

CITOGENÉTICA DE MICROHYLIDAE (ANURA) DA FAUNA BRASILEIRA.

Thiago Gazoni, Sanae Kasahara, João Reinaldo da Cruz de Campos. – Genética – Ciências Biológicas – Departamento de Biologia – Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista – Campus de Rio Claro.

Os anuros da família Microhylidae, com diversos representantes no Brasil, apresentam uma grande diversidade principalmente quanto à morfologia externa, ocorrem nas regiões tropicais e em algumas localidades das regiões temperadas (Duellman e Trueb, 1994). Possuem como características marcantes corpo e membros relativamente pequenos e nas formas cavadoras uma cabeça pontiaguda e dedos delgados.

De acordo com Frost (2004), os 69 gêneros de Microhylidae estavam distribuídos em nove subfamílias, isto é, Asterophryinae, Brevicipitinae, Cophylinae, Dyscophinae, Genyophryinae, Melanobatrachinae, Microhyalinae, Phrynomerinae e Scaphiophryinae. Mais recentemente, Frost et al. (2006) realizaram uma extensa revisão em toda a classe Amphibia, com o uso principalmente de dados de sequenciamento de genes nucleares e mitocondriais, e, dentre as diversas alterações propostas, algumas se referem a Microhylidae, a qual passou a contar com sete subfamílias. Houve a remoção das espécies de Genyophryinae para Asterophryinae, enquanto as da subfamília Brevicipitinae passaram à categoria de família denominada Brevicipitidae. Microhyalinae foi a que sofreu as maiores mudanças, já que parte de suas espécies foi transferida para uma nova subfamília, a Gastrophryinae, e, além disso, alguns microhylíneos, assim como os representantes de Phrynomerinae, não foram alocados em nenhuma subfamília, por não terem sido analisados ou porque os dados eram insuficientes para se chegar a uma conclusão segura.

Particularmente, o gênero *Elachistocleis*, que era da subfamília Microhyalinae e passou a ser Gastrophryinae, tem sido alvo de diversos questionamentos quanto à nomenclatura atribuída às suas seis espécies. Três importantes fatores podem ter contribuído para essa situação, como a nomenclatura incerta, a distribuição de formas mais complexas em todo o continente e a ausência de análises estatísticas da variação entre as formas propostas (Frost, 2004). Na espécie *E. ovalis*, é notável a ocorrência de polimorfismo morfológico, o que indica que pode haver mais de uma entidade específica sob a mesma denominação. Tal fato tem levado à suposição da ocorrência de um complexo de espécies, de modo que os animais do sudeste brasileiro devem ser referidos como *Elachistocleis* aff *ovalis* (C.F.B. Haddad, comunicação pessoal). Quanto ao gênero *Arcovomer*, até o presente é considerado monotípico com uma única espécie conhecida, *A. passarelli*.

A única informação citogenética até o momento em *E. ovalis* é a de Bogart e Nelson (1976) que descreveram $2n=22$, em um exemplar coletado no estado de São Paulo. Os cromossomos desse animal, assim como da grande maioria dos microhilídeos já cariotipados, foram analisados somente com coloração convencional. Ainda em Bogart e Nelson (1976), é apresentado o cariótipo de *Arcovomer passarelli* cujo padrão é muito semelhante ao de *E. aff ovalis*.

Elachistocleis ovalis e *A. passarelli* estavam incluídas na subfamília Microhyalinae e, após a reestruturação feita por Frost et al. (2006), *E. ovalis* passou a ser considerada da subfamília Gastrophryinae, enquanto que *A. passarelli* não foi alocada em nenhuma das subfamílias propostas. Considerando que a citogenética é uma importante ferramenta que pode auxiliar na resolução de questões, como as de taxonomia e sistemática, apresentamos resultados de estudos cromossômicos em *E. aff ovalis* e *A. passarelli*.

Foram realizadas análises citogenéticas de dois machos e duas fêmeas de *E. aff ovalis*, procedentes de Rio Claro, SP, e de quatro exemplares de *A. passarelli*, 3 machos de Aracruz, ES, e 1 fêmea de Ubatuba, SP. Os exemplares foram identificados pelo Dr. Célio F. B. Haddad, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, e depositados na coleção CFBH do referido Departamento.

As preparações foram obtidas a partir de medula óssea, fígado, baço e testículos, e submetidas às técnicas usuais de diferenciação cromossômica, de acordo com os protocolos do Laboratório de Citogenética de Vertebrados, como descritos a seguir.

Obtenção das preparações cromossômicas, segundo Baldissera Jr et al. (1993) - Os animais serão submetidos à injeção intraperitoneal de solução de colchicina a 0,01% na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso, cerca de 12 horas antes do sacrifício. Para aumentar o índice mitótico, será

injetada previamente solução de fitohemaglutinina, na mesma proporção da colchicina, cujo tratamento terá duração entre 24 a 48 horas. No caso de tratamento *in vivo* pelo BrdU, a solução desse análogo de base juntamente com FudR é injetada no animal e o tratamento terá duração aproximada de 20 horas (Silva et al., 2000a).

Após o sacrifício, os fêmures e as tíbias serão dissecados e o canal ósseo lavado com solução de cloreto de potássio 0,075M. As células do fígado e do baço serão liberadas com injeções seguidas da solução hipotônica, enquanto os túbulos seminíferos pipetados repetidas vezes até a liberação das células em solução. As suspensões obtidas serão incubadas a 37°C e, após 45 minutos, será feita pré-fixação em duas etapas de cinco minutos cada, com adição de cerca de seis gotas de fixador Carnoy (3 metanol:1 ácido acético) recém-preparado e gelado. A suspensão será centrifugada e, após o descarte do sobrenadante, serão realizados dois banhos com fixador. Após a última centrifugação, as suspensões serão mantidas na geladeira por 24 horas antes da confecção das lâminas ou armazenadas no *freezer* a -20°C.

Preparação de lâminas - Antes da preparação das lâminas, será feita pelo menos uma troca de fixador. Sobre uma lâmina limpa e seca, mantida horizontalmente sobre um suporte em banho-maria a 60°C, uma ou duas gotas da suspensão serão gotejadas e, em seguida, o mesmo número de gotas de ácido acético glacial, com a finalidade de melhorar o espalhamento dos cromossomos (Henegariu et al., 2001). As lâminas serão secas ao ar e envelhecidas por pelo menos 24 horas, antes da aplicação das técnicas de coloração, ou armazenadas no *freezer*, se necessário guardá-las por um período longo.

Coloração convencional com Giemsa - A lâmina será hidrolisada por cinco minutos em solução de ácido clorídrico 1N a 60°C e, após a lavagem, corada por sete minutos com Giemsa preparado com 1mL da solução comercial diluído em 14mL de solução tampão de fosfato de sódio, pH6,8.

Marcação de Ag-RONs, segundo Howell e Black (1980), com modificações - A lâmina será hidrolisada por três minutos em ácido clorídrico 1N a 60°C. Após a secagem, serão gotejadas em cada lâmina uma gota de solução coloidal reveladora preparada com 1g de gelatina dissolvida em 50mL de água destilada e 0,25mL de ácido fórmico, e duas gotas de solução de nitrato de prata a 50%. A lâmina será coberta com lamínula e incubada em câmara úmida a 60°C, durante dois a três minutos. Em seguida, será lavada e corada por 30 segundos com solução de Giemsa.

Marcação de banda C, segundo Sumner (1972), com modificações - A lâmina será hidrolisada por 45 minutos em ácido clorídrico 0,2N à temperatura ambiente. Em seguida, lavada e incubada em solução de hidróxido de bário octahidratado a 5%, aquecida a 60°C, durante 20 a 40 segundos. Será passada rapidamente em solução de ácido clorídrico 1N a 60°C e incubada em 2xSSC a 60°C, durante 45 minutos. Decorrido esse tempo, a lâmina será corada com solução de Giemsa durante 15 a 20 minutos.

As preparações cromossômicas submetidas às diferentes técnicas serão analisadas ao microscópio de luz e as melhores metáfases, assim como as fases meióticas, fotografadas com filme Copex HDP 13 da Agfa, revelado com Dektol 1:4 a 25°C, por seis minutos e fixado com Fixador Endurecedor 1:1 por 15 minutos. Quando coradas com fluorocromos, a análise das lâminas e a fotografia das metáfases serão feitas sob luz ultravioleta, com filtros adequados. Será utilizado, nesse caso, filme preto-e-branco T-Max da Kodak, cuja revelação é feita com D76 ou Microdol puro, a 20°C, por nove minutos, sob agitação constante, e fixado com Fixador Endurecedor a 20°C, por 15 minutos. As ampliações do material fotografado serão feitas em papel Kodabrome II, RC, F-3, da Kodak, ou impresso em papel comum quando os negativos forem digitalizados para o computador.

Para a montagem dos cariogramas, os cromossomos serão emparelhados de acordo com a morfologia e em ordem decrescente de tamanho, com base em inspeção visual. Para a classificação morfológica e o estabelecimento do número fundamental de braços cromossômicos (NF), será adotada a nomenclatura de Green e Sessions (1991).

Elachistocleis aff *ovalis* e *A. passarelli* possuem cariótipos com 2n=22, praticamente indistinguíveis quando os cromossomos são corados apenas pelo Giemsa. Conforme já descrito na literatura para exemplares das duas espécies (Bogart e Nelson, 1976), os pares 1, 2 e 6 são metacêntricos, os pares 3, 4 e 5, submetacêntricos, e os pares 7, 8, 10 e 11 do tipo metacêntrico/submetacêntrico; com relação ao par 9, parece haver uma ligeira discrepância nos cariótipos, pois é do tipo metacêntrico/submetacêntrico em *E. aff ovalis* e subtelocêntrico em *A.*

passarelli. Não há evidência de cromossomos sexuais diferenciados citologicamente no cariótipo das fêmeas e tampouco no dos machos de ambas as espécies, o que foi confirmado também pela análise de suas preparações meióticas. As células em diplóteno/metáfase I mostraram 11 bivalentes e as em metáfase II, 11 cromossomos. As marcações de Ag-RONs, obtidas pela primeira vez, ocorrem nas duas espécies na região proximal dos braços longos dos cromossomos 8. Já a técnica de bandamento C mostrou uma grande diferença entre os dois cariótipos, pois em *E. aff ovalis* apenas a heterocromatina adjacente à RON foi evidenciada, enquanto que em *A. passarelli* as regiões centroméricas de todos os cromossomos foram marcadas, além de existir uma leve banda intersticial nos braços curtos dos cromossomos 11. Para melhor compreensão dos mecanismos evolutivos que promoveram a diferenciação dos cariótipos das duas espécies, as quais pertenciam anteriormente à mesma subfamília, é relevante a aplicação de técnicas mais resolutivas como, por exemplo, de coloração por fluorocromos base-específicos, que indicam a natureza molecular das regiões repetitivas existentes nos genomas de ambas as espécies, e a de obtenção de bandas de replicação com o uso de BrdU.

Referências Bibliográficas

- BALDISSERA Jr, F.A., OLIVEIRA, P.S.L., KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Rev. Brasil. Genet.**, 16:335-345, 1993.
- BOGART, J.P., NELSON, C.E. Evolutionary implications from karyotypic analysis of frogs of the families Microhylidae and Rhinophrynidae. **Herpetologica**, 32:199-208, 1976.
- DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. New York: McGraw-Hill, 670p, 1994.
- FROST, D.R. Amphibians Species of the World: an on Line Reference. **V3.0 Eletronic database available at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>**. 2004, Acesso em julho de 2006.
- FROST, D.R., GRANT, T., FAIVOVICH, J., BAIN, R.H., HAAS, A., HADDAD, C.F.B., De SÁ, R.O., CHANNING, A., WILKINSON, M., DONNELLAN, S.C., RAXWORTHY, C.J., CAMPBELL, J.A., BLOTTO, B.L., MOLER, P., DREWES, R.C., NUSSBAUM, R.A., LYNCH, J.D., GREEN, D.M., WHEELER, W.C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 297:1-370, 2006.
- GREEN, D.M., SESSIONS, S.K. Nomenclature for chromosomes. In: GREEN, D.M., SESSIONS, S.K. (Eds.) **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. San Diego: Academic Press, p.431-432, 1991.
- HENEGARIU, O., HEEREMA, N.A., WRIGHT, L.L., BRAY-WARD, P., WARD, D.C., VANCE, G.H. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. **Cytometry**, 43:101-109, 2001.
- HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. **Experientia**, 36:1014-1015, 1980.
- SILVA, A.P.Z., HADDAD, C.F.B., KASAHARA, S. Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining. **Cytobios**, 103:25-38, 2000a.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exptl. Cell Res.**, 75:304-306, 1972.

Apoio financeiro: FAPESP, CNPq