

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudos Citogenéticos em *Plathemys platycephala* (SCHNEIDER,
1792) da Amazônia Brasileira.

Bolsista: Thiago Wilter Delgado de Souza, FAPEAM

MANAUS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO FINAL

Projeto: PIB-B/0065/2014

Estudos Citogenéticos em *Plathemys platycephala* (SCHNEIDER,
1792) da Amazônia Brasileira

Bolsista: Thiago Wilter Delgado de Souza, FAPEAM

Orientador: Profa. Dra. Maria das Neves Silva Viana

MANAUS

2015

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	4
2. INTRODUÇÃO	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	7
5. CONCLUSÃO.....	10
6. REFERÊNCIAS.....	11
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	13

RESUMO

Das subespécies de *Platemys platycephala* que ocorrem na Região Amazônica, apenas a subespécie *Platemys platycephala platycephala* é conhecida por apresentar mosaicismos diplóide – triplóide, além de possuir determinação cromossômica do sexo, diferentemente do que é comum para maioria dos quelônios. Estudos anteriores mostraram a ocorrência de mosaicos para esta espécie, mas sabe-se pouco a respeito da sua estrutura e constituição cariotípica, sendo necessários mais estudos para uma definição mais confiável e definitiva sobre a espécie, bem como o estabelecimento de relação entre o tempo evolutivo e o elevado número cromossômico. Nós analisamos dois espécimes de *P. platycephala*, e apesar de termos tido problemas em encontrar metáfases devido a falta de um protocolo específico para a família Chelidae, encontramos diferença no número cromossômico para os dois indivíduos estudados, $2n = 93$ e $2n = 72$. Mesmo tendo encontrado número diferente de cromossomos e considerando que os indivíduos são de duas localidades distintas, ainda não temos resultados suficientes para afirmar a ocorrência de poliploidia e o número exato de cromossomos para esta subespécie, assim é necessário dar continuidade ao estudo para chegarmos a uma conclusão.

Palavras-chave: Quelônios, *Platemys platycephala*, poliploidia.

2. INTRODUÇÃO

Os répteis sofreram redução do número de espécies desde a época em que dominavam a terra até os dias atuais. Apesar dos quelônios de água doce da Amazônia serem relativamente de grande utilidade para o homem, existem poucos estudos sobre a sua biologia e poucos são os estudos citogenéticos desenvolvidos para suas espécies. Do ponto de vista da citotaxonomia e citogenética molecular, este é o grupo menos estudado entre os répteis.

Estudos citogenéticos em espécies da ordem Testudines são muito escassos, quando comparado com outros grupos da classe Reptilia (Barros *et al.*, 1976). De acordo com Ezaz *et al.* (2006), não há informação sobre cerca de cariótipos de 150 espécies pertencentes a doze famílias (Cheloniidae, Chelydridae, Emydidae, Kinosternidae, Testudinidae, Trionychidae, Carettochelyidae, Chelidae, Podocnemididae, Pelomedusidae, Dermochelyidae e Dermatemydidae). Atualmente são reconhecidos apenas três grupos cariotípicos definidos para a ordem Testudines: I) cariótipos diplóides com números elevados, $2n = 60$ a 64 cromossomos, com a presença de microcromossomos; II) cariótipo diplóide com números variando de $2n = 50$ a 56 cromossomos com menos microcromossomos do que no primeiro grupo; III) cariótipos com baixos números diplóides, variando de $2n = 26$ a 28 cromossomos, e sem microcromossomos (Ayres *et al.*, 1969; Barros *et al.*, 1976; Touro e Legler, 1980; Bickham *et al.*, 1985). Estudos citogenéticos com espécies do gênero *Podocnemis* revelaram o gênero apresenta número diplóide de $2n = 28$ (Rhodin *et al.*, 1978, Ortiz *et al.*, 2005 Fantin e Monjeló, 2011)

O gênero Sul-Americano *Platemys*, pertencente a família Chelidae, possui apenas uma espécie, *Platemys platycephala* (Schneider 1792), caracterizada pelo pequeno tamanho normalmente com menos de 18 cm de comprimento de carapaça. A espécie apresenta duas subespécies: *Platemys platycephala platycephala* (Schneider 1792) e *Platemys platycephala*

melanonota (Ernst 1984). *Platemys p. melanonota*, uma subespécie de coloração mais escura, é encontrada no Peru e no Equador, enquanto *Platemys p. platycephala* é encontrada nas Guianas, Venezuela, Colômbia, Brasil e Bolívia (Ernst, 1983; 1987; Pritchard e Trebbau 1984). Estudos citogenéticos realizados em *Platemys p. platycephala* revelaram indivíduos diplóides e triplóides (mosaicismo) encontrados em populações naturais desta espécie no Suriname e Guiana Francesa.

A tartaruga, *Platemys platycephala*, é uma de apenas duas espécies conhecidas por apresentar mosaicismo diplóide - triplóides. Segundo Bickham e Hanks (2010), apenas indivíduos diplóides são conhecidos na Bolívia e no Brasil. Enquanto que em *P. platycephala* do Suriname, a frequência de mosaicismo foi estudada em uma grande amostra para explorar mais plenamente a diversidade de níveis de ploidia entre os indivíduos. As análises revelaram uma grande diversidade de condições, incluindo diplóides, mosaicos diplóides - triplóides, triplóides e mosaicos triplóides – tetraplóides. A maior classe de frequência encontrada foi de 100% diplóide, e a segunda maior foi de 100% triplóides. No entanto, os indivíduos mosaicos foram observados a partir de todo o espectro de misturas que variam de quase todos diplóide para quase todos os triplóides e dois indivíduos foram mosaicos triplóides - tetraplóides. Parece provável que os diplóides, triplóides e mosaicos não representam biótipos distintos, mas simplesmente condições diferentes dentro de uma gama de possíveis misturas de ploidia. Como o trabalho realizado no Brasil, analisou apenas dois exemplares e de origens desconhecidas, é necessário um esforço maior para uma caracterização mais confiável e definitiva da espécie e os resultados ainda poderão contribuir para estudos evolutivos e conhecimento da biodiversidade da espécie no Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos dois espécimes jovens de *Platemys platycephala platycephala*, sendo um coletado no estado do Amazonas e o outro no Amapá, ambos do sexo feminino. Os animais não foram sacrificados, e as amostras de sangue foram obtidas através de punção da veia femoral.

O procedimento para obtenção de células metafásicas foi seguindo o protocolo de Moorhead *et al.* (1960) com modificações. O sangue total foi inoculado em meio de cultura para cariótipo RPM a 29°C, sendo agitadas duas vezes por dia para maior proliferação celular. Passadas 95 horas e 15 minutos de incubação foram adicionados 400 µl de colchicina 0,025%, e após 45 minutos as células foram recolhidas para contagem mitótica.

As células foram centrifugadas a 800 RPM por 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante e o pellet ressuspenso em solução hipotônica pré-aquecida a 37°C de KCl 0,075M. As células voltaram a ser incubadas a 29°C por mais 50 minutos. Após o tratamento com solução hipotônica, cinco gotas de fixador Carnoy (metanol: ácido acético, 3:1) foram adicionadas para interromper a ação do KCl, e a preparação foi centrifugada a 800 RPM por 10 minutos. Novamente, após o descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspenso em 8 mL de Carnoy (metanol: ácido acético, 3:1) e centrifugado a 800 RPM por 10 minutos, esse procedimento é repetido mais duas vezes. Decorridos os três processos de fixação e descarte do sobrenadante, adicionou-se aproximadamente 1,5 mL de fixador à solução, a qual foi transferida para um tubo eppendorf e homogeneizada.

A solução foi gotejada a uma altura de aproximadamente 1,80 cm, sobre regiões distintas de lâminas limpas e úmidas, colocadas sobre um suporte em banho-maria a 50°C. Depois de secas em temperatura ambiente, foram coradas com Giemsa (diluído a 5% em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8), por 10 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas, secas ao ar e analisadas em microscópio óptico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não obtivemos muito sucesso nas análises realizadas com o sangue dos dois *Plathemys platycephala platycephala* pois o número e a qualidade de metáfases obtidas não foram suficientes para inferir o número exato de cromossomos. De um total de 47 metáfases obtidas, foi possível realizar com precisão a contagem cromossômica de apenas duas, uma metáfase para cada indivíduo estudado. Esse número de células é muito pequeno para se inferir

qualquer conclusão a respeito do cariótipo de indivíduos e por isso os estudos devem continuar para que possamos chegar a qualquer conclusão.

O cariótipo desta espécie foi descrito primeiramente por Barros *et al.* (1976), apresentando um conjunto inteiramente acrocêntrico, com $2n = 64$. Estudos posteriores feitos por Bull e Legler (1980) e Bickham *et al.* (1985) apresentaram $2n = 96$ com presença de microcromossomos e de acordo com a organização cariotípica os autores presumiram que esta espécie é triplóide.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram dois números cariotípicos diferentes para os indivíduos, 01 e 02, com $2n = 93$ e $2n = 72$, respectivamente, com cromossomos acrocêntricos e muitos microcromossomos (Fig. 01). Apesar dos números cromossômicos serem diferentes dos obtidos em estudos anteriores, a estrutura cariotípica do indivíduo 01 sugere que ele provavelmente seja um triplóide (Fig. 01a), no entanto, os resultados obtidos neste trabalho não são suficientes para nos permitir afirmar que este seja exatamente o número de cromossomos para a espécie na região do Amazonas. Seriam necessárias pelo menos 30 células metafásicas de boa qualidade para confirmar este resultado. Para afirmar com precisão a poliploidia encontrada nossos estudos irão continuar apesar do projeto (PIBIC) ter sido encerrado.

Para o indivíduo 02, proveniente do Amapá, o número de cromossomos encontrados foi 72, com arranjo cariotípico $2n = 72$ (Fig. 01b), sendo que o par número 36 apresentou características que podem classifica-lo como cromossomos sexuais.

As espécies do gênero *Podocnemis* são caracterizados por baixos números diplóides ($2n = 26$ e 28) e a ausência de microcromossomos e cromossomos sexuais, enquanto que para *Platemys platycephala*, Touro e Legler (1980) e Bickham *et al.* (1985) encontraram $2n = 96$ e a presença de microcromossomos.

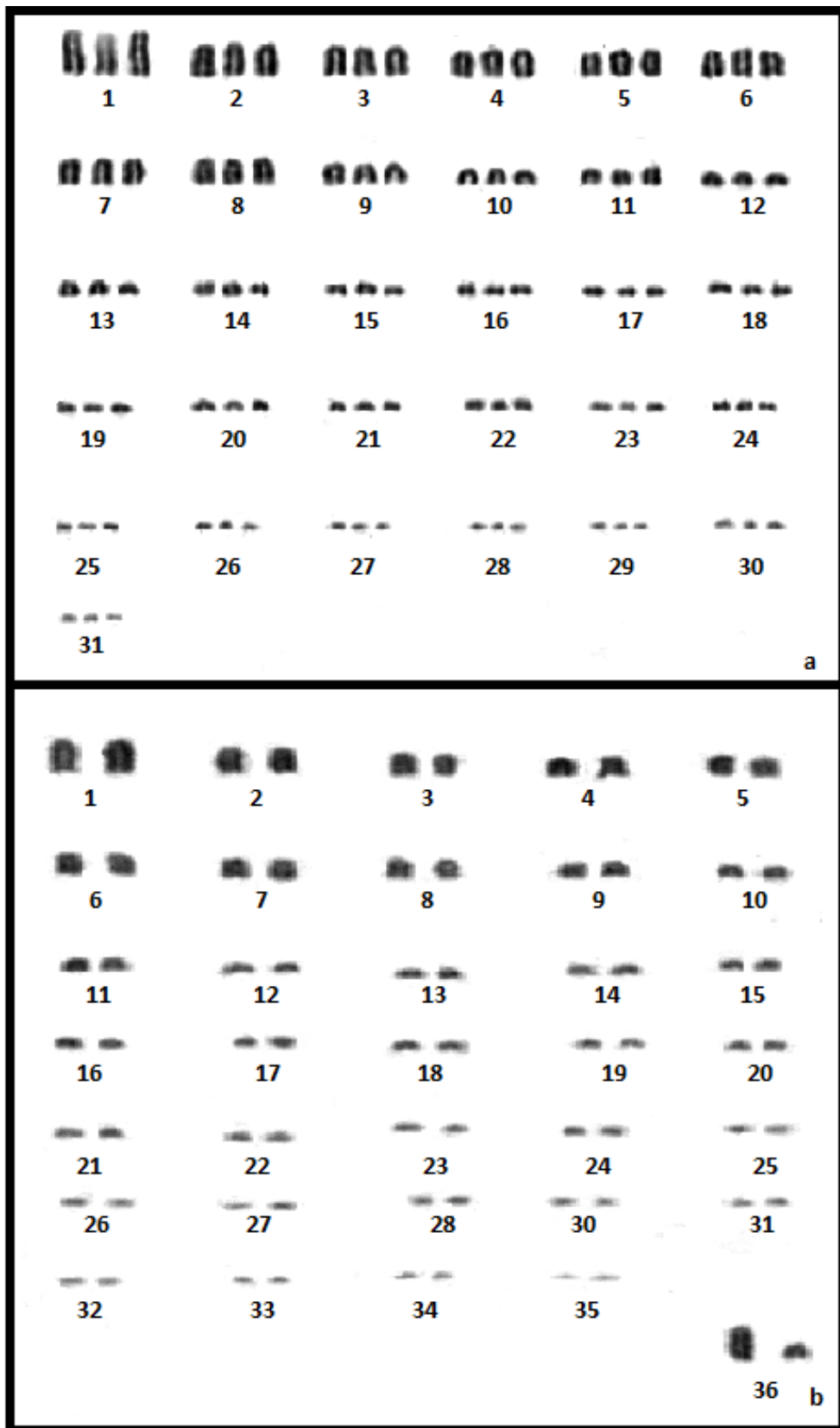


Fig. 01. Cariótipo dos dois espécimes de *Platemys platycephala platycephala*. a) Indivíduo 01, $3n = 93$; b) Indivíduo 02 com $2n = 72$, os cromossomos do par 36 deste indivíduo podem ser os cromossomos sexuais.

O cariótipo de *Plathemys platycephala platycephala* é enigmático, pois ainda não está bem descrito e existe contradição entre os autores a respeito do número e organização dos cromossomos. Mas, de acordo com Fantin e Monjeló (2011), o elevado número cromossômico encontrado nesta espécie sugere que *Plathemys* é um gênero mais basal quando comparado com *Podocnemis*, onde o número de cromossomos é $2n = 28$. Isto pode indicar que múltiplos rearranjos cromossômicos podem ter sido responsáveis pela redução do número de cromossomos na ordem Testudines. O tipo de rearranjos cromossômicos que poderiam levar a essa redução no número de cromossomos encontrados para os Podocnemidideos pode ser explicado pela morfologia dos cromossomos deste gênero, os quais são metacêntricos e submetacêntricos e não possuem microcromossomos. Estes arranjos sugerem que ocorreram fusões entre cromossomos acrocêntricos reduzindo o número pela e aumentando o tamanho dos cromossomos, uma vez que não são observados microcromossomos. Assim, vários rearranjos dos cromossomos podem ser responsável pela redução do número diplóide neste gênero, tal como sugerido por Fantin e Monjeló (2011).

5. CONCLUSÃO

A poliploidia é uma condição existente para a espécie *Plathemys platycephala platycephala* e o sexo nestes indivíduos pode ser determinado por cromossomos sexuais diferentemente de grande parte dos quelônios estudados, mas uma análise mais aprofundada, com uma amostra maior é necessário para confirmar isso.

A dificuldade em encontrar metáfases continua sendo um problema, pois as técnicas utilizadas continuam sendo adaptadas a partir de protocolos desenvolvidos para outros grupos de animais, e o nível de contaminação dos meios de cultura ainda são considerados elevados. Apesar destas dificuldades que prevaleceram durante todo este estudo, obtivemos sucesso com as últimas adaptações e testes realizados e estamos otimistas que teremos resultados melhores com a aplicação deste novo protocolo. Por isso, apesar do prazo do

projeto ter terminado, os estudos irão continuar e apresentaremos novos resultados no Congresso de Iniciação Científica.

6. REFERÊNCIAS

AYRES, M. SAMPAIO M. M, BARROS R. M. S, DIAS, L.B AND CUNHA O. R. (1969) A karyological study of turtles from the Brazilian Amazon region. *Cytogenetics* 8:401-409.

BARROS, R. M, SAMPAIO, M. M, ASSIS M F AND AYRES, M (1976) General considerations on the karyotypic evolution of *Chelonia* from the Amazon region of Brazil. *Cytologia* 41:559-565.

- BICKHAM J.W, TUCKER P.K AND LEGLER J.M (1985) Diploid-triploid mosaicism: An unusual phenomenon in side-necked turtles (*Platemys platycephala*). *Science* 227:1591-1593.
- BULL, J.J AND LEGLER J. M (1980) Karyotypes of sidenecked turtles (Testudines, Pleurodira). *Can J Zool* 58:828-841.
- EZAZ, T. VALENZUELA N, GRÜTZNER F, MIURA I, GEORGES A, BURKE RL AND GRAVES JAM (2006) An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines, Chelidae) with genetic sex determination. *Chromosome Res* 14:139-150.
- ERNST, C. H. 1983. Geographic variation in the Neotropical turtle, *Platemys platycephala*. *Journal of Herpetology*, v. 17, n. 4, p. 345-355.
- ERNST, C. H. 1987. *Platemys, Platemys platycephala*. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles*, v. 405, p. 1-4.
- FANTIN, C.; MONGELÓ, L. A. D. S. 2011. Cytogenetic studies in *Podocnemis expansa* and *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemididae), turtles of the Brazilian Amazon, v. 64, 2: 154-157.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. 1980. Controlled silver-staining of Nucleolar Organizer Regions with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P. C.; MELLMAM, W. J.; BATTIPS, D. M. AND HUNGERFORD, D. A. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res* 20:613-616.
- PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. 1984. The turtles of Venezuela. *SSAR Contributions to Herpetology*, v. 2, p. 1-403.
- SCHNEIDER, J. G. 1972. Beschreibung und Abbildung einer neun Art von Wasserschildkrot. *Schriften der Gesellschaft Naturforschender Freund zu Berlin* 10: 283
- SEABRIGHT, M (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-972.
- SUMNER, A. T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304-306.

7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	2014					2015						
		Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Treinamento do bolsista	R	R	R	R	R	P	P	P				
2	Revisão de literatura	R	R	R	R	R	P	P	P	P	P	P	
3	Coleta do experimento	R	R	R	R	R	P	P	P	P			
4	Análise do experimento	R	R	R	R	R	P	P	P	P	P		
5	Elaboração do Resumo e do Relatório Final											P	P
6	Relatório da Apresentação final para o Congresso												P

R: Atividades Realizadas

P: Atividades Previstas