.

### 1.2.2 *Eretmochelys imbricata*

A tartaruga-de-pente foi descrita por Linnaeus em 1766, tendo como localidade tipo a América do Norte (MENEZES, 1972). A carapaça possui quatro pares de escudos laterais, sendo que as placas são sobrepostas (imbricadas) e de coloração marrom, a cabeça possui dois pares de escudos pré-frontais e três pós-orbitais (Figuras 3 e 4) (MÁRQUEZ, 1990). A medida curvilínea média da carapaça nas principais áreas de desova no mundo varia entre 76,8 e 97,4 centímetros de comprimento (MARCOVALDI; VIEITAS; GODFREY, 1999) e o peso gira em

torno de 80 quilos (PRITCHARD; MORTIMER, 1999). Essa espécie apresenta distribuição circunglobal em águas tropicais e subtropicais do Atlântico, Índico e Pacífico (MÁRQUEZ, 1990). Juvenis e adultos de *E. imbricata* alimentam-se principalmente em locais com substratos duros, como recifes, sendo suas presas crustáceos, moluscos, briozoários, celenterados, ouriços, esponjas e algas (SANCHES; BELLINI, 1999). As áreas de alimentação conhecidas para a tartaruga-de-pente no Brasil são as ilhas de Fernando de Noronha – PE e Atol das Rocas - RN (SANCHES; BELLINI, 1999). No Atlântico, os principais sítios reprodutivos estão localizados em diferentes países do Caribe e no Brasil (MORTIMER, 2007). A principal área de desova de *E. imbricata* no Brasil está localizada no norte da Bahia e em Sergipe, com uma área importante no litoral sul do Rio Grande do Norte (MARCOVALDI et al., 2007). A tartaruga-de-pente é a espécie de tartaruga marinha mais ameaçada de extinção, sendo classificada como “ criticamente em Perigo ” na avaliação do estado de conservação elaborada para esta espécie com base nos dados disponíveis até 2009 (MARCOVALDI et al., 2011; IUCN, 2017).

Figura 3 - Esquema de identificação de *Eretmochelys imbricata*



Fonte: MÁRQUEZ, M. R. Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. 11 ed. **FAO Fisheries Synopsis**: Rome. 81 p. 1990.

Figura 4 - Foto de um espécime de *Eretmochelys imbricata*



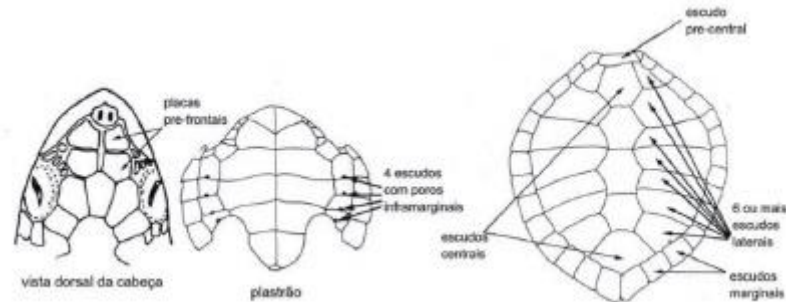
Fonte: PROJETO TAMAR. Tartarugas marinhas. Disponível em: <https://www.tamar.org.br/>. Acesso em: 10 jan. 2017.

### 1.2.3 *Lepidochelys olivacea*

A tartaruga-oliva foi descrita por Erchscholtz em 1829 e tem como localidade tipo o Golfo do México (MENEZES, 1972). A carapaça possui de cinco a nove pares (normalmente seis) de placas laterais, as quais são assimétricas, a coloração dorsal é verde oliva e o ventre é amarelo claro, a cabeça possui dois pares de placas pré-frontais e três pares pós-orbitais (Figuras 5 e 6) (MÁRQUEZ, 1990). A carapaça tem medida curvilínea média de 73,1 centímetros de comprimento (SILVA et al., 2007) e podem pesar em torno de 50 quilos (PRITCHARD; MORTIMER, 1999). Essa espécie tem ampla distribuição pelas bacias oceânicas tropicais e subtropicais sendo provavelmente a mais abundante das espécies de tartarugas marinhas. Populações dessa espécie no Oceano Atlântico são encontradas tanto em ambientes costeiros quanto oceânicos (MARCOVALDI, 2001). Nessa mesma área os indivíduos se alimentam em águas rasas com substrato de barro próximas a áreas altamente produtivas de ecossistemas estuarinos (PRITCHARD; TREBBAU, 1984), a sua estratégia de alimentação tem sido caracterizada como oportunista com uma ampla variedade de itens alimentares como peixes, salpas, crustáceos e pequenos invertebrados (BJORNDAL, 1997). Os principais sítios reprodutivos no Atlântico estão localizados no Suriname/Guiana Francesa e Brasil (SWOT, 2009). No Brasil a principal área de reprodução de *L. olivacea* está localizada entre o litoral sul do estado de Alagoas e o litoral norte da Bahia com maior densidade de desovas no estado de

Sergipe (SILVA et al., 2007). A tartaruga-oliva é classificada como uma espécie “vulnerável” em seu status internacional de conservação (IUCN, 2017) e no Brasil é classificada como “em perigo” (CASTILHOS et al., 2011).

Figura 5 - Esquema de identificação de *Lepidochelys olivacea*



Fonte: MÁRQUEZ, M. R. Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. 11 ed. **FAO Fisheries Synopsis**: Rome. 81 p. 1990.

Figura 6 - Foto de um espécime de *Lepidochelys olivacea*



Fonte: PROJETO TAMAR. Tartarugas marinhas. Disponível em: <https://www.tamar.org.br/>. Acesso em: 10 jan. 2017.

### 1.3 DETERMINAÇÃO SEXUAL EM TARTARUGAS

Estudos originados na década de 1960 demonstraram que a vulnerabilidade de vários répteis antecede a eclosão e tem momentos críticos durante a incubação. Hoje, é consenso que a temperatura é o elemento principal da determinação sexual de inúmeras espécies de tartarugas



(FERREIRA JÚNIOR, 2009). A tartaruga-verde (BICKHAM et al., 1980), a tartaruga-cabeçuda (YNTEMA; MROSOVSKY, 1982), a tartaruga-oliva (MORREALE et al., 1982), a tartaruga-de-couro (MROSOVSKY; DUTTON; WHITMORE, 1984) e a tartaruga-de-pente (MROSOVSKY et al., 1992) não têm cromossomos sexuais heteromórficos e seu sexo é determinado pela temperatura de incubação dos ninhos.

Na determinação sexual dependente da temperatura de incubação (DSDT) uma determinada faixa de temperatura induz o desenvolvimento de machos e outra faixa de temperatura, o desenvolvimento de fêmeas. Separando essas faixas termais existe uma zona de transição onde são gerados machos e fêmeas na mesma proporção, a temperatura que determina essa zona é chamada temperatura pivotal ou *threshold* (FERREIRA JÚNIOR, 2009). O período termo-sensitivo, ou seja, o momento em que a temperatura age irreversivelmente sobre a diferenciação das gônadas em tartarugas de água doce e em tartarugas marinhas é o mesmo, e localiza-se no segundo terço do desenvolvimento embrionário (BULL; VOGT, 1979), neste estágio a temperatura atua na síntese de enzimas envolvidas na diferenciação das gônadas (PIEAU, 1996). É consenso geral que a temperatura exerce grande influência sobre espécies com DSDT agindo sobre mecanismos genéticos que governam enzimas esteroidogênicas ou receptores hormonais de esteroide, alterando assim o ambiente do hormônio no embrião sexualmente indiferenciado e direcionando o desenvolvimento deste para machos ou fêmeas (PIEAU et al., 1994).

O gene *DMRT1* (*Doublesex and mab-3 related transcription factor 1*) é um candidato a regulador durante o desenvolvimento sexual dos répteis (KETTLEWELL; RAYMOND; ZARKOWER, 2000). Níveis de *DMRT1* foram detectados no complexo adrenal, rim e gônadas da tartaruga do ouvido vermelho (*Trachemys scripta*) em diferentes estágios de desenvolvimento, tanto nas temperaturas que produzem machos quanto nas que produzem fêmeas. Porém, durante o período termo-sensitivo, níveis de *DMRT1* foram significativamente diferentes nos estágios de desenvolvimento observados na temperatura que produz machos para essa espécie (26°C). Para a temperatura que produz fêmeas (31°C), os níveis não foram significativamente diferentes quando comparados aos outros estágios de desenvolvimento observados. Esses resultados corroboram com estudos realizados para outros répteis com DSDT, onde a expressão do gene *DMRT1* aumenta durante o período termo-sensitivo em machos e permanece baixo em fêmeas (MURDOCK; WIBBELS, 2003). Recentemente foi descrito o envolvimento do gene *CIRBP* (*Cold-inducible RNA-binding protein*) na DSDT da tartaruga-víbora *Chelidra serpentina*, o estudo aponta várias evidências do envolvimento do



*CIRBP* na determinação gonadal, as quais foram observadas em diferentes indivíduos e populações da espécie (SCHROEDER et al., 2016).

A temperatura pivotal média encontrada para ninhos de *C. mydas* no Mediterrâneo é de 29°C (BRODERICK et al., 2000), essa temperatura não é conhecida para ninhos no Brasil (ALMEIDA et al., 2011). Temperatura pivotal de 29,6°C para ninhos de *E. imbricata* na Bahia – Brasil (GODFREY et al., 1999) e 31, 65°C para ninhos de *L. olivacea* em Pirambu – Sergipe – Brasil (CASTHELOGE, 2014). Quando a embriogênese se processa a temperaturas próximas à pivotal, pequenas diferenças de 1°C a 2°C são suficientes para alterar a razão sexual dos embriões (YNTEMA; MROSOVSKY, 1982). A amplitude da zona de transição da temperatura, em que machos e fêmeas são gerados, é muito variável e as variações da temperatura durante a incubação na razão sexual dos filhotes dependerá dessa amplitude (FERREIRA JÚNIOR, 2009).

Além disso, análises genéticas e dados comportamentais sugerem que populações que possuem DSDT podem ser incapazes de se desenvolverem rápido o bastante para driblar as consequências negativas da mudança da temperatura global. Essas populações podem servir como indicadoras do impacto biológico da mudança na temperatura global (JANZEN, 1994).

#### 1.4 ESTUDOS GENÉTICOS EM CHELONIIDAE

Nos últimos 20 anos a genética molecular tem desempenhado um papel central na resposta de perguntas que são diretamente relevantes para a conservação das tartarugas marinhas (JENSEN; SIMMONS; DUTTON, 2013). Um estudo de tartarugas verdes do Atlântico forneceu a primeira evidência de fidelidade aos sítios de desova (“*natal homing*”) demonstrando que tartarugas que nidificavam na Ilha das Aves, Venezuela, e as que nidificavam em Tortuguero, Costa Rica, tinham fixado diferenças em haplótipos de genes mitocondriais (mtDNA), apesar dessas duas populações se misturarem em áreas de alimentação localizadas no Caribe (MEYLAN; BOWEN; AVISE, 1990). Desde então, vários estudos têm demonstrado que este padrão de diferenciação de mtDNA entre os locais de nidificação é uma característica comum entre todas as espécies de tartarugas marinhas, embora em grau variável (JENSEN; SIMMONS; DUTTON, 2013).

A diferenciação genética entre os locais de nidificação levou a um outro avanço importante para a utilização de ferramentas moleculares, a capacidade de determinar a origem das tartarugas amostradas longe das praias de nidificação. Assim, estudos utilizando análise de estoques mistos (*mixed stock analysis – MSA*) têm procurado explicar os processos que geram

a composição de tartarugas em áreas de alimentação mistas. Até então esse é um dos campos mais ativos que envolve a pesquisa em genética de tartarugas marinhas procurando gerar dados que auxiliem na conservação das espécies (JENSEN; SIMMONS; DUTTON, 2013).

Atualmente, a genética das cinco espécies de tartarugas marinhas do litoral brasileiro tem se focado basicamente no uso de marcadores moleculares para observar padrões de migração e diversidade genética dos indivíduos, assim como o uso de mtDNA para identificar populações que se reproduzem em diferentes partes do globo (LARA-RUIZ et al., 2006).

### 1.5 DNAs REPETITIVOS

O genoma dos eucariotos varia em tamanho entre as espécies e parte dessa variação se deve ao acúmulo de sequências repetitivas (KIDWELL, 2002). Durante algum tempo essas sequências eram chamadas de “DNA lixo” (*junk DNAs*) pelo desconhecimento das suas funções (NOWAK, 1994, BIÉMONT; VIEIRA, 2006). Porém, diferentes estudos têm mostrado que este tipo de DNA está envolvido com organização estrutural e funcional do genoma, atuando na regulação gênica, duplicação do DNA, reparo do DNA, rearranjos cromossômicos e segregação cromossômica (KIDWELL, 2002; SHAPIRO; STERNBERG, 2005; BIÉMONT; VIEIRA, 2006).

Os DNAs repetitivos são sequências idênticas ou semelhantes, que podem ser encontradas *in tandem* (lado a lado) ou dispersas pelo genoma. As sequências encontradas *in tandem* compõem o DNA satélite, minissatélites, microssatélites e algumas famílias multigênicas. Entretanto, os DNAs repetitivos também podem ser encontrados dispersos pelo genoma, representados pelos elementos transponíveis (TE – *Transposable Elements*), classificadas como retrotransposons e transposons (HARDMAN, 1986; BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015).

As repetições *in tandem* são consecutivas de acordo com um padrão a partir de um local de duplicação, ocorrendo em regiões teloméricas, centroméricas, em regiões de ligação ao DNA, entre outras (RAO et al., 2010). A unidade dos DNAs satélites apresentam, geralmente, de 100-1000 nucleotídeos e são encontrados em regiões heterocromáticas, como centroméricas e teloméricas (TAUTZ, 1993). Os minissatélites, ou também conhecidos por sequências *in tandem* com número variável de repetições (VNTR - *Variable Number of Tandem Repeats*), são DNAs moderadamente repetitivos e suas unidades de repetição detêm de 10-100 pares de base (pb), são caracterizados por taxas de mutação elevadas e encontrados nas regiões terminais de cada braço dos cromossomos estruturando os telômeros (TAUTZ, 1993; RAO et al., 2010). As

sequências teloméricas (TTAGGG) $n$  são conservadas na maioria dos vertebrados e podem dar grandes informações sobre a evolução cariotípica (BOLZÁN, 2011). Por fim, os microssatélites, também conhecidos como sequências repetitivas simples (SSR - *Simple Sequence Repeats*), são DNAs repetitivos com unidades de repetição de 1-6 pb que possuem distribuição ampla no genoma e frequentemente encontrados em regiões não-centroméricas, ficando próximos ou dentro dos genes (TAUTZ, 1993; LI et al., 2002). Participam da organização da cromatina, replicação do DNA, recombinação e regulação da atividade gênica (LI et al., 2002).

As famílias multigênicas incluem genes oriundos de um ancestral comum e que possuem sequências estruturalmente e funcionalmente semelhantes, como genes codificadores de hemoglobina, tubulinas, histonas e RNAs ribossomais (NEI; ROONEY, 2005). Vale destacar um dos exemplos mais conhecido dessa família, os DNAs ribossomal (DNAr) que transcrevem os RNAs ribossomal (RNAr) principais componentes dos ribossomos que participam ativamente da síntese proteica nos organismos (SMIT; WIDMANN; KNIGHT, 2007).

Os elementos transponíveis apresentam notável sucesso evolutivo e grande diversidade genética e funcional. Conseguem se diferenciar das outras sequências no genoma por possuírem capacidade de se mover e duplicar. O critério para classificação desses elementos se baseia em seu mecanismo de transposição, são categorizados em classe I e classe II. A classe I é representada pelos elementos que se transpõem utilizando a transcriptase reversa de uma cópia intermediária de RNA do organismo, são os denominados retrotransposons. Na classe II estão os elementos que se transpõem utilizando a enzima transposase, ou via cópia de DNA, os chamados transposons (WICKER et al., 2007).

Os répteis têm variações relativamente pequenas no tamanho do genoma (OLMO, 1976), com diferenças interespecíficas bastante limitadas, provavelmente devido a diferenças na quantidade de DNA repetitivo (EPPLEN et al., 1979). Existe um estudo em que o loci de microssatélites compostos por (CA) $n$  foram obtidos de três espécies de tartarugas marinhas (*C. mydas*, *C. caretta* e *E. imbricata*) como uma forma de testar o polimorfismo dentro de espécies e a persistência de microssatélites entre espécies. Foram encontrados lócos homólogos em cada espécie das seis espécies marinhas dentro das duas famílias Cheloniidae e Dermochelyidae, bem como em espécies de água doce (Emydidae, *Trachemys scripta*), o que indica uma conservação dessas sequências de microssatélites há aproximadamente 300 milhões de anos (FITZSIMMONS; MORITZ; MOORE, 1995).

## 1.6 CITOGENÉTICA DE TARTARUGAS MARINHAS

Estudos citogenéticos com espécies de tartarugas são escassos e normalmente voltados apenas para tartarugas de água doce com interesse comercial (MARINHO, 2011). Trabalhos citogenéticos envolvendo espécies de tartarugas marinhas são raros e utilizam normalmente técnicas de citogenética clássica, como bandamento C, bandamento G e localização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) ou apenas confeccionam os cariótipos (BICKHAM et al., 1980; MEDRANO et al., 1987; KAMEZAKI, 1989; KAMEZAKI, 1990; LÓPEZ; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; BERNAL-VILLEGAS, 2008; FUKUDA et al., 2012; FUKUDA et al., 2013). Porém, nenhum dos trabalhos publicados até então com essas espécies utilizou técnicas de citogenética molecular, como hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNAs repetitivos para localização dos mesmos no genoma dessas espécies, com exceção de apenas um estudo (MÜHLMANN-DÍAZ et al., 2001) que produziu uma sonda para o cromossomo 1 em cinco espécies de tartarugas, somente uma delas marinha, e hibridou no cariótipo das mesmas. Portanto, destaca-se a importância de estudos de citogenética clássica e molecular mais aprofundados para espécies de tartarugas marinhas com foco na evolução cariotípica do grupo.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As espécies de tartarugas marinhas que ocorrem na costa brasileira são todas ameaçadas de extinção e consideradas espécies bandeira para conservação da biodiversidade. Porém, estudos genéticos que podem contribuir futuramente para a conservação dessas espécies são escassos. Sendo assim, não existem estudos citogenéticos para *C. mydas*, *E. imbricata* e *L. olivacea* do litoral brasileiro. Desta forma, caracterizar citogeneticamente diferentes amostragens de tartarugas marinhas do litoral brasileiro pode ser útil no entendimento de mecanismos evolutivos atuantes na diferenciação cromossômica deste importante grupo da fauna litorânea brasileira.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos cromossômicos responsáveis pela variação interespecífica em *C. mydas*, *E. imbricata* e *L. olivacea* amostradas em cativeiro e na natureza para o conhecimento da organização, evolução e diversidade cariotípica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar cromossomicamente *C. mydas*, *E. imbricata* e *L. olivacea* amostradas no litoral brasileiro;
- b) Utilizar marcadores citogenéticos para estudar a história evolutiva dos cariótipos;
- c) Obter, sequenciar e caracterizar sondas de DNAr (18S e 5S) e outros tipos de DNAs repetitivos para determinar a localização física destes elementos nos genomas das espécies e inferir sobre os mecanismos de diferenciação populacional e responder questões evolutivas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL E LOCAIS DE COLETA

Foram estudadas citogeneticamente três espécies de tartarugas marinhas para caracterização cariotípica: *C. mydas*, *E. imbricata* e *L. olivacea*. O material biológico utilizado foi originado de exemplares de vida livre e de cativeiro dessas espécies, obtidos em quatro localidades diferentes (Tabela 1) (Figura 7). A coleta de material biológico dos exemplares de cativeiro foi realizada em parceria com o Aquário Natal. Já a coleta de material de espécimes de vida livre foi realizada através de captura intencional com rede de espera ou de animais em reabilitação, em parceria com o Laboratório de Ecologia e Conservação de Mamíferos e Tartarugas Marinhas (LEC) da Universidade Federal do Paraná, a Associação MarBrasil, o Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) e o Projeto TAMAR ICMBio – Base Florianópolis e em áreas de desova da espécie em parceria com o Projeto TAMAR ICMBio – Base Pipa (Autorização para atividades com finalidade científica MMA/ICMBio/SISBIO: 52218-1; Anexo A).

O material cromossômico foi obtido por meio da cultura temporária de linfócitos (Anexo B) obtidos da coleta de sangue periférico (Anexo C) e analisado no Laboratório de Biologia Cromossômica: Estrutura & Função na Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os procedimentos estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo: 7200/2016, Anexo D).

Tabela 1 - Localidades de coleta do material biológico das espécies de tartarugas marinhas juntamente com os nomes das instituições parceiras e a condição de vida dos animais.

<b>Espécie</b>	<b>Instituição</b>	<b>Condição</b>	<b>Localidade</b>
<i>Chelonia mydas</i>	Aquário Natal	Cativeiro	Extremoz – RN
	PMP-BS	Reabilitação	Pontal do Sul - PR
	LEC/MarBrasil/TAMAR	Vida Livre	Ilha das Cobras - PR
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Projeto TAMAR	Vida Livre	Tibau do Sul - RN
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Aquário Natal	Cativeiro	Extremoz - RN

Nota: RN = Rio Grande do Norte; PR = Paraná.

Figura 7 - Locais de coleta de material biológico das espécies: *Chelonia mydas* (Extremoz – RN e Pontal do Sul/Ilha das Cobras (anexo a Ilha do Mel) – PR), *Eretmochelys imbricata* (Tibau do Sul – RN) e *Lepidochelys olivacea* (Extremoz – RN).



### 3.2 MÉTODOS

Os cromossomos mitóticos foram obtidos através do cultivo temporário de linfócitos de sangue periférico segundo Ortiz e Rodríguez (2003), com modificações (Anexo B). Foi utilizado material biológico de dezoito exemplares de *C. mydas* ( $n = 18$ ), dois de *E. imbricata* ( $n = 2$ ) e três de *L. olivacea* ( $n = 3$ ). Para estudos de caráter citogenético quando se trata de animais de cativeiro e ameaçados de extinção, como as espécies em questão, são utilizados tamanhos populacionais ( $n$ ) baixos que já são suficientes para estudar a citogenética comparativa. As lâminas com as preparações cromossômicas foram submetidas a coloração convencional por Giemsa 10%, tampão fosfato pH 6,8 (Anexo E), Bandamento G segundo Seabright (1971), com modificações (Anexo F), e analisadas em microscópio (Olympus Bx41) de campo claro e de epifluorescência, as melhores imagens foram capturadas com câmera digital.

A extração de DNA foi realizada a partir de tecidos do tipo pele e músculo de *C. mydas*, espécie utilizada como padrão nesse estudo, utilizando o kit *PureLink™ Genomic DNA Kits*

(Invitrogen) (Anexo G). A partir do DNA extraído foram amplificadas sequências de diferentes tipos de DNAs repetitivos (Anexo H). As sequências de DNAr 18S foram amplificadas utilizando-se os *primers* 18S Fw 5'-ccgctttggtgactcttgat-3' e 18S Rv 5'-ccgaggacctcactaaacca-3' isolados de *Ictalurus punctatus* segundo Gross et al. (2010). Sequências de DNAr 5S foram amplificadas usando o par de *primers* 5S A 5'-tcaaccaaccacaagacattggcac-3' e 5S B 5'-tagacttctgggtggccaaggaatca-3' isolados de *Danio rerio* segundo Pendás et al. (1994). Essas sequências amplificadas foram purificadas (Anexo I) e utilizadas nos procedimentos de sequenciamento (Anexo J) e análise de identidade (Anexo K).

Para o procedimento de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foram utilizadas duas sondas: *i*) o DNAr 18S amplificado a partir do genoma de *C. mydas* neste estudo e; *ii*) a sonda telomérica obtida a partir da sequência telomérica geral para vertebrados (TTAGGG)*n* segundo Ijdo et al. (1991). As sondas foram marcadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando biotin-16- dUTP (Roche®) para o DNAr 18S e digoxigenina-11-dUTP (Roche®) para a telomérica (Anexo L), as quais foram submetidas a FISH (Anexo M). Essas preparações foram analisadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axiolab A1 acoplado ao software ZEN.

Para a montagem dos cariótipos foram organizados três grupos, sendo o grupo A os macrocromossomos metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm), o grupo B os macrocromossomos subteloicêntricos (st) e acrocêntricos (a) e o grupo C os microcromossomos (mc) segundo Bickham (1975) com modificações (Anexo N). Calculou-se o número fundamental (NF) considerando metacêntricos, submetacêntricos e subteloicêntricos contendo dois braços e os cromossomos acrocêntricos e microcromossomos contendo apenas um braço.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

### Capítulo I

#### **Citogenética comparativa em tartarugas marinhas da família Cheloniidae (Reptilia: Testudines): diversificação cariotípica microestrutural**

##### **Resumo**

Em tartarugas marinhas a identificação de sequências repetitivas e métodos de citogenética molecular são inexistentes e, as análises cromossômicas destas espécies está limitada a descrição do número diploide, fórmulas cariotípicas e bandamentos convencionais. Neste estudo foram caracterizadas citogeneticamente *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata* e *Lepidochelys olivacea* com o uso de métodos citogenéticos clássicos e moleculares para auxiliar no entendimento de mecanismos evolutivos atuantes na diferenciação cromossômica. As três espécies estudadas apresentam  $2n=56$  cromossomos e variações na fórmula cariotípica quanto a morfologia cromossômica e número de microcromossomos quando comparado ao cariótipo considerado ancestral para a subordem. A FISH permitiu a identificação de um par de microcromossomos detentor do sítio de DNAr nas três espécies. O sítio de DNAr 18S está distribuído de forma desigual entre o par demonstrando que mecanismos de *crossing-over* desigual atuaram na origem do heteromorfismo de tamanho deste cístron. A sonda (TTAGGG) $n$  permitiu detectar um sítio telomérico intersticial (*ITS – interstitial telomeric sites*) no par microcromossomo 14 na espécie *C. mydas*, o qual é colocalizado ao sítio de DNAr 18S. A presença deste ITS sem a alteração do  $2n$  sugere sua inserção durante o reparo de quebras da dupla fita no sítio do DNAr 18S pela via de ação da telomerase. Não houve detecção de cariótipos híbridos nos espécimes analisados. Esses resultados demonstram que os cariótipos das tartarugas marinhas da família Cheloniidae não são extremamente conservados como previamente descritos e, que variações microestruturais nos cromossomos atuaram na diversificação cariotípica do grupo.

## Abstract

The identification of repetitive sequences and methods of molecular cytogenetic in sea turtles are absent, and their chromosome analyses are limited to diploid number description, karyotypic formula and conventional chromosome banding techniques. In this study the following species *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata* and *Lepidochelys olivacea* were cytogenetically characterized by using classical and molecular methods, in order to help in understanding the evolutive mechanisms related to chromosome differentiation. All the studied species showed  $2n = 56$  chromosomes and some variations concerning the karyotypic formula, chromosome morphology and amount of microchromosomes, when compared to the ancestral karyotype of the infraorder Cryptodira. The FISH allowed the identification of a microchromosome pair with the rDNA site in all the studied species. The 18S rDNA sites are distributed unequally between the chromosomes of the same pair, showing that unequal crossing-over mechanisms were probably acting in the origin of the heteromorphism size of this cistron. The (TTAGGG) $n$  probe highlighted one interstitial telomeric site (ITS) in the microchromosome pair 14 of *C. mydas*, which is co-located with the 18S rDNA site. The presence of this ITS, without  $2n$  changes, suggests that it was inserted during the repair of a double DNA strands breakage in the 18S rDNA site, with telomerase action. There was no hybrid karyotypes in the analyzed specimens. These results demonstrated that the Cheloniidae sea turtles karyotypes are not extremely conserved like it was thought until recently, and that the chromosome microstructural variations played a role in karyotype diversification of the group.

## Introdução

As tartarugas marinhas são répteis pertencentes a grande classe Reptilia, subclasse Anapsida, ordem Testudines e se encontram dentro da subordem Cryptodira (HICKMAN, 2004). Representam um componente primitivo e singular da diversidade biológica, pertencendo à mais antiga linhagem de répteis vivos e sendo parte importante dos ecossistemas marinhos (SANTOS et al., 2011). Neste momento evolutivo são reconhecidas sete espécies de tartarugas marinhas no mundo, sendo que apenas uma pertence à família Dermochelyidae: *Dermochelys coriacea* (tartaruga-de-couro), e as outras seis espécies pertencem à família Cheloniidae: *Lepidochelys olivacea* (tartaruga-oliva), *Lepidochelys kempii* (tartaruga-de-kempii), *Eretmochelys imbricata* (tartaruga-de-pente), *Caretta caretta* (tartaruga-cabeçuda), *Chelonia mydas* (tartaruga-verde) e *Natator depressus* (tartaruga-australiana) (PRITCHARD, 1997), todas ameaçadas de extinção em diferentes níveis (IUCN, 2017). As tartarugas-de-couro, oliva, de-pente, cabeçuda e verde ocorrem em águas brasileiras (BAPTISTOTTE; THOMÉ; BJORNDALE, 2003), as outras duas espécies são endêmicas de diferentes partes do mundo, sendo a tartaruga-de-kempii endêmica do Golfo do México e a tartaruga-australiana endêmica da plataforma continental da Austrália (PRITCHARD, 1997).

Atualmente, a genética das cinco espécies de tartarugas marinhas do litoral brasileiro tem se focado basicamente no uso de marcadores moleculares para observar padrões de migração e da diversidade genética dos indivíduos, assim como o uso de mtDNA para identificar populações que se reproduzem em diferentes partes do globo (LARA-RUIZ et al., 2006). Até então esse é um dos campos mais ativos que envolve a pesquisa em genética de tartarugas marinhas procurando gerar dados que auxiliem na conservação das espécies (JENSEN; SIMMONS; DUTTON, 2013).

Hibridações interespecíficas para tartarugas marinhas têm sido relatadas em várias áreas do mundo, como entre *E. imbricata* e *C. caretta* (CONCEIÇÃO et al., 1990; KARL; BOWEN; AVISE, 1995; LARA-RUIZ et al., 2006), *C. mydas* e *C. caretta* (KARL; BOWEN; AVISE, 1995; JAMES; MARTIN; DUTTON, 2004), *E. imbricata* e *L. olivacea* (LARA-RUIZ et al., 2006), *C. caretta* e *L. kempii* (KARL; BOWEN; AVISE, 1995; BARBER et al., 2003) e *C. mydas* e *E. imbricata* (WOOD; WOOD; CRITCHLEY, 1983; KARL; BOWEN; AVISE, 1995), as quais foram constatadas comparando o DNA mitocondrial (mtDNA) das espécies.. Na costa brasileira os híbridos entre *E. imbricata* e *C. caretta* são comumente observados na Bahia (LARA-RUIZ et al., 2006). No entanto, o estabelecimento das tartarugas marinhas como espécies independentes ocorreu por milhões de anos apesar da sobreposição entre seus habitats (BOWEN; NELSON; AVISE, 1993). A aquisição de informações genéticas básicas, como os cariótipos, é importante no entendimento dos mecanismos meióticos da hibridação. A estrutura e o número dos cromossomos diferentes entre espécies são fatores que restringem o *crossing-over* no segmento rearranjado. Estes segmentos assinápticos podem falhar durante a segregação meiótica gerando gametas desbalanceados e, como resultado podem prevenir a introgressão genética (NAVARRO; BARTON, 2003; FARIA, NAVARRO, 2010). Os estudos existentes mostraram que a hibridação entre as tartarugas marinhas ocorre em condições naturais corroborada pelas estruturas cariotípicas praticamente idênticas das espécies (FUKUDA et al., 2013). A presença destes híbridos tem implicações negativas profundas na conservação das espécies e influencia no desenvolvimento e implementação de estratégias de manejo apropriadas para estas espécies (LARA-RUIZ et al., 2006).

Dados citogenéticos clássicos demonstraram uma estrutura cariotípica altamente conservada para as espécies de tartarugas marinhas das famílias Dermochelyidae e Cheloniidae (BICKHAM et al., 1980; MEDRANO et al., 1987; KAMEZAKI, 1989; KAMEZAKI, 1990; LÓPEZ; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; BERNAL-VILLEGAS, 2008; FUKUDA et al., 2012; FUKUDA et al., 2013). Estas espécies apresentam cariótipos idênticos ( $2n=56$  cromossomos), com a ocorrência de macrocromossomos altamente conservados (BICKHAM et al., 1980;

BICKHAM; CARR, 1983). Desta forma, as tartarugas marinhas são consideradas ancestrais dentro da subordem Cryptodira (ambas as famílias datam do Cretáceo) e por isso Bickham e Carr (1983) determinaram a estrutura cariotípica com  $2n=56$  cromossomos como primitiva, a qual possivelmente originou os cariótipos das outras espécies da subordem através de alguns poucos eventos de diferenciação cromossômica (BICKHAM; CARR, 1983).

O uso da citogenética clássica, como os métodos de bandamentos, auxilia na determinação de homologias cromossômicas. Quando dois cromossomos têm exatamente o mesmo padrão de bandamento, especialmente em espécies próximas com poucos rearranjos cromossômicos, pode-se concluir que eles são cromossomos homólogos (BICKHAM; CARR, 1983; CHOWDHARY; RAUDSEPP, 2001). Nesta mesma via, a identificação de um conjunto de bandas de um cromossomo da espécie em outra localização cromossômica em espécies próximas permitem mapear rearranjos cromossômicos evolutivos (CHOWDHARY; RAUDSEPP, 2001). Contudo, os métodos de bandamentos cromossômicos convencionais são ineficazes para a detecção de diferenças menores nos cariótipos, como a localização das famílias gênicas, de sequências satélites e dos elementos transponíveis (SCHEMBERGER et al., 2011). Desta forma, caracterizar citogeneticamente as espécies de tartarugas marinhas do litoral brasileiro, *C. mydas*, *E. imbricata* e *L. olivacea* com o uso de métodos citogenéticos clássicos e moleculares pode ser útil no entendimento de mecanismos evolutivos atuantes na diferenciação cromossômica deste importante grupo da fauna litorânea brasileira.

## **Material e Métodos**

### *Amostragem*

Foram estudadas citogeneticamente três espécies de tartarugas marinhas para caracterização cariotípica: *C. mydas*, *E. imbricata* e *L. olivacea*. O material biológico utilizado foi originado de exemplares de vida livre, de cativeiro ou em reabilitação dessas espécies obtidos em quatro localidades diferentes. *Chelonia mydas* de vida livre da Ilha das Cobras – PR, na reabilitação em Pontal do Sul – PR e de cativeiro em Extremoz – RN. *Eretmochelys imbricata* de vida livre em Tibau do Sul – RN. Por fim, *Lepidochelys olivacea* de cativeiro em Extremoz – RN.

A coleta de material biológico dos exemplares de cativeiro foi realizada em parceria com o Aquário Natal. Já a coleta de material de espécimes de vida livre foi realizada através de captura intencional com rede de espera ou de animais em reabilitação, em parceria com o

Laboratório de Ecologia e Conservação de Mamíferos e Tartarugas Marinhas (LEC) da Universidade Federal do Paraná, a Associação MarBrasil, o Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) e o Projeto TAMAR ICMBio – Base Florianópolis e em áreas de desova da espécie em parceria com o Projeto TAMAR ICMBio – Base Pipa (Autorização para atividades com finalidade científica MMA/ICMBio/SISBIO: 52218-1).

#### *Preparação cromossômica*

O material cromossômico foi originado da cultura temporária de linfócitos obtidos por meio da coleta de sangue periférico (ORTIZ; RODRÍGUEZ, 2003) e analisado no Laboratório de Biologia Cromossômica: Estrutura & Função na Universidade Estadual de Ponta Grossa. Foi utilizado material biológico de dezoito exemplares de *C. mydas* (n = 18), dois de *E. imbricata* (n = 2) e três de *L. olivacea* (n = 3). Os procedimentos estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo: 7200/2016). As lâminas com preparações cromossômicas foram submetidas a coloração convencional por Giemsa 10%, tampão fosfato pH 6,8, para a determinação do número diploide, fórmula cromossômica, bandamento G (SEABRIGHT, 1971) e posterior utilização em ensaios de hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

#### *Amplificação das sequências de DNAs ribossomais 5S e 18S*

As sequências dos DNAs ribossomal (DNAr) 5S e 18S foram obtidas a partir do DNA genômico total de *C. mydas*, espécie-padrão nesse estudo. As sequências de DNAr 18S foram amplificadas utilizando-se os *primers* 18S Fw 5'-ccgctttggtgactcttgat-3' e 18S Rv 5'-ccgaggacctcactaaacca -3' isolados de *Ictalurus punctatus* (GROSS et al., 2010). Sequências de DNAr 5S foram amplificadas usando o par de *primers* 5S A 5'-tcaaccaaccacaaagacattggcac-3' e 5S B 5'-tagacttctgggtggcceaaggaatca-3' isolados de *Danio rerio* (PENDÁS et al., 1994). Essas sequências foram purificadas e utilizadas nos procedimentos de sequenciamento e análise de identidade.

#### *Obtenção e marcação de sondas de DNAs repetitivos*

As sondas de DNAr 18S e DNAr 5S foram sintetizadas a partir da sequência destes genes obtidos de *C. mydas* neste estudo, e a sonda telomérica foi obtida a partir da sequência

geral para vertebrados (TTAGGG) $n$  (IJDO et al., 1991). As sondas foram marcadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando biotina-16- dUTP (Roche®) para o DNAr 18S e digoxigenina-11-dUTP (Roche®) para o DNAr 5S e sequência telomérica, as quais foram submetidas a hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

#### *Hibridação in situ fluorescente (FISH)*

O protocolo geral da FISH foi realizado sob alta condição de estringência (2,5 ng/ $\mu$ L sonda, 50% formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, 37°C por 16 h) (PINKEL; STRAUME; GRAY, 1986). Para a detecção da sonda de DNAr 18S foi utilizada a streptavidina alexa flúor 488 (Molecular Probes) e para o DNAr 5S e sequência telomérica foi utilizada a anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2  $\mu$ g/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados no microscópio de epifluorescência Zeiss Axiolab A1 acoplado ao software ZEN.

#### *Organização dos cariótipos*

Para a montagem dos cariótipos os cromossomos foram divididos em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subteloêntricos (st), acrocêntricos (a) e microcromossomos (mc), dependendo da sua razão de braços e em ordem decrescente de tamanho (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964). Os cromossomos foram organizados em três grupos, sendo o grupo A os macrocromossomos metacêntricos e submetacêntricos, o grupo B os macrocromossomos subteloêntricos e acrocêntricos e o grupo C os microcromossomos (BICKHAM, 1975).

## **Resultados**

As três espécies de tartarugas marinhas estudadas (*Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata* e *Lepidochelys olivacea*) apresentam número diploide (2n) igual a 56 cromossomos e pequenas variações na fórmula cariotípica quanto a morfologia cromossômica e número de microcromossomos.

### *Chelonia mydas*

Os exemplares de *C. mydas* de Extremoz – RN e Ilha das Cobras - PR apresentam  $2n=56$  cromossomos, com  $14m+6st+4a+32mc$  (Figuras 8 e 9) e número fundamental (NF) igual a 76. O bandamento G detectou regiões de homologias entre os macrocromossomos facilitando a identificação dos pares homólogos (Figura 10). A FISH com as sondas de DNAr 18S permitiu a identificação do par cromossômico 14 como portador dos sítios de DNAr 18S (Figura 11) e a sonda (TTAGGG) $n$  evidenciou as regiões de telômero de todos os cromossomos e, para o par 14, foi detectado um sítio telomérico intersticial (*ITS – interstitial telomeric sites*) co-localizado ao rDNA 18S em ambas as amostragens de *C. mydas* (Figuras 12 e 13). A FISH com a sonda DNAr 5S não retornou sinais de hibridação nos cariótipos.

A sequência parcial de DNAr 18S de *C. mydas* obtida é composta por 478 pares de base (pb) e apresentou 88% de identidade com o 18S do peixe *Argyrosomus regius* (GeneBank: KU559840.1), e 79% de identidade com o 18S da salamandra *Ranodon sibiricus* (GeneBank: AJ279506.1). A sequência parcial de DNAr 5S de *C. mydas* é composta por 175 pb e apresentou 94% de identidade com o DNAr 5S do sapo *Engystomops petersi* (GeneBank: JF325860.1), e do peixe *Leporinus cf. elongatus* (GeneBank: AF284741.1), e 93% de identidade com o 5S do sapo *E. freibergi* (GeneBank: JF325869.1).

### *Eretmochelys imbricata*

Os exemplares de *E. imbricata* amostrados de Tibau do Sul – RN apresentam  $2n=56$  cromossomos, com  $12m+2st+8a+34mc$  e  $NF=70$  (Figura 14). O bandamento G permitiu a confirmação das homologias e a identificação dos pares homólogos de macrocromossomos (Figura 15). A FISH com as sondas de DNAr 18S permitiu a identificação do par cromossômico 12 como portador dos sítios de DNAr 18S (Figura 16), e a sonda (TTAGGG) $n$  evidenciou as regiões teloméricas de todos os cromossomos (Figura 17). Em *E. imbricata* (Tibau do Sul – RN) não foram detectados ITS, e a FISH com a sonda DNAr 5S não retornou sinais de hibridação nos cariótipos.

### *Lepidochelys olivacea*

Os exemplares de *L. olivacea* de Extremoz – RN apresentam  $2n=56$  cromossomos, com  $12m+2sm+2st+8a+32mc$  e  $NF=72$  (Figura 18). O bandamento G permitiu observar os padrões

de bandamento dos macrocromossomos e identificar os pares homólogos (Figura 19). A FISH com as sondas de DNAr 18S localizou o par cromossômico 18 como portador dos sítios de DNAr 18S (Figura 20) e a sonda (TTAGGG)*n* evidenciou as regiões teloméricas dos cromossomos (Figura 21). Em *L. olivacea* (Extremoz – RN) não foram detectados ITS, e a FISH com a sonda DNAr 5S não retornou sinais de hibridação nos cariótipos.

## Discussão

### *Descrição cariotípica para C. mydas, E. imbricata e L. olivacea*

Na organização dos cromossomos das tartarugas marinhas (família Cheloniidae, subordem Cryptodira) foi proposta a divisão em três grupos com base no tamanho e a posição do centrômero, sendo o grupo A os macrocromossomos metacêntricos e submetacêntricos, o grupo B os macrocromossomos subteloicêntricos e telocêntricos e o grupo C os microcromossomos acrocêntricos (BICKHAM, 1975). Entretanto, já foi descrita a presença de cromossomos de morfologia acrocêntrica no grupo B (KAMEZAKI, 1989; KAMEZAKI, 1990; LÓPEZ; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; BERNAL-VILLEGAS, 2008; FUKUDA et al., 2013), demonstrando possíveis diferenças na classificação morfológica dos cromossomos em trabalhos anteriores.

Estudos citogenéticos de *C. mydas* mostraram um  $2n=56$  cromossomos, divididos pela quantidade de pares cromossômicos nos grupos A, B e C em 7:5:16, com fórmula cariotípica  $12m+2sm+6st+4t+32mc$  (t: telocêntrico) (BICKHAM et al., 1980). Porém, no presente estudo a fórmula cariotípica foi diferente para os indivíduos dessa espécie, sem cromossomos de morfologia submetacêntrica e telocêntrica, apontando diferenças na classificação morfológica dos macrocromossomos.

O possível cariótipo ancestral para a subordem Cryptodira compreende um  $2n=56$  e a quantidade de pares cromossômicos nos grupos A, B e C é 7:5:16, o qual corresponde exatamente ao cariótipo de *C. mydas* (HAIDUK; BICKHAM, 1982). Ainda, a primeira ramificação da subordem compreende a família Chelydridae, a qual possui um cariótipo derivado e estruturalmente semelhante, apenas com a ausência de dois pares de microcromossomos (HAIDUK; BICKHAM, 1982). Portanto, Chelydridae possui  $2n=52$ , distribuídos nos grupos A, B e C 7:5:14 (HAIDUK; BICKHAM, 1982), fortalecendo a hipótese de que o cariótipo ancestral é idêntico ao de *C. mydas*, e a partir deste possivelmente



originaram-se outros das diferentes espécies da família Cheloniidae e da subordem Cryptodira após eventos de diferenciação cromossômica.

Para *E. imbricata*, os estudos mostraram um  $2n=56$  cromossomos dos quais  $10m+2sm+2st+8a+34mc$  (KAMEZAKI, 1990, FUKUDA et al., 2012). A ocorrência de cromossomos submetacêntricos não é observada em *E. imbricata*, apontando mais uma vez para falhas na classificação morfológica. Contudo, quando comparado com o possível cariótipo ancestral de *C. mydas* (7:5:16) (HAIDUK; BICKHAM, 1982) observa-se que *E. imbricata* não apresenta o mesmo número de pares cromossômicos no grupo A e no grupo C (6:5:17), possuindo um par metacêntrico a menos no grupo A e um par de microcromossomos a mais no grupo C. Além disso, no grupo B a espécie apresenta quatro pares acrocêntricos (pares 8, 9, 10 e 11) sendo que dois destes pares são observados como subtlocêntricos em *C. mydas* (9 e 10). Tais diferenças podem ter surgido a partir de um rearranjo cromossômico do tipo inversão pericêntrica ou através de reposicionamento de centrômero, a partir do cariótipo dado como ancestral para a subordem (HAIDUK; BICKHAM, 1982). Em adição, a análise destes exemplares de *E. imbricata* não mostraram evidências de cariótipos híbridos com *C. caretta*. Embora não tenham sido analisados exemplares de *C. caretta* neste estudo, a fórmula cariotípica descrita para a espécie é  $12m+2sm+6st+12a+24mc$  (KAMEZAKI, 1989), a qual é diferente de *E. imbricata*.

Já em *L. olivacea*, foi observado o  $2n=56$  cromossomos, dos quais  $12m+2sm+2st+8a+32mc$  (FUKUDA et al., 2013). Assim como *E. imbricata*, *L. olivacea* apresenta diferenças quanto a morfologia cromossômica, os pares acrocêntricos 9 e 10 do grupo B são de morfologia subtlocêntrica no cariótipo de *C. mydas*, porém *L. olivacea* apresenta a mesma fórmula 7:5:16 considerada ancestral para a subordem indicando que rearranjos do tipo inversão pericêntrica ou reposicionamento de centrômero também atuaram na evolução do cariótipo da espécie.

Os diferentes NF apresentado nas três espécies apesar da manutenção do  $2n$  sugere que inversões pericêntricas possam estar envolvidas nessas diferenças encontradas como já foi hipotetizado para outras espécies de tartarugas de água doce, o que foi confirmado através de técnicas de bandamento (BICKHAM et al., 1979). No entanto, outro fator também pode estar envolvido nessas diferenças, o reposicionamento de centrômero. O reposicionamento de centrômero (RC) consiste no surgimento de um novo centrômero ao longo do cromossomo e a inativação do centrômero antigo, esses eventos afetam profundamente a arquitetura cromossômica apesar de não modificar a ordem física de marcadores nos cromossomos (MONTEFALCONE et al., 1999). Em algumas espécies o RC pode ter sido um fator importante

na evolução cariotípica tendo consequências na dinâmica populacional e na especiação (CARBONE et al., 2006), esse fenômeno inclusive já foi estudado em aves (KASAI et al., 2004), grupo irmão das tartarugas (CAO et al., 2000). Em mamíferos o reposicionamento de centrômero já está bem estudado e os *Evolutionary New Centromeres* (ENCs) foram definidos como centrômeros que se movem para uma nova posição ao longo do cromossomo sem precisar de nenhum tipo de rearranjo cromossômico para que isso ocorra. São aceitos como um importante mecanismo na evolução do genoma assim como os rearranjos cromossômicos tradicionais como inversões, translocações, deleções e inserções. As linhas de evidências evolutivas sustentam a hipótese de que os ENCs são resultados de eventos epigenéticos e não da transposição de sequências específicas (ROCCHI et al., 2012).

Os cariótipos da maioria das tartarugas, assim como das aves e cobras são caracterizados por dois componentes cromossômicos distintos, os macrocromossomos e os microcromossomos (BICKHAM, 1984; OLMO, 1986; MATSUDA et al., 2005). Antigamente, não se tinha certeza de que os microcromossomos eram cromossomos verdadeiros, alguns autores os classificavam como “acessórios supranuméricos” com centrômero difuso (NEWCOMER, 1957), porém logo foi comprovado que se tratavam de cromossomos verdadeiros (BRINK, 1959). Os microcromossomos são pequenos cromossomos que medem entre 0,5 e 1,5  $\mu\text{m}$  (MATTEY, 1975), nas diferentes espécies de tartarugas são frequentemente eucromáticos, ricos em conteúdo Guanina-Citosina (GC) (BICKHAM et al., 1980, BICKHAM; CARR, 1983). Na tartaruga *Pelodiscus sinensis*, os macrocromossomos apresentam menor conteúdo de GC e densidade gênica, enquanto a maioria das regiões ricas em GC e 50% dos genes são encontradas em microcromossomos, embora estes contenham apenas 23% do DNA total (KURAKU et al., 2006). Além disso, um par de microcromossomos é portador de genes determinantes do sexo na espécie de tartaruga australiana de água doce *Chelodina longicollis* (família Chelidae) (EZAZ et al., 2006), que não possui determinação sexual a partir da temperatura de incubação como na maioria das espécies de tartarugas (FERREIRA JÚNIOR, 2009). Os microcromossomos, em sua maioria, parecem ser de morfologia acrocêntrica e diante disso Ford e Woollan (1964) propuseram que eles fossem admitidos como acrocêntricos, o que permite calcular o número fundamental de braços cromossômicos (NF) das espécies (WALDRIGUES, 1981).

Tirando as variações quanto a morfologia dos cromossomos, as tartarugas mostram pequena variação em relação ao  $2n$  e os padrões de bandamento G nos cromossomos (BICKHAM, 1984). A maioria dos macromossomos das diferentes espécies da subordem Cryptodira exibem padrões de bandamento G praticamente idênticos (BICKHAM, 1984;

OLMO, 1986), apenas com algumas mudanças que ocorreram durante a evolução cariotípica da subordem (BICKHAM, 1981, 1984), inclusive acredita-se que o padrão de bandamento do cromossomo metacêntrico 1 permanece sem mudanças há cerca de 200 milhões de anos (BICKHAM, 1981). Nas espécies de tartarugas marinhas *C. mydas*, *E. imbricata* e *L. olivacea* observa-se que o padrão de bandamento dos macrocromossomos dos grupos A e B são semelhantes (Figura 22), inclusive nos pares acrocêntricos 8 e 9 de *E. imbricata* e 9 e 10 de *L. olivacea*, os quais são subtlocêntricos em *C. mydas* indicando que provavelmente o responsável pela diferença dessa morfologia cromossômica entre as espécies não foi a inversão pericêntrica, pois seriam encontradas diferenças nos padrões de bandamento, mas provavelmente o reposicionamento de centrômero.

No presente estudo não houve diferenças quanto ao  $2n$  e não foram evidenciados cariótipos híbridos, porém ocorreram diferenças entre as espécies no NF e na morfologia comparada dos cariótipos, mostrando que possíveis reposicionamentos de centrômeros e prováveis acúmulos diferenciais de DNAs repetitivos participaram da evolução do cariótipo da família Cheloniidae.

#### *Mapeamento cromossômico de sondas de DNAs repetitivos*

O genoma das tartarugas, assim como dos crocodilos, é considerado relativamente grande quando comparado aos outros répteis (OLMO et al., 1985, 1986). Essa diferença no tamanho depende principalmente da tendência de acumular e preservar sequências de DNAs repetitivos (OLMO et al., 1985). As tartarugas possuem somente um par cromossômico com a região organizadora de nucléolo (RON) (BICKHAM; ROGERS, 1985) e conseqüentemente somente um par portador do sítio de DNAr 18S. Os sítios de DNAr 18S foram encontrados em posições diferentes nas espécies estudadas, em *C. mydas* no par mc 14, *E. imbricata* no par mc 12 e em *L. olivacea* no par mc 18. Além disso, os sinais do sítio de 18S evidenciados pela FISH aparecem com intensidades diferentes. Essa diferença na intensidade do sinal é resultado provavelmente de um *crossing-over* desigual dentro do par (PENDÁS; MORÁN; GARCIA-VÁZQUEZ, 1993) resultando no acúmulo de mais sequências em um mc do que no outro.

O *crossing-over* desigual entre sequências de DNAs repetitivos já é muito estudado e frequentemente envolve unidades de genes inteiros (WALSH; STEPHAN, 2001). Essa distribuição desigual dos genes dentro dos cromossomos pode ser resultado da deleção da sequência desse gene de uma cromátide e na duplicação do mesmo na outra cromátide, conseqüentemente aumentando o número de cópias do gene em um cromossomo e diminuindo

no outro (SMITH, 1976; SZOSTAK; WU, 1980; WALSH; STEPHAN, 2001). Os sítios de 18S encontrados em diferentes pares nas espécies desse estudo não quer dizer que se tratam de pares cromossômicos diferentes, mas sim que o *crossing-over* desigual acumulou quantidade diferente dessas sequências repetitivas alterando assim o tamanho dos cromossomos o que coloca eles em posições diferentes no cariótipo mesmo se tratando do mesmo par. Ainda, não foram evidenciados sítios de DNAr 5S nos cariótipos. Essa ausência de sinal pode ser decorrente a poucas repetições DNAr 5S nos genomas das tartarugas, situando-se fora do limite de resolução da FISH (SCHWARZACHER; HESLOP-HARRISON, 2000).

O uso da sonda (TTAGGG)*n* na espécie *C. mydas* permitiu detectar um ITS no par mc 14 em indivíduos de diferentes localidades. De acordo com a organização e localização genômica, três tipos diferentes de ITSs podem ser identificados: (i) ITS heterocromático (het-ITS), composto por uma grande quantidade de sequências *telomeric-like* localizadas principalmente nos centrômeros; (ii) ITS curtos (s-ITSs), composto de trechos com poucas repetições dos hexâmeros teloméricos e com distribuição intersticial nos cromossomos e; (iii) ITS eucromático (eu-ITSs), os quais são grandes trechos de sequências teloméricas presentes em regiões eucromáticas (RUIZ-HERRERA et al., 2008; SCHMIDT; STEINLEIN, 2016).

A análise comparativa dos cariótipos não permitiu a detecção de pontos de fusão robertsoniana na origem do ITS, porém o ITS está colocalizado no par detentor dos sítios de DNAr 18S. Desta forma, é provável que o ITS presente em *C. mydas* tenha característica de s-ITS, com localização intersticial no braço longo do microcromossomo 14 e, seja oriundo do reparo da telomerase em regiões de quebra de dupla fita (*double-strand break*) (RUIZ-HERRERA et al., 2008), especificamente que a telomerase tenha reparado uma quebra na sequência do DNAr 18S. Isso é possível pois não foi observado nenhum tipo de rearranjo cromossômico para o par mc 14 e o DNAr 18S é uma região altamente descondensada e suscetível a quebra, que pode estar invadida por elementos transponíveis como já observado em outros organismos (MANDRIOLI, 1999).

Entretanto, s-ITS tem, por característica, baixo número de cópias teloméricas. O ITS de *C. mydas*, aparentemente, apresenta um grande número de cópias do hexâmero telomérico. Em ITSs com grandes repetições, é notável uma instabilidade molecular que deixa a região mais suscetível a quebras e posteriores recombinações (NERGADZE et al., 2007). Nessa via, a expansão do número das repetições teloméricas pode ter ocorrido por mecanismos tipo *crossing-over* desigual, DNA polimerase *slippage* e conversão gênica, como descrito para outras sequências de repetição *in tandem* (ELDER; TURNER, 1995). Ainda, o uso da sonda

(TTAGGG)*n* não evidenciou resquícios ITS como vestígios de rearranjos cromossômicos em *E. imbricata* e em *L. olivacea*.

Desta forma, nossos resultados apontam para a importância do uso de técnicas de citogenética convencional e molecular como ferramenta para detecção de diversidade cromossômica em espécies de tartarugas marinhas e padrão de distribuição das diferentes classes de DNAs repetitivos que nos mostram, até o momento, que os cariótipos da família Cheloniidae não estão conservados como se pensava anteriormente. Estes dados, principalmente os moleculares, podem corroborar essa nova informação, auxiliando no entendimento da formação de híbridos e com vistas à evolução cariotípica.

Figura 8 - Cariótipo de *Chelonia mydas* (Extremoz – RN) submetido a coloração convencional com Giemsa. Barra = 10 µm.

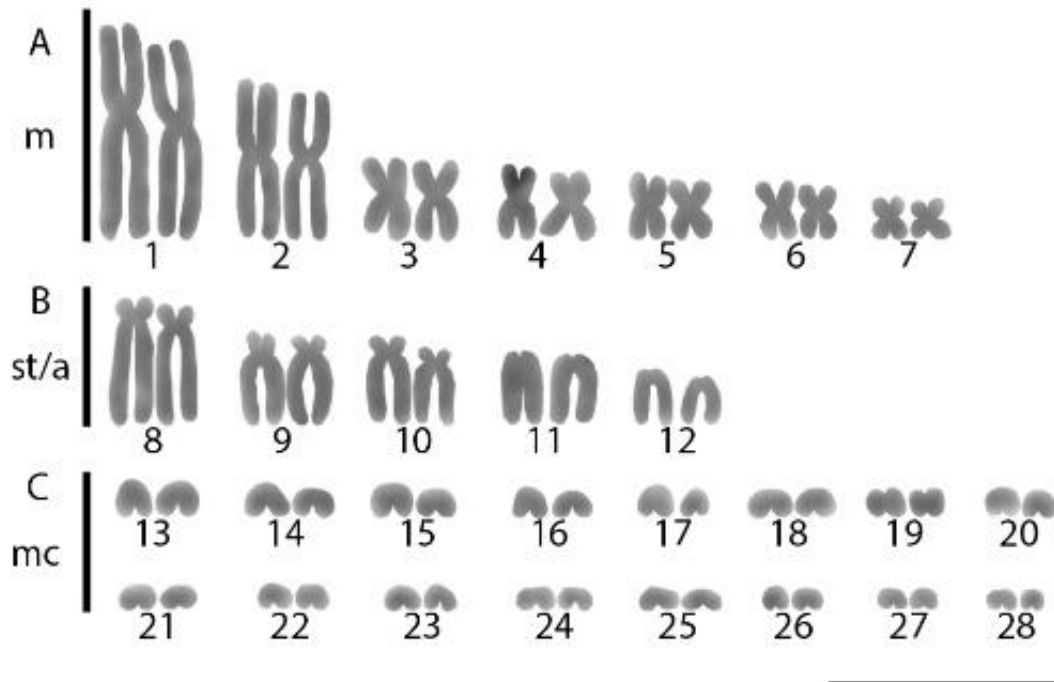


Figura 9 - Cariótipo de *Chelonia mydas* (Ilha das Cobras - PR) submetido a coloração convencional com Giemsa. Barra = 10 µm

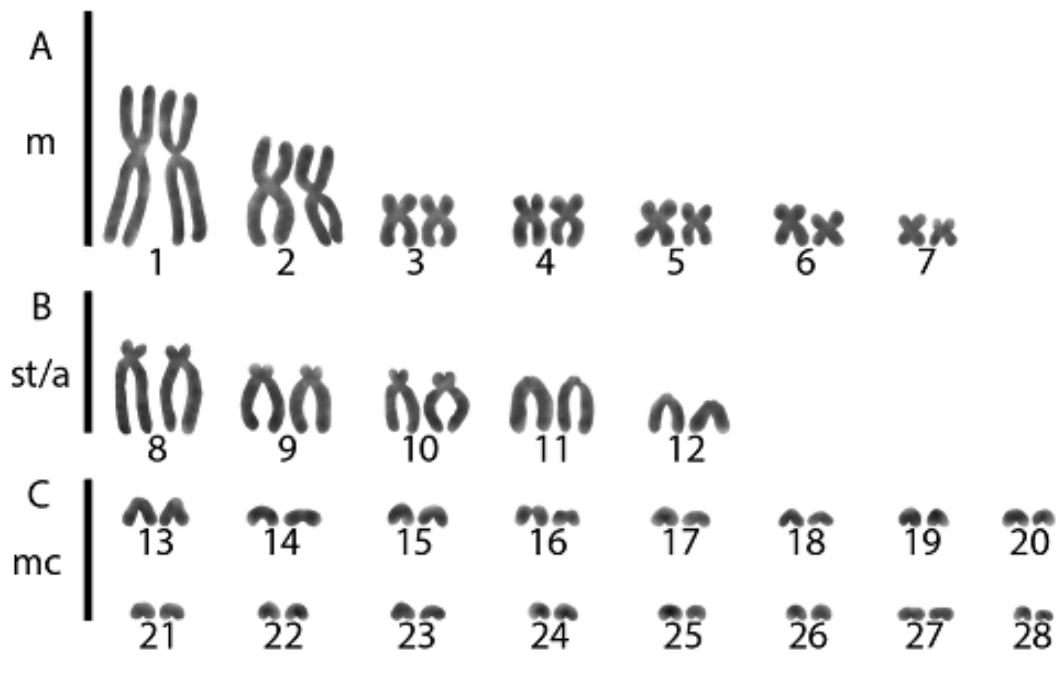


Figura 10 - Cariótipo de *Chelonia mydas* (Extremoz - RN) submetido ao Bandamento G destacando os macrocromossomos dos grupos A e B, abaixo está representada a metáfase utilizada na confecção do cariótipo. Barra = 10  $\mu$ m.

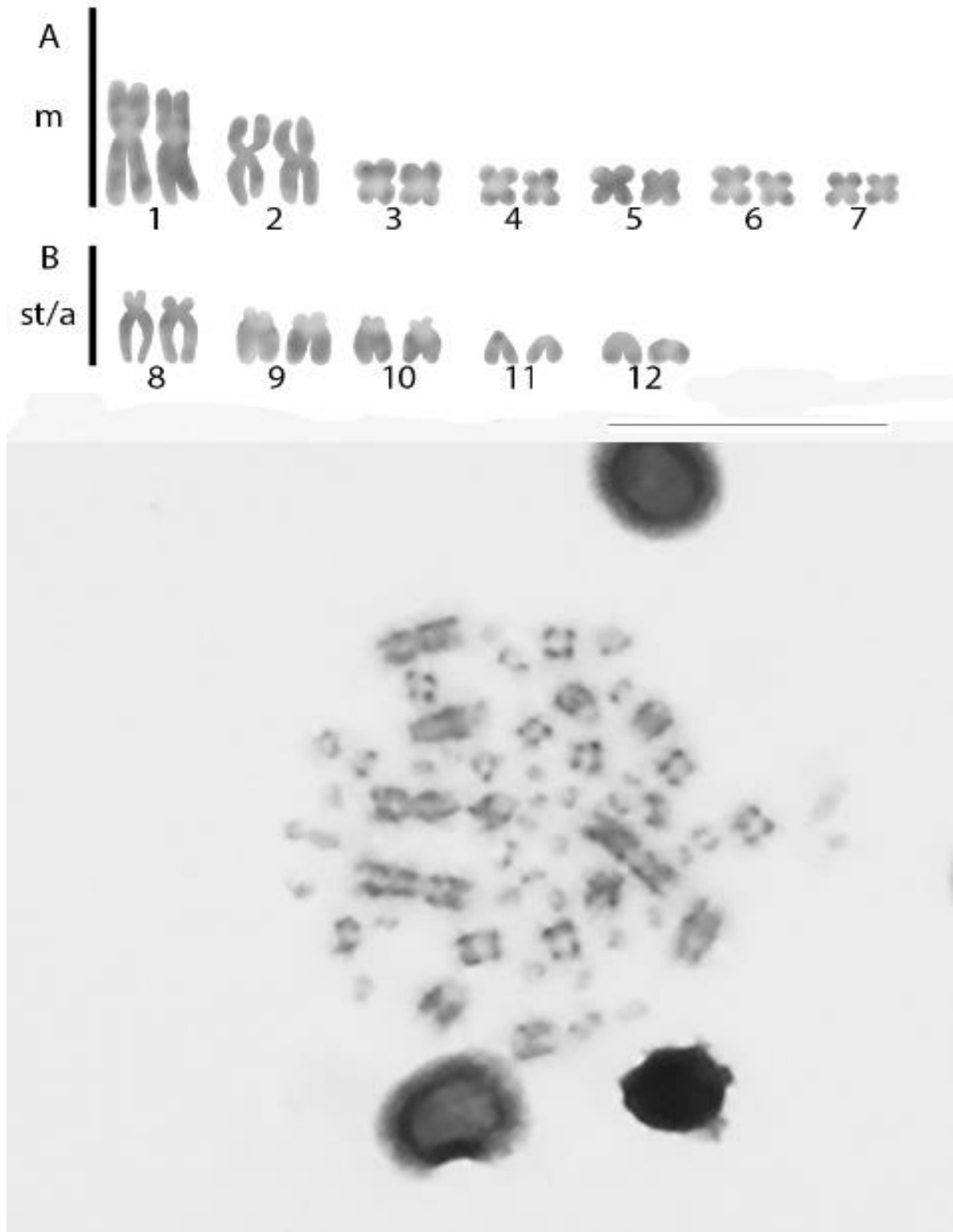


Figura 11 - Cariótipo de *Chelonia mydas* (Extremoz - RN) submetido a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 18S. Barra = 10  $\mu$ m.

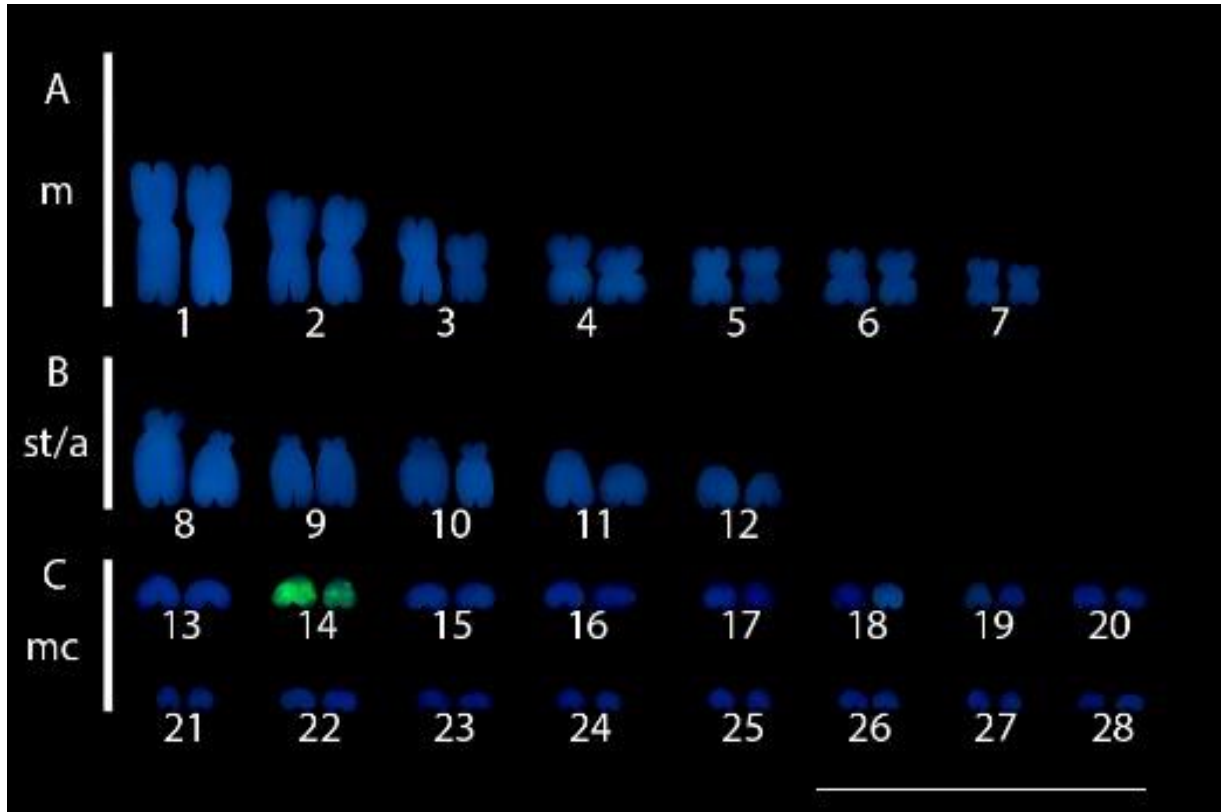


Figura 12 - Cariótipo de *Chelonia mydas* (Extremoz - RN) submetido a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda (TTAGGG)*n*. Barra = 10  $\mu$ m.

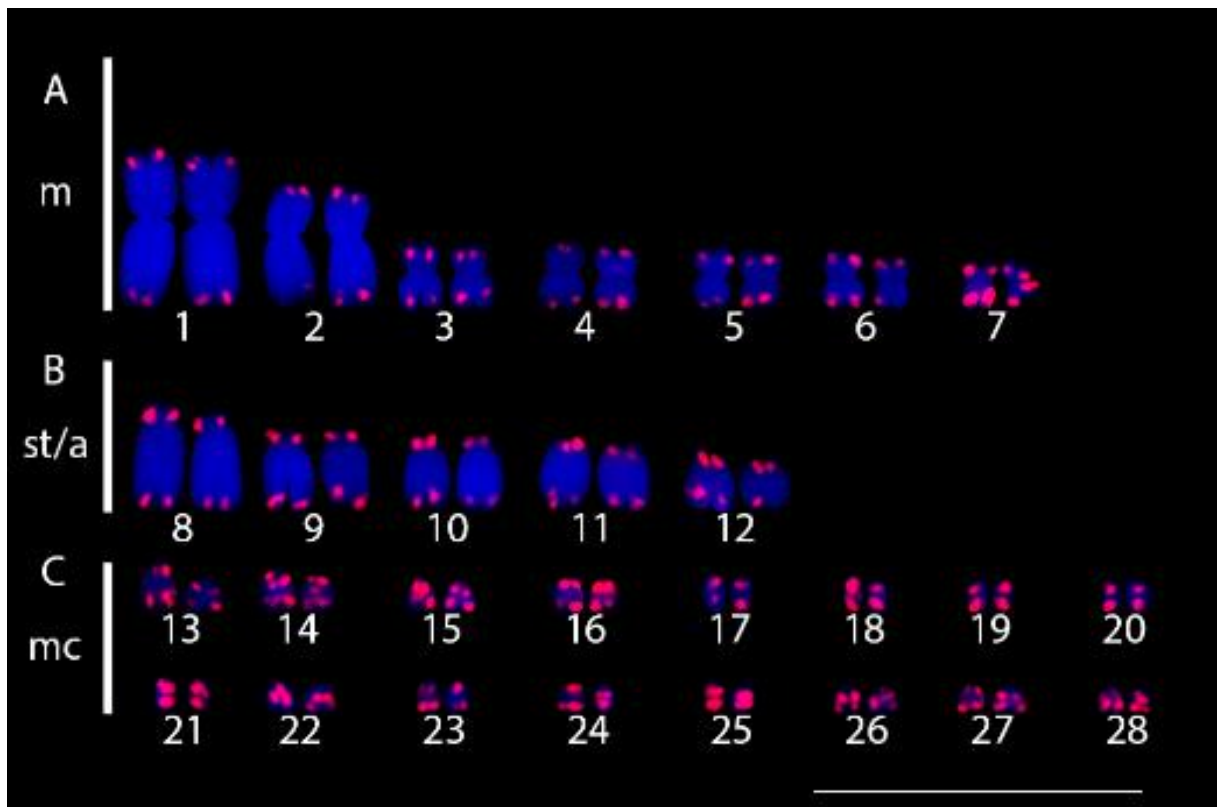




Figura 13 - Cariótipo de *Chelonia mydas* (Ilha das Cobras - PR) submetido a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda (TTAGGG)*n*. Barra = 10 µm.

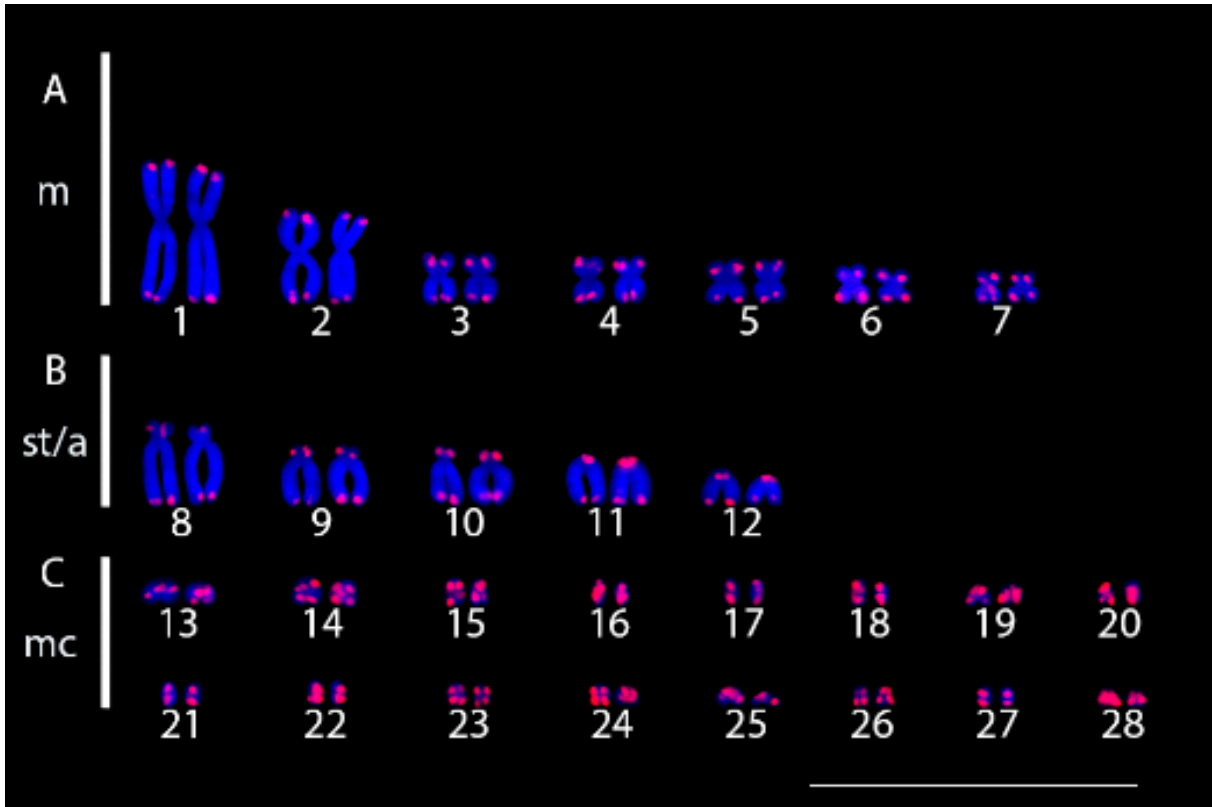


Figura 14 - Cariótipo de *Eretmochelys imbricata* (Tibau do Sul - RN) submetido a coloração convencional com Giemsa. Barra = 10 µm.

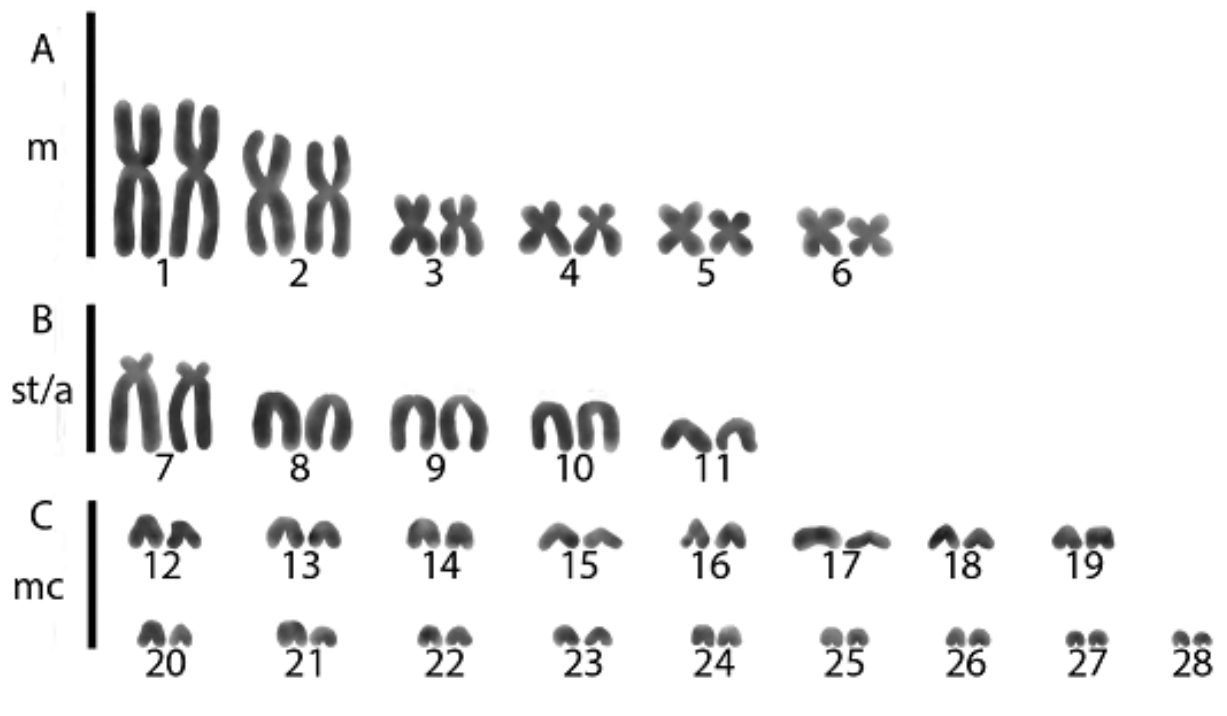


Figura 15 - Cariótipo de *Eretmochelys imbricata* (Tibau do Sul – RN) submetido ao Bandamento G destacando os macrocromossomos dos grupos A e B, abaixo está representada a metáfase utilizada na confecção do cariótipo. Barra = 10  $\mu$ m.

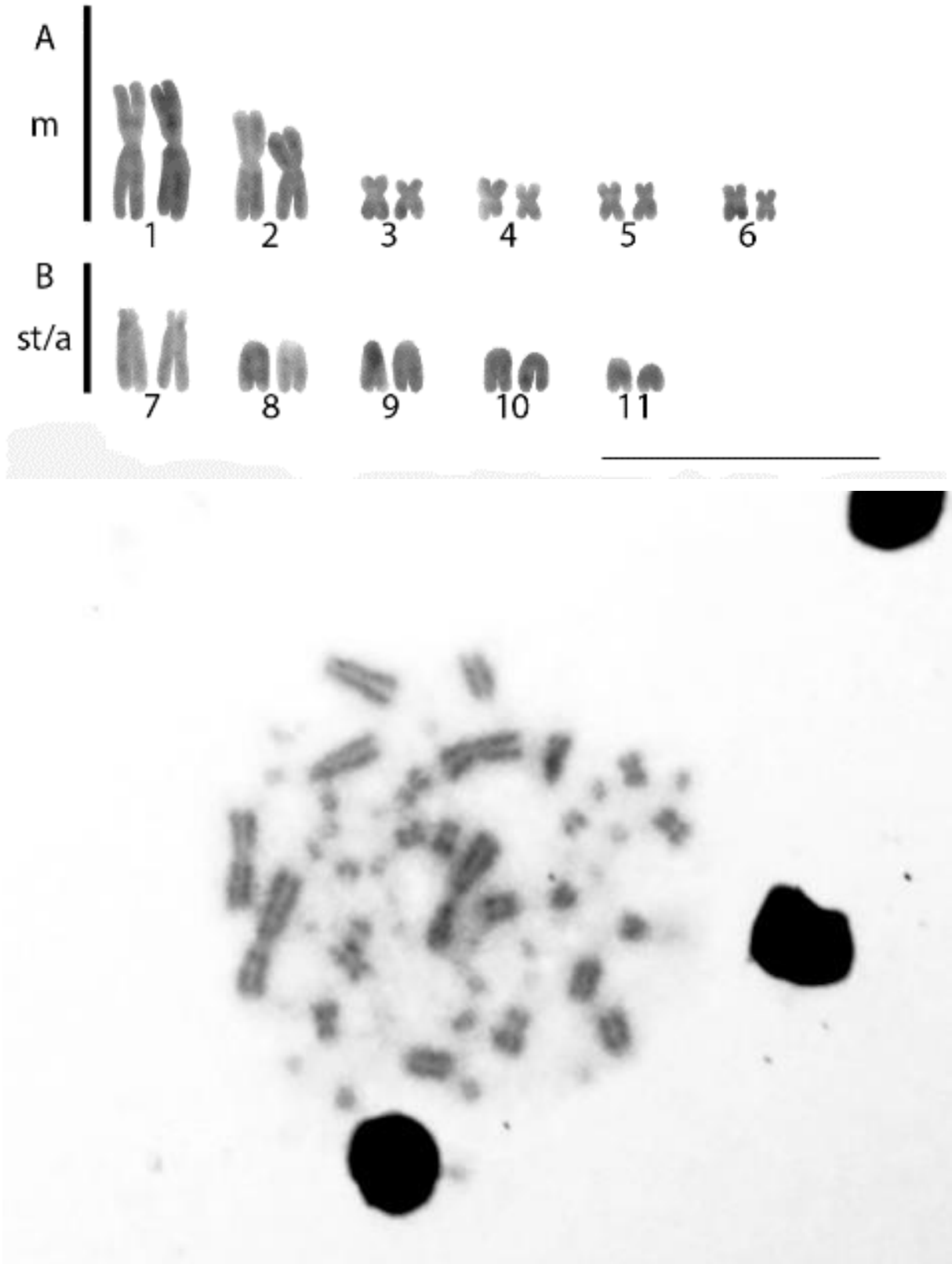


Figura 16 - Cariótipo de *Eretmochelys imbricata* (Tibau do Sul - RN) submetido a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 18S. Barra = 10  $\mu$ m.

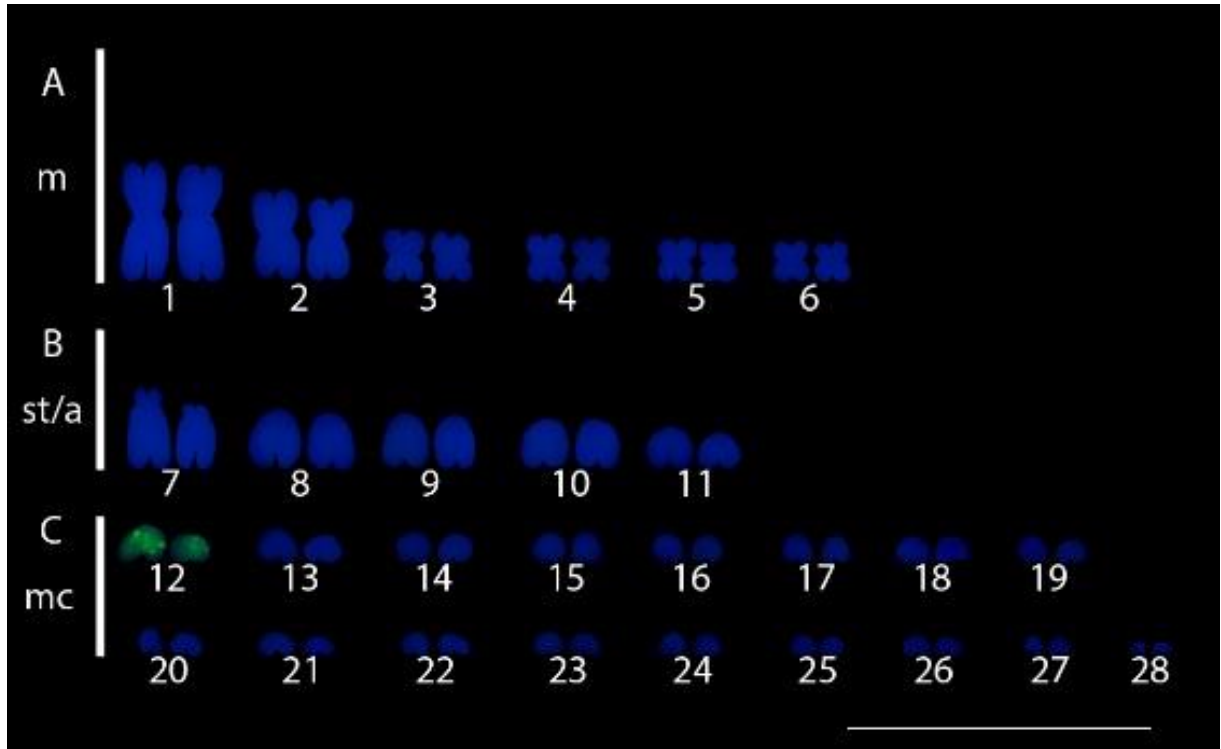


Figura 17 - Cariótipo de *Eretmochelys imbricata* (Tibau do Sul - RN) submetido a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda (TTAGGG)*n*. Barra = 10  $\mu$ m.

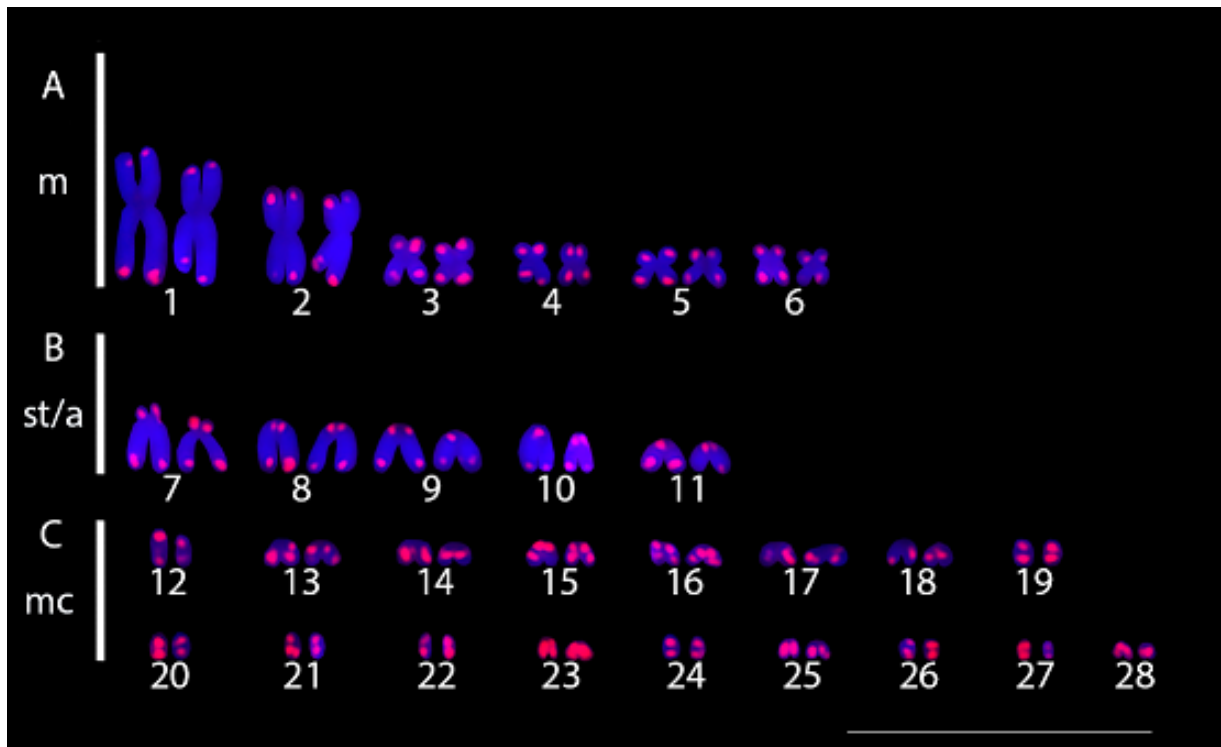


Figura 18 - Cariótipo de *Lepidochelys olivacea* (Extremoz - RN) submetido a coloração convencional com Giemsa. Barra = 10 µm.

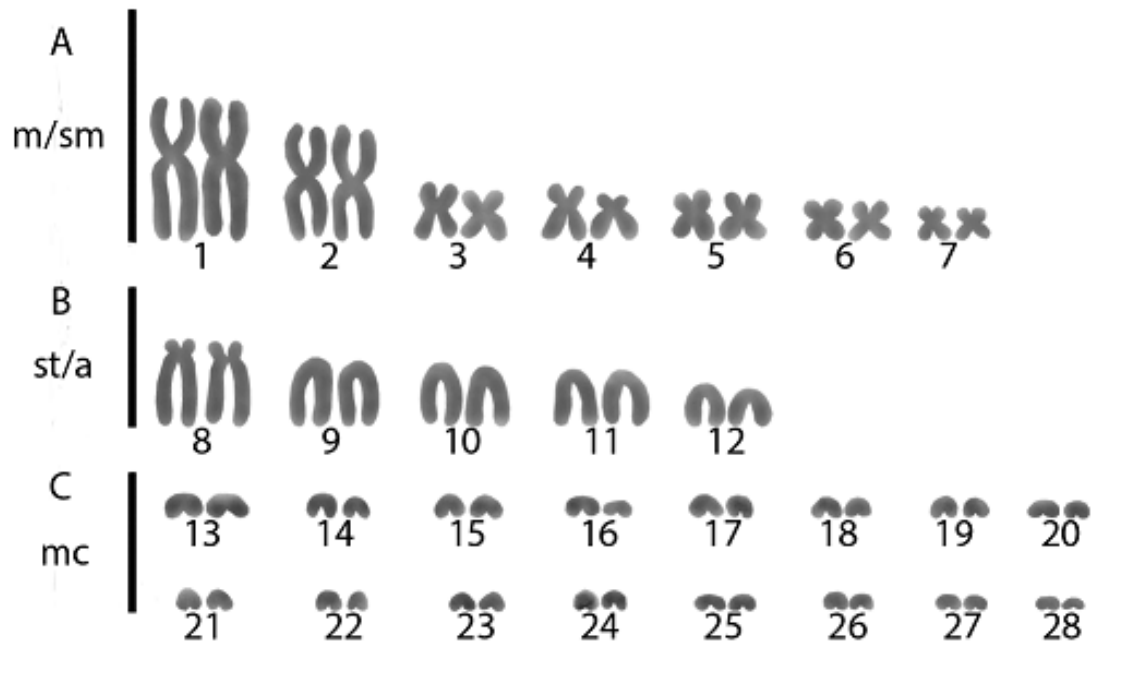


Figura 19 - Cariótipo de *Lepidochelys olivacea* (Extremoz – RN) submetido ao Bandamento G destacando os macrocromossomos dos grupos A e B, abaixo está representada a metáfase utilizada na confecção do cariótipo. Barra = 10  $\mu$ m.

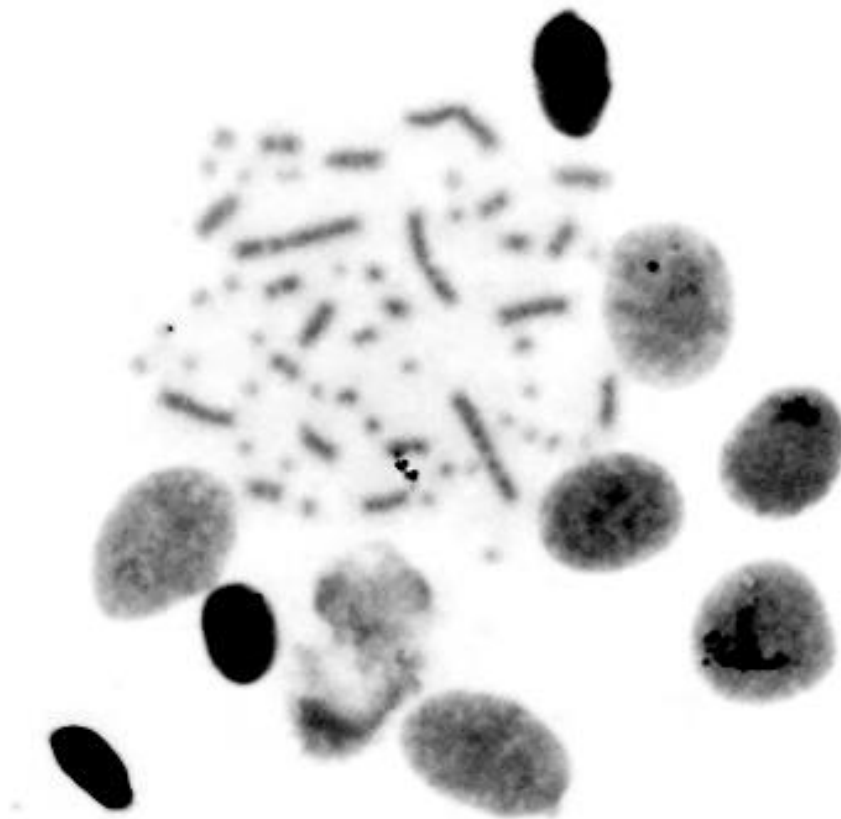
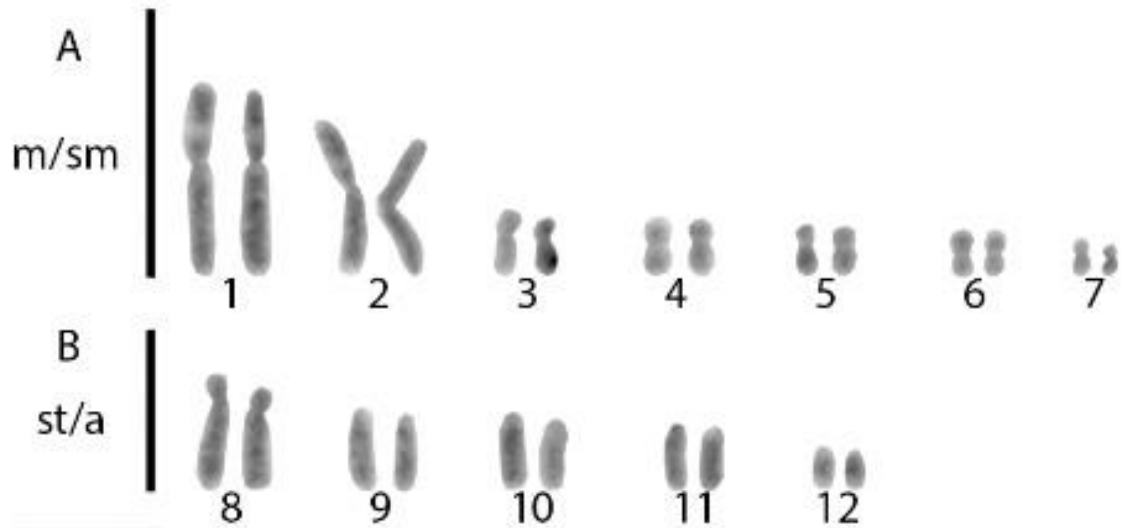


Figura 20 - Cariótipo de *Lepidochelys olivacea* (Extremoz - RN) submetido a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 18S. Barra = 10  $\mu$ m.

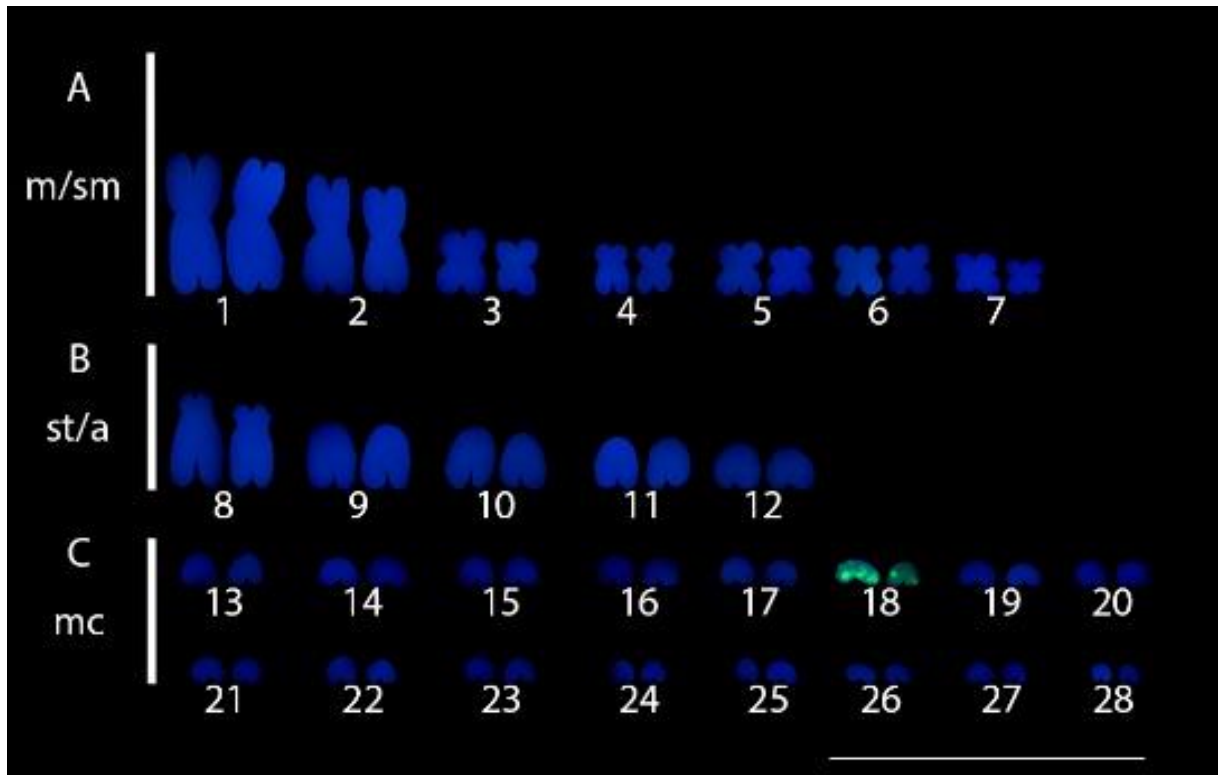


Figura 21 - Cariótipo de *Lepidochelys olivacea* (Extremoz - RN) submetido a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda (TTAGGG)*n*. Barra = 10  $\mu$ m.

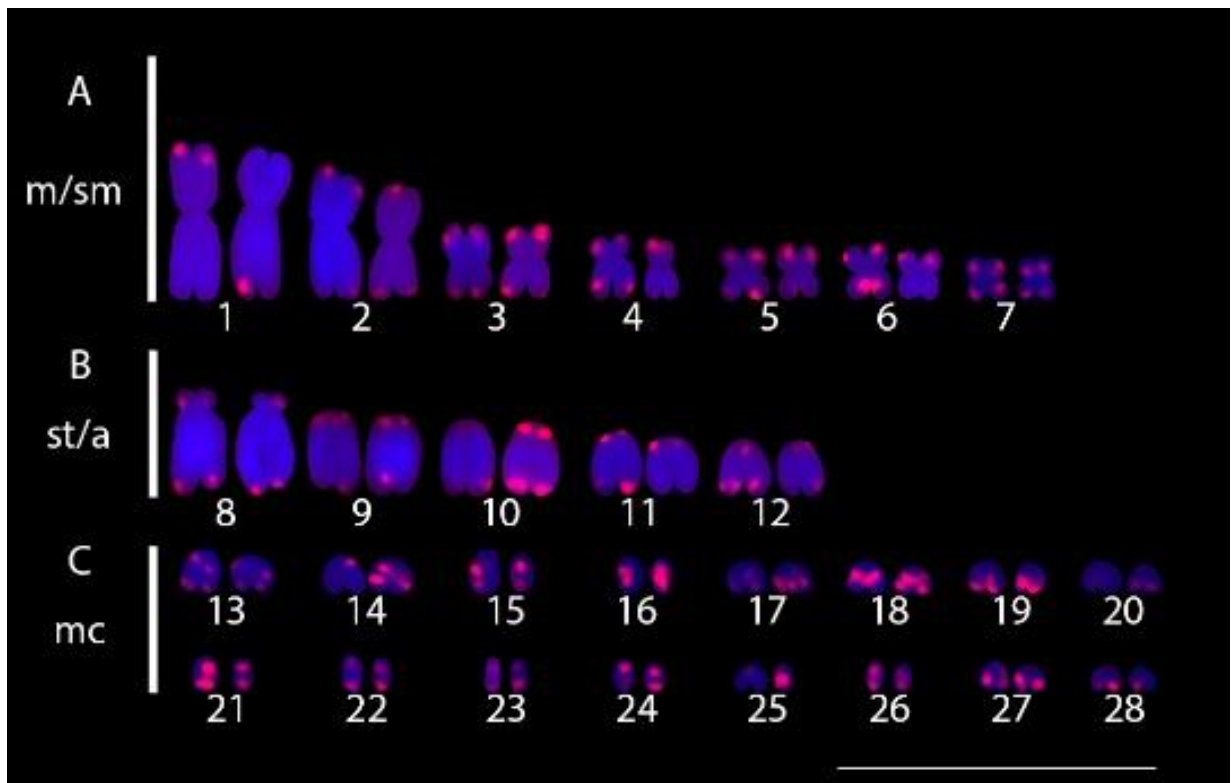
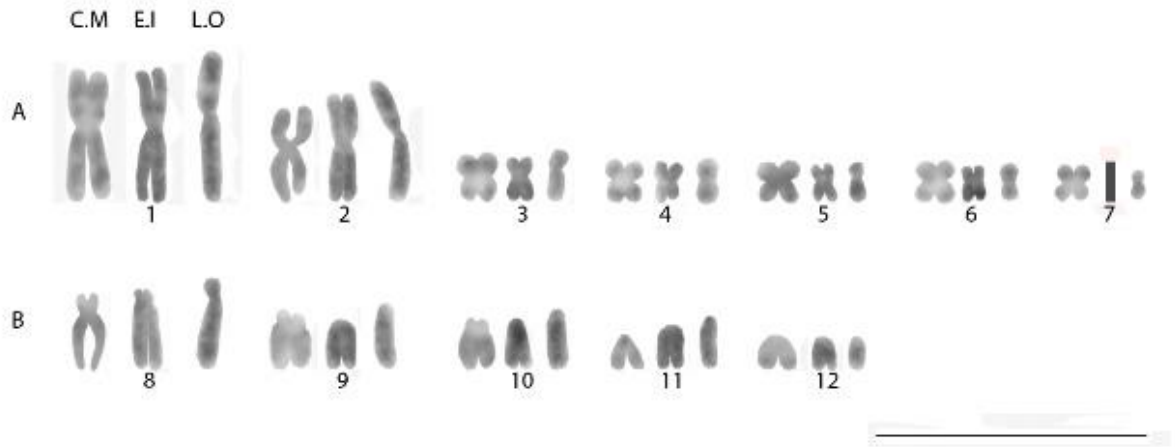


Figura 22 - Comparação dos macrocromossomos dos grupos A e B de *C. mydas* (C.M), *E. imbricata* (E.I) e *L. olivacea* (L.O) submetidos ao bandamento G. O retângulo representa a ausência do par 7 em *E. imbricata*. Barra = 10 µm.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, todas as sete espécies de tartarugas marinhas estão incluídas nas listas de espécies ameaçadas de extinção em diferentes categorias (IUCN, 2017). As interferências humanas em escala global é a causa do colapso das populações dessas espécies. As ameaças das atividades humanas impactam todos os estágios do ciclo de vida das tartarugas, desde a perda de áreas de desova e dos habitats de alimentação até a mortalidade na costa e em alto mar pela prática intensa da pesca, tanto artesanal quanto industrial. Além disso, são ameaçadas pela carga de resíduos não biodegradáveis e poluentes descartados nas zonas costeiras e oceanos (LUTCAVAGE et al., 1997). Por se tratarem de espécies tão ameaçadas, é de extrema importância estudos genéticos que possam contribuir, em um futuro próximo, para o manejo e conservação dessas espécies que se tornaram espécies bandeiras para a conservação da biodiversidade.

Nesse estudo foi realizada a descrição citogenética de três das cinco espécies que ocorrem no litoral brasileiro, *C. mydas*, *E. imbricata* e *L. olivacea*, um estudo pioneiro para o litoral do país, somando que estudos de caráter citogenético envolvendo espécies de tartarugas marinhas há muito tempo não eram realizados mundialmente.

Através da citogenética convencional foi possível observar um  $2n=56$  cromossomos para as três espécies, as quais apresentaram os mesmos padrões de bandamento em seus macrocromossomos apesar das diferenças quanto a morfologia dos cromossomos. Além disso, o cariótipo dado como ancestral para a subordem Cryptodira de 7:5:16 é idêntico ao de *C. mydas* (HAIDUK; BICKHAM, 1992) o que permitiu que fossem feitas inferências sobre possíveis mecanismos evolutivos que contribuiriam para a evolução cariotípica, através da comparação dos cariótipos dessas espécies. Pela primeira vez *C. mydas*, *E. imbricata* e *L. olivacea* foram submetidas a estudos de citogenética molecular, o que permitiu identificar e localizar, através da FISH, genes de DNAr 18S e as regiões teloméricas.

Foi identificado somente um par detentor do sítio de DNAr 18S, o que corrobora dados anteriores apresentados para tartarugas quanto a localização das RONS (BICKHAM; ROGERS, 1985). Os sítios de DNAr 18S foram localizados em pares de microcromossomos e parecem estar distribuídos de maneira desigual entre os cromossomos do par, o que mostra um possível mecanismo de *crossing-over* desigual envolvido na distribuição dos sítios de DNAr 18S nas tartarugas marinhas. Além disso, em *C. mydas* foi identificado um ITS coincidentemente no mesmo par detentor do sítio de 18S, mostrando que essa ITS pode ter sido resultado de um reparo da telomerase em uma região de quebra do gene de DNAr 18S. Esses dados mostram



que os cariótipos dessas espécies não estão no grau de conservação inferido anteriormente, pois manutenção no número diploide e de algumas morfologias não demonstra conservação a nível molecular (MÜHLMANN-DÍAZ et al., 2001).

Atualmente, os estudos genéticos envolvendo as cinco espécies de tartarugas marinhas que ocorrem no litoral brasileiro estão voltados ao padrão de migração das espécies e diversidade genética dos indivíduos em áreas de alimentação e desova (LARA-RUIZ et al., 2006). Contudo, a citogenética das tartarugas de água doce já se mostra uma área em crescimento, apresentando estudos de citogenética clássica e molecular de espécies que ocorrem no país (NOLETO et al., 2006; MARINHO, 2011).

Deve ser destacada a importância da condução de estudos citogenéticos atuais envolvendo mais espécies e populações de tartarugas marinhas para que essa área seja fortificada e inovada, tendo em vista os escassos estudos realizados até então e a ausência de estudos para o litoral brasileiro nessa área. Isso deve-se também à dificuldade na obtenção de material biológico assim como na padronização dos protocolos citogenéticos para essas espécies. Sendo assim, fica clara a importância da divulgação do conhecimento científico para que seja possível contribuir cada vez mais para a identificação de híbridos interespecíficos e para a conservação e manutenção das tartarugas marinhas na costa brasileira e nos oceanos como um todo.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, de P. A. et al. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Revista Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 12-19, 2011.
- BAPTISTOTTE, C.; THOMÉ, J. C. A.; BJORN DAL, K. Reproductive biology and conservation status of the loggerhead sea turtle (*C. Caretta*) in Espírito Santo state, Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v.4, n.3, p.523-529, 2003.
- BARBER, R. C. et al. Natural hybridization between a Kemp's Ridley (*Lepidochelys kempii*) and loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) confirmed by molecular analysis. **Chelonian Conservation and Biology**, v.4, n.3, p. 701-704, 2003.
- BARROS, J. A. et al. Análise da dieta de juvenis de tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) no extremo sul do Brasil. In: VIII CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 2007, Caxambu. **Anais do VIII CEB**, 2007.
- BICKHAM, J. W. A cytosystematic study of turtles in the genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. **Herpetologica**, v. 31, n. 2, p. 198-204, 1975.
- BICKHAM, J. W. et al. Banded Karyotypes of Six Taxa of Kinosternid Turtles. **Copeia**, v. 1979, n. 4, p. 692-698, 1979.
- BICKHAM, J. W. et al. The karyotype and chromosomal banding patterns of the green turtle (*Chelonia mydas*). **Copeia**, v. 1980, n. 3, p. 540-543, 1980.
- BICKHAM, J. W. Two-Hundred-Million-Year-Old Chromosomes: Deceleration of the Rate of Karyotypic Evolution in Turtles. **Science**, v. 212, n. 4500, p. 1291-1293, 1981.
- BICKHAM, J. W.; CARR, J. L. Taxonomy and Phylogeny of the Higher Categories of Cryptodiran Turtles Based on a Cladistic Analysis of Chromosomal Data. **Copeia**, v. 1983, n. 4, p. 918-932, 1983.
- BICKHAM, J. W. Patterns and modes of chromosomal evolution in reptiles. In: Chromosomes in evolution of eukaryotic groups. **CRC Press**: Boca Raton, v. 2, p. 13-40, 1984.
- BICKHAM, J. W.; ROGERS, D. S. Structure and variation of the nucleolus organizer region in turtles. **Genetica**, v. 67, n. 3, p. 171, 1985.
- BIÉMONT, C & VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, p. 521-524, 2006.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 415-420, 2015.
- BJORN DAL, K. A.; ZUG, G. R. Growth and Age of Sea Turtles. In: BJORNDAL, K. A. (eds.). Biology and Conservation of Sea Turtles. **Smithsonian Institution Press**: Washington DC. p. 599-600, 1995.

- BJORNDAL, K.A., Foraging ecology and nutrition of sea turtles. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). *The Biology of Sea Turtles*. **CRC Press**: Boca Raton. p.199-231, 1997.
- BOLZÁN, A. D. Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. **Mutagenesis**, v. 27, n. 1, p. 1-15, 2011.
- BOWEN, B. W.; NELSON, W. S.; AVISE, J. C. A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping rate assessment and conservation relevance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 12, p. 5574-5577, 1993.
- BOWEN, B. W.; KARL, S.A. Population genetics and phylogeography of sea turtles. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 4886-4907, 2007.
- BRINK, J. M. *L'expression morphologique de la digametic chez les Sauropsides et les Monotremes*. **Chromosoma**, v. 10, p. 1-72, 1959.
- BRODERICK, A. C. et al. Incubation periods and sex ratios of green turtles: highly female biased hatchling production in the eastern Mediterranean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 202, p. 273-281, 2000.
- BRODERICK, A. C. et al. Are green turtles globally endangered?. **Global Ecology and Biogeography**, v. 15, n. 1, p. 21-26, 2006.
- BRONGNIART, A. Essai d'une classification naturelle des reptiles. **Badouin**: Paris. 53 p., 1805.
- BUJES, C. S. **Biologia e conservação de quelônios no delta do Rio Jacuí – RS: Aspectos da história natural de espécies em ambientes alterados pelo homem**. 2008, 257 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- BULL, J.J.; VOGT, R.C. Temperature-dependent sex determination in turtles. **Science**, v. 206, n. 7, p. 1186-1188, 1979.
- CAO, Y. et al. Phylogenetic position of turtles among amniotes: evidence from mitochondrial and nuclear genes. **Gene**, v. 259, n. 1, p. 139-148, 2000.
- CARBONE, L. et al. Evolutionary movement of centromeres in horse, donkey, and zebra. **Genomics**, v. 87, n. 6, p. 777-782, 2006.
- CASTILHOS, J. C. de et al. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) no Brasil. **Revista Biodiversidade Brasileira**, Ano I, n. 1, p. 28-36, 2011.
- CASTHELOGE, V. D. **Determinação da Temperatura Pivotal e da Razão Sexual de *Lepidochelys olivacea* (Escholtz, 1829) em Pirambu, Sergipe**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecossistemas) – Universidade Vila Velha, Vila Velha, 2014.
- CHALOUPKA, M. Y.; LIMPUS, C. J.; MILLER, J. D. Green turtle growth dynamics in a spatially disjunct Great Barrier Reef metapopulation. **Coral Reefs**, v. 23, p. 325-335, 2004.

CHOWDHARY, B. P.; RAUDSEPP, T. Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. **Methods in Cell Science**, v. 23, p. 37-55, 2001.

CONCEIÇÃO, M. B. et al. Electrophoretic characterization of a hybrid between *Eretmochelys imbricata* and *Caretta caretta* (Cheloniidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 97B, n. 2, p. 275-278, 1990.

ELDER, J. F.; TURNER, B. J. Concerted Evolution of Repetitive DNA Sequences in Eukaryotes. **The Quarterly Review of Biology**, v. 70, n. 3, p. 297-320, 1995.

EPPLEN, J. T. et al. Contrasting DNA sequence organization patterns in Sauropsidian Genomes. **Chromosoma**, v. 75, p. 199-214, 1979.

EZAZ, T. et al. An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination. **Chromosome Research**, v. 14, p. 139-150, 2006.

FARIA, R.; NAVARRO, A. Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 11, p. 660-669, 2010.

FERREIRA JÚNIOR, P. D. Aspectos Ecológicos da Determinação Sexual em Tartarugas. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 139-154, 2009.

FITZSIMMONS, N. N.; MORITZ, C; MOORE, S. S. Conservation and Dynamics of Microsatellite Loci over 300 Million Years of Marine Turtle Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, n. 3, p. 432-440, 1995.

FORD, E. H. R.; WOOLAN, D. H. M. Testicular chromosomes of *Gallus domesticus*. **Chromosoma**, v. 15, p. 568-578, 1964.

FUKUDA, T. et al. Efficient establishment of primary fibroblaste cultures from the hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 48, p. 660-665, 2012.

FUKUDA, T. et al. Primary fibroblast cultures and karyotype analysis for the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 50, p. 381-383, 2013.

GODFREY, M. H. et al. Pivotal temperature and predicted sex ratios for hatchling hawksbill turtles from Brazil. **Canadian Journal of Zoology**, n. 9, v. 74, p. 1465-1473, 1999.

GROSS, M. C. et al. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. **Journal of Fish Biology**, n.76, p. 1117-1127, 2010.

HAIKUK, M. W.; BICKHAM, J. W. Chromosomal Homologies and Evolution of Testudinoid Turtles with Emphasis on the Systematic Placement of *Platysternon*. **Copeia**, v. 1982, n. 1, p. 60-66, 1982.

HARDMAN, N. Structure and function of repetitive DNA in eukaryotes. **Biochemical Journal**, v. 234, p. 1-11, 1986.

HICKMAN, C. P. Princípios integrados de Zoologia. 11 ed. **Guanabara Koogan**: Rio de Janeiro. 846 p. 2004.

IJDO, J. W et al. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)*n* generated by PCR. **Nucleic Acids Research**. v.19, p.17, 1991.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

JAMES, M. C.; MARTIN, K.; DUTTON, P. H. Hybridization Between a Green Turtle, *Chelonia mydas*, and Loggerhead Turtle, *Caretta caretta*, and the First Record of a Green Turtle in Atlantic Canada. **The Canadian Field-Naturalist**, v. 118, p. 579-582, 2004.

JANZEN, F. J. Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 7487-7490, 1994.

JENSEN, M. P.; SIMMONS, N. N. F.; DUTTON, P. H. Molecular Genetics of Sea Turtles. In: Wyneken, J.; Lohmann, K. J. and Musick, J. A. (eds.). *The Biology of Sea Turtles Volume III*. **CRC Press**: Boca Raton. p. 135-161, 2013.

KAMEZAKI, N. Karyotype of the Loggerhead Turtle, *Caretta caretta*, from Japan **Zoological Science**, v. 6, p. 421-422, 1989.

KAMEZAKI, N. Karyotype of the Hawksbill Turtle, *Eretmochelys imbricata*, from Japan, with Notes on a Method for Preparation of Chromosomes from Liver Cells. **Japanese Journal of Herpetology**, v. 13, n. 4, p. 111-113, 1990.

KARL, S.; BOWEN, B.; AVISE, J. Hybridization among the ancient mariners: characterization of marine turtle hybrids with molecular genetic assays. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 262-268, 1995.

KASAI, F. et al. Chromosome homology between chicken (*Gallus gallus domesticus*) and the red-legged partridge (*Alectoris rufa*); evidence of the occurrence of a neocentromere during evolution. **Cytogenetic and Genome research**, v. 102, n. 1-4, p. 326-330, 2004.

KETTLEWELL, J.; RAYMOND, C.; ZARKOWER, D. Temperature dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. **Genesis**, v. 26, p. 174-178, 2000.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, p. 49-63, 2002.

KURAKU, S. et al. cDNA-based gene mapping and GC3 profiling in the soft-shelled turtle suggest a chromosomal size-dependent GC bias shared by sauropsids. **Chromosome Research**, v. 14, n. 2, p. 187-202, 2006.

LARA-RUIZ, P. et al. Extensive hybridization in hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 773-781, 2006.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

LI, Y et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2453-2465, 2002.

LINNAEUS, C. Systema naturae per regna triae naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. **Editio Decima**: Stockholm. 823 p., 1758.

LOHMANN, K. J. et al. Orientation, navigation and natal beach homing in sea turtles. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). The Biology of Sea Turtles. **CRC Press**: Boca Raton. p. 107-135, 1997.

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

LUTCAVAGE, M. E. et al. Human impacts on sea turtle survival. In: Lutz, P. L.; Musick, J. A. (eds.). The Biology of Sea Turtles, **CRC Press**: Boca Raton. p. 387-409, 1997.

LUTCAVAGE, M. E.; LUTZ, P. L. Diving Physiology. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). The Biology of Sea Turtles. **CRC Press**: Boca Raton. p. 277-296, 1997.

LUTZ, P. L. Salt, water and pH balance in the sea turtle. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). The Biology of Sea Turtles. **CRC Press**: Boca Raton. p. 343-361, 1997.

MANDRIOLI, Mauro. Mariner-like transposable elements are interspersed within the rDNA-associated heterochromatin of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). **Chromosome Research**, v. 8, n. 2, p. 177-179, 2000.

MARCOVALDI, M. A; VIEITAS, C. F.; GODFREY, M. H. Nesting and conservation management of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in northern Bahia, Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 3, n. 2, p. 301-307, 1999.

MARCOVALDI, M. A. Status and distribution of the olive ridley turtle, *Lepidochelys olivacea*, in the western atlantic ocean. In: Karen L.; Eckert and F.; Grobois, A. A. (eds.). **Widecast, IUCN/SSC/MTSG, WWF and the UNEP Caribbean Environment Programme onservation and Biology**. 2001.

MARCOVALDI, M. A. et al. Fifteen year of Hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) Nesting in Northern Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 6, n. 2, p. 223-228, 2007.

MARCOVALDI, M. A. et al. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) no Brasil. **Revista Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 20-27, 2011.

MARINHO, L. A. **Contribuição à citogenética de testudines e análise de assimetria flutuante em *Eretmochelys imbricata*, Cheloniidae**. 2011, 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Área de Concentração em Ecologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

- MÁRQUEZ, M. R. Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. 11 ed. **FAO Fisheries Synopsis**: Rome. 81 p. 1990.
- MATSUDA, Y. et al. Highly conserved linkage homology between birds and turtles: Bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. **Chromosome Research**, v. 13, p. 601-615, 2005.
- MATTHEY, R. Karyotypes of mammals and birds. The problem of the microchromosomes. Some remarks about the evolution of chromosomes. **Archiv fur Genetik**, v. 48, n. 1, p. 12-26, 1974.
- MEDRANO, L. et al. Karyotype of the sea turtle *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761). **Amphibia-Reptilia**, v. 8, p. 171-178, 1987.
- MENEZES, M. F. As tartarugas marinhas do Brasil. **Arquivo de Ciências do Mar**, v. 12, n. 1, p. 17-20, 1972.
- MEYLAN, A. B.; BOWEN, B. W.; AVISE, J. C. A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. **Science**, v. 248, p. 724-727, 1990.
- MEYLAN, A. B.; DONNELLY, M. Status justification for listing the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as critically endangered on the 1996 IUCN Red List of Threatened Animals. **Chelonian Conservation and Biology**, v.3, n.2, p.200-224, 1999.
- MILLER, J.D. Reproduction in sea turtles. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). The Biology of Sea Turtles. **CRC Press**: Boca Raton. p. 51-82, 1997.
- MONTEFALCONE, G. et al. Centromere repositioning. **Genome Research**, v. 9, n. 12, p. 1184-1188, 1999.
- MORREALE, S. J. et al. Temperature dependent sex determination: Current practices threaten conservation of sea turtles. **Science**, v. 216, p. 1245-1247, 1982.
- MORTIMER, J. A. The state of the world's hawksbills. **SWOT Report**, v. 3, p. 10-13, 2007.
- MROSOVSKY, N.; DUTTON, P.H.; WHITMORE, C.P. Sex ratio of two species of sea turtle nesting in Suriname. **Canadian Journal of Zoology**, v. 62, n. 11, p. 2227-2239, 1984.
- MROSOVSKY, N. et al. Pivotal and beach temperatures for hawksbill turtles nesting in Antigua. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, n. 10, p. 1920-1925, 1992.
- MÜHLMANN-DÍAZ, M. C. et al. Conservation of chromosome 1 in turtles over 66 million years. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 92, p. 139-143, 2001.
- MURDOCK, C.; WIBBELS, T. Expression of Dmrt1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 101, p. 302-308, 2003.
- MUSICK, J. A.; LIMPUS, C. J. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). The Biology of Sea Turtles. **CRC Press**: Boca Raton. p. 137-164, 1997.

- NAVARRO, A.; BARTON, N. H. Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: a new twist on chromosomal speciation. **Evolution**, v. 57, n. 3, p. 447-459, 2003.
- NEI, M; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 121-152, 2005.
- NERGADZE, S. G. et al. Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution. **Genome biology**, v. 8, n. 12, p. R260, 2007.
- NEWCOMER, E. H. The mitotic chromosomes of the domestic fowl. **Journal of Heredity**, v. 48, p. 227-234, 1957.
- NOLETO, R. B. et al. Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines, Pleurodira) from the upper Iguaçú River in the Brazilian state of Paraná. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 263-266, 2006.
- NOWAK, R. Mining treasures from junk DNA. **Science**, v. 263, p. 608-610, 1994.
- OLMO, E. Genome size in some Reptiles. **Journal of Experimental Zoology**, v. 195, p. 305-310, 1976.
- OLMO, E. et al. Different trends in the variations of the main genomic components in turtles and scaly-reptiles. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 80, n. 3, p. 441-446, 1985.
- OLMO, E. Reptilia. In: John, B. (eds.). Animal Cytogenetics. **Gebrüder Borntraeger: Stuttgart**. p. 1-100, 1986.
- ORTIZ, M. L., RODRÍGUEZ, P. A., BUENO, M. L. Agentes mitogénicos para cultivos de linfocitos en quelônios. **Orinoquia**, v. 7, n. 1-2, p. 47-49, 2003.
- PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; GARCIA-VÁZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 63, n. 2, p. 128-130, 1993.
- PENDÁS, A. M. et al. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 67, p. 31-36, 1994.
- PIEAU, C. et al. Environmental control of gonadal differentiation. In: Short RV, Balaban E (eds). The differences between the sexes. **Cambridge University Press: Cambridge**. p 433-448, 1994.
- PIEAU, C. Temperature variation and sex determination in reptiles. **BioEssays**, v. 18, n. 1, p. 19-26, 1996.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.



- PRITCHARD, P.C.H.; TREBBAU, P. The turtles of Venezuela. **Society for the Study of Amphibians and Reptiles**: Oxford. 403 p. 1984.
- PRITCHARD, P. C. H. Evolution, phylogeny and current status. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). *The Biology of Sea Turtles*. **CRC Press**: Boca Raton, FL. p. 1–28, 1997.
- PRITCHARD, P.C.H.; MORTIMER, J. A. Taxonomy, external morphology and species identification. In: Eckert, K. L., Bjorndal, K. A.; Abreu-Grobois, F. A. and Donnelly, M. (eds.). **Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles**. **IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication**. n. 4, 235 p., 1999.
- RAO, S. R. et al. DNA repetitive sequences types, distribution and function: A review. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 7-8, p. 1-11, 2010.
- ROCCHI, M. et al. Centromere repositioning in mammals. **Heredity**, v. 108, n. 1, p. 59-67, 2012.
- RUIZ-HERRERA, A. et al. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, p. 219-228, 2008.
- SANCHES, T. M.; BELLINI, C. Juvenile *Eretmochelys imbricata* and *Chelonia mydas* in the Archipelago of Fernando de Noronha, Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 4, n. 2, p. 308-331, 1999.
- SANTOS, A. S. et al. Plano de ação nacional para a conservação de tartarugas marinhas. **Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade (ICMBio)**: Brasília, p. 21. 2011.
- SCHEMBERGER, M. O. et al. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**, v. 139, p. 1499–1508, 2011.
- SCHMIDT, M.; STEINLEIN, C. Chromosome Banding in Amphibia. XXXIV. Intrachromosomal Telomeric DNA Sequences in Anura. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 148, n. 2-3, p. 211-226, 2016.
- SCHROEDER, A. L. et al. A Novel Candidate Gene for Temperature-Dependent Sex Determination in the Common Snapping Turtle. **Genetics of Sex**, v. 203, p. 557-571, 2016.
- SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. Practical in situ hybridization. **BIOS Scientific Publishers Ltd**, 2000.
- SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, v. 2, n. 7731, p. 971-972, 1971.
- SEMINOFF, J. A. et al. Status review of the green turtle (*Chelonia mydas*) under the endangered species act. **NOAA Technical Memorandum NMFS**: United States of America. 599 p. 2015.

- SILVA, A. C. C. D. et al. Nesting biology and conservation of the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) in Brazil, 1991/1992 to 2002/2003. **Journal of Marine Biology Association of the UK**, v. 87, p. 1047-1056, 2007.
- SHAPIRO, J. A.; STERNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biological Reviews**, v. 80, p. 1-24, 2005.
- SMIT, S.; WIDMANN, J.; KNIGHT, R. Evolutionary rates vary among rRNA structural elements. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 3339-3354, 2007.
- SMITH, G. P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science**, v. 191, n. 4227, p. 528-535, 1976.
- SWOT. Global biogeography of the olive ridley. **SWOT Report**, v. 5, p. 32-33, 2009.
- SZOSTAK, J. W.; WU, R. Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 284, p. 426-430, 1980.
- TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: DNA fingerprinting: State of the science, S. D. J. Pena, R. Chakraborty, J. T. Eppelen et al. (eds.). DNA fingerprinting: State of the science. **Birkhäuser Verlag Basel**: Switzerland. P. 21-28, 1993.
- WAGLER, J. G. Natürliches System der Amphibian. **Cotta**: Munich. 354 p., 1830.
- WALDRIGUES, A. Citogenética de Aves II Características dos Cromossomos. **Semina**, v. 9, n. 3, p. 5-10, 1981.
- WALSH, J. B.; STEPHAN, W. Multigene families: evolution. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-6, 2001.
- WICKER, T. W. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 973-982, 2007.
- WOOD, J. R.; WOOD, F. E.; CRITCHLEY, K. Hybridization of *Chelonia mydas* and *Eretmochelys imbricata*. **Copeia**, v. 1983, n. 3, p. 839-842, 1983.
- YNTEMA, C.L.; MROSOVSKY, N. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. **Canadian Journal of Zoology**, v. 60, n. 5, p. 1012-1016, 1982.
- ZUG, G.R.; CHALLOUPKA, M.; BALAZS, G. H. Age and growth in olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*) from the North-central Pacific: a skeletochronological analysis. **Marine Ecology**, v. 27, p. 263-270, 2006.

**ANEXOS**

# ANEXO A - AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA

## MMA/IBAMA/SISBIO: 52218-1



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 52218-1	<b>Data da Emissão:</b> 26/01/2016 18:06	<b>Data para Revalidação*:</b> 24/02/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Caroline Regina Dias Machado	CPF: 083.652.039-44
Título do Projeto: Estudo de marcadores cromossômicos em <i>Chelonia mydas</i> , <i>Caretta caretta</i> , <i>Lepidochelys olivacea</i> e <i>Eretmochelys imbricata</i> (Testudines: Cheloniidae): Ênfase na diversidade cariotípica	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	CNPJ: 80.257.355/0001-08

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material biológico in situ e ex situ	01/2016	01/2018

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Daphne Wrobel Goldberg	Colaboradora	081.966.617-38	11022803-8 IFP-RJ	Brasileira
2	Marcelo Ricardo Vicari	Coordenador	952.846.480-72	11.122.845-0 SSP-PR	Brasileira
3	Layse Aranha Marinho	Colaboradora	081.207.404-81	2280646 ITEP-RN-RN	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	PONTAL DO PARANA	PR	Pontal do Sul	Fora de UC Federal
2	TIBAU DO SUL	RN	Projeto TAMAR - ICMBio - Base Pipa	Fora de UC Federal
3	FLORIANÓPOLIS	SC	Projeto TAMAR - ICMBio - Base Florianópolis	Fora de UC Federal
4	PARNAMIRIM	RN	Projeto TAMAR - ICMBio - Base Barreira do Inferno	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade do documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 43797511



## **ANEXO B - CULTIVO DE LINFÓCITOS OBTIDOS DE SANGUE PERIFÉRICO E PREPARAÇÃO CELULAR PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS**

O cultivo temporário de linfócitos foi realizado segundo o protocolo de Ortiz & Rodríguez (2003), com modificações. Com seringas de 5 ml, foi transferido cerca de 10 gotas de sangue dos tubos BD VACUTAINER® Heparina para alíquotas de meio de cultivo RPMI (1640 da Sigma). Após a semeadura do sangue, as alíquotas foram incubadas em estufa à 28-30°C por 72 horas, depois das primeiras 24 horas foi adicionado 0,5 ml de soro bovino fetal. Uma hora antes do término do tempo de cultivo foi adicionado 100-125 µL de colchicina 0,025% e as alíquotas ficaram na estufa até completarem as 72 horas. Terminadas as 72 horas, com auxílio de uma pipeta o conteúdo das alíquotas foi ressuspensionado para homogeneizar o material. Feito isso, o material foi transferido para tubos de centrifuga (Falcon) e submetidos à centrifugação a 1000 rpm durante 10 minutos. Após esse tempo na centrífuga, o sobrenadante foi desprezado e acrescentado 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M), a qual foi previamente aquecida em estufa à 28-30°C. Com o auxílio de uma pipeta pasteur o material foi ressuspensionado e incubado à 28-30°C por 40 minutos. Após o tempo na hipotônica foi adicionado 1 ml de fixador 4:1 (álcool metílico: ácido acético) recém preparado e gelado para cessar o efeito da mesma. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos e desprezado o sobrenadante para posteriormente acrescentar 5 ml de fixador 4:1. Após essa etapa o material foi ressuspensionado e guardado em freezer para que as lavagens continuassem no dia seguinte. No segundo dia de processamento das amostras foram realizadas mais duas ou três lavagens com 5 ml de fixador 4:1. Por fim, após as lavagens, adicionou-se 1,5 ml de fixador 4:1 ao material, o qual foi transferido para um microtubo de 1,5 ml. O material foi armazenado em freezer para posterior preparo das lâminas.

**ANEXO C - COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO DE EXEMPLARES DE *CHELONIA MYDAS*, *ERETMOCHELYS IMBRICATA* E *LEPIDOCHELYS OLIVACEA***

Para coleta de sangue, primeiramente foi realizada uma desinfecção local com álcool 70% e então foram coletados aproximadamente 5 ml de sangue do seio cervical dorsal ou do seio supra-occipital de dezoito exemplares de *Chelonia mydas* (n = 18), dois de *Eretmochelys imbricata* (n = 2) e três de *Lepidochelys olivacea* (n = 3).

Na coleta de sangue foram utilizadas seringas de 5 ml estéreis previamente rinçadas com heparina sódica, agulhas de calibre 25:8 e 40:8 estéreis e tubos BD VACUTAINER® Heparina estéreis onde o sangue será armazenado.

**ANEXO D - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA**



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Processo CEUA – 020/2016**

Protocolo UEPG – 7200/2016

**Título** - Projeto de pesquisa “Estudo de marcadores cromossômicos em tartarugas marinhas da família Cheloniidae (Reptilia: Testudines)”

Interessado: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

**Data de Entrada** – 09/05/2016

**Resultado:** Aprovado

**Data/Prazo** – 03/06/2016 a 03/06/2018

**Considerações**

Prezado Professor Dr. *Marcelo Ricardo Vicari*

Em relação à utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização de setenta (70) tartarugas marinhas da família Cheloniidae (Reptilia: Testudines).

Ponta Grossa, 03 de junho de 2016.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROPEP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

*Prof. Dra. Maria Marta Loddi*  
Coordenadora

## **ANEXO E - COLORAÇÃO CONVENCIONAL POR GIEMSA 10%, TAMPÃO FOSTATO PH 6,8**

As lâminas preparadas com suspensão celular foram coradas com solução de Giemsa, diluída em tampão fosfato pH 6,8 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 10% por 6-8 minutos e em seguida foram lavadas com água corrente e secadas ao ar.



## **ANEXO F - BANDAMENTO G**

Para realizar o procedimento de bandamento G foi utilizado o protocolo proposto por Seabright (1971), com modificações. As lâminas com material a ser analisado foram envelhecidas previamente, ficando aproximadamente 6 a 8 dias em temperatura ambiente. Este material após envelhecimento foi submetido a uma digestão com uma solução de tripsina a 0,1% em tampão fosfato pH 6,8 pré-aquecida a 37°C durante 4 a 6 segundos. A ação da tripsina foi interrompida mediante a lavagem com água destilada gelada. Em seguida as lâminas foram coradas com Giemsa a 3% em tampão fosfato pH 6,8 por 4-6 minutos.

## ANEXO G - EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE TECIDOS TIPO PELE E MÚSCULO

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de tecidos tipo pele e músculo de *Chelonia mydas*, utilizada como espécie-padrão, obtidos de animais mortos em parceria com o Laboratório de Ecologia e Conservação de Mamíferos e Tartarugas Marinhas (LEC) da Universidade Federal do Paraná utilizando o kit *PureLink™ Genomic DNA Kits* (Invitrogen). Os tecidos foram cortados e colocados em microtubos estéreis de 1,5 ml onde foram adicionados 180 µL da solução *PureLink™ Genomic Digestion Buffer* e 20 µL de Proteinase K. Os microtubos foram incubados em banho maria a 55°C por aproximadamente 1 hora e posteriormente centrifugados por 3 minutos a 15000 g em temperatura ambiente. O sobrenadante, aproximadamente 220 µL, foi transferido para um novo microtubo estéril com 20 µL de *RNase A* e incubado a temperatura ambiente por 4 minutos. Foi adicionado 200 µL de solução *PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer* e posteriormente 200 µL de etanol absoluto (100%). Essa solução, aproximadamente 640 µL, foi adicionada em uma coluna do kit (*PureLink™ Spin Column*), colocada em um tubo coletor, a qual foi centrifugada por 1 minuto a 10 000 g em temperatura ambiente. Após, descartado o líquido do tubo coletor. A seguir, foram adicionados 500 µL de *Wash Buffer 1* a coluna, o material foi centrifugado a 10 000 g por 1 minuto em temperatura ambiente. Após, descartado o líquido do tubo coletor. Em seguida, foi adicionado 500 µL de *Wash Buffer 2* a coluna, centrifugada a 15 000 g por 3 minutos em temperatura ambiente. O tubo coletor foi descartado e a coluna colocada para secar em estufa a 60°C por 5 minutos. A coluna foi colocada em um novo microtubo estéril e foram adicionados 50 µL de solução *PureLink™ Genomic Elution Buffer*, previamente aquecida a 60°C, a coluna e incubada a temperatura ambiente por 1 minuto. A coluna foi centrifugada por 1 minuto a 15 000 g em temperatura ambiente e posteriormente descartada. O microtubo foi guardado a -20°C.

## ANEXO H - AMPLIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS POR PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

Diferentes tipos de DNAs repetitivos tiveram suas sequências amplificadas por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando como molde o DNA da espécie *Chelonia mydas*. As sequências amplificadas foram utilizadas nos procedimentos de sequenciamento e análise de identidade.

Sequências de DNAr 18S foram amplificadas utilizando-se os *primers* 18S Fw 5'-ccgcttgggtgactcttgat-3' e 18S Rv 5'-ccgaggacctcactaaacca -3' isolados de *Ictalurus punctatus* segundo Gross et al. (2010). Sequências de DNAr 5S foram amplificadas usando o par de *primers* 5S A 5'-tcaaccaaccacaaagacattggcac-3' e 5S B 5'-tagacttctgggtggcceaaggaatca-3' isolados de *Danio rerio* segundo Pendás et al. (1994).

As sequências do DNAr 18S e telomérica utilizadas para obtenção das sondas submetidas a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foram amplificadas, respectivamente, a partir do DNA total de *Prochilodus argenteus* segundo Hatanaka & Galetti Júnior (2004), utilizando os *primers* NS1 5'-gtagcatatgcttgtctc- 3' e NS8 5'-tccgcaggttcacctacgga-3' segundo White et al. (1990), e a partir da sequência telomérica geral para vertebrados (TTAGGG)<sub>n</sub> segundo Ijdo et al. (1991).

## ANEXO I - PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA OBTIDOS POR PCR

A purificação dos fragmentos de DNA de interesse obtidos por PCR foi realizada utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Amersham Biosciences), seguindo as especificações do fabricante. Foram adicionados aproximadamente 100 µL de produto de PCR, 250 µL de *Capture Buffer Type 3* deixando a solução amarela o que indica pH correto. Depois toda a amostra foi transferida para uma coluna dentro de um tubo coletor que foi centrifugada a 16 000 g por 30 segundos e, em seguida, descartado o conteúdo do tubo coletor. Foram adicionados 500 µL de *Wash Buffer Type 1* à coluna, centrifugada novamente a 16 000 g por 30 segundos, descartado o conteúdo do tubo coletor. Por fim, foram adicionados 10 µL de *Elution Buffer Type 6*, previamente aquecido em estufa a 60°C, à coluna que foi deixada em temperatura ambiente por 1 minuto e então centrifugada a 16 000 g por 1 minuto. Esse último passo foi repetido por mais uma vez e então o conteúdo restante no tubo coletor foi armazenado em freezer à -20°C.

## ANEXO J - SEQUENCIAMENTO

Devido a não disponibilidade de equipamento, as sequências nucleotídicas foram realizadas mediante serviço de contratação de terceiros, pessoa jurídica.

O sequenciamento nucleotídico dos fragmentos de DNA foi realizado utilizando o kit *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences®), segundo as instruções do fabricante. As amostras foram preparadas com 30 a 60 ng de produto purificado, 100 pmol de *primer* e água estéril (volume necessário para 6,0 µl de reação final).

## **ANEXO K - ANÁLISE DE IDENTIDADE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS**

Após o sequenciamento os resultados foram processados utilizando-se *software Geneious Pro 4.8.2* para realizar os alinhamentos de sequência. Para identificação de possíveis homologias de genes, as sequências nucleotídicas previamente processadas foram submetidas a buscas *online* utilizando os bancos de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## ANEXO L - MARCAÇÃO DE SONDAS POR PCR

As sondas de DNAr 18S e telomérica foram marcadas por meio do método PCR, utilizando biotin-16- dUTP (Roche®) para o DNAr 18S e digoxigenina-11-dUTP (Roche®) para a telomérica. O PCR marcado com *primers* específicos foi realizado para o DNAr 18S utilizando 20 ng de molde de DNA e sem DNA molde para a telomérica, 1X *Taq Reaction buffer* (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 µM de dATP, dGTP e dCTP, 28 µM de dTTP, 12 µM digoxigenina-11-dUTP, 1 µM de *primers*, 2mM MgCl<sub>2</sub> e 0.05 U/µL de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®).

## **ANEXO M - HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)**

O protocolo geral da FISH sob alta condição de estringência (2,5 ng/ $\mu$ L sonda, 50% formamida, 2 x SSC, 10% sulfato dextrano, 37°C por 16 h) segue o procedimento geral descrito por Pinkel; Straume; Gray (1986). Para a detecção da sonda de DNAr 18S foi utilizada streptavidina (Sigma-Aldrich) e para a telomérica anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (0,2  $\mu$ g/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados no microscópio de epifluorescência Zeiss Axiolab A1 acoplado ao software ZEN.



## ANEXO N - ORGANIZAÇÃO DOS CARIÓTIPOS

Foram analisadas cerca de 30 metáfases para cada metodologia realizada nesse estudo e as melhores estão sendo selecionadas para organização dos cariótipos. Os cromossomos foram divididos em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st), acrocêntricos (a) e microcromossomos (mc), dependendo da sua razão de braços e em ordem decrescente de tamanho segundo Levan; Fredga; Sandberg, 1964. Os cromossomos foram organizados em três grupos, sendo o grupo A os macrocromossomos metacêntricos e submetacêntricos, o grupo B os macrocromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos e o grupo C os microcromossomos segundo Bickham (1975) com modificações.