Rodrigo Marques Lima dos Santos

**ESTUDOS EVOLUTIVOS EM ESPÉCIES DE LAGARTOS DA
FAMÍLIA TEIIDAE (SQUAMATA), COM BASE EM DADOS
CITOGENÉTICOS E MOLECULARES**

São Paulo

2007

Rodrigo Marques Lima dos Santos

**ESTUDOS EVOLUTIVOS EM ESPÉCIES DE LACERTÍLIOS
BRASILEIROS DA FAMÍLIA TEIIDAE (SQUAMATA), COM BASE EM
DADOS CITOGENÉTICOS E MOLECULARES**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Yatiyo
Yonenaga – Yassuda

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia C. M.
Pellegrino

São Paulo

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Rodrigo Marques Lima dos

“Estudos evolutivos em espécies de lacertílios brasileiros da família Teiidae (Squamata), com base em dados citogenéticos e moleculares”.

183 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia e Genética Evolutiva.

1. Citogenética 2. Genética molecular 3. Teiidae
4. Filogenia

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Biologia/Genética.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof^a. Dr^a. Yatiyo Yassuda
Orientadora

DEDICATÓRIA

A Fabiana Casarin e Eni Marques, com amor.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Yatiyo Yonenaga Yassuda pela orientação, incentivo, disponibilidade e amizade durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Dra. Kátia Cristina Machado Pellegrino, pela coorientação, incentivo, amizade e apoio dado ao trabalho.

Ao. Dr. Miguel Trefaut Rodrigues por todo incentivo e valor dado ao meu trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP – Proc.03/00404-2), pelo auxílio financeiro.

Aos meus queridos amigos do laboratório Carolina Elena Bertolotto, Maria José de J. Silva, Renata C. Amaro, Marcia Laguna, Karen Ventura, Glaciene Thomás, Silvia Geurgas, J. Cassimiro Silva e Roberto Vilela. Por todos os momentos, amizade e colaboração, que sem dúvida permitiram o prazeroso desenvolvimento desse trabalho.

Aos coletores: Alexandre U. Christoff, Alexandre Percequillo, Ana Paula Carmingnotto, Cláudia R. Silva, Dante Pavan, Diego Q. Morato, Flávio Rodrigues, Gabriel Skuk, e Vinícios Xavier da Silva pela valiosa colaboração.

Aos funcionários do Instituto de Biociências, especialmente Cícero, Deise, Francisco, Genoveva, Helder, Helenice, Márcia e Regiane.

Ao Departamento de Biologia e ao Instituto de Biociências, pelas condições para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha querida família: que esteve presente em todos os momentos, me incentivando por toda esta jornada científica. Agradeço por todo carinho e paciência.

E a todos que colaboraram de alguma forma para a realização desse trabalho, meu muito obrigado!

ÍNDICE

	Página
<i>Resumo</i>	01
<i>Abstract</i>	03
<i>Capítulo I – Introdução</i>	05
I. INTRODUÇÃO.....	06
I.1. Sistemática dos Squamata.....	08
I.2. Sistemática e evolução dos teídeos.....	10
I.3. Citogenética de lacertílios.....	16
I.3.1. Bandamento C	20
I.3.2. Regiões organizadoras de nucléolo (RONs)	23
I.3.3. Padrões longitudinais de bandamento	25
I.3.4. Determinação do sexo e cromossomos sexuais em lagartos	27
I.3.5. Partenogênese e poliploidia	30
I.4. Citogenética de teídeos.....	34
I.5. Estudos moleculares em lacertílios.....	42
I.5.1. Seqüenciamento de genes nucleares em lacertílios	44
I.5.2. Seqüenciamento de genes nucleares em lacertílios	47
I.5.3. Múltiplos conjuntos de dados em análises combinadas	47
I.6. Estudos moleculares em teídeos.....	48
II. OBJETIVOS.....	51
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
<i>Capítulo II – Materiais e métodos</i>	63
I. MATERIAL.....	64
II. MÉTODOS.....	65

II.1. Estudos citogenéticos.....	65
II.1.1. Preparações cromossômicas.....	65
II.1.1.1. Preparação direta de baço, fígado e medula óssea, segundo YONENAGA-YASSUDA (1972), com modificações.....	65
II.1.1.2. Suspensão de testículos, segundo SCHMID (1978), com modificações.....	66
II.1.1.3. Esmagamento de intestino e testículos, segundo BOGART (1973), com modificações.....	67
II.1.1.4. Cultura de fibroblastos, segundo YONENAGA-YASSUDA <i>et al.</i> (1988), com modificações.....	68
II.1.1.4.1. Obtenção das biópsias.....	68
II.1.1.4.2. Implante da cultura.....	68
II.1.1.4.3. Tripsinização.....	69
II.1.1.4.4. Colheita do material para preparação cromossômica.....	70
II.1.2. Coloração e bandamento cromossômico.....	71
II.1.2.1. Coloração convencional.....	71
II.1.2.2. Bandamento C (CBG), modificada a partir de SUMNER (1972).....	71
II.1.2.3. Coloração das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), segundo HOWELL & BLACK (1980).....	72
II.1.2.4. Bandamento R (RBG) por incorporação de 5-BrdU, modificada a partir de DUTRILLAUX & COUTURIER (1981).....	72
II.1.3. Análise dos resultados.....	72
II.2. Estudos Moleculares.....	74
II.2.1. Extração do DNA.....	74

II.2.1.1. Lise celular.....	74
II.2.1.2. Tratamento com RNase.....	75
II.2.1.3. Precipitação das proteínas.....	75
II.2.1.4. Precipitação do DNA.....	75
II.2.1.5. Hidratação do DNA.....	76
II.2.1.6. Verificação da extração em gel de agarose.....	76
II.2.1.7. Quantificação do DNA.....	76
II.2.2. Amplificação das seqüências gênicas de interesse.....	77
II.2.3. Reação de seqüenciamento.....	78
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
<i>Capítulo III – Resultados .....</i>	82
I. Padrões de bandamento e evolução cromossômica em cinco espécies de lagartos neotropicas da subfamília Teiinae (Squamata: Teiidae).....	83
II. Variações no padrão de bandas C e no número de microcromossomos em lagartos da subfamília Tupinambinae (Squamata: Teiidae).....	106
III. Filogenia molecular de lagartos da família Teiidae, com ênfase na tribo cnemidophorini (Squamata).....	123
IV. Deleções parciais no proto-oncogene <i>c-mos</i> podem favorecer a reprodução partenogenética nos Squamata?.....	154
<i>Capítulo IV – Considerações finais.....</i>	180

Resumo

A família Teiidae é restrita à região neotropical e possui cerca de 110 espécies distribuídas em dez gêneros. Estudos moleculares, juntamente com citogenéticos e morfológicos e as recentes descrições de novas espécies, apontam para uma necessidade urgente de estudos multidisciplinares mais amplos que caracterizem melhor a grande diversidade nos Teiidae, especialmente quanto a espécies brasileiras, de modo a fornecer importantes contribuições à sistemática, evolução cromossômica, possibilitando a formulação de hipóteses filogenéticas mais robustas. Assim, esse trabalho tem por objetivos dar continuidade aos estudos evolutivos em Teiidae, tanto citogeneticamente, quanto molecularmente e discutir, se possível, sobre a reprodução partenogenética encontrada em muitas espécies deste grupo de lagartos. A ampla amostragem geográfica disponível para os estudos, associada ao estudo de um grupo reconhecidamente variável citogeneticamente e taxonomicamente complexo, contribui para orientar revisões futuras e também para uma avaliação da diversidade entre as populações estudadas. Do ponto de vista interpretativo, os dados obtidos também fornecem importantes contribuições à sistemática, biogeografia e programas de conservação desse grupo de lagartos neotropicais.

Cariótipos de cinco espécies de lagartos teídeos sulamericanos da subfamília Teiinae (*Ameiva ameiva*, *Cnemidophorus ocellifer*, *Kentropyx calcarata*, *K. paulensis* e *K. vanzoi*) são descritos e comparados em coloração convencional e diferencial. Dados meióticos também estão incluídos. Cariótipos de *K. paulensis*, *K. vanzoi* e *C. ocellifer* são apresentados aqui pela primeira vez. As técnicas de coloração diferencial aqui apresentadas fornecem importantes informações sobre a diversidade cariotípica da subfamília Teiinae e possibilitou a comparação entre as espécies, contribuindo tanto para a melhor compreensão da evolução cromossômica e da sistemática do grupo. Para a subfamília Tupinambinae, foram descritos cariótipos para *Crocodilurus amazonicus*, *Tupinambis merianae*, *T.*

quadrilineatus e *T. teguixim*, após coloração convencional e diferencial. O artigo contribui para o esclarecimento de alguns cariótipos conflitantes de Tupinambinae presentes na literatura e descreve padrões espécie-específico de bandas C para *T. quadrilineatus*.

Foi proposta uma filogenia molecular para 17 espécies de lagartos pertencentes à família Teiidae usando 1415 pb de seqüências do DNA mitocondrial (cit B e ND4) e nuclear (*c-mos*), com o uso de análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e inferência bayesiana (MB). A árvore proposta recuperou o monofiletismo da família Teiidae, assim como para as subfamílias Tupinambinae e Teiinae e a tribo Cnemidophorini. Na tribo Cnemidophorini, o gênero *Ameiva* foi identificado como monofilético e basal. *Cnemidophorus* se mostrou parafilético, com a espécie *C. lemniscatus* mais relacionada ao gênero *Kentropyx*, identificado por sua vez como monofilético e com a espécie *K. calcarata* basal e *K. paulensis* grupo irmão de *K. vanzoi*. As demais espécies que compõem o gênero *Cnemidophorus* formam grupo monofilético que corresponde ao grupo ocellifer, irmão do clado *Kentropyx* + *C. lemniscatus*. Conseqüências da filogenia obtida sobre a evolução cromossômica do grupo, são também apresentadas.

A partenogênese (reprodução virginal) é um mecanismo reprodutivo, pelo qual um óvulo se desenvolve sem fertilização. Assim, para uma espécie sexuada se reproduzir por partenogênese, o maior problema é evitar a redução do número de cromossomos durante a meiose, uma vez que óvulos haplóides são inviáveis em vertebrados. Diversos estudos citológicos tentaram descrever os eventos meióticos responsáveis por esse modo reprodutivo, não encontrando resultados precisos. Esse trabalho descreve em detalhes uma hipótese sobre como deleções no proto-oncogene *c-mos* podem favorecer a reprodução partenogenética, na forma da partenogênese automítica facultativa (PAF), nos lacertiformes e nos Squamata.

Abstract

The Teiidae family is restrict to neotropical region and comprises around 110 species distributed in ten genera. Molecular studies, besides cytogenetical and morphological data and the new species recently described, reinforces the need of multidisciplinary studies that better comprises the huge diversity found within Teiidae, specially related to Brazilian species, giving lights on the systematics, chromosomal evolution and robust phylogenetic hypotheses. The aim of this work is study cytogenetically and molecularly lizards form Teiidae family and discuss, if possible, about the parthenogenetical reproduction found in many species from this group of lizards.

Karyotypes of five south American species of teiid lizards (*Ameiva ameiva*, *Cnemidophorus ocellifer*, *Kentropyx calcarata*, *K. paulensis* and *K. vanzoi*) are herein described and compared. Meiotic data are also included. Chromosomal data for *K. paulensis*, *K. vanzoi* and *C. ocellifer* are presented for the first time. Differential staining techniques presented revealed many pieces of information about the karyotypic diversity within Teiinae and made possible the comparison between al the species sampled, giving lights on chromosomal evolution and systematics. Karyotypes of Tupinambinae subfamily were described for *Crocodylurus amazonicus*, *Tupinambis merianae*, *T. quadrilineatus* and *T. teguixim*. The article presented contributes for make clear some cytogenetical incongruences found in literature and describes a specie-specific C-banding pattern for *T. quadrilineatus*.

A molecular phylogenetical propose was obtained for 17 species of teiid lizards, from 1415 bp of mitochondrial (cit B e ND4) and nuclear (*c-mos*) DNA, using maximum parcimony (MP), maximum likelihood (MV) and bayesian inference (MB) analyses. The consensus tree reconstructed revealed the monofiletism of Teiidae family, as well as for Tupinambinae and Teiinae subfamily plus Cnemidophorini tribe. Whithin Cnemidophorini,

the genus *Ameiva* was monophyletic and basal. *Cnemidophorus* was paraphyletic, with *C. lemniscatus* closely related to *Kentropyx*, identified in your turn as monophyletic with *K. calcarata* basal and *K. paulensis* sister group of *K. vanzoi*. The remaining *Cnemidophorus* species sampled corresponds to the monophyletic group ocellifer, sister group of *Kentropyx* + *C. lemniscatus*. Chromosomal evolution of the family was also discussed in face of the molecular phylogenetic hypothesis proposed.

Parthenogenesis (virgin birth) is a reproductive mechanism in which an egg develops without fertilization. In this view, for a bisexual species reproduces in that form, the main obstacle is to avoid the reduction of diploid number during meiosis, once that haploid oocytes are unlikely to occur in vertebrates. Many cytological studies had attempted to clarify the meiotic events that make possible this reproductive mechanism, without any precise results. This article describes in detail a hypothesis about how deletions found in *c-mos* sequence may favour the parthenogenetical reproduction, in the form of facultative automictic parthenogenesis (PAF), in Lacertiformes and Squamata.

Capítulo I - Introdução

I. INTRODUÇÃO

O crescente interesse na biodiversidade e conservação motiva estudos multidisciplinares que busquem uma caracterização mais detalhada da fauna, especialmente em regiões de intenso endemismo e diversidade como o Brasil. Segundo FUNK *et al.* (2002) uma melhor compreensão da sistemática, assim como dos mecanismos históricos atuantes na diferenciação dos grupos, pode fornecer informações críticas muito importantes para a conservação e manejo da biodiversidade e representam amostras do sinergismo possível a partir de diferentes abordagens combinadas (como citogenética, morfológica, molecular, ecológica).

O objetivo principal da biologia da conservação, segundo FRANK (1974), é o de manter os processos evolutivos e a viabilidade das espécies assim como prover o território necessário para garanti-los. Assim, é essencial uma compreensão da diversidade genética das espécies envolvidas, que pode ser medida por estudos filogenéticos (MORITZ, 2002), especialmente com o seqüenciamento de regiões do DNA mitocondrial (AVISE, 1989).

Considerando que o Brasil é apontado como um “ponto quente” em diversidade (“hotspot”, REID, 1998), um esforço maior, buscando uma caracterização mais precisa de nossa fauna, tanto sistematicamente (utilizando dados morfológicos, citogenéticos e moleculares) quanto em relação à sua diversidade genética (com estudos moleculares e de genética de populações), é imprescindível para um programa de conservação eficientes.

Com relação a herpetofauna em especial, diversos trabalhos têm demonstrado a necessidade de estudos mais detalhados sobre a ampla variação observada em muitas espécies da família Teiidae, em especial as neotropicais que permanecem pouco conhecidas. Estudos multidisciplinares, incluindo dados citogenéticos, moleculares e morfológicos, podem fornecer importantes contribuições à sistemática e evolução

cromossômica, possibilitando a formulação de hipóteses filogenéticas mais consistentes, e uma melhor compreensão da história evolutiva da família.

A citogenética de lacertílios tem se limitado, principalmente, a animais de algumas regiões, como Austrália e Europa, permanecendo sub-explorada nas demais localidades (OLMO, 1986). Diversos trabalhos têm apresentado dados de coloração diferencial, como bandas C e R e localização das RONS, para diversas famílias neotropicais, como tropidurídeos (KASAHARA *et al.*, 1987a,b, 1996; YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1988; RODRIGUES *et al.*, 1989; BERTOLOTTO *et al.*, 1996), policrotídeos (PELLEGRINO *et al.*, 1999a; BERTOLOTTO *et al.*, 2001, 2002), geconídeos (KASAHARA *et al.*, 1991; PELLEGRINO *et al.*, 1995; PELLEGRINO *et al.*, 1997), microteídeos (PELLEGRINO *et al.*, 1999b, 1999c, YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1995, 1996, 2005; YONENAGA-YASSUDA & RODRIGUES, 1999) e teídeos (SANTOS *et al.*, 2007). Estes estudos têm contribuído de maneira significativa para a compreensão dos mecanismos envolvidos na evolução cromossômica do grupo, demonstrando o potencial da citogenética de lacertílios, principalmente das técnicas de coloração diferencial, na obtenção de caracteres úteis no contexto filogenético, ampliando nosso conhecimento sobre a diversidade destes grupos neotropicais.

PELLEGRINO *et al.* (2001) estabeleceram uma filogenia para 26 gêneros (50 espécies, 4 subespécies) de lagartos neotropicais da família Gymnophthalmidae (grupo irmão de Teiidae), utilizando de seqüências de regiões do DNA mitocondrial e nuclear (2.379 pb). Com base nesta hipótese filogenética, foi proposto um arranjo sistemático mais coerente para um grupo, até então, caótico taxonomicamente. O estudo levou à proposição de novas subfamílias e tribos, permitindo discutir, pela primeira vez com base em uma filogenia robusta, problemas relacionados às adaptações à fossorialidade, como alongamento do corpo, perda e redução de membros, perda de pálpebra, e à vida aquática,

presente em algumas espécies. Este estudo exemplifica o potencial que o estabelecimento de hipóteses filogenéticas oferece para o estudo dos processos evolutivos ocorridos na história de um grupo de lagartos.

O presente estudo tem como objeto de estudo a família Teiidae, com base em dados citogenéticos e moleculares de exemplares coletados ao longo de uma ampla área geográfica busca fornecer importantes contribuições à sistemática, à filogenia, estudos biogeográficos e a conservação deste grupo de lagartos neotropicais.

I.1. Sistemática dos Squamata

Os lagartos encontram-se distribuídos em quatro infra-ordens: Iguania, com treze famílias; Gekkota, com uma família; Scincomorpha, com sete famílias; e Anguimorpha, com seis famílias (ESTES *et al.*, 1988; FROST & ETHERIDGE, 1989; FROST *et al.* 2001). Essas quatro infra-ordens reunidas constituem o grupamento parafilético Lacertilia (ou Sauria), com cerca de 4100 espécies (POUGH *et al.*, 2001), e juntamente com as serpentes, anfisbenas e dibamídeos formam a ordem monofilética Squamata (Figura 1).

Figura 1. Relação filogenética dos Squamata segundo ESTES *et al.*, 1988. As quatro infra-ordens de lagartos estão em negrito e constituem o grupo parafilético Lacertilia.

Os Squamata constituem o maior e mais diverso grupo de répteis, apresentando uma alta diversidade ecológica, com espécies terrestres, fossoriais, arborícolas e aquáticas, e ocorrem em uma extensa variedade de habitats como desertos, florestas, rios e oceanos, podendo ser encontrados em todos os continentes, com exceção da Antártida.

As relações filogenéticas entre as quatro infra-ordens de lagartos, assim como suas relações com os demais grupos (serpentes, anfisbenas e dibamídeos) continuam temas muito controversos, variando conforme os caracteres empregados no estudo. A classificação sistemática mais aceita continua sendo a publicada por ESTES *et al.* (1988), elaborada com base em numerosos caracteres osteológicos e de tecidos moles (Figura 2).

Figura 2. Hipótese filogenética entre diversas famílias de Squamata proposta por ESTES *et al.*, 1988.

Apesar deste cladograma ser o mais aceito atualmente, alguns autores tem apresentado críticas a essa classificação também empregando dados morfológicos. MACEY *et al.* (1997), reexaminando os dados de ESTES *et al.* (1988), propuseram uma hipótese filogenética diferente, com o monofiletismo de Gekkota + Scincomorpha e ocorrência de um grupo irmão formado pelas famílias Gekkonidae e Xantusiidae (originalmente pertencente aos Scincomorpha). CALDWELL (1999), estudando caracteres osteológicos em busca do posicionamento das serpentes e mososaurídeos, não encontrou uma árvore que resolvesse as relações entre os Scleroglossa (Gekkota + Scincomorpha + Anguimorpha). Entretanto, na análise de exemplares fósseis, Scincomorpha se mostrou parafilético e Anguimorpha polifilético. Resultados similares foram apresentados por LEE (1998) que também apontou Scincomorpha como parafilético (com as famílias Scincidae e Cordylidae mais relacionadas a Anguimorpha do que com os Lacertiformes) e a posição de Xantusiidae permaneceu indeterminada.

I.2. Sistemática e evolução dos teídeos

A família Teiidae pertence à infra-ordem Scincomorpha (Figura 2) e está restrita atualmente ao continente americano, sendo encontrada do nordeste dos Estados Unidos até a Argentina (Figura 3) em uma ampla variedade de ecossistemas como desertos, florestas tropicais e matas de altitude nos Andes.

Figura 3. Distribuição geográfica dos lagartos da família Teiidae.

Os teídeos são lagartos relativamente grandes (com muitas espécies dos gêneros *Dracaena* e *Tupinambis* atingindo mais de um metro de comprimento), ativos e diurnos. Devido ao seu tamanho, os teídeos são conhecidos informalmente como macroteídeos, em contraposição ao seu grupo irmão, a família *Gymnophthalmidae*, conhecida como microteídeos. Ambas famílias formam o grupo monofilético *Teiioidea*, restrito ao novo mundo. Este grupo por sua vez é irmão da família *Lacertidae*, cujos representantes atuais se distribuem pela Eurásia e África e são conhecidos como “corredores do velho mundo”, constituindo o grupo *Lacertiformes* (Figura 4).

Figura 4. Relação filogenética entre as famílias de lacertiformes, segundo Estes *et al.*, 1988.

A família Teiidae conta com aproximadamente 110 espécies atuais, distribuídas em duas subfamílias e em dez gêneros: Teiinae (*Ameiva*, *Aspidoscelis*, *Cnemidophorus*, *Dicrodon*, *Kentropyx* e *Teius*) e Tupinambinae (*Callopistes*, *Crocodilurus*, *Dracaena* e *Tupinambis*). Existem ainda dentro da família Teiidae, três subfamílias fósseis (DENTON & O'NEILL, 1995): Chamopsiinae, com exemplares que datam do Cretáceo Inferior (WINKLER *et al.* 1990), Macrocephalosaurinae e Polyglyphanodontinae, do Cretáceo Superior (SULIMSK, 1975). Essas formas fósseis foram encontradas na América do Norte e na Ásia Central até o final do Cretáceo, quando desaparecem nestas localidades, apesar de sua ampla diversidade (ALIFANOV, 1993).

Na América do Norte a família esteve representada por teídeos, tupinambíneos e poliglifanodontíneos ocorrendo simpatricamente, mas todo o grupo desapareceu no final do Cretáceo. Esses fósseis já representam espécies extintas de gêneros das atuais subfamílias Teiinae e Tupinambinae, indicando que a divergência entre ambas subfamílias é bastante antiga e que grande parte da diversificação atual destes grupos deve ter ocorrido entre o Paleoceno e o Mioceno, enquanto a América do Norte e Central estavam separadas da América do Sul (PRESCH, 1974). No Mioceno, aparecem na

América do Norte as espécies de teiíneos dos gêneros *Aspidoscelis* e *Ameiva* (DENTON & O'NEILL, 1995), únicos gêneros que ocorrem nessa região atualmente.

O táxon fóssil mais antigo da América do Sul foi encontrado no Brasil e data do Paleoceno, mas ainda não foi descrito (ESTES, 1983), sendo considerado por SULLIVAN & ESTES (1995) como duvidoso. Os fósseis se tornam mais abundantes durante o Oligoceno quando espécimes próximos às formas atuais são encontradas (ESTES, 1961). O registro fóssil conhecido para a América do Sul, durante o início do Mioceno ao Holoceno é dominado por *Tupinambis* (BRIZUELA & ALBINO, 2004). Os Teiinae *Ameiva*, *Cnemidophorus* e *Dicrodon* aparecem na América do Sul durante o Quaternário (HOFFTETER, 1970; ESTES, 1983; ALBINO, 2002).

Tupinambíneos não ocorrem atualmente na América do Norte, tendo sido confinados na América do Sul no final do Cretáceo. Apesar de nenhum teídeo fóssil do Cretáceo ter sido encontrado na América do Sul, considerações biogeográficas sugerem sua existência (ESTES, 1983), embora não existam evidências para essa provável imigração durante ou próximo do final do Cretáceo (SULLIVAN & ESTES, 1995).

A divisão dos teídeos atuais em dois agrupamentos foi inicialmente proposta a partir de dados citogenéticos apresentados por GORMAN (1970), que indicaram a ocorrência de um grupo conhecido como grupo *Dracaena* (que corresponde à atual subfamília Tupinambinae) com cariótipo apresentando de 34 a 38 cromossomos com uma clara distinção entre macrocromossomos e microcromossomos; e o grupo *Ameiva* (subfamília Teiinae) com um número diplóide mais elevado (de 46 a 56 cromossomos) e sem uma clara distinção entre macro e microcromossomos (Figura 5).

Figura 5. Cariótipos representativos de espécies do grupo *Dracaena* e *Ameiva*, demonstrando as diferenças cromossômicas entre as subfamílias de lagartos teídeos (SANTOS, 2002).

Estudos osteológicos posteriores conduzidos por PRESCH (1974, 1983) corroboraram os dados cromossômicos apresentados por GORMAN (1970), e apoiaram a divisão dos teídeos em duas tribos: Teiini (*Ameiva*, *Cnemidophorus*, *Dicrodon*, *Kentropyx* e *Teius*) e Tupinambini (*Callopiastes*, *Crocodylurus*, *Dracaena* e *Tupinambis*). Mais tarde, ESTES *et al.* (1988) elevaram as duas tribos à categoria de subfamília: Teiinae e Tupinambinae.

Apesar do monofiletismo das subfamílias ser evidente, as relações filogenéticas entre os gêneros de teídeos são muito controversas. Das quatro hipóteses formuladas para a subfamília Teiinae (GORMAN, 1970; PRESCH, 1974; RIEPPEL, 1980; DENTON & O'NEIL, 1995) pelo menos duas são conflitantes (Figura 6), e das quatro para a subfamília Tupinambinae (DENTON & O'NEIL, 1995; GORMAN, 1970; PRESCH, 1974; SULLIVAN & ESTES, 1995; VANZOLINI & VALENCIA, 1965) todas são discordantes entre si (Figura 7).

Figura 6. Hipóteses de relações filogenéticas para a subfamília Teiinae. A) GORMAN, 1970; B) PRESCH, 1974; C) RIEPEL, 1980 e DENTON & O'NEIL, 1995.

Figura 7. Hipóteses de relações filogenéticas para a subfamília Tupinambinae. A) VANZOLINI & VALENCIA, 1965 e GORMAN, 1970; B) PRESCH, 1974; C) DENTON & O'NEIL, 1995, D) SULLIVAN & ESTES, 1995.

Desde o início da década de 90, diversas espécies de lagartos teídeos têm sido descritas, em especial nos gêneros *Cnemidophorus* (COLE & DESSAUER, 1993; MARKEZICH *et al.*, 1997; ROCHA *et al.*, 1997, 2000; FELTRIM, 1999; COLLI *et al.*, 2003a, 2003b) e *Tupinambis* (COLLI *et al.*, 1998). A maioria destas novas espécies são brasileiras, o que reflete a carência de revisões e estudos morfológicos, citogenéticos e moleculares no país.

Em lagartos do gênero *Tupinambis*, os problemas sistemáticos e taxonômicos também são grandes indicando a necessidade de amplas revisões (FITZGERALD *et al.*, 1999). Neste sentido, estudos multidisciplinares, incluindo abordagens com marcadores citogenéticos e moleculares poderiam fornecer importantes contribuições à sistemática e evolução cromossômica, possibilitando a formulação de hipóteses filogenéticas mais robustas.

I.3. Citogenética de lacertílios

Estudos citogenéticos em lacertílios se iniciaram na década de 60, com a descrição do número diplóide e da morfologia cromossômica, de diversas espécies, em especial as australianas. No entanto, eram raras as preparações que apresentavam uma boa resolução morfológica. A partir do início da década de 80, acumularam-se diversos trabalhos com descrições cariotípicas, predominantemente em coloração convencional, e alguns estudos já utilizando os cromossomos em abordagens evolutivas, com base na cariometria. Com o salto qualitativo observado nesse período, extensas revisões foram publicadas (GORMAN, 1973; PECCININI-SEALE, 1981; KING, 1981; BICKHAM, 1984; OLMO, 1986), revelando importantes características do grupo como duas formas cariotípicas:

- Cariótipos com uma clara distinção entre macrocromossomos (M) e microcromossomos (m), predominando o número diplóide de 36 cromossomos (12M + 24m). Presente em lagartos das infra-ordens Iguania (Figura 8a), Scincomorpha e Anguimorpha, assim como em algumas espécies de serpentes e anfisbenas;
- Cariótipos compostos por uma série gradual de cromossomos, geralmente acrocêntricos, sem uma clara distinção entre macro e microcromossomos. Esse cariótipo ocorre principalmente em espécies da infra-ordem Gekkota (Figura 8b).

Figura 8. Cariótipo da espécie da infra-ordem Iguania *Enyalius bilineatus* 2n=36 (12M + 24m) (BERTOLOTTO *et al.*, 2002), portadora de cariótipo com macro e micro cromossomos (a), e da espécie *Gonatodes humeralis* 2n=32 (SANTOS *et al.* 2003) da infra-ordem Gekkota, com uma série gradual de cromossomos (b).

A alta incidência do cariótipo 2n=36 (12M + 24m), levou diversos autores (GORMAN & ATKINS, 1967; PAULL *et al.*, 1976; BICKHAM, 1984), tendo como base apenas trabalhos envolvendo coloração convencional, a considerar este cariótipo como um caráter primitivo conservado, portanto ancestral, de todos os Squamata. Assim, o principal mecanismo envolvido na evolução cromossômica desse grupo seria o rearranjo do tipo robertsoniano, especialmente fissão e fusão cêntrica, uma vez que na maioria das vezes as mudanças cariotípicas observadas envolvem aumento ou diminuição do número diplóide, sem alteração no número fundamental.

Outra hipótese para a alta incidência dessa fórmula cariotípica seria o princípio de orto-seleção cariotípica proposto por KING (1981). Segundo essa teoria, a configuração cariotípica ($2n=36$, $12M + 24m$) teria surgido independentemente diversas vezes durante a evolução dos Squamata por ser essencialmente mais estável que as demais formas, sendo, portanto, decorrente de convergência evolutiva. O autor ainda sugere um cariótipo ancestral acrocêntrico, semelhante aos presentes na infra-ordem Gekkota, como ancestral para os Squamata, onde o principal mecanismo envolvido na evolução cromossômica seria a fusão cêntrica.

Esta visão, de que cromossomos acrocêntricos são mais primitivos, se baseia também na crença de que fusão é citogeneticamente muito mais fácil de ocorrer que fissão, e, portanto, mais comum (MATTHEY, 1949; WHITE 1954; REIGER *et al.* 1968). Tal hipótese baseia-se nas dificuldades envolvidas na criação de um telômero e centrômero novo, enquanto que a fusão tem sido interpretada como um resultado conceitualmente menos dificultoso, pois envolveria uma translocação recíproca seguida pela perda de um centrômero e de um pequeno fragmento cromossômico, e não a aquisição de novas estruturas (centrômero e telômero).

Tais teorias e propostas levaram a intensos debates sobre a utilização de informações cariotípicas em inferências filogenéticas e a uma ampla discussão sobre o papel das mudanças cromossômicas nos processos de especiação, chegando-se à conclusão que técnicas de coloração diferencial são essenciais nesse tipo de estudo (SITES & MORITZ, 1987; KLUGE, 1994; KING, 1994; SITES & REED, 1994).

Atualmente, cerca de 20% das 4100 espécies de lagartos têm seus cariótipos descritos. O número diplóide varia de $2n=16$ cromossomos, na espécie de geconídeo neotropical *Gonatodes taeniae*, a $2n=62$ (+2B) na espécie de microteídeo *Nothobachia ablephara*, que possui sistema de cromossomos supernumerários (Bs). A ampla maioria

das espécies de lagartos estudadas apresenta descrições cariotípicas apenas em coloração convencional, sobretudo devido à dificuldade na obtenção de boas preparações citogenéticas, à presença em alguns grupos de microcromossomos e a características inerentes à estrutura cromossômica desse grupo de vertebrados, que parecem dificultar a obtenção de bandas longitudinais. OLMO (1986) considera que, sendo a grande maioria dos dados cariotípicos em lagartos descritos em coloração convencional, há dificuldade de uma análise mais detalhada desses conjuntos cromossômicos, assim como no estabelecimento de homologias ou diferenças entre cariótipos, dificultando o emprego destes dados tanto em estudos sistemáticos e filogenéticos quanto em estudos citogenéticos comparativos.

A partir de meados da década de 80, com o aperfeiçoamento das preparações cromossômicas, técnicas de coloração diferencial como bandamento C e marcações de Ag-RONs se mostraram bastante informativas, ampliando as ferramentas disponíveis em estudos citogenéticos de lagartos. Outras técnicas de bandamento aparecem em poucos trabalhos com raros resultados satisfatórios publicados, como bandas R de alta resolução aplicadas a duas espécies do gênero *Tropidurus* (YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1988). Dentre os avanços técnicos, destacamos a técnica de cultura de fibroblastos (YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1988) que possibilitou a aplicação de técnicas avançadas de coloração diferencial (e.g. bandamento R, hibridações *in situ* fluorescente), permitindo estudos mais detalhados sobre a evolução cromossômica de lagartos, assim como a manutenção de células criopreservadas para futuros estudos citogenéticos ou moleculares.

KING (1990) analisou dados citogenéticos com a aplicação de técnicas de coloração diferencial em diversas espécies das famílias Gekkonidae, Pygopodidae, Agamidae, Scincidae e Varanidae, com ênfase em lagartos australianos, trazendo

importantes contribuições para o esclarecimento das possíveis origens, diversificação e sistemática das diferentes espécies de cada família.

OLMO *et al.* (1990) reuniram dados de coloração diferencial obtidos por CAPULA *et al.* (1989) e CARDONE *et al.* (1990) para espécies de lagartos lacertídeos, descrevendo diversos padrões espécie-específicos, com base em bandamento C, buscando uma melhor compreensão sobre a sistemática e filogenia desse grupo.

Atualmente, diversos trabalhos têm apresentado dados de coloração diferencial dos cromossomos para diversas famílias neotropicais, como tropidurídeos (KASAHARA *et al.*, 1983; KASAHARA *et al.*, 1987a,b; YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1988; RODRIGUES *et al.*, 1989; BERTOLOTTO *et al.*, 1996), policrotídeos (PELLEGRINO *et al.*, 1999a; BERTOLOTTO *et al.*, 2001, 2002), geconídeos (KASAHARA *et al.*, 1991; PELLEGRINO *et al.*, 1995; PELLEGRINO *et al.*, 1997) e microteídeos (PELLEGRINO *et al.*, 1991, 1999b, 1999c; YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1988, 1995, 1996, 2005; YONENAGA-YASSUDA & RODRIGUES, 1999). Estes estudos têm contribuído de maneira significativa para a compreensão dos mecanismos envolvidos na evolução cromossômica do grupo, no estabelecimento de relações filogenéticas entre as espécies e também na descrição de novos citótipos, ampliando nossos conhecimentos sobre a biodiversidade deste grupo, em especial na região neotropical.

I.3.1. Bandamento C

A técnica de bandamento C evidencia as regiões de heterocromatina constitutiva, que são regiões de DNA altamente repetitivo. De um modo geral, a heterocromatina constitutiva se encontra distribuída em regiões pericentroméricas, teloméricas ou intersticiais e, em alguns casos, próximas às regiões organizadoras de nucléolo ou às constrições secundárias.

Variações intra-individuais, intrapopulacionais e interpopulacionais, na quantidade e localização da heterocromatina constitutiva, têm sido descritas em algumas espécies, muitas vezes com a descrição de padrões espécie-específicos, aumentando a importância desta técnica na citotaxonomia e caracterização das mesmas, como nos exemplos a seguir.

As espécies de microteídeos *Procellosaurinus erythrocerus*, *P. tetradactylus* e *Vanzosaura rubricauda*, apresentam $2n=40$ com os cariótipos semelhantes tanto em coloração convencional quanto em padrões de bandamento R (YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1996). Entretanto, o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva se mostrou conspícuo nas regiões pericentroméricas e teloméricas na maioria dos pares das espécies de *Procellosaurinus*, enquanto que na espécie *Vanzosaura rubricauda* as marcações heterocromáticas se mostraram sutis e restritas a poucos pares. Além disso, padrões espécie-específicos foram observados entre as duas espécies de *Procellosaurinus* (Figura 9). Nesse trabalho, a variação no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva corroborou dados morfológicos e foi importante na separação dessas espécies em dois gêneros distintos, demonstrando o potencial desta técnica para estudos taxonômicos e filogenéticos.

Figura 9. Cariótipos de três espécies de lagartos microteídeos semelhantes em coloração convencional, mas com padrões de bandas C distintos (YONENAGA-YASSUDA *et al.* 1996).

Em uma ampla revisão sobre bandamento C e localização das RONS em espécies de lacertídeos, OLMO *et al.* (1990) descreveram diversos padrões espécie-específicos, apresentados em estudos anteriores (CAPULA *et al.*, 1989; CARDONE *et al.*, 1990) e aliaram a esses dados, estudos com enzimas de restrição obtendo uma melhor compreensão sobre a filogenia do grupo. Variações inter e intra-específicas nos padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva também foram descritas em geconídeos (KING, 1984), em policrotídeos (BERTOLOTTI *et al.*, 2002), e em tropidurídeos (KASAHARA *et al.*, 1983; BERTOLOTTI *et al.*, 1996).

A técnica de bandamento C também é útil na identificação de cromossomos supernumerários e dos cromossomos sexuais Y ou W que são geralmente heterocromáticos (Tabela 1). Trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Citogenética de Vertebrados do IBUSP são os únicos com a descrição de cromossomos supernumerários

após coloração diferencial em lagartos e foram reunidos em uma recente revisão por BERTOLOTTO *et al.* 2004.

Tabela 1. Padrões de bandamento C em cromossomos supernumerários e no cromossomo sexual Y.

ESPÉCIE	2n	SUPERNUMERÁRIO	CROMOSSOMO Y	REFERÊNCIAS
<i>Enyalius bilineatus</i>	2n=36 (+ 1, 2 B)	Não heterocromático	Puntiforme	BERTOLOTTO <i>et al.</i> , 2002
<i>Gymnodactylus geckoides</i>	2n=38	Heterocromático	Ausente	PELLEGRINO, 1998
<i>Micrablepharus maximiliani</i>	2n=50 (+ 1, 2, 3 B)	Heterocromático	Heterocromático	YONENAGA-YASSUDA & RODRIGUES, 1999
<i>Nothobachia ablephara</i>	2n=62 (+ 1, 2 B)	Não heterocromático	Não heterocromático	PELLEGRINO <i>et al.</i> , 1999 ^a

Na espécie *Cnemidophorus tigris*, pertencente à família Teiidae, padrões de bandamento C possibilitaram a identificação de estágio inicial de diferenciação entre dois homólogos cuja diferença na distribuição e quantidade de heterocromatina constitutiva mostraram influência na determinação sexual da espécie (BULL, 1978), sendo então considerado um cromossomo W em estágio inicial de diferenciação.

I.3.2. Regiões organizadoras de nucléolo (RONs)

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs), constituem-se de seqüências de DNA dispostas em *tandem*, portadoras de genes ribossomais. A alta repetibilidade dessas seqüências favorece sua identificação por técnicas citogenéticas, como a coloração por nitrato de prata, que possui alta afinidade por algumas proteínas não histônicas relacionadas à síntese do RNAr (como a proteína C23), evidenciando, assim, as regiões cromossômicas cujo DNAr esteve ativo durante a intérfase anterior. Outra técnica bastante precisa é a hibridação *in situ* fluorescente com sondas ribossomais, que identifica seqüências de DNAr. A alta repetibilidade dessas seqüências também faz das regiões de

DNAr mais susceptíveis a permutações desiguais e/ou ampliações, favorecendo o surgimento de duplicações e deleções que podem ser mantidas dentro da população, fornecendo bons caracteres para inferências filogenéticas.

A localização das RONS é a técnica de coloração diferencial mais comumente empregada em lagartos e segundo PORTER *et al.* (1991, 1994), fornece importantes caracteres para a compreensão das relações filogenéticas em diversos grupos de répteis. A localização das RONS pode, muitas vezes, ser um útil e confiável método para o estabelecimento das relações de parentesco entre espécies do mesmo grupo e, em certos casos, podem ser marcadores genéticos espécie-específicos. Estudos envolvendo hibridação *in situ* fluorescente, com a utilização de sondas ribossomais também podem fornecer importantes respostas quanto à distribuição das sequências de DNAr em lagartos, como na família Phrynosomatidae em que variações na localização da região de DNAr é caracter diagnóstico entre as espécies estudadas (PORTER *et al.* 1991, 1994). Variação na localização também foi observada em lagartos do gênero *Gymnodactylus*, onde a localização da RON é caracter diagnóstico entre as espécies *G. geckoides* e *G. darwinii* (PELLEGRINO, 1998). ODIERNA *et al.* (1987), também utilizaram a identificação das Ag-RONS em três sub gêneros de lacertídeos, possibilitando a elevação dessas categorias a gêneros distintos e fornecendo dados úteis para a compreensão das relações filogenéticas em toda a família.

As Ag-RONS em lagartos geralmente estão presentes em um único par. Em espécies portadoras do cariótipo $2n=36$ (12M+24m), considerado ancestral nos Squamata, as RONS geralmente se encontram associadas às constrições secundárias localizadas na região distal do braço longo do par 2. Entretanto, variações tanto na localização quanto no número foram relatadas, podendo fornecer importantes caracteres diagnósticos em diversas espécies, como no caso das espécies do gênero *Tropidurus* (Figura 10).

Figura 10. Variação interespecífica na localização das Ag-RONs em espécies do gênero *Tropidurus* (a, b, c); Variação interindividual quanto ao número na espécie *T. torquatus* (d, e) (KASAHARA *et al.*, 1996).

Múltiplas Ag-RONs foram encontradas em representantes das famílias Anguillidae (SANTOS, 2002), Gekkonidae (KING, 1984, PELLEGRINO *et al.*, 1997) e Gymnophthalmidae (YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1995; YONENAGA-YASSUDA & RODRIGUES, 1999; PELLEGRINO *et al.*, 1999b).

I.3.3. Padrões longitudinais de bandamento

Ao contrário do que ocorre em outros vertebrados como mamíferos e aves, nos répteis é muito difícil se obter padrão de bandas G, existindo raros resultados satisfatórios na literatura, como no complexo de espécies *Gehyra variegata-punctata* (Gekkonidae), em que foram reconhecidas várias raças cromossômicas e foi possível sugerir que a fusão cêntrica é o principal tipo de rearranjo cromossômico responsável pelas variações cromossômicas observadas no grupo (KING, 1981).

A dificuldade na obtenção de padrões de bandas G é atribuída à estrutura dos cromossomos dos lagartos. Dessa forma, somente com os avanços na técnica de cultura de fibroblastos, padrões longitudinais de bandamento foram obtidos pela incorporação da 5'-Bromodeoxiuridina (5-BrdU), uma substância análoga à timidina, que se incorpora nas regiões ricas em AT. A descrição do padrão de bandas R em lacertílios obtidos por incorporação de 5-BrdU e 5-FudR (5'-Fluordeoxiuridina) em cultura de fibroblastos é rara na literatura, existindo dados para algumas espécies de geconídeos (PELLEGRINO *et al.*, 1995, 1997; VOLOBOUEV *et al.*, 1993; VOLOBOUEV & INEICH, 1994; SANTOS *et al.* 2003), tropidurídeos (KASAHARA *et al.*, 1987a,b, 1996; YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1988; RODRIGUES *et al.*, 1989; PELLEGRINO *et al.*, 1994; BERTOLOTTO *et al.*, 1996), policrotídeos (PELLEGRINO *et al.*, 1999a; BERTOLOTTO *et al.*, 2001, 2002), microteídeos (YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1996, PELLEGRINO *et al.*, 1999b, c) e teídeos (SANTOS *et al.*, 2007).

No entanto, é evidente a limitação desta técnica na obtenção de bandas longitudinais em microcromossomos, mas mesmo assim os padrões de bandas R possibilitaram a:

- Identificação precisa dos pares de homólogos, principalmente dos de maior tamanho, contribuindo no estabelecimento de homeologias e comparações entre diferentes espécies, favorecendo a compreensão dos rearranjos ocorridos durante a evolução cromossômica do grupo. Por exemplo, padrões de bandas R de alta resolução em microteídeos neotropicais dos gêneros *Procellosaurinus* e *Vanzossaura* estudados por YONENAGA-YASSUDA *et al.* (1996).
- Identificação de sítios frágeis que podem estar envolvidos no processo de diferenciação cariotípica, como nas espécies de geconídeos neotropicais

Gonatodes humeralis e *G. hasemani*, $2n=32$, em relação a espécie *Coleodactylus amazonicus*, $2n=36$ (SANTOS *et al.* 2003).

- Identificação de cromossomos supernumerários que, por apresentarem, geralmente, replicação tardia de DNA, são fracamente corados, como nas espécies *Gymnodactylus geckoides* (PELLEGRINO, 1998), *Micrablepharus maximiliani* (YONENAGA-YASSUDA & RODRIGUES 1999) e *Enyalius bilineatus* (BERTOLOTTO *et al.*, 2002). Entretanto, na espécie *Nothobacchia ablephara* (PELLEGRINO *et al.*, 1999c) o cromossomo B não apresentou padrão tardio de replicação. BERTOLOTTO *et al.* (2004) apresentam uma revisão sobre cromossomos supernumerários nos lagartos.

I.3.4. Determinação do sexo e cromossomos sexuais em lagartos

Nos lagartos, dois tipos de determinação sexual são observados: ambiental e genotípica. A determinação ambiental foi descrita para apenas 24 espécies pertencentes às famílias Agamidae, Anguidae, Eublepharidae, Gekkonidae, Iguanidae, Lacertidae e Varanidae. Nesses lagartos, a temperatura exerce um papel crítico na embriogênese, influenciando a diferenciação gonadal. Segundo classificação sugerida por EWERT & NELSON (1991), ocorrem dois tipos de determinação sexual por temperatura em lagartos:

- Padrão onde baixas temperaturas de incubação produzem fêmeas e altas temperaturas, machos;
- Padrão onde temperaturas extremas (tanto baixas quanto altas) produzem fêmeas e temperaturas medianas, machos.

Na família Anguidae, a espécie *Elgaria multicarinata* parece apresentar determinação sexual dependente da temperatura (LANGERWERF, 1984), apesar desse estudo ser questionável (JANZEN & PAUKSTIS, 1991). Em geconídeos, as espécies *Eublapharis macularius* (WAGNER, 1980), *Gekko japonicus* (TOKUNAGA, 1985), *Hemitheconyx caudicinctus* (WAGNER, 1980), *Phelsuma sp* (MCKEOWN, 1984) e em seis espécies do gênero *Tarentola* (NETTMANN & RYKENA, 1985) a determinação sexual é dependente da temperatura. Em teídeos não há estudos sobre a influência da temperatura na determinação sexual.

É importante ressaltar que estudos envolvendo a influência da temperatura na diferenciação do sexo em lagartos são muito raros, tendo sido aplicados em somente 52 espécies (de um total de 4100), onde destas 24 espécies apresentaram determinação sexual dependente da temperatura (VIETS *et al.*, 1994). Assim, o número de espécies portadoras deste tipo de determinação sexual deve estar subestimado.

A maioria das espécies de lagartos, aparentemente, apresenta determinação do sexo do tipo genotípica, onde são os genes que exercem papel crucial neste processo. Estudos citogenéticos têm demonstrado que, em grande parte das espécies que apresentam esse tipo de determinação sexual, não existem cromossomos sexuais diferenciados. No entanto, alguns fatores devem ser levados em consideração na avaliação deste dado, pois a maioria das espécies de lagartos são desconhecidas do ponto de vista citogenético e existem dificuldades na obtenção de boas preparações cromossômicas e na detecção dos cromossomos sexuais, que podem ser microcromossomos, como em *Tropidurus* cujas espécies apresentam mecanismo cromossômico de determinação sexual do tipo XX:XY, porém foram consideradas por muito tempo como possuindo cariótipos não diferenciados entre os sexos pois os cromossomos sexuais são microcromossomos (KASAHARA *et al.*, 1996).

De um modo geral, das cerca de 20% de espécies de lagartos cariotipadas, em aproximadamente 25% destas, a presença de cromossomos sexuais pôde ser comprovada. Nestas espécies, dois tipos de mecanismos cromossômicos de determinação do sexo ocorrem. O primeiro é aquele em que a heterogametia ocorre em machos (sistema XX:XY), como na espécie *Liolaemus lutzae* (BERTOLOTTTO *et al.* 1996 – Figura 11 A) e o outro é aquele em que o par heterogamético é observado em fêmeas (sistema ZZ:ZW), como na espécie *Phyllodactylus marmoratus* (KING & ROFE 1976 – Figura 11 B). Devido a translocações entre cromossomos sexuais e autossomos (BICKHAM, 1984), sistemas múltiplos de determinação sexual são observados, como na espécie *Polychrus acutirostris* que apresenta o sistema $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ (BERTOLOTTTO *et al.*, 2001 – Figura 11 C) e na espécie *Lacerta vivipara* que apresenta o sistema $Z_1Z_1Z_2Z_2:Z_1Z_2W$ (ODIERNA *et. al.*, 2001).

Figura 11. Exemplos de espécies com mecanismo de determinação cromossômico do sexo. A) Sistema XX:XY em *Liolaemus lutzae* (BERTOLOTTTO *et al.*, 1996); B) Sistema ZZ:ZW em *Phyllodactylus marmoratus* (KING & ROFE., 1976); C) Sistema múltiplo $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ em *Polychrus acutirostris* (BERTOLOTTTO *et al.* 2001).

Cromossomos sexuais Y ou W muitas vezes são heterocromáticos, apresentando-se intensamente corados quando submetidos à técnica de bandamento C, apesar deste padrão não ser observado em algumas espécies (Tabela1). Acredita-se que entre os lagartos, os cromossomos sexuais tenham surgido inúmeras vezes (OLMO, 1986).

I.3.5. Partenogênese e poliploidia

Outro tema muito interessante abordado pela citogenética de lacertílios é a ocorrência de populações de lagartos unissexuais que se reproduzem partenogeneticamente. O termo partenogênese foi cunhado por OWEN, em 1849 (do grego: παρθενος = virgem; e γενεσις = origem) e quer dizer reprodução virginal. Esse mecanismo reprodutivo se expressa de forma diferenciada entre os diversos grupos de metazoários, o que reflete uma condição filogenética independente, cuja homoplasia é a capacidade de formar descendência a partir unicamente do material genético contido na célula germinativa da gônada feminina.

SUOMALAINEN *et al.* (1987) propõe três tipos de partenogênese:

- a) Haplóide: Quando os indivíduos são originados a partir de óvulos haplóides.

Ocorre em nemátodos, rotíferos, homópteros, coleópteros, himenópteros e aracnídeos.

- b) Apomítica: Quando o conjunto cromossômico não sofre redução meiótica.

Ocorre em cnidários, platelmintos, nemátodos, insetos, aracnídeos, rotíferos, moluscos, anelídeos, crustáceos e peixes.

- c) Automítica: Os cromossomos se emparelham no zigóteno, ocorre o *crossing over* e eles formam bivalentes. A seguir ocorre a redução meiótica e a diploidia é restaurada por um dos seguintes processos: fusão dos núcleos polares ou dos núcleos de clivagem, formação de um núcleo de

restituição, endomeiose ou duplicação pré-meiótica. Ocorre em insetos, aracnídeos, anelídeos, salamandras e répteis.

Com base nessa classificação, percebemos que os fenômenos citológicos formam a base para o entendimento da natureza da reprodução partenogenética e por essa razão, diversos estudos realizados entre as décadas de 30 a 80 buscaram sua compreensão. No entanto, com as dificuldades envolvidas na análise da formação dos oócitos, tais estudos foram escassos, se limitando a poucos organismos e desapareceram a partir do final da década de 80.

WHITE *et al.* (1977) destaca que nos Metazoa estes fenômenos citológicos responsáveis pela partenogênese, não apresentam um padrão de expressão claro, sendo, portanto, de difícil detecção. Tais dificuldades aumentam, quando associadas com a aparente diversidade de tipos citológicos observados (haplóide, apomítico, automítico), os quais ocorrem muitas vezes dentro de um mesmo grupo como Insecta ou Arachnida.

Nos lagartos, são raros os estudos buscando compreender a base citológica da partenogênese. CUELLAR (1971), estudando a espécie partenogenética *Aspidoscelis uniparens*, não encontrou indícios de alterações meióticas, devido às dificuldades envolvidas na obtenção e análise das divisões primárias dos oócitos, e atribuiu a manutenção da diploidia a eventos pré-meióticos de restituição, considerando mais provável a duplicação pré-meiótica, caracterizando os lagartos como automíticos (SUOMALAINEN *et al.* 1987). No entanto, CUELLAR aponta para a incorporação do 2º. corpúsculo polar ou a não disjunção (fenômeno apomítico), como alternativas possíveis à duplicação pré-meiótica. PECCININI-SEALE (1987), também comprovaram a origem pré-meiótica do mecanismo e, com as mesmas opções de mecanismos, preferiram apontar a fusão do 2º. corpúsculo polar como o processo mais provável.

HARDY *et al.* (1989) também buscaram a elucidação de tais mecanismos para a espécie *Gymnophthalmus underwoodi* não encontrando resultados precisos.

Em ambos mecanismos pré-meióticos automíticos (duplicação e fusão nuclear), o número cromossômico é reduzido normalmente através de meiose e, como somente cromossomos homólogos são emparelhados, o processo é geneticamente equivalente à apomixia (não disjunção) e o nível de heterozigosidade é mantido. Um caso recente de partenogênese facultativa na espécie de cobra *Python molorus bivittatus* (GROOT *et al.* 2003), ilustra bem tal processo, que não altera a heterozigosidade do embrião. Como a espécie apresenta sistema de determinação sexual do tipo ZZ:ZW (onde a fêmea é o sexo heterogamético), e a prole era apenas constituída de fêmeas, os autores propuseram mecanismos como fusão do núcleo de clivagem, fusão do 1º. corpúsculo polar com o núcleo do oócito secundário e duplicação pré meiótica, responsáveis pela manutenção da heterozigosidade.

DAWLEY & BOGART (1989) apresentam uma listagem dos répteis unissexuais conhecidos, principalmente nas famílias Teiidae e Gekkonidae, envolvendo diversos aspectos tais como ecologia, relações de parentesco, distribuição, diversidade, possíveis origens e descrições de alguns cariótipos. Constam também dados citogenéticos de populações bissexuais e unissexuais de *Cnemidophorus* provenientes da Amazônia. Neste gênero, CASE (1990) descreve a coexistência de espécies que se reproduzem dos dois modos, demonstrando o equilíbrio adaptativo dos dois tipos de reprodução.

A maioria das espécies de lagartos unissexuais, especialmente as pertencentes ao gênero *Aspidoscelis* (WRIGHT, 1978; DESSAUER & COLE, 1989; SITES *et al.*, 1990), parecem ter se originado por hibridação entre espécies que não representam, necessariamente, grupos irmãos. De acordo com a teoria da hibridação, os híbridos diplóides são formados primeiro e essa hibridação de algum modo propicia o

desenvolvimento da partenogênese nos híbridos diplóides (LOWE & WRIGHT 1966; SCHULTZ, 1967). A subsequente fecundação do ovócito não reduzido, hipoteticamente produzido pelo híbrido diplóide partenogenético recém surgido, com o espermatozóide haplóide normal de uma das espécies parentais origina triplóides. A poliploidia em lagartos foi observada em cerca de 30 espécies das famílias Gekkonidae, Teiidae e Gymnophthalmidae, onde ocorre sempre na forma triplóide.

Exemplo deste processo pode ser encontrado em algumas espécies de lagartos teídeos do gênero *Aspidoscelis*. A espécie partenogenética diplóide *A. tessalatus* surgiu a partir de hibridações entre *A. tigris* e *A. septemvittatus*. A seguir, populações triplóides de *A. tessalatus* surgiram por uma nova hibridação da forma diplóide partenogenética com uma terceira espécie *A. sexlineatus* (WRIGHT & LOWE, 1968). A ocorrência de triplóides também foi descrita por PELLEGRINO *et al.*, 2003 para a espécie *Leposoma percarinatum* da família Gymnophthalmidae (Figura 12), onde a origem da triploidia parece estar relacionada a eventos de hibridação, mas a população diplóide ancestral ainda não foi encontrada.

Figura 12. Cariótipo de *Leposoma percarinatum*, 3n=66 (PELLEGRINO *et al.*, 2003).

Diversos trabalhos têm relatado a ocorrência de partenogênese espontânea em espécies de lagartos, como no geconídeo *Lepidodactylus lugubris* (PASTEUR *et al.*, 1987), *Lepidophyma flavimaculatus* da família Xantusiidae (BEZY & SITES, 1987), na espécie de microteídeo *Gymnophthalmus underwoodii* (YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1995), em uma população da espécie *Liolaemus chiliensis* (LAMBOROT & ALVAREZ-SARRET, 1989) e na espécie *Varanus komodoensis* (WATTS *et al.* 2006). Nesses casos, a origem desse mecanismo parece ter sido espontânea a partir de uma população ancestral bissexual, assim como já relatado em diversas espécies de serpentes que apresentam partenogênese facultativa, e não híbrida.

Segundo CUELLAR (1974), existem diversos fatos que corroboram ambas as hipóteses, apesar de uma maior quantidade de dados apontar a origem espontânea (ou uma combinação de ambos mecanismos) como mais provável.

I.4. Citogenética de teídeos

A família Teiidae, que ocorre exclusivamente no continente americano, apresenta cerca de 70% de suas 105 espécies com cariótipos descritos. Os dados citogenéticos encontrados nessa família revelaram duas fórmulas cariotípicas distintas permitindo o estabelecimento de dois grupos citogenéticos (GORMAN, 1973): *Dracaena* (que corresponde à subfamília Tupinambinae) e *Ameiva* (subfamília Teiinae), o que foi corroborado posteriormente pelos dados morfológicos de PRESCH (1974) e ESTES (1988).

Os Tupinambinae apresentam número diplóide variando de $2n=34$ a 38 (GORMAN, 1973), formados por 10 ou 12 macrocromossomos metacêntricos e submetacêntricos e por 22 a 26 microcromossomos. É descrita também, para diversas espécies da subfamília, constrição secundária na região subtelomérica do braço longo do

par 2. Essa constituição cariotípica é muito similar à fórmula 12 macrocromossomos e 24 microcromossomos (12M + 24m) observada em três das quatro infra-ordens de lagartos (Anguimorpha, Iguania e Scincomorpha), assim como em algumas espécies de serpentes e anfisbenas, o que levou diversos autores (GORMAN & ATKINS, 1967; PAULL *et al.*, 1976 e BICKHAM, 1984), a considerar este cariótipo como ancestral de todos os Squamata. Com base nestes dados, OLMO (1986) sugere que a subfamília Tupinambinae ocupa posição basal entre os Teiidae.

As espécies da subfamília Teiinae apresentam número diplóide variando de $2n=46$ a 56 cromossomos, geralmente acrocêntricos, sem distinção clara entre macro e microcromossomos. GORMAN (1973) sugere que um cariótipo com $2n = 50$ (como o observado em *Ameiva ameiva* e *Kentropyx calcarata*) seria o primitivo para este grupo e teria se originado a partir da fissão cêntrica dos macrocromossomos de um cariótipo ancestral dos Tupinambinae.

Na subfamília Teiinae, os gêneros *Aspidoscelis* e *Cnemidophorus* estiveram até o trabalho de REEDER *et al.* (2002) reunidos no mesmo gênero (*Cnemidophorus*) e são os mais diversos dentre os lagartos teídeos. O gênero *Aspidoscelis* ocorre na América do Norte e Central e engloba, com base em dados cromossômicos e morfológicos, cinco grupos de espécies, muitas delas partenogenéticas e poliplóides:

- Grupo *cozumela* (FRITZ, 1969): Compreende três espécies partenogenéticas diplóides, originadas a partir de *A. maslini* ($2n=47$), resultado de hibridizações entre espécies do grupo *deppei* ($2n=50$) e *sexlineatus* ($2n=44$).
- Grupo *deppei* (LOWE *et al.*, 1970): Abrange quatro espécies, com $2n=52$ cromossomos acrocêntricos e constrição secundária no segundo ou terceiro par de maior tamanho. Para o autor este seria o cariótipo ancestral para o grupo, por ser mais semelhante ao das espécies dos gêneros *Ameiva* e *Kentropyx*.

- Grupo *sexlineatus* (LOWE *et al.*, 1970): Abrange pelo menos 21 espécies, com $2n=46$ cromossomos com um par metacêntrico grande, portador de uma constrição secundária na região terminal do braço longo, presente também em pelo menos dois pares intermediários com dois braços. Possui seis espécies partenogenéticas diplóides e triplóides.
- Grupo *tigris* (LOWE *et al.*, 1970): Abrange a espécie *A. tigris* e suas diversas subespécies. Possuem $2n=46$ cromossomos com três pares metacêntricos ou submetacêntricos maiores, com uma constrição secundária terminal em um dos braços do par 2. A maioria dos demais pares, incluindo microcromossomos, também apresentam dois braços. Existem populações partenogenéticas diplóides e triplóides.
- Grupo *tesselatus* (LOWE *et al.*, 1970): Duas espécies partenogenéticas diplóides pertencem a esse grupo. Em uma delas ocorrem também populações triplóides. A origem destas espécies deve-se à hibridização entre uma população parental de *A. tigris* com *A. inorantus* (pertencente ao grupo *sexlineatus*).

O gênero *Cnemidophorus* possui 18 espécies amplamente distribuídas na América do Sul e com poucas na América Central, divididas em quatro complexos:

- Complexo *lacertoides*: Compreende a espécie *C. lacertoides*, que se distribui do sul do Brasil à Argentina, Uruguai e Paraguai. Possui $2n=50$ com o terceiro par submetacêntrico e constrição secundária telomérica distal no par 1. Segundo COLE *et al.* (1979), do ponto de vista cromossômico este complexo está mais relacionado com as espécies de *Ameiva* e *Kentropyx*, do que com outras espécies de *Cnemidophorus*. As demais espécies *C. vacariensis*, *C. serranus* e *C. tergolaevigatus* são desconhecidas do ponto de vista citogenético.

- Complexo *lemniscatus*: Abrange cinco espécies distribuídas pela Amazônia e Guianas. Possuem $2n=50$, com o primeiro par submetacêntrico e com uma constrição secundária na região terminal de seu braço longo, associada à região organizadora de nucléolo (PECCININI-SEALE & ALMEIDA, 1986). Ao contrário de LOWE (1970), GORMAN (1973) considera este grupo de *Cnemidophorus* mais primitivo, por compartilhar mais semelhanças cariotípicas com as espécies dos gêneros *Ameiva* e *Kentropyx*. Variações neste cariótipo básico foram observadas em populações unisexuais ($2n=48$) e algumas bissexuais de *C. lemniscatus* por PECCININI-SEALE & FROTA-PESSOA (1974), que descreveram cinco citótipos. Três de suas espécies são partenogenéticas, com populações diplóides e triplóides (*C. pseudolemniscatus*, *C. cryptus* e *C. lemniscatus*) as demais bissexuais (*C. gramivagus* e *C. arenivagus*).
- Complexo *ocellifer*: Compreende seis espécies, onde *C. ocellifer* é amplamente distribuída pelo Brasil ao sul do Rio Amazonas até o norte da Argentina. As demais espécies (*C. nativo*, *C. littoralis*, *C. abaetensis*, *C. mumbuca* e *C. parecis*) possuem distribuição geográfica restrita. Possuem $2n=50$ ou 48, com a maioria dos pares com dois braços, e a espécie *C. nativo* é partenogenética e diplóide (ROCHA *et al.* 1997).
- Complexo *murinus*: Compreende a espécie tipo de *Cnemidophorus* (*C. murinus*), *C. nigicolor* e *C. vanzoi*, encontradas no norte da América do Sul e América Central.

Como apresentado, diversas espécies novas de *Cnemidophorus* têm sido descritas para a região neotropical, refletindo a carência de estudos para os animais desta região. COLE & DESSAUER (1993), ainda sugerem que estudos de genética

comparativa envolvendo amostras de populações isoladas de *Cnemidophorus* devam revelar mais espécies crípticas dentro do complexo *lemniscatus*, como também aponta RODRIGUES (1987) em relação às espécies brasileiras do complexo *ocellifer*, ressaltando a necessidade de estudos multidisciplinares para a compreensão de eventos biogeográficos ocorridos na região tropical, bem como para uma melhor avaliação da nossa biodiversidade.

Apesar de muitas espécies de teídeos terem sido estudadas citogeneticamente, para somente 10% dispõe-se de dados em coloração diferencial. PECCININI-SEALE & ALMEIDA (1986) observaram nos Teiinae *Ameiva ameiva* e *Cnemidophorus lemniscatus*, de diferentes localidades brasileiras, variação no número e na localização das RONS. Entretanto, SCHMID & GUTTENBACH (1988), SANTOS *et al.* (2007) e VERONESE *et al.* (2003) apontam a localização das RONS em *Ameiva ameiva* na região telomérica de somente um par cromossômico mediano (par 7). Já na espécie *Ameiva auberi*, PORTER *et al.* (1991), utilizando hibridação *in situ* fluorescente com sonda ribossomal, localizaram a região de DNAr em um par de microcromossomos. SANTOS *et al.* (2007) descreve as Ag-RONS de *Kentropyx calcarata*, *K. paulensis* e *K. vanzoi* na região distal do braço longo do par 1 e para a espécie *Cnemidophorus ocellifer* na região distal do braço longo do par 5, mostrando que a distribuição das RONS em lagartos da subfamília Teiinae é um caracter muito útil e informativo do ponto de vista filogenético, podendo caracterizar diversos gêneros de teídeos neotropicais. Além disso, também corrobora a hipótese de parafiletismo entre as espécies sul-americanas e as centro e norte-americanas do gênero *Ameiva* proposta por REEDER *et al.* (2002), com base em dados moleculares.

Entretanto, ROCHA *et al.* (1997), apresentam dados citogenéticos para a espécie *Cnemidophorus natio* (2n=48), incluindo dados de RONS múltiplas e bandamento C que

o único cariótipo apresentado que pretende mostrar a localização das RONS, não exhibe qualidade confiável e o bandamento C não é mostrado.

A técnica de bandamento C foi aplicada à espécie *Cnemidophorus laredoensis*, com o objetivo de auxiliar a elucidação da origem dessa espécie partenogenética (BICKHAM *et al.*, 1976), e em *Cnemidophorus tigris*, juntamente com padrões de bandamento G, para uma melhor compreensão da origem do mecanismo de determinação cromossômica do sexo (XX:XY) observado nesta espécie e que é o único descrito para teídeos (BULL, 1978).

Diversos mecanismos Robertsonianos parecem estar envolvidos na diferenciação das duas subfamílias de Teiidae, assim como nos diversos grupos de espécies do gênero *Cnemidophorus* (OLMO, 1986), mas a falta de informações para diversas espécies e diferentes populações, dificulta a compreensão da evolução cromossômica do grupo. Além disso, deve-se ter muito cuidado no estabelecimento de homologias cromossômicas e rigor na aplicação da metodologia cladística para a compreensão da evolução cromossômica de um grupo.

Um bom exemplo do problema enfrentado pode ser observado no trabalho de VERONESE *et al.* (2003), que propõe que, tendo em vista a presença de alguns pares de microcromossomos com dois braços na maioria de espécies de teídeos estudada até o momento, “a presença de uma média de três pares de microcromossomos metacêntricos pode, portanto, ser sugerida como um marcador para esta família de lagartos”. Na verdade, a classificação morfológica de microcromossomos é subjetiva, uma vez que depende diretamente da qualidade das preparações, como pode ser notada pela proposta do autor de “uma média”. Além disso, não existe nenhuma garantia de homologia entre os microcromossomos. Outro equívoco pode ser atribuído à falta de um grupo externo para se determinar uma sinapomorfia (“média de três microcromossomos”) à família.

Considerando os cariótipos de lacertídeos e gymnophthalmídeos (grupos irmãos da família Teiidae) e mesmo de outras espécies portadoras de cariótipo ancestral como *Enyalius* (BERTOLOTTI *et al.*, 2002), que pertence à infra-ordem Iguania, e *Ophiodes striatus* (SANTOS, 2002), que pertence à infra-ordem Anguimorpha, descritos na literatura, verificam-se a presença de microcromossomos com dois braços, o que classificaria estes caracteres, uma vez homólogos, como plesiomórficos.

Tabela 2. Revisão bibliográfica dos estudos citogenéticos em lagartos da família Teiidae.

Espécie	Número diplóide	NF	Coloração Diferencial	Referência
<i>Ameiva ameiva</i> *	50	50	RON, DA/MM	MATTLEY, 1933; PECCININI, 1969, PECCININI-SEALE, 1972; PECCININI-SEALE & ALMEIDA, 1986; GORMAN, 1970; BEÇAK <i>et al.</i> , 1972; SCHMID & GUTTENBACH, 1988; SITES <i>et al.</i> , 1990; VERONESE <i>et al.</i> , 2003.
<i>A. auberi</i>	30, 50	50	FISH rib.	PORTER <i>et al.</i> , 1991
<i>A. chrysolema</i>	50	56	-	GORMAN, 1970; DE SMET, 1981
<i>A. dorsalis</i> *	50	54	-	GORMAN, 1970
<i>A. exsul</i>	50	50	-	GORMAN, 1970
<i>A. maynardi</i>	50	54	-	GORMAN, 1970
<i>Callopistes exanguis</i> *	70, 71	73, 74	-	COLE <i>et al.</i> , 1979
<i>C. flavipunctatus</i> *	38	50	-	GORMAN, 1970
<i>C. maculatus</i> *	38	50	-	GORMAN, 1970; NAVARRO <i>et al.</i> , 1981
<i>Aspidoscelis arenivagus</i>	50	52	-	MARKEZICH <i>et al.</i> , 1997
<i>A. angusticeps</i>	44, 46	48, 50	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970; MANRIQUEZ-MORAN <i>et al.</i> , 2000
<i>A. arubensis</i>	50	52	-	MARKEZICH <i>et al.</i> , 1997
<i>A. burti</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. calidipes</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. communis</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. costatus</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. cozumelus</i>	49, 50	49, 50	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970; MANRIQUEZ-MORAN <i>et al.</i> , 2000
<i>A. deppei</i>	50, 52	50, 52	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970; MANRIQUEZ-MORAN <i>et al.</i> , 2000
<i>A. exsanguis</i>	46	48	RON	LOWE <i>et al.</i> , 1970; WARD & COLE, 1986
<i>A. flagellicaudas</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970

Espécie	Número diplóide	NF	Coloração Diferencial	Referência
<i>A. gularis</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970; BICKHAM <i>et al.</i> , 1976
<i>A. guttatus</i>	52	52	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. hyperythrus</i>	52	52	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. inoratus</i>	46	48	RON	LOWE <i>et al.</i> , 1970; WARD & COLE, 1986
<i>A. laredoensis</i>	46	48	BC	BICKHAM <i>et al.</i> , 1976
<i>A. lineatissimus</i>	52	52	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. marmoratus</i>	46	46	FISH rib.	PORTER, 1991
<i>A. mastini</i>	47	49	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. mexicanus</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. motaguae</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. neomexicanus</i>	46	52	RON	LOWE & WRIGHT, 1966; LOWE <i>et al.</i> , 1970; WARD & COLE, 1986
<i>A. opatae</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. parvisocius</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. sacki</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. septemvittatus</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. sexlineatus</i>	46, 50	48	-	MATTLEY, 1933; LOWE <i>et al.</i> , 1970; BICKHAM <i>et al.</i> , 1976
<i>A. sonorae</i>	46, 69 (3n)	48	RON	GORMAN, 1970; LOWE <i>et al.</i> , 1970; WARD & COLE, 1986
<i>A. tessellatus</i>	46, 69 (3n)	50	RON	LOWE <i>et al.</i> , 1970; WARD & COLE, 1986, WALKER <i>et al.</i> , 1997
<i>A. tigris tigris</i>	46, XY/XX	52	RON, BC, BG	COLE <i>et al.</i> , 1969; GORMAN, 1970; BULL, 1978; WARD & COLE, 1986
<i>A. tigris aethiops</i>	46	52	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. t. estebanensis</i>	46	52	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. t. gracilis</i>	46	52	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. t. marmoratus</i>	46	52	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. t. maximus</i>	46	52	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. t. septentrionalis</i>	46	52	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>A. tigris x C. sonorae</i>	92 (4n)	104	-	COLE <i>et al.</i> , 1979
<i>A. uniparens</i>	46	48	RON	LOWE <i>et al.</i> , 1970; WARD & COLE, 1986
<i>A. velox</i>	46	48	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970
<i>Cnemidophorus lacertoides*</i>	50	52	-	COLE <i>et al.</i> , 1979; VERONESE <i>et al.</i> , 2003
<i>C. lemniscatus*</i>	75, 50, 49, 48	78, 52	RON	GORMAN, 1970; LOWE <i>et al.</i> , 1970; PECCINI-SEALE & FROTA-PESSOA, 1974; PECCINI-SEALE & ALMEIDA, 1986; DESSAUER & COLE, 1989; COLE

Espécie	Número diplóide	NF	Coloração Diferencial	Referência
				<i>et al.</i> , 1993; VERONESE <i>et al.</i> , 2003.
<i>C. lemniscatus splendidus</i> *	50	52	-	MARKEZICH <i>et al.</i> , 1997
<i>C. murinus</i>	50	50, 52	-	LOWE <i>et al.</i> , 1970; GORMAN, 1970
<i>C. nativo</i> *	48	N/S	RON, BC	ROCHA <i>et al.</i> , 1997
<i>Crocodilurus lacertinus</i> *	34	46	-	GORMAN, 1970
<i>Dicrodon guttulatum</i>	56	56	-	GORMAN, 1970
<i>Dracaena guianensis</i> *	38	48	-	GORMAN, 1970
<i>K. borckiana</i> *	50	50	-	COLE <i>et al.</i> , 1995
<i>K. calcarata</i> *	50	50	-	COLE <i>et al.</i> , 1995
<i>K. striata</i> *	50	50	-	COLE <i>et al.</i> , 1995
<i>Tupinambis nigropunctata</i> *	36, 38	48/ 50	-	PECCININI, 1969; GORMAN, 1970; DE SMET, 1981
<i>T. merianae</i> *	36, 38	48/ 50	RON, BC	MATTLEY, 1933; PECCININI, 1969; BEÇAK <i>et al.</i> , 1972; DE SMET, 1981; VERONESE <i>et al.</i> , 2003.
<i>T. teguixim</i> *	36, 38	48/ 50	-	MATTLEY, 1933; PECCININI, 1969; BEÇAK <i>et al.</i> , 1972; DE SMET, 1981
<i>Teiús oculatus</i>	54	62	RON	VERONESE <i>et al.</i> , 2003.
<i>Teiús teyou</i>	54	62	-	GORMAN, 1970

*=Ocorre no Brasil, NF= Número fundamental, N/S= dados não satisfatórios, RON= Identificação das Regiões Organizadoras de Nucléolo, DA/MM= distamicina, BC= Bandamento C, BG= Bandamento G, FISH rib.= Hibridação *in situ* fluorescente com sonda ribossomal.

I.5. Estudos moleculares em lacertílios

Estudos moleculares, envolvendo o seqüenciamento de genes nucleares e mitocondriais, têm sido amplamente empregados desde a última década, revelando-se uma ferramenta bastante útil em estudos evolutivos. Os dados obtidos têm fornecido importantes subsídios à compreensão da estrutura de populações e fluxo gênico, hibridação, biogeografia, relações filogenéticas em diferentes grupos de vertebrados, além de identificar e orientar programas de conservação (MORITZ, 2002).

O grande avanço dos estudos moleculares deve-se a dois fatores principais: O

desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) (MULLIS *et al.*, 1986) que é uma técnica simples e barata, permitindo a aplicação de diversas técnicas moleculares a partir de uma pequena amostra genética. O segundo fator foi a grande quantidade de dados potencialmente informativos para a proposição de hipóteses filogenéticas, associada ao extenso conjunto de dados e modelos disponíveis sobre as transformações destes caracteres, assim como sobre a funcionalidade e herança de tais conjuntos genéticos.

O seqüenciamento de DNA é um exemplo de ferramenta útil na investigação acerca da origem de novos alelos e locos, no traçado de genealogias alélicas, e na elucidação dos processos que geram a variabilidade observada nessas moléculas, como mutações, fluxo gênico, variação geográfica, hibridação. A variabilidade presente no material genético também permite avaliar as pressões seletivas envolvidas na evolução de tais moléculas, permitindo importantes considerações acerca de homoplasias e permitindo o emprego de políticas de conservação mais eficientes para os organismos estudados. A técnica de seqüenciamento de DNA é também útil na obtenção de grande quantidade de dados passíveis de emprego em estudos filogenéticos, em uma ampla gama de níveis taxonômicos. Em tais estudos é crucial a escolha de um gene apropriado ao nível taxonômico a ser investigado, uma vez que os genes apresentam taxas de evolução diferentes entre si, e mesmo entre diferentes regiões dele mesmo.

As bases púricas (A, G) e pirimídicas (C, T), constituem os caracteres multi-estado codificados para emprego inferências filogenéticas e nesta abordagem a homologia de posição entre as bases é essencial para a atribuição correta da ancestralidade (HILLIS *et al.*, 1996). Nesse ponto dois fatores devem ser levados em consideração: 1) As transições (mudanças que envolvem purinas-purinas e pirimídicas-pirimídicas) são mais comuns que as tranversões (purinas-pirimídicas e pirimídicas-purina), uma vez que tais

mutações não geram distorções na molécula do DNA, que seriam mais facilmente detectadas pelo sistema reparo, e assim tendem a se acumular, podendo ocasionar saturação (homoplasia) em vários sítios, especialmente em estudos envolvendo genes de evolução rápida e espécimes distantes; 2) Uma vez que o código genético é degenerado, as mutações tendem a se acumular em sítios onde não ocorrem alterações no aminoácido codificado, em especial na 3ª posição dos códons, podendo gerar saturações.

Além das diferenças entre as taxas de mutações entre as bases e posições do códon, as taxas de mutação variam entre as regiões codificadoras e não codificadoras, entre os genes e entre as diferentes regiões de um mesmo gene. Como regra geral, quanto maiores forem as restrições funcionais, menores serão as taxas evolutivas, mas outros fatores como a estrutura terciária da proteína também exercem influência sobre a taxa de mutação local.

Podemos perceber então que na escolha da região nucleotídica a ser estudada é essencial atentar ao grau de divergência entre os táxons que se deseja estudar e assim, optar por seqüências que apresentarão grau de variabilidade informativa para o problema a ser abordado. Os genes a serem estudados podem ser do DNA nuclear ou do DNA mitocondrial que apresentam uma série de vantagens e desvantagens dependendo do problema a ser estudado, como veremos a seguir.

I.5.1. Seqüenciamento de genes nucleares em lacertílios

Os genes nucleares apresentam em geral taxas mais lentas que os genes mitocondriais e são empregados principalmente no estudo de divergências mais antigas. As seqüências nucleares podem também servir como marcadores independentes das seqüências mitocondriais em abordagens intragenéricas. No entanto, a pouca quantidade

de DNA alvo, a presença de íntrons, a presença de pseudogenes, a herança biparental e a recombinação podem ser fatores que dificultam a utilização desse tipo de marcadores.

As hipóteses filogenéticas para os Squamata, propostas com base em dados moleculares, são um exemplo da aplicação das seqüências nucleares na elaboração de propostas filogenéticas, e que tendem a apresentar diferentes topologias em relação às propostas de relacionamento a partir de dados morfológicos. SAINT *et al.* (1998) apresentou uma hipótese filogenética para os Squamata com base em seqüência do gene nuclear *c-mos* e posteriormente HARRIS *et al.* (2001) e HARRIS (2003) utilizando essa mesma matriz de dados, mas analisando criteriosamente os vieses de utilização de códons, detectaram problemas no uso deste gene para inferências filogenéticas, uma vez que a taxa de mutação deste gene dentro da família Teiidae e Gymnophthalmidae é muito mais alta que nos demais Squamata, levando à saturação da terceira posição dos códons. Lagartos do gênero *Leposoma*, por exemplo, tem 80% de GC na terceira posição, contra uma média de 39,8% nos demais Squamata e 57,8% do grupo externo (*Chelodina*, *Elseya* e *Crocodylus*), o que explicaria o posicionamento basal da família Teiidae dentro dos Squamata recuperadas nas filogenias de SAINT *et al.* (1998), HARRIS *et al.* (2001) e HARRIS (2003). Assim a infra-ordem Scincomorpha ficou parafilética, com Lacertidae grupo irmão de Amphisbaenidae e Scincidae com Cordylidae, Gerrhosauridae e Xantusiidae. Gekkota permaneceu monofilético, assim como Ophidia (Serpentes) e Iguania.

TOWNSEND *et al* (2004) acrescentaram seqüência parcial de 2750 pb do gene nuclear RAG-1 e seqüência parcial de 1500 pb do gene mitocondrial ND2 à seqüência do *c-mos*, empregada nos trabalhos citados anteriormente, para propor uma hipótese filogenética para os Squamata. A topologia obtida foi praticamente a mesma, mas o uso dos demais genes conseguiu reposicionar os teídeos + gymnophthalmídeos como grupo

irmão dos lacertídeos mais os anfisbenídeos (Figura 13), compensando de certo modo os vieses de uso de códons detectados por HARRIS (2003) para o gene *c-mos* em lagartos teídeos.

Figura 13. Relações filogenéticas em Squamata baseadas em dados de sequência do genes nucleares *c-mos* e *RAG-1* e do gene mitocondrial *ND2* (TOWNSEND *et al.*, 2004).

Assim, podemos perceber que a sistemática dos Squamata em níveis mais basais está em constante revisão. Com a aplicação de dados moleculares, diversos grupos hierárquicos que se julgavam monofiléticos com base em dados morfológicos, têm sido apontados como parafiléticos, desde os Scleroglossa e da infra-ordem Scincomorpha, até diversos gêneros e espécies.

I.5.2. Seqüenciamento de genes mitocondriais em lacertílios

O DNA mitocondrial apresenta várias características que o tornam uma importante ferramenta para estudos evolutivos, como o fato de apresentar, predominantemente herança uniparental (materna) (LANSMAN *et al.*, 1983), ausência de recombinação (CLAYTON, 1992), ausência de íntrons, múltiplas cópias em uma única célula e taxas evolutivas de 5 a 10 vezes mais rápida que o genoma nuclear (BROWN *et al.*, 1982). As altas taxas de substituição nucleotídica nas mitocôndrias podem ser atribuídas a altas taxas de mutação decorrente de excesso de resíduos metabólicos, uma vez que as mitocôndrias são as organelas responsáveis pela produção e conservação da energia, baixa fidelidade na replicação e ausência de mecanismos de reparo (LI, 1997).

Dessa maneira, seqüências mitocondriais são bastante empregadas em estudos de genética de populações, onde a filogenia dos genes juntamente com a biogeografia das populações permite inferências sobre a estrutura genética das mesmas, incluindo taxa de migração, fluxo gênico, redução de heterozigotidade e introgressão, entre outras informação, assim como estudos de diversidade e evolução interespecífica.

I.5.3. Múltiplos conjuntos de dados em análises combinadas

Caracteres de diversas naturezas têm sido combinados em análises filogenéticas de lacertílios, como diferentes genes mitocondriais, nucleares ou ambos (PELLEGRINO *et al.*, 2001; HARRIS, 2003; TOWNSEND *et al.*, 2004; WHITING *et al.*, 2006), como combinações entre eles e caracteres morfológicos (FROST *et al.*, 2001; REEDER *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.* 2005) e mesmo com dados citogenéticos (FLORES-VILLELA *et al.*, 2000). Existem controvérsias quanto à análise concatenada de caracteres de fontes distintas (HUELSENBECK *et al.*, 1996), no entanto, uma análise de incongruência entre

as propostas filogenéticas individuais pode facilmente auxiliar a proposição de hipóteses mais robustas (SITES *et al.*, 1996).

I.6. Estudos moleculares em teídeos

Em teídeos existem poucos trabalhos envolvendo o seqüenciamento de genes mitocondriais ou nucleares, com uma pequena quantidade de caracteres codificados. Com base no seqüenciamento de regiões do gene ribossomal 12S (380 pb) e 16S (500 pb) do DNA mitocondrial, em alozimas e em dados morfológicos (10 caracteres em parte dos taxa estudados) de espécies de lagartos da subfamília Teiinae, REEDER *et al.* (2002) demonstraram o estado parafilético dos gêneros *Ameiva* e *Cnemidophorus*. Nesse trabalho, dois grupos monofiléticos foram recuperados: o primeiro composto pelos gêneros *Ameiva*, *Kentropyx* e as espécies sul americanas de *Cnemidophorus*, e outro com espécies centro e norte-americanas de *Ameiva* e *Cnemidophorus*. As espécies norte-americanas deste último gênero foram reagrupadas em um gênero monofilético distinto (*Aspidoscelis*), enquanto que *Ameiva* permanecem parafilético. Além disso, apesar dos autores não terem tido acesso a espécimes de *Cnemidophorus* do grupo *ocellifer*, os demais grupos Neotropicais (*lemniscatus* e *lacertoides*) também se mostraram parafiléticos. Resultado semelhante foi observado quanto ao monofiletismo da família Teiidae, onde *Tupinambis* (Tupinambinae) se mostrou mais relacionado à espécie *Pholidobolus* (Gymnophthalmidae) do que às espécies da subfamília Teiinae.

Figura 14. Árvore de máxima parcimônia proposta por REEDER *et al.* (2002) para lagartos teíneos. Os números acima dos ramos são os valores de bootstraps.

Estudos envolvendo o seqüenciamento do DNAm^t em espécies da subfamília Teiinae também têm contribuído ao entendimento da origem e persistência de taxa partenogenéticos, bem como na determinação dos taxa parentais envolvidos, já que a hipótese mais aceita de origem daqueles taxa é por hibridação entre duas espécies próximas (REEDER *et al.* 2002). Análises de genes nucleares também têm sido úteis na identificação das espécies parentais, como na espécie partenogenética triplóide *Cnemidophorus flagellicaudatus* e suas espécies parentais bissexuais *C. inornatus* e *C. burti* (MORITZ *et al.*, 1989; revisto por AVISE, 1994).

FITZGERALD *et al.* (1999) recuperaram dois clados basais para espécies do gênero *Tupinambis*, pertencente a subfamília Tupinambinae, a partir do seqüenciamento de regiões dos genes mitocondriais citocromo *b* (300pb) e do gene ND4 (375 pb). O primeiro clado foi formado por espécies de ocorrência predominante no norte da América do Sul: *T. quadrilineatus* e *T. teguixim* (que apresentou estruturação coesa nas populações de Roraima/Brasil e do Equador), e o outro com espécies distribuídas mais ao sul: *T. merianae*, *T. rufescens* e *T. dreseni*, onde nessas últimas não se observaram diferenças moleculares que corroborassem sua distinção (Figura 15). Apesar do resumido número de caracteres utilizados e da amostra envolver poucas regiões brasileiras, os dados moleculares obtidos nesse trabalho, juntamente com os dados citogenéticos confusos para o gênero, apontam os grandes problemas taxonômicos e sistemáticos presentes no grupo e justificam a continuidade de estudos multidisciplinares detalhados.

Figura 15: Árvore de MP com pesagem e valores de bootstrap e bremer (esquerda) e árvore de NJ com valores de bootstrap (direita) (FITZGERALD *et al.*, 1999).

II. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo estudar espécies de lagartos da família Teiidae, numa abordagem citogenética e molecular, abrangendo novas localidades e espécies ainda não exploradas. Para tanto, pretende-se:

- Caracterizar os cariótipos das espécies em coloração convencional para a identificação do número e morfologia dos cromossomos, e através de técnicas de coloração diferencial (bandamento C, R e identificação das Ag-RONs), visando contribuir com a citotaxonomia e compreensão da evolução cromossômica dos Teiidae;
- Propor uma hipótese sobre as relações filogenéticas entre os grupos de teídeos neotropicais, com base em dados moleculares obtidos a partir do seqüenciamento de regiões de genes mitocondriais e/ou nucleares, e interpretar os dados cromossômicos à luz dessa hipótese;
- Associar dados citogenéticos e moleculares, de modo a contribuir para o entendimento da diversidade dos Teiidae, principalmente em relação às espécies brasileiras do gênero *Cnemidophorus*.
- Realizar uma extensa revisão na literatura sobre partenogênese, uma vez que teídeos são um modelo para estudo deste mecanismo reprodutivo, propondo hipótese sobre o papel de deleções presentes no proto-oncogene *C-mos* no favorecimento da reprodução através de partenogênese nos lacertiformes e nos Squamata;

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINO, A. Los lagartos del Cuaternario del sur de la region pampeana. I Congresso "Osvaldo A. Reig" de vertebradologia de la ciência, Resúmenes: p. 21, 2002.
- ALIFANOV, V. R. New lizards of the family macrocephalosauridae (Sauria) from the upper cretaceous of Mongolia, critical remarks on the systematics of the Teiidae (Sensu Estes, 1983). *Paleontological Journal* 27(1): 70-90, 1993.
- AVISE, J. C. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution* 43 (6): 1192-1208, 1989.
- AVISE, J.C. *Molecular Markers, Natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York, 511pp. 1994.
- BEÇAK, M.L., BEÇAK, W. & DENARO, L. Chromosome polymorphism, geographical variation and karyotypes in Sauria. *Caryologia* 25: 313-326, 1972.
- BERTOLOTTO, C. E. V.; RODRIGUES, M. T.; SKUK, G.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Comparative cytogenetic analysis with differential staining in three species of *Liolaemus* (Squamata, Tropiduridae). *Hereditas* 125: 257-264, 1996.
- BERTOLOTTO, C. E. V.; RODRIGUES, M. T.; SKUK, G.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Banding patterns, multiple sex chromosome system and localization of telomeric (TTAGGG) n sequences by FISH on two species of *Polychrus* (Squamata, Polychrotidae). *Caryologia* 54: 217-226, 2001.
- BERTOLOTTO, C. E. V.; PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Comparative cytogenetics and supernumerary chromosomes in the Brazilian lizard genus *Enyalius* (Squamata, Polychrotidae). *Hereditas* 136: 51-57, 2002.
- BERTOLOTTO, C. E. V., PELLEGRINO, K. C. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Occurrence of B chromosomes in lizards: a review. *Cytogenet Genome Res.* 106: 243-246, 2004.
- BEZY, R. L.; SITES, J. W. Jr. A preliminary study of allozyme evolution in the lizard family Xantusiidae. *Herpetologica* 43: 280-292, 1987.
- BICKHAM, J. W. Patterns and modes of chromosomal evolution in reptiles. In: *Chromosomes in Evolution of Eukaryotic Groups*. Eds. Sharma, A. K.; Sharma, A., 1984. vol. II, p.13-39.
- BICKHAM, J. W.; MCKINNEY, C. O.; MATTHEWS, M. F. Karyotypes of the partenogenetic whiptail lizard *Cnemidophorus laredoensis* and its presumed parental species (Sauria: Teiidae), *Herpetologica* 32: 395-399, 1976.
- BRIZUELA, S.; ALBINO, A. The earliest *Tupinambis* Teiid from south america and its palaeoenvironmental significance. *Journal of Herpetology*, 38 (1): 113-119, 2004.
- BROWN, W. M.; PRAGER, E. M.; WANG, A.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA sequences of primates: time and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18: 225-239, 1982.
- BULL, J. J. Sex chromosome differentiation: na intermediate stage in a lizard. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 20:205-209, 1978.

- CALDWELL M.W. Squamate phylogeny and the relationships of snakes and mosasauroids. *Zool. J. Linnean Society*, 125: 115-147, 1999.
- CAPULA, M.; LAPINI, L.; CAPANNA, E. The karyotype of *Lacerta horvathi* (Reptilia, Sauria, Lacertidae). *Genetica* 79: 11-16, 1989.
- CARDONE, A.; CAPRIGLIONE, T.; ODIERNA, G., REDI, C. A.; GARAGNA, S. Genomic intraspecific variations in some populations of *Podarcis s. sivicula*. In: *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles* (ed. E. OLMO), Birkhäuser Verlag, Berlin, 1990. p. 247-254.
- CASE, T. J. Patterns of coexistence in sexual and asexual species of *Cnemidophorus* lizards. *Oecologia* 83 (2): 220-227, 1990.
- CLAYTON, D. A. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int. Rev. Cytol.* 141: 217-232, 1992.
- COLE, C. J.; LOWE, C. H.; WRIGHT, J. W. Sex chromosomes in teiid whiptail lizards (genus *Cnemidophorus*).- *American Museum Novitates* 2395: 1-14, 1969.
- COLE, C.J.; McCOY, A.; ACHAVAL, F. Karyotype from a south american teiid lizard, *Cnemidophorus lacertoides*. *American Museum Novitates* 2617: 1-5, 1979.
- COLE, C. J.; DESSAUER, H. C. Unisexual and bisexual whiptail lizards of the *Cnemidophorus lemniscatus* complex (Squamata: Teiidae) of the Guiana region, South America, with descriptions of new species. *American Museum Novitates* 3081: 1-30, 1993.
- COLE, C. J.; DESSAUER, H. C.; TOWNSEND, C. R.; ARNOLD, M. G. *Kentropyx borckiana* (Squamata: Teiidae): an unisexual lizard of hybrid origin in the Guyana Region, South America. *American Museum Novitates* 2671: 1-5, 1995.
- COLLI, G.R.; PÉREZ Jr, A. K.; CUNHA, H. J. A new species of *Tupinambis* (Squamata: Teiidae) from central Brazil, with na analisis of morphological and genetic variation in the genus. *Herpetologica* 477-492, 1998.
- COLLI G. R.; CALDWELL J. P.; COSTA G. C.; GAINSBURY A. M. A new species of *Cnemidophorus* (Squamata, Teiidae) from the Cerrado biome in central Brazil. *Occasional Papers Of The Oklahoma Museum Of Natural History* 14: 1-14, 2003a.
- COLLI, G. R.; COSTA G. C.; GARDA A. A. A critically endangered new species of *Cnemidophorus* (Squamata, Teiidae) from a Cerrado enclave in southwestern Amazonia, Brazil. *Herpetologica* 59 (1): 76-88, 2003b.
- CUELLAR, O. Reproduction and the mechanism of meiotic restitution in the parthenogenetic lizrd *Cnemidophorus unipares*. *J. Morphology* 133: 139-165, 1971.
- CUELLAR, O. On the origin of parthenogenesis: The cytogenetic factors. *Am. Nat.* 108: 625-648, 1974.
- DAWLEY, R. M.; BOGART, J. P. *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*. Albany, New York, 1989, 302p.
- DE SMET, W. H. O. Description of the orcein stained karyotypes of 36 lizard species (Lacertilia, Reptilia) belonging to the families Teiidae, Scincidae, Lacertidae, Cordylidae and Varanidae (Autarchoglossa). *Acta Zoological et Pathologica Antverpiensia* 76: 73-118, 1981

- DENTON, R. K.; O'NEILL, R. C. *Prototeius stageri*, gen. Et. Sp.nov, a new teiid lizard from the upper cretaceous Marshalltown formation of the New Jersey, with a preliminary phylogenetic revision of the Teiidae. *Journal of vertebrate paleontology* 15 (2): 235-253, 1995.
- DESSAUER, H. C.; COLE, C. J. Diversity between and within nominal forms of unisexual teiid lizards. In R.M. Dawley and J. P. Bogart (eds.), *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*. *New York State Museum Bulletin* 466: 49-71, 1989.
- ESTES, R. Miocene lizards from Colombia, South America. *Breviora* 143: 1-8, 1961.
- ESTES, R. The fossil record and early distribution of lizards. In: *Advances in Herpetology and Evolutionary Biology: Essays in Honor of Ernest E. Williams*. A. RHODIN and K. MIYATA (eds), Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 1983. p. 365-398.
- ESTES, R.; QUEIROZ, K.; GAUTHIER, J. Phylogenetic relationships within Squamata. In: *Phylogenetic relationships of the lizard families*, E. ESTES and G. PREGILL (eds), Stanford, California, 1988. p.119-281.
- EWERT, A.; NELSON, C. E. Sex determination in turtles: diverse patterns and some possible adaptive values. *Copeia* 7: 50-69, 1991.
- FELTRIM, A. C. *O gênero Cnemidophorus Wagler, 1830, no sul do Brasil e regiões limítrofes, com a descrição de uma nova espécie (Sauria: Teiidae)*. Tese de Doutorado. Pontifícia Univ. Católica Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 1999.
- FITZGERALD, L.A., COOK, J.A. & AQUINO, A.L. Molecular phylogenetics and conservation of *Tupinambis*. *Copeia* (4): 894-905, 1999.
- FLORES-VILLELA, O.; KJER, K.M.; BENABIB, M.; SITES JR., J.W. 2000. Multiple data sets, congruence, and hypothesis testing for the phylogeny of basal groups of the lizard genus *Sceloporus* (Squamata, Phrynosomatidae). *Systematic Biology* 49(4): 713-739.
- FRITZ, T.H. The systematics of the parthenogenetic lizards of the *Cnemidophorus cozumela* complex. *Copeia* 3: 519-535, 1969.
- FROST, D.R.; ETHERIDGE, R.A. phylogenetic analysis and taxonomy of iguanian lizards (Reptilia:Squamata). *Misc. Publ., Univ. Kan. Mus. Nat. Hist.* 81: 1-65, 1989.
- FROST, D.R., ETHERIDGE, R., JANIES, D.; TITUS, T. A. Total evidence, sequence alignment, evolution of polychrotid lizards, and a reclassification of the Iguania (Squamata: Iguania). *American Museum Novitates* 3343: 1-38, 2001.
- FUNK, V.A., SAKAI, A.K.; RICHARDSON, K.S. Biodiversity: the interface between systematics and conservation. *Systematic biology* 51(2): 235-237, 2002.
- GORMAN, G.C. Chromosomes and systematics of the family Teiidae (Sauria, Reptilia). *Copeia* 230-245, 1970.
- GORMAN, G.C. The chromosomes of the Reptilia, a cytotaxonomic interpretation. In: *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*. A. B. Chiarelli and E. Cappana (eds.), New York, Acad. Press, 1973, p.349-424.
- GORMAN, G. C.; ATKINS, L. The relationships of the Anolis of the roquet species group (Sauria: Iguanidae). II. Comparative chromosome cytology. *Syst. Zool.* 16: 137-143, 1967.

- GROOT, T. V. M.; BRUINS E.; BREEUWER, J. A. J. Molecular genetic evidence for parthenogenesis in the Burmese python, *Python molurus bivittatus*. *Heredity* 90: 130-135, 2003.
- HARDY, L. M.; COLE, C. J.; TOWNSEND, C. R. Parthenogenetic reproduction in the neotropical unisexual lizard, *Gymnophthalmus underwoodi* (Reptilia: Teiidae). *Journal of Morphology* 201:215-234, 1989.
- HARRIS, D. J. Codon bias variation in c-mos between squamate families might distort phylogenetic inferences.- *Mol. Phylogenet. Evol.* 27: 540-544, 2003.
- HARRIS, D. J.; MARSHALL, J. C.; CRANDALL, K. A. Squamate relationships based on c-mos nuclear DNA sequences: increased taxon sampling improves bootstrap support. *Amphib. Reptil.* 22: 235-242, 2001.
- HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. Horned lizard (Phrynosoma) phylogeny inferred from mitochondrial genes and morphological characters: understanding conflicts using multiple approaches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 961-971, 1996.
- HOFFTETER, R. Vertebrados cenozóicos de Ecuador. IV Congresso Latinoamericano de Zoologia, Actas: 2: 955-970, 1970.
- HUELSENBECK, J. P.; BULL, J. J.; CUNNINGHAM, C. W. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends Ecol. Evol.* 11: 152-158, 1996.
- JANZEN, F. J.; PAUKSTIS, G. L. Environmental sex determination in reptiles: Ecology, evolution, and, experimental design. *The quarterly review of biology* 66 (2): 149-179, 1991.
- KASAHARA, S., YONENAGA-YASSUDA, Y. SCHINCARIOL, R. A.; L'ABBATE, M. Chromosome mechanisms of sex determination, G- and C band patterns and nucleolus organizer regions in *Tropidurus torquatus* (Sauria, Iguanidae).- *Genetica* 60: 151-156, 1983.
- KASAHARA, S.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Karyotype and evolution of the *Tropidurus nanuzae* species group (Sauria, Iguanidae). *Revista Brasileira de Genética* 10:185-197, 1987a.
- KASAHARA, S.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M.T. Geographical karyotypic variations and chromosome banding patterns in *Tropidurus hispidus* (Sauria, Iguanidae) from Brazil. *Caryologia* 40: 43-57, 1987b.
- KASAHARA, S.; PELLEGRINO, K. C. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M.T. Estudos citogenéticos em duas espécies de lagartos do gênero *Phyllorhynchus* (Sauria; Gekkonidae). *Revista Brasileira de Genética (supl.)* 14:59, 1991.
- KASAHARA, S.; PELLEGRINO, K. C. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Comparative cytogenetic studies of eleven species of the *Tropidurus torquatus* group (Sauria; Tropiduridae), with banding patterns. *Hereditas* 125: 37-46, 1996.
- KING, M. Chromosome change and speciation in lizards. In: *Evolution and Speciation*. W.R. Atchley and D.S. Woodruff (eds.), Cambridge University Press, London 1981. p.262-285.
- KING, M.. Karyotypic evolution in *Gehyra* (Gekkonidae: Reptilia). IV. Chromosome change and speciation.- *Genetica* 64: 101-114, 1984.

- KING, M. Chromosomal and immunogenetic data: a new perspective on the origin of Australia's reptiles. In: *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*, Olmo, E. (ed.), Birkhäuser verlag, 1990, p. 153-180.
- KING, M. Unbuckling the cladistic straight jacket: an exercise in elementary cytogenetics and a reply to Kluge. *Herpetologica* 50: 222-237, 1994.
- KING, M.; ROFE, R. Karyotypic variation in the australian gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Chromossoma* 54: 75-87, 1976.
- KLUGE, A. G. Principles of phylogenetic systematics and the informativeness of the karyotype in documenting gekkotan lizard relationships.- *Herpetologica* 50: 210-221, 1994.
- LAMBOROT, M.; ALVAREZ-SARRET, E. Karyotypic characterization of some *Liolaemus* lizards in Chile (Iguanidae).- *Genome* 32: 393-403, 1989.
- LANGERWERF, B. Technique for large-scale meeding of lizards from temperate climates in green house enclosures. *Acta Zool Pathol Antverp.* 78: 163-176. 1984.
- LANSMAN, R. A.; AVISE, J. C.; AQUADRO, C. F.; SHOPINA, J. F.; DANIEL, S. W. & HUETTEL, C. F. Critical experimental test of the possibility of "potencial leakage" of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:1969-1971. 1983
- LEE, M. S. Y. Convergent evolution and character correlation in burrowing reptiles: towards a resolution of squamate relationships. *Biological Journal of the Linnean Society* 65: 369-453, 1998.
- LI, W. H. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland. U.S.A. 487p.
- LOWE, C. H.; WRIGHT, J. W. Chromosomes and karyotypes of *Cnemidophorus teiid* lizards. *Mamm Chromosome Newsl.* 22: 199-200, 1966.
- LOWE, C. H.; WRIGHT, J. W.; COLE, C. L.; BEZY, R. L. Chromosomes and evolution of the species group *Cnemidophorus* (Reptilia: Teiidae). *Systematic Zoology* 19: 114-127, 1970.
- MACEY J. R.; LARSON A.; ANANJEVA N. B.; PAPENFUSS T. J. Evolutionary shifts in three major structural features of the mitochondrial genome among iguanian lizards. *J. Mol. Evol.* 44: 660-674, 1997.
- MANRIQUEZ-MORAN, N. L.; VILLAGRAN-SANTA CRUZ, M & MENDEZ-DE LA CRUZ, F. R.. Origin and Evolution of the Parthenogenetic Lizards, *Cnemidophorus maslini* and *C. cozumela*. *Journal of Herpetology*, 34:4, pp. 634-637. 2000.
- MARKEZICH, A. L.; COLE, C. J.; DESSAUER, H. C. The blue and green whiptail lizards (Squamata: Teiidae: *Cnemidophorus*) of the Peninsula de Paraguana, Venezuela: systematics, ecology, descriptions of two new taxa, and relationships to whiptails of the Guianas. *American Museum Novitates* 3207: 1-60, 1997.
- MATTLEY, R. Nouvelle contribution à l'étude des chromossomes chez les Sauriens. R. Suisse Zool. 40: 281-316, 1933.
- MATTHEY, R. Les chromosomes des Vertébrés Librairie de L'Université, F. Rouge, Lausanne, Switzerland, 1949.
- MCKEOWN, S. Management and propagation of the lizard genus *Phelsuma*. *Acta Zool. Pathol. Antverp.* 78: 149-162, 1984.

- MORITZ, C.; WRIGH, J.W.; BROWN, W. M. Mitochondrial DNA analyses and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (genus *Cnemidophorus*). III. *C. velox* and *C. exsanguis*. *Evolution* 43: 958-968, 1989.
- MORITZ, C. Strategies to protect biological diversity and evolutionary process that sustain it. *Systematic Biology* 51: 238-254, 2002.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273, 1986.
- NAVARRO, J.; SALLABERRY, M.; VELOSO, A.; VALENCIA, J. Diversidad cromosomica en lagartos (Squamata-Sauria). I Avances citotaxonomicos. Perspectiva de estudios evolutivos en Iguanidae. *Medio Ambiente* 5: 28-38, 1981.
- NETTMANN, H. K.; RYKENA, S. Verhaltens-und fortpflanzungsbiologische Notizen über kanarische und nordafrikanische *Tarentola*-Arten. *Bonn. Zool. Beitr.* 36: 287-305, 1985.
- ODIERNA, G.; OLMO, E.; COBROR, O. Taxonomic implications of NOR-localization in lacertid lizards. *Amph. Rept.* 8: 373-381, 1987.
- ODIERNA, G.; HEULIN, B.; GUILLAUME, C. P.; VOGRIN, N.; APREA, G.; CAPRIGLIONE, T.; SURGET-GROBA, Y.; KUPRIYANOVA, L. Evolutionary and biogeographical implications of the karyological variations in the oviparous and viviparous forms of *Lacerta vivipara*. *Ecography* 24 (3): 332-340, 2001.
- OLMO, E. Reptilia.- In: *Animal Cytogenetics* (ed. B. John) Berlin, Gebruder, Borntraeger, 1986, p. 1-100.
- OLMO, E.; ODIERNA, G.; CAPRIGLIONE, T.; CARDONE, A. DNA and chromosome evolution in lacertid lizards.- In: *Cytogenetics of amphibians and reptiles*, E. OLMO (ed.), Birkhäuser Verlag, Berlin, 1990. p. 181-204.
- OWEN, R. On parthenogenesis, or the successive production of procreating individuals from a single ovum. London: van Voorst, 1490pp. 1849.
- PAULL, D.; WILLIAMS, E. E.; HALL, W. P. Lizard karyotypes from the Galapagos islands: chromosomes in phylogeny and evolution.- *Breviora* 441: 1-31, 1976.
- PASTEUR, G.; AGNÈSE, J. F.; BLANC, C. P.; PASTEUR, N. Polyclony and low relative heterozygosity in a widespread unisexual vertebrate., *Lepidodactylus lugubris* (Sauria). *Genetica* 75: 71-79, 1987.
- PECCININI-SEALE, D. New developments in vertebrate cytotaxonomy. IV. Cytogenetic studies in reptiles.- *Genetica* 56: 123-148, 1981.
- PECCININI-SEALE, D. Chromosomal constitution and meiotic mechanism in *Cnemidophorus lemniscatus* (Sauria, Teiidae). In: SUOMALAINEN, E; SAURA, A; LOKKI, J. *Cytology and evolution in Parthenogenesis*. CRC Press: Boca Raton, FL., 1987, 134-157.
- PECCININI, D. Cariótipo e mecanismo de determinação do sexo em algumas espécies de lacertílios brasileiros (Iguanidae e Teiidae). *Est. Acad. Fac. Fil. Cienc. Letr. Univ. S. Paulo.* 95: 1-46, 1969.
- PECCININI-SEALE, D. Estudo da meiose em machos de *Cnemidophorus lemniscatus* (Sauria, Teiidae) e quantidade de DNA na espermatogênese. *Ciência e Cultura* 24: 161-162, 1972.

- PECCININI-SEALE, D.; ALMEIDA, T. M. B. Chromosomal variation nucleolar organizers and constitutive heterochromatin in the genus *Ameiva* and *Cnemidophorus* (Sauria, Teiidae). *Caryologia* 39: 227-239, 1986.
- PECCININI-SEALE, D.; FROTA-PESSOA, O. Structural heterozygosity in parthenogenetic populations of *Cnemidophorus lemniscatus* (Sauria, Teiidae) from the Amazonas Valley.- *Chromosoma* 47: 439-451, 1974.
- PELLEGRINO, K. C. M. Diversidade cariotípica e evolução cromossômica em lagartos das famílias Gymnophthalmidae e gekkonidae (Squamata): evidências baseadas em coloração diferencial e hibridação in situ fluorescente. *Genetics and molecular biology* 21(3): 418-419, 1998.
- PELLEGRINO, K. C. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T.; CHU, T. H. Estudos cariotípicos em *Nothobachia ablephara* (Sauria, Teiidae). *Revista Brasileira de Genética (Supl.)* 14: 59, 1991.
- PELLEGRINO, K. C. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Cytogenetic studies in six species of Tropiduridae (Sauria).- *Revista Brasileira de Genética* 17: 401-408, 1994.
- PELLEGRINO, K. C. M.; SUCUPIRA, M. C. A.; KASAHARA, S.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. C- and R-banding patterns and nucleolus organizer regions in the karyotype of *Hemidactylus mabouia* (Sauria, Gekkonidae). *Revista Brasileira de Genética* 18: 527-531, 1995.
- PELLEGRINO, K. C. M.; KASAHARA, S.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Pericentric inversion events in karyotypic distinction of brazilian lizards of genus *Phylllopezus* (Squamata, Gekkonidae) detected by chromosomal banding patterns. *Hereditas* 127: 255-262, 1997.
- PELLEGRINO, K. C. M.; BERTOLOTTO, C. E. V.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Banding patterns, heteromorphic sex chromosomes and Ag-stained NORs after pachytene stage in the meiosis of the brazilian lizard *Urostrophus vautieri* (Squamata, Polychrotidae). *Caryologia* 52: 21-26, 1999a.
- PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences.- *Hereditas* 131: 15-21, 1999b.
- PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal polymorphism due to supernumerary chromosomes and pericentric inversions in the eyelidless microteiid lizard *Nothobachia ablephara* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Chrom. Res.* 7: 247-254, 1999c.
- PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; SITES, J. W. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family.- *Biological J. of the Linnean Society* 74: 315-338, 2001.
- PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. The triploid karyotype of *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae).- *J. Herpetology* 37 (1): 197-199, 2003.

- PORTER, C. A.; MEREDITH, J. H.; SITES, J. W. JR.; BAKER, R. J. Location of ribosomal DNA in chromosomes of squamate reptiles: systematic and evolutionary implications. *Herpetologica* 27: 271-280, 1991.
- PORTER, C. A.; HAIDUK, M. W.; QUEIROZ, K. Evolution and phylogenetic significance of ribosomal gene location in chromosomes of squamate reptiles. *Copeia* 302-313, 1994.
- POUGH, H. F.; ANDREWS R. M.; CADLE J. E.; CRUMP M. L.; SAVITZKY A. M.; WELLS K. D. *Herpetology* 2nd edition Prentice Hall, New Jersey, 2001.
- PRESCH, W. Evolutionary relationships and biogeography of the macroteiid lizards (Family Teiidae, Subfamily Teiinae). *Bull. South. Cal. Acad. Sci.* 73: 23-32, 1974.
- PRESCH, W. The lizard family Teiidae: is it a monophyletic group *Zoological J. Linnean Society* 77: 189-197, 1983.
- REEDER, T. W.; COLE, C. J.; DESSAUER, H. C. Phylogenetic relationships of whiptail lizards of genus *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae). *American Museum Novitates*, 3365: 1-61, 2002.
- REIGER, R.; MICHAELIS, A. & GREEN, M. M. Glossary of genetics and cytogenetics. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1968.
- RIEPPPEL, O. *The phylogeny of anguimorph lizards*, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1980, 86p.
- REID, W. V. Biodiversity hotspots. *Tree* 13 (7): 275-280, 1998.
- ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; PECCININI-SEALE, D. Evidence of a unisexual population of the Brazilian whiptail lizard genus *Cnemidophorus* (Teiidae), with description of a new species. *Herpetologica* 53:374-382, 1997.
- ROCHA, C. F. D.; ARAÚJO, A. F. B.; VRCIBRADIC, D.; COSTA, E. M. M. New *Cnemidophorus* (Squamata; Teiidae) from coastal Rio de Janeiro State, Southeastern Brazil. *Copeia* 2: 501-509, 2000.
- RODRIGUES, M. T. Sistemática, Ecologia e Zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo *torquatus* ao sul do Rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia* 31(3):105-230, 1987.
- RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; KASAHARA, S. Notes on the ecology and karyotypic description of *Strobilurus torquatus* (Sauria, Iguanidae). *Revista Brasileira de Genética* 12: 747-759, 1989.
- RODRIGUES, M.T.; FREIRE, E.M.X; PELLEGRINO, K.C.M.; SITES JR., J.W. Phylogenetic relationships of a new genus and species of microteiid lizard from the Atlantic forest of north-eastern Brazil (Squamata, Gymnophthalmidae). *Zoological Journal of Linnean Society* 144: 543-557, 2005.
- SAINT, K. M.; Austin, C. C.; Donnellan, S. C.; Hutchinson, M. N. C-mos, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. *Mol. Phyl. Evol.* 10: 259-263, 1998.
- SANTOS, R. M. L. Estudos cromossômicos em espécies de lacertílios brasileiros das famílias Teiidae, Gekkonidae e Anguidae (Sauria, Squamata), com a aplicação de técnicas de coloração diferencial. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 96pp. 2002.

- SANTOS, R. M. L.; BERTOLOTTO, C. E. V.; PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal studies on sphaerodactyl lizards of genera *Gonatodes* and *Coleodactylus* (Squamata, Gekkonidae) using differential staining and fragile sites analyses.- *Cytogenet. Genome Res* 103: 128-134, 2003.
- SANTOS, R. M. L., PELLEGRINO K. C. M., RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Banding patterns and chromosomal evolution in five species of teiid lizards (Squamata: Teiidae). *Genetica* in press, 2007)
- SCHMID, M, GUTTENBACH, M. Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosomes bands in vertebrates. *Chromosoma* 97: 101-114, 1988.
- SCHULTZ, R. J. Hybridization, unisexuality and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *The american naturalist*. 103(934): 605-619 1967.
- SITES, J. W. Jr.; MORITZ, C. Chromosomal evolution and speciation revisited. *Syst. Zool.* 36 (2): 153-174, 1987.
- SITES, J. W. Jr.; REED, K. M. Chromosomal evolution, speciation, and systematics: some relevant issues. *Herpetologica* 50 (2): 237-249, 1994.
- SITES, J. W.; PECCININI-SEALE, D. M.; MORITZ, C.; WRIGHT, J. W.; BROWN, W. M. The evolutionary history of parthenogenetic *Cnemidophorus lemniscatus* (Sauria, Teiidae). I. Evidence for a hybrid origin.- *Evolution* 44: 906-921, 1990.
- SITES JW Jr, BASTEN CJ, ASMUSSEN MA Cytonuclear structure of a hybrid zone in the lizards of the *Sceloporus grammicus* complex (Sauria, Phrynosomatidae). *Molecular Ecology*, 5, 379 392. 1996.
- SULLIVAN, R. M.; ESTES, R. A reassessment of the fossil Tupinambinae. In: Vertebrate paleontology in Neotropical. KAY, R. F.; CIFELLI, R. L.; FLYNN, J. J. (eds.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 1995, p. 100-112.
- SULIMSKI, A. Macrocephalosauridae and Polyglyphanodontidae (Sauria) from the late Cretaceous of Mongolia. *Paleontologia Polonica* 33: 25-102, 1975.
- SUOMALAINEN, E; SAURA, A; LOKKI, J. *Cytology and evolution in Parthenogenesis*. CRC Press: Boca Raton, FL. 1987.
- TOKUNAGA, S. Temperature-dependent sex determination in *Gekko japonicus* (Gekkonidae, Reptilia). *Dev. Growth Differ.* 27: 117-120, 1985.
- TOWNSEND, T.M.; LARSON, A.; LOUIS, E. e MACEY, R. Molecular Phylogenetics of Squamata: the position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the root of the Squamata tree.- *Syst. Biol.* 53 (5): 735-757, 2004.
- VANZOLINI, P. E.; VALENCIA, J. The genus *Dracaena*, with a brief consideration of macroteiid relationships (Sauria, Teiidae). *Arquivos de Zoologia* 13: 7-35, 1965.
- VERONESE, L. B.; FREITAS, T. R. O.; KRAUSE, L. Cytogenetic studies of four Brazilian species of lizards (Squamata, Teiidae). *Caryologia* 56 (1): 107-114, 2003.
- VIETS, B. E.; EWERT, M. A.; TALENT, L. G.; NELSON, C. E. Sex-determining mechanisms in squamate reptiles. *J. Exp. Zool.* 270: 71-78, 1994.

- VOLOBOUEV, V.; INEICH, I. A chromosome banding study of *Ailuronyx seychellensis* (Reptilia, Gekkonidae) and its phylogenetic affinities.- *J. Herpetology* 28: 267-270, 1994.
- VOLOBOUEV, V.; PASTEUR, G.; INEICH, I.; DUTRILLAUX, B. Chromosomal evidence for a hybrid origin of diploid parthenogenetic females from the unisexual-bisexual *Lepidodactylus lugubris* complex (Reptilia, Gekkonidae).- *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 194-199, 1993.
- WAGNER, E. Temperature-dependent Sex determination in a gekko lizard. *Q. Rev. Biol.* 55: 21, 1980.
- WALKER J.M, J.E CORDES, H.L TAYLOR. Parthenogenetic *Cnemidophorus tessellatus* complex (Sauria: Teiidae): a neotype for diploid *C. tessellatus* (Say, 1823), redescription of the taxon, and description of a new triploid species. *Herpetologica.* 53:233-259. 1997.
- WATTS, P. C.; BULEY, K. R.; SANDRESON, S.; BOARDMAN, W.; CIOFI, C.; GIBSON, R. Parthenogenesis in komodo dragons. *Nature* 44: 21-28, 2006.
- WARD, O. G.; COLE, C. J. Nucleolar dominance in diploid and triploid parthenogenetic lizards of hybrid origin. *Cytogenetics and Cell Genetics* 42: 177-182, 1986.
- WINKLER, D.; MURRY, P.; JACOBS, L. L.. Early Cretaceous (Comanchean) vertebrates of central Texas. *Journal of Vertebrate Paleontology* 10: 95-116, 1990.
- WHITE, M. J. D. "Animal cytology and evolution". Cambridge Univ. Press. London and New York, 1954.
- WHITE, M. J. D.; CONTRERAS, N.; CHENEY, J.; WEBB, G. C. Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba* (formerly *Moraba*) *virgo* and its bisexual relatives. *Chromosoma* 61: 127-148, 1977.
- WHITING, A.S.; SITES JR., J.W. PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T. Comparing alignment methods for inferring the history of the new world lizard genus *Mabuya* (Squamata: Scincidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution* 38: 719-730, 2006.
- WRIGHT, J. W. Parthenogenetic lizards. *Science* 201: 1152-1154, 1978
- WRIGHT, J. W.; LOWE, C. H. Weeds. polyploids, parthenogenesis, and the geographical and ecological distribution of all-female species of *Cnemidophorus*. *Copeia* 128-138, 1968.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Supernumerary chromosome variation, hetromorphic sex chromosomes and banding patterns in microteiid lizards of the genus *Micrablepharus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Chromosome Research.* 7: 21-29, 1999.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; KASAHARA, S.; CHU, T.H.; RODRIGUES, M.T. High-resolution RBG-banding pattern in the genus *Tropidurus* (Sauria, Iguanidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 48: 68-71, 1988.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; VANZOLINI, P. E.; RODRIGUES, M. T.; CARVALHO, C. M. Chromosome banding patterns in the unisexual microteiid *Gymnophthalmus underwoodi* in two related sibling species (Gymnophthalmidae, Sauria). *Cytogenet. Cell Genet.* 70: 29-34, 1995.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; MORI, L.; CHU, T. H.; RODRIGUES, M. T. Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid radiation: *Procellosaurinus* and *Vanzosaura* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Cytogenet. Cell Genet.* 74:203-210, 1996.

YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T.; PELLEGRINO, K. C. M. Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid radiation: The $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae).- *Genetics and Molecular Biology* 28 (4): 700-709, 2005.

Capítulo II – Material e Métodos

I. MATERIAL

Os exemplares estudados foram obtidos a partir de coletas, operações de resgate, monitoramento e levantamento faunístico, rotineiramente executados pelo Laboratório de Citogenética de Vertebrados (LCV) do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP, em colaboração com zoólogos do grupo coordenado pelo Dr. Miguel T. Rodrigues, do Departamento de Zoologia, também do IBUSP. Outros pesquisadores também nos enviaram amostras de tecidos e as espécies e localidades estudadas nessa tese estarão devidamente identificadas nos artigos apresentados no capítulo III.

II. MÉTODOS

II.1. Estudos citogenéticos

As metáfases mitóticas dos exemplares foram obtidas por meio de diferentes técnicas: preparações diretas de baço, fígado e intestino e culturas de fibroblastos. Para a análise meiótica foi utilizado material de testículos.

As preparações citogenéticas foram analisadas tanto em coloração convencional, como após bandamento C (CBG), R (RBG) e coloração por nitrato de prata (Ag-RONs).

II.1.1. Preparações cromossômicas

Para a preparação direta dos órgãos de lagartos, foi utilizada solução de Fitohemaglutinina-M (Gibco) (5 ml de fitohemaglutina diluída em 37,5 ml de água destilada), técnica adaptada de BAKER *et al.* (1971), para estimular a divisão celular. Essa solução foi injetada intraperitonealmente (na proporção de 0,1 ml/10 g de peso do animal) 48 e 24 horas antes do sacrifício. Entre 4 e 5 horas antes do sacrifício foi injetada intraperitonealmente solução de colchicina 0,1 % (na proporção de 0,1 ml/10 g de peso do animal). Após a injeção dessas drogas, o animal foi mantido à temperatura aproximada de 30° C.

II.1.1.1. Preparação direta de baço, fígado e medula óssea, segundo YONENAGA-YASSUDA (1972), com modificações

1. Sacrificar o animal, já previamente submetido ao tratamento com colchicina e fitohemaglutinina, com éter ou cloridato. Retirar o baço, o fígado e o fêmur, colocando-os em uma placa de Petri pequena contendo cerca de 3 ml de solução de Hanks.

2. Injetar repetidas vezes essa solução com o auxílio de uma seringa, até que os órgãos fiquem transparentes e, no caso do fêmur, a medula seja dissolvida; desprezar os resíduos teciduais, homogeneizar a solução celular, transferir para um tubo de centrífuga e centrifugar 10 minutos a 1200 rpm. Desprezar o sobrenadante.
3. Adicionar 7 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M), ressuspender suavemente e manter a 37°C por 20 minutos.
4. Colocar 6 gotas de fixador metanol : ácido acético (3:1) recém-preparado e gelado, homogeneizando levemente a suspensão. Esperar 5 minutos e adicionar 2 ml de fixador. Ressuspender levemente e deixar 5 minutos em temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 1.200 rpm durante 10 minutos e desprezar o sobrenadante.
6. Colocar 3 ml de fixador, pipetar repetidas vezes (cerca de 100), centrifugar novamente e desprezar o sobrenadante.
7. Ressuspender o material em fixador por 2 ou 3 vezes.
8. Após a última centrifugação, desprezar o sobrenadante e adicionar fixador na proporção de 2:1 em relação à quantidade de sedimento. Homogeneizar levemente a suspensão.
9. Pingar 1 a 2 gotas da suspensão celular sobre a superfície de uma lâmina seca, aquecida em banho-maria a 60° C, obedecendo uma distância de aproximadamente 0,5 cm. Retirar do banho-maria e secar ao ar. As lâminas devem ser previamente lavadas com sabão neutro, estocadas em álcool absoluto e secas no momento do uso.

II.1.1.2. Suspensão de testículos, segundo SCHMID (1978), com modificações

1. Retirar os testículos e colocá-los em uma placa de Petri pequena contendo cerca de 3 ml de meio Hanks.

2. Separar e romper os túbulos seminíferos com auxílio de uma agulha, homogeneizar a solução com uma pipeta Pasteur, transferir para um tubo de ensaio e centrifugar 10 minutos a 1200 rpm.
3. Os procedimentos seguintes são os mesmos apresentados nos itens 3 a 9 da técnica descrita para baço e fígado.

II.1.1.3. Esmagamento de intestino e testículos, segundo BOGART (1973),
com modificações

1. Retirar o intestino e os testículos, colocá-los em placa de Petri e proceder a hipotonização por 30 minutos em água destilada em temperatura ambiente.
2. Retirar a água destilada e adicionar fixador etanol : ácido acético (3:1) recém-preparado. Manter em fixador por pelo menos um dia.
3. Cortar o intestino em pequenos pedaços e com uma agulha raspar o tecido epitelial sobre uma lamínula seca. Com o auxílio de duas agulhas, separar os túbulos seminíferos do testículo, e espalhá-los sobre uma lâmina. Pingar uma gota de ácido acético 70%, “pescar” a lamínula com uma lâmina previamente limpa e proceder ao esmagamento. Manter as lâminas já prontas em câmara úmida.
4. Colocar as lâminas em recipiente contendo nitrogênio líquido ou gelo seco, deixando-as por cerca de 5 minutos.
5. Retirar as lâminas do recipiente e, com o auxílio de uma lâmina de barbear, desprender as lamínulas. Passar as lâminas em álcool absoluto e deixá-las secar ao ar.

II.1.1.4. Cultura de fibroblastos, segundo YONENAGA-YASSUDA *et al.* (1988), com modificações

II.1.1.4.1. Obtenção das biópsias

1. Anestesiado animal com éter.
2. Fazer completa assepsia, através de lavagens sucessivas com algodões embebidos em acetona, álcool etílico 70 % (3 lavagens), Merfene (solução desinfetante, contendo 0,05 g de borato de fenilmercúrio, 50 ml de etanol 95 % e 100 ml de água deionizada) e éter.
3. Tirar biópsias de músculo da coxa ou dorso, com auxílio de tesoura e pinça esterilizadas.
4. Colocar a biópsia em um frasco de vidro contendo 5 ml de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 10 % de soro bovino fetal e Neomicina a 50 µg/ml. Deixar na geladeira por 24 horas.
5. Dividir as biópsias em duas partes, sendo uma delas implantada e a outra estocada em 5 ml de meio e guardada na geladeira, no caso de contaminação da primeira.

II.1.1.4.2. Implante da cultura

1. Picotar a biópsia em uma placa de Petri estéril contendo 5 ml de meio de cultura completo (DMEM com 10 % de soro bovino fetal), com auxílio de pinça e tesoura esterilizadas, em pequenos fragmentos.
2. Umedecer a parede inferior de um frasco plástico para cultura com capacidade de 25 cm² (marcas Corning, Falcon ou Nunclon), com soro bovino fetal.
3. Colocar os fragmentos na parede inferior do frasco já umedecida com o soro.
4. Virar o frasco de cultura e acrescentar 2 ml de meio completo. Fechá-lo e deixá-lo em repouso por 15 a 30 minutos em estufa a 28° C.

5. Desvirar o frasco, cuidadosamente, para que os fragmentos fiquem em contato com o meio de cultura. Deixar em estufa a 28° C por aproximadamente 3 dias. Se durante esse período ocorrer contaminação, implantar a outra parte da biópsia que foi estocada em geladeira, adicionando ao meio de cultura Garamicina a 50 µg/ml (para contaminação com bactérias) ou Fungizon a 2,75 µg/ml (contaminação por fungos).
6. Quando as células começarem a proliferar, adicionar mais 3 ml do meio completo e manter em estufa a 28° C.

Durante essa etapa, é necessária a observação diária dos frascos de cultura para controlar o pH do meio, que deve permanecer na faixa de 7,4 a 7,6. No caso de muita acidez, deve-se adicionar algumas gotas de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 2,8 % e para neutralizar a alcalinidade utiliza-se HEPES 1 % (N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-ácido etanossulfônico). As etapas que envolvem a proliferação celular são realizadas em condições de assepsia, com utilização de fluxo laminar.

Dependendo da proliferação celular, o meio de cultura deve ser trocado, para remoção de produtos tóxicos do metabolismo e reposição de nutrientes.

Com a proliferação celular, as células cobrem toda a superfície da parede do frasco, formando uma camada única. Quando as células atingirem uma proliferação adequada, elas serão divididas, por meio da tripsinização, em garrafas distintas.

II.1.1.4.3. Tripsinização

1. Desprezar o meio de cultura e adicionar 2 ml de Hanks sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺. Deixar por 2 a 5 minutos. Desprezar o sobrenadante.
2. Colocar cerca de 1,5 ml de uma solução de Hanks sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ contendo tripsina 0,125 %, EDTA 0,02 % (etileno-diamino-ácido tetracético) e o indicador de

pH vermelho de fenol. Observar ao microscópio invertido o desprendimento das células. Quando as células ficarem arredondadas, desprezar a solução de tripsina.

3. Adicionar 3 ml de meio completo. Bater bem nas paredes laterais do frasco de cultura para soltar as células. Observar ao microscópio invertido.
4. Transferir metade do material para um frasco de cultura novo e completar para 5ml com 90% de meio de cultura DMEM e 10% de soro bovino fetal.
5. Manter os frascos em estufa a 28° C.

Após a proliferação das células em cultura, pode-se colher o material para análise dos cromossomos e/ou congelar as células para conservação do estoque no banco de células.

II.1.1.4.4. Colheita do material para preparação cromossômica

1. Incubar o material com 50 µl de solução de colchicina 0,01 % durante 40 minutos a 28° C.
2. Transferir o meio para um tubo de centrifuga.
3. Acrescentar ao frasco de cultura, cerca de 3 ml de Hanks sem Ca^{++} e Mg^{++} . Deixar em estufa a 26° C por 20 minutos.
4. Recolher o Hanks para o tubo de centrifuga e adicionar aproximadamente 1,5 ml de solução de tripsina (a mesma usada para tripsinização) ao frasco de cultura. Observar ao microscópio invertido e avaliar o índice mitótico pela presença de células arredondadas.
5. Soltar as células, acrescentando cerca de 5 ml do meio que está no tubo de centrifuga.
6. Transferir todo o material do frasco de cultura para o tubo de centrifuga e centrifugar a 1.200 rpm por 10 minutos, desprezando, a seguir, o sobrenadante.

7. Colocar aproximadamente 5 ml de Hanks, homogeneizar a suspensão e centrifugar a 1.200 rpm por 10 minutos, desprezando o sobrenadante.
8. Adicionar cerca de 5 ml de solução hipotônica de KCl 0,075 M. Homogeneizar a suspensão e manter a 37° C por 20 minutos. Em seguida, adicionar 5 ml de fixador metanol : ácido acético (3:1) fresco e centrifugar a 1.200 rpm por 10 minutos.
9. Desprezar o sobrenadante e adicionar cerca de 5 ml de fixador, pipetar repetidas vezes e centrifugar a 1.200 rpm por 10 minutos. Repetir essa etapa mais uma vez.
10. Após a última centrifugação, desprezar o sobrenadante e adicionar fixador na proporção de 2:1 em relação à quantidade de sedimento. Homogeneizar levemente a suspensão, pingar 1 a 2 gotas da suspensão celular sobre a superfície de uma lâmina limpa e seca, aquecida em banho-maria a 60° C e secar ao ar.

II.1.2. Coloração e bandamento cromossômico

II.1.2.1. Coloração convencional

1. Hidrolisar a lâmina em HCl 1N a 60° C por 7 minutos. Lavar em água destilada;
2. Corar com solução de Giemsa (Merck) diluído em tampão fosfato pH 6,8 (1:30) por cerca de 7 minutos. Lavar em água destilada e secar.

II.1.2.2. Bandamento C (CBG), modificada a partir de SUMNER (1972)

1. Hidrolisar a lâmina em HCl 0,2N durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Lavar em água destilada.
2. Mergulhar a lâmina em hidróxido de bário octahidratado 5 % (Ba(OH)₂) a 37° C, de 3 a 5 minutos. Lavar em água destilada.
3. Passar as lâminas rapidamente em HCl 1N em banho-maria a 60° C.
4. Incubar em 2xSSC pH 7,0 a 60° C durante 30 minutos. Lavar em água destilada.

5. Corar com solução de Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8 (1:20) durante 30 minutos. Lavar em água destilada e secar.

II.1.2.3. Coloração das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), segundo HOWELL & BLACK (1980)

1. Hidrolisar as lâminas em HCl 1N a 60° C de 7 a 10 minutos. Lavar em água destilada.
2. Pingar uma gota de solução coloidal reveladora (1 g de gelatina da Merck em 50 ml de água destilada com 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO₃) 50 % sobre o material da lâmina.
3. Cobrir com lamínula e incubar por 2 a 5 minutos em câmara úmida a 60° C.
4. Retirar a lamínula e lavar em água destilada e corar com solução de Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8 (1:30) durante 20 segundos. Lavar em água destilada e secar.

II.1.2.4. Bandamento R (RBG) por incorporação de 5-BrdU, modificada a partir de DUTRILLAUX & COUTURIER (1981)

1. Nas últimas 15 a 20 horas do ciclo celular, adicionar ao frasco de cultura uma solução de 5-BrdU a uma concentração final de 50 µg/ml. Envolver o frasco em papel escuro e incubá-lo em estufa a 28° C.
2. Acrescentar 50 µl de solução de colchicina 0,01 % para cada 5 ml de material e manter o frasco de cultura a 28° C por 40 minutos, ainda envolto em papel escuro.
3. Colher o material conforme descrito anteriormente para obtenção de preparações cromossômicas. Em seguida, proceder a coloração.

4. Mergulhar a lâmina em solução de Hoechst 33258 na concentração 10 µg/ml, numa cuba Coplin coberta com papel alumínio, por 20 minutos. Lavar em água destilada.
5. Passar a lâmina em solução de 2xSSC em temperatura ambiente e montá-la com 2 a 3 gotas da mesma solução.
6. Preparar uma câmara úmida com 2xSSC e deixar sob luz negra por 2 horas.
7. Lavar em água destilada e manter em solução de 2xSSC a 60° C por 20 minutos.
8. Corar com solução de Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8 (1:30) durante 7 minutos. Lavar em água destilada e secar.

II.1.3. Análise dos resultados

As preparações citogenéticas foram analisadas em coloração convencional, o que permitiu o estabelecimento do número diplóide com a análise de um número variável de metáfases e, quando possível, em bandamento C (CBG) (SUMNER, 1972), R (RBG) (DUTRILLAUX & COUTURIER, 1981) e coloração por nitrato de prata para a localização das Ag-RONs (HOWELL & BLACK, 1980).

As melhores metáfases, nas diferentes técnicas de coloração, foram fotografadas em microscópio da marca Zeiss em objetiva 100 de imersão com filtro verde, usando filme Kodak Imagelink HQ ASA 64. As fotos foram ampliadas em nosso laboratório em papel Kodabrome Print RC F-3 (Kodak), reveladas com Dektol diluído em água, na proporção de 1:3 e fixadas.

Os cariótipos foram montados levando-se em conta a morfologia, o tamanho e a posição centromérica dos cromossomos, dispostos em ordem decrescente de tamanho. As análises e comparações dos padrões de bandas C e R foram feitas por fotos e emparelhamento dos pares de homólogos.

II.2. Estudos moleculares

O DNA genômico total foi extraído de amostras de fígado ou músculo armazenados em ultrafreezer à -70°C ou etanol absoluto (protocolo de FETZNER, 1999). As pinças e tesouras utilizadas para retirar alíquotas de tecido eram esterilizadas em formol entre um exemplar e outro. Todo o manuseio foi feito com luvas cirúrgicas descartáveis e o material plástico e soluções submetidos à esterilização em autoclave e luz ultravioleta em forno UV (Spectrolinker XL-1000 UV Crosslinker- Spectronics Corporation). Tanto para a purificação do produto amplificado como para a purificação do produto da reação de seqüenciamento existem dois procedimentos diferentes, ambos realizados com sucesso.

II.2.1. Extração do DNA

Para tecidos armazenados em Etanol, devemos retirar uma parte do material e secá-lo com uma toalha de papel, colocando-o em um tubo de 1,5 ml, centrifugado por 5 minutos em centrífuga a vácuo ou 10 minutos em uma bomba de vácuo, até ficar bem seco. Proceder à lise celular. Já tecidos armazenados no Ultra-Freezer (-80 °C) devem ser alicotados em um tubo de 1,5 ml e proceder diretamente à lise celular.

II.2.1.1. Lise celular

- 1) Adicionar de 300 a 900 µl da solução de lise celular (proporcional à quantidade de material). “Triturar” o tecido com um pistilo;
- 2) Adicionar de 3 a 9 µl de Proteinase-K (20 mg/ml) (proporcional à quantidade de solução de lise). Misturar invertendo o tubo várias vezes. Incubar em estufa a 55°C por algumas horas ou por toda a noite, até o tecido dissolver completamente. Seguir com o tratamento com RNase (10 mg/ml).

II.2.1.2. Tratamento com RNase

- 1) Adicionar 4 µl de RNase (10 mg/ml);
- 2) Misturar invertendo algumas vezes o tubo e incubar em banho-maria a 37°C por 60 minutos. Retirar da estufa e deixar uns 20 minutos à temperatura ambiente. Proceder à precipitação das proteínas.

II.2.1.3. Precipitação das proteínas

- 1) Adicionar 300 µl de Acetato de amônio;
- 2) Misturar vigorosamente (vortex) por cerca de 20 segundos. Incubar no gelo por 30 minutos;
- 3) Centrifugar por 3 minutos em ultracentrífuga para a precipitação das proteínas, RNAs, e outras moléculas. Retirar a suspensão contendo o DNA e transferir para um tubo de 2,0 ml. Descartar o pellet. Prosseguir com a precipitação do DNA. Se após a centrifugação, não se formar um pellet adequado, transferir o sobrenadante para um novo tubo e repetir os passos 2 e 3.

II.2.1.4. Precipitação do DNA

- 1) Adicionar de 300 a 900 µl de isopropanol (proporcional à quantidade utilizada de solução de lise celular). Misturar invertendo várias vezes. Deixar por toda a noite no freezer a -20°C;
- 2) No dia seguinte, centrifugar por 6 minutos a 14.000 rpm;
- 3) Retirar o sobrenadante com muito cuidado. Inverter os tubos em cima de um pedaço de papel higiênico;
- 4) Acrescentar 900 µl de etanol 70% e inverter várias vezes para lavar o DNA;

5) Centrifugar por 3 minutos a 14.000 rpm. Retirar com cuidado o sobrenadante.

Inverter os tubos em papel higiênico;

6) Colocar as amostras na centrífuga a vácuo por 20 minutos. É essencial que o pellet esteja seco; se depois desse período ainda permanecer etanol, volte a utilizar a centrífuga a vácuo. Proceder à hidratação.

II.2.1.5. Hidratação do DNA

- 1) Adicionar de 25 a 200 µl de tampão TLE, dependendo do tamanho do pellet;
- 2) Deixar à temperatura ambiente até o dia seguinte;
- 3) No dia seguinte, guardar o DNA em geladeira (2-8°C) ou no freezer (-20°C).

II.2.1.6. Verificação da extração em gel de agarose

- 1) Preparar um gel com 0,7 g de agarose + 45 ml de TAE (1X);
- 2) Preparar as amostras utilizando 2 µl de DNA + 1,0 µl de corante blue juice. Usar como marcador o 100 bp DNA (DNA de fago lambda de concentração conhecida).

II.2.1.7. Quantificação do DNA

Para a quantificação do DNA presente nas amostras, foi utilizado espectrofotômetro modelo Ultrospec 1000- Pharmacia Biotech, conforme o seguinte procedimento:

- 1) Em um tubo de 1,5 ml, misturar 248 µl de H₂O miliq. com 2 µl do DNA extraído.
Misturar bem;
- 2) Calibrar o espectrofotômetro com 250 µl de H₂O miliq.;
- 3) A cada medição, lavar bem a cubeta.

Para obter a concentração de DNA, proceder aos seguintes cálculos:

$$X = \frac{Y + 0,0070}{0,0302} \quad \text{onde, } X = \text{quantidade de DNA na cubeta}$$

II.2.2. Amplificação das seqüências gênicas de interesse (PCR)

Para a amplificação das seqüências gênicas de interesse, foi utilizado o Termociclador: GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), onde foram colocadas as amostras e as seguintes soluções:

- DNA = 1,0 µl (Concentração de 20 ng/µl a 40 ng/µl)
- DNTPs (5 mM) = 4,0 µl
- Tampão (10X) = 2,5 µl
- Mg (25mM) = 2,5 µl
- Primers (10 µlM) cadeia leve = 2,0 µl
- Primers (10 µlM) cadeia pesada = 2,0 µl
- Taq polimerase (2,5U) = 0,5 µl
- H₂O miliq. = 10,5 µl

OBS: As quantidades de magnésio, DNA e água podem variar de acordo com o gene a ser sequenciado.

As amplificações foram então verificadas em gel de agarose 1% (corado com brometo de etídeo) em corridas de cerca de 20 minutos a 160 V, com marcador Low DNA Mass Ladder e tampão Blue Juice. O gel foi fotografado sobre transluminador de ultravioleta FOTO/UV®26 (FOTODYNE Inc.) utilizando equipamento Polaroid MP4 + Instant Camera System e filme Polaroid 667. Confirmado o sucesso no experimento, proceder à purificação dos produtos da reação de sequenciamento:

PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO (KIT DE PURIFICAÇÃO GENECLAN® DA BIO 101)

- 1) Transferir os produtos de PCR para tubos de 2 ml;
- 2) Adicionar 250 µl de NaI e 3 µl de Glassmilk. Misturar suavemente por 30 minutos;
- 3) Centrifugar por 10 segundos;
- 4) Desprezar o sobrenadante e adicionar 250 µl de New Wash (mantê-la no gelo);
- 5) Centrifugar por 10 segundos;
- 6) Repetir procedimentos 4 e 5 por mais duas vezes;
- 7) Adicionar H₂O miliq. Para PCRs fracos de 7-8 µl de H₂O miliq. e para bons PCRs, máximo de 20 µl;
- 8) Deixar os tubos à 58°C por 10 minutos;
- 9) Centrifugar por 10 segundos. Retirar com cuidado o sobrenadante. Proceder à reação de seqüenciamento.

PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO (KIT EXOSAP™ DA USB CORPORATION)

- 1) Adicionar 2 µl de ExoSAP para 5 µl de PCR. Manter em gelo;
  - 2) Colocar a solução na máquina de PCR.
- (condições do termociclador: 37°C por 40 minutos e 80°C por 15 minutos)

II.2.3. Reação de seqüenciamento

Para cada exemplar, são necessárias duas preparações distintas, uma para a cadeia leve e a outra para a cadeia pesada. Abaixo estão os produtos e as concentrações dos mesmos para cada reação de seqüenciamento de 5 µl.

-2,0 µl primer 5 µM

-1,0 µl do produto de PCR purificado

-2,0 µl de Big Dye

(condições do termociclador: 25 ciclos: 96°C /10 seg., 50°C /5 seg. e 60°C /4 min.)

A seguir a reação de sequenciamento foram purificadas seguindo os seguintes protocolos:

PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO (COLUNAS DE SEPHADEX)

- 1) Fazer colunas com 800 µl de sephadex, poucos minutos antes de usá-las;
- 2) Centrifugar a 4.000 rpm por 4 minutos;
- 3) Aos produtos de seqüenciamento, adicionar 10 µl de H₂O miliq.;
- 4) Aplicar os produtos na coluna pelo centro, utilizando tubos de 1,5 ml devidamente identificados (cadeia leve e pesada por indivíduo);
- 5) Centrifugar as colunas a 4.000 rpm por 4 minutos;
- 6) Desprezar o conteúdo das colunas. O DNA estará no tubo de 1,5 ml;
- 7) Secar em centrífuga a vácuo por 15 minutos ou em banho-seco a 90°C por aproximadamente 2 minutos. As amostras estão prontas para leitura no seqüenciador automático. Mantê-las a -20°C no escuro.

PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO (ISOPROPANOL/ETANOL)

- 1) Adicionar 80 µl de isopropanol 75%. Misturar vigorosamente (vortex);
- 2) Deixar 20 minutos a temperatura ambiente;
- 3) Centrifugar 25 minutos a 13.000 rpm. Retirar o isopropanol;
- 4) Adicionar 200 µl de etanol 70%. Misturar vigorosamente (vortex);
- 5) Centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm;
- 6) Retirar o etanol secar a 95°C por 2 minutos.

Manter as amostras prontas para leitura no seqüenciador automático a -20°C no escuro. As reações de seqüenciamento purificadas foram seqüenciadas pela equipe técnica do Departamento de Botânica (IB-USP), utilizando Sequenciador automático: ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer de 96 capilares (Applied Biosystems) e pelo Serviço de Seqüenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano, IB-USP, onde são fornecidas amostras de produto de PCR amplificado e purificado e os *primers*. As reações com nucleotídeos marcados são realizadas utilizando o APBiotech DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase), depois são aplicadas no seqüenciador MegaBACE™ 1000 de 96 capilares (Amersham Biosciences) e analisadas com o software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12.

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, R. J.; BULL, J. J.; MENGDEN, G. A. Chromosomes of *Elaphe subcularis* (Reptilia: Serpentes) with the description of an in vivo technique for preparation of snake chromosomes. *Experientia* 27: 1228-1229, 1971.
- BOGART, J. P. Method for obtaining chromosomes. *Caldasia* XI: 1973, p. 29-40.
- DUTRILLAUX, B.; COUTURIER, J. *La pratique de l'analyse chromosomique*. Paris, 1981, 86 p.
- FETZNER, J. Extracting high-quality DNA from shed reptiles skins: a simplified method. *Biotechniques* 26: 1052-1054, 1999.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015, 1980.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia I: Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66: 361-388, 1978.
- SUMMER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl. Cell. Res.* 75: 304-306, 1972.
- YONENAGA-YASSUDA, Y. *Polimorfismos cromossômicos em roedores brasileiros*. São Paulo, 214p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1972.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; KASAHARA, S.; CHU, T. H.; RODRIGUES, M. T. High-resolution RBG-banding pattern in the genus *Tropidurus* (Sauria, Iguanidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 48: 68-71, 1988.

Capítulo III – Resultados

Esse capítulo será apresentado na forma de quatro artigos científicos:

- I. Padrões de bandamento e evolução cromossômica em cinco espécies de lagartos neotropicas da subfamília Teiinae (Squamata: Teiidae).
- II. Variações no padrão de bandas C e no número de microcromossomos em lagartos da subfamília Tupinambinae (Squamata: Teiidae).
- III. Filogenia molecular de lagartos da família Teiidae, com ênfase na tribo cnemidophorini (Squamata).
- IV. Deleções parciais no proto-oncogene *c-mos* podem favorecer a reprodução partenogenética nos Squamata?

I. Padrões de bandamento e evolução cromossômica em cinco espécies de lagartos neotropicais da subfamília Teiinae (Squamata: Teiidae).

Abstract

Karyotypes of five species of South American teiid lizards from subfamily Teiinae (*Ameiva ameiva*, *Cnemidophorus ocellifer*, *Kentropyx calcarata*, *K. paulensis* and *K. vanzoi*) are herein described and compared on the basis of conventional and silver staining, and CBG and RBG banding patterns. Meiotic data are also included. Karyotypes of *K. paulensis*, *K. vanzoi* and *C. ocellifer* are reported here for the first time. Inter-generic variability in Ag-NORs location was detected with NORs occurring at the end of long arm of pair 1 in *K. calcarata*, *K. paulensis* and *K. vanzoi*; pair 5 in *C. ocellifer* and pair 7 in *A. ameiva*. The location of NORs in *A. ameiva* corroborates the molecular-based hypothesis that the genus *Ameiva* is paraphyletic. Inter-population heteromorphism in Ag-NORs size was detected between populations of *C. ocellifer* here sampled. RBG and CBG banding data demonstrated that the banded condition of the *C. ocellifer* chromosomes is due to multiple pericentric inversion events instead of addition of constitutive heterochromatin. Differential-staining techniques used here revealed valuable information about Teiinae diversity and made it possible to compare these species, contributing to both the better comprehension of their chromosomal evolution and issues on taxa systematics.

Key words: Chromosomal evolution, karyotype, differential staining, lizards, Teiidae.

Resumo

Cariótipos de cinco espécies de lagartos teídeos sulamericanos da subfamília Teiinae (*Ameiva ameiva*, *Cnemidophorus ocellifer*, *Kentropyx calcarata*, *K. paulensis* e *K. vanzoi*) são aqui descritos e comparados em coloração convencional e por nitrato de prata, e padrões de bandas CBG e RBG. Dados meióticos também estão incluídos. Cariótipos de *K. paulensis*, *K. vanzoi* e *C. ocellifer* são apresentados aqui pela primeira vez. Foi observada variação inter-genérica na localização das Ag-RONs: na região distal do braço longo do par 1 em *K. calcarata*, *K. paulensis* e *K. vanzoi*; par 5 em *C. ocellifer* e par 7 em *A. Ameiva*. A localização das Ag-RONs em *A. ameiva* corrobora a hipótese que o gênero *Ameiva* é parafilético. Heteomorfismo inter-populacional no tamanho das Ag-NORs foram detectados entre populações de *C. ocellifer* aqui amostradas. Padrões de bandas RBG e CBG demonstraram que a presença de cromossomos com dois braços no cariótipo de *C. ocellifer* deve-se a eventos múltiplos de inversões pericêntricas ao invés de adição de heterocromatina constitutiva. As técnicas de coloração diferencial aqui apresentadas fornecem importantes informações sobre a diversidade cariotípica da subfamília Teiinae e possibilitou a comparação entre essas espécies, contribuindo tanto para a melhor compreensão da evolução cromossômica e da sistemática do grupo.

Palavras chave: Evolução cromossômica, cariótipo, coloração diferencial, Teiidae, lagartos.

Introdução

A família Teiidae é um grupo de lagartos exclusivos do Novo Mundo, que se distribui da costa oeste dos Estados Unidos, passando pela América Central até o Norte da Argentina (POUGH *et al.* 2001) e compreende dez gêneros atuais e cerca de 120 espécies. GORMAN (1970) sugeriu a divisão dos Teiidae em dois grupos citogenéticos: o cariótipo do grupo *Dracaena* ($2n= 34-38$) é caracterizado pela presença de macro e microcromossomos e os do grupo *Ameiva* ($2n= 30-56$) que apresenta uma série gradual de cromossomos. PRESCH (1974, 1983) com base em dados osteológicos, elevou ambos os grupos em duas tribos: Teiini, com os gêneros *Ameiva*, *Cnemidophorus*, *Dicrodon*, *Kentropyx* e *Teius*, e Tupinambini (*Callopistes*, *Crocodilurus*, *Dracaena* e *Tupinambis*). Posteriormente, ESTES (1983, 1988) elevou ambas tribos para as subfamílias Teiinae e Tupinambinae.

Apesar do monofiletismo de ambas subfamílias serem evidentes, as relações filogenéticas dentro das subfamílias, assim como entre e dentro dos gêneros de teídeos são disputadas. Dentre as cinco hipóteses propostas para os Teiinae (GORMAN 1970, PRESCH 1974, RIEPPEL 1980, DENTON & O'NEIL 1995, REEDER *et al.* 2002), pelo menos três são controversas, especialmente envolvendo a tribo Cnemidophorini (*Ameiva*, *Aspidoscelis*, *Cnemidophorus* e *Kentropyx*, *sensu* Reeder *et al.* 2002). Recentemente, REEDER *et al.* (2002), com base em dados morfológicos e moleculares encontrou evidência para o estado parafilético do gênero *Cnemidophorus*, onde as espécies centro e norte-americanas foram re-aloçadas no gênero *Aspidoscelis*. No mesmo artigo o parafiletismo do gênero *Ameiva* também foi identificado.

A incongruência observada entre as hipóteses filogenéticas alternativas para os Teiinae é principalmente atribuída a uma amostragem inadequada e erros de identificação taxonômica, assim como a falta de estudos envolvendo múltiplos

conjuntos de dados, necessários para a proposição de hipóteses filogenéticas mais robustas para a família. Muitas espécies novas tem sido descritas para o gênero *Cnemidophorus* (COLE & DESSAUER 1993, MARKEZICH *et al.* 1997, ROCHA *et al.* 1997, 2000, FELTRIM & LEMA 2000, DIAS *et al.* 2002, COLLI *et al.* 2003 a,b, SOARES *et al.* 2003), principalmente na América do Sul, refletindo a necessidade de extensas revisões e estudos multidisciplinares envolvendo espécies e populações dessa região geográfica.

O número diplóide dos lagartos da subfamília Teiinae varia de $2n=46$ até $2n=56$ com a maioria dos cromossomos acrocêntricos, exceto para algumas espécies dos gêneros *Aspidoscelis* e *Cnemidophorus*. GORMAN (1970) propôs um cariótipo semelhante a *Ameiva* e *Kentropyx* com 50 cromossomos acrocêntricos como ancestral para esta subfamília, que teria se originado através de múltiplas fissões cêntricas nos macrocromossomos do cariótipo ancestral $2n=36$ (12 macrocromossomos e 24 microcromossomos), semelhante aos dos Tupinambinae. OLMO (1986) considera que rearranjos Robertsonianos devam estar envolvidos na diferenciação de ambas subfamílias, mas a falta de bandamentos cromossômicos que poderiam contribuir significativamente na compreensão da evolução cromossômica do grupo, é um fator limitante.

Cerca de 65% das espécies de teíneos foram estudadas citogeneticamente (REEDER *et al.* 2002), mas a ampla maioria dos dados envolve espécies do gênero *Aspidoscelis* e apenas a descrição do cariótipo em coloração convencional, sem a apresentação de bandamentos cromossômicos, essenciais no estabelecimento de homologias mais precisas que poderiam contribuir para a compreensão da evolução cromossômica e relações filogenéticas do grupo. Cariótipos com bandas foram descritos para cerca de 8% dos Teiinae (BICKHAM *et al.* 1976, BULL 1978, SCHMID &

GUTTENBACH 1988, PORTER *et al.* 1991, 1994, VERONESE *et al.* 2003, PECCININI-SEALE *et al.* 2004), outros sendo controversos (PECCININI-SEALE & ALMEIDA 1986, SITES *et al.* 1990, ROCHA *et al.* 1997) ou não ilustrados (ROCHA *et al.* 1997, VERONESE *et al.* 2003).

Neste artigo nós descrevemos e comparamos os cariótipos de cinco espécies de teídeos Sul-americanos: *Ameiva ameiva*, *Cnemidophorus ocellifer*, *Kentropyx calcarata*, *K. paulensis* e *K. vanzoi*, com base em coloração convencional e por nitrato de prata, e bandamentos CBG e RBG. O uso de diferentes técnicas de coloração revelou diversos caracteres filogenéticos valiosos que podem contribuir para a compreensão da diversidade cariotípica, evolução cromossômica e estudos filogenéticos nos Teiidae.

Materiais e métodos

Análises citogenéticas foram realizadas em um total de 33 espécimes de *Ameiva ameiva*, *Cnemidophorus ocellifer*, *Kentropyx calcarata*, *K. paulensis* e *K. vanzoi* de diferentes localidades brasileiras (Tabela 1), que foram identificados e seu ID provisório será relacionado com o ID da coleção herpetológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

Preparações cromossômicas foram obtidas a partir de medula óssea, intestino, fígado e baço, conforme KASAHARA *et al.* (1987), ou de cultura de fibroblastos do músculo caudal (YONENAGA-YASSUDA *et al.* 1988). Análises meióticas foram realizadas em preparações de testículo.

O número diplóide e morfologia cromossômica foram estabelecidos após coloração convencional. Cromossomos mitóticos foram analisados após coloração CBG e por nitrato de prata, segundo técnicas de rotina. Bandamento RBG foram obtidos em

cultura de fibroblastos após tratamento com 5-bromodeoxiuridina (5-BrdU) por cerca de 16 horas, seguido por coloração FPG (DUTRILLAUX & COUTURIER 1981).

Resultados

Coloração convencional

Todos os teíneos estudados apresentaram cariótipo composto por uma série gradual de 50 cromossomos. Em *Ameiva ameiva* (Figura 1a), *Kentropyx calcarata*, *K. paulensis* e *K. vanzoi* (Figura 1b) os cromossomos são acrocêntricos enquanto que em *Cnemidophorus ocellifer* eles são todos com dois braços (Figura 1c). Constrições secundárias foram observadas no fim do braço longo do par 5 em *C. ocellifer* e no final do par 1 em todas as espécies de *Kentropyx*. Cromossomos sexuais heteromórficos não foram detectados.

Análises de células meióticas realizadas em machos de *K. calcarata*, *K. vanzoi* e *C. ocellifer* revelaram 25 bivalentes com quiasmas terminais e intersticiais em células diplotênicas (Figura 2). Bivalentes heteromórficos não foram observados.

Coloração diferencial

Foi detectado um único par portador das Ag-RONs em todas as espécies estudadas. Em *Ameiva ameiva* as Ag-RONs foram localizadas na região terminal do braço longo do par 7 (Figura 3a), enquanto que em todas as espécies de *Kentropyx* elas foram observadas nas regiões das constrições secundárias na região telomérica do braço longo do par 1 (como o padrão de *K. calcarata* Figura 3b). *C. ocellifer* apresentou Ag-RONs no final do braço longo do par 5 (Figura 3c), mas os exemplares provenientes da Bahia (Tabela 1) apresentaram heteromorfismo no tamanho da Ag-RONs: um

homólogo apresentou RONS duas vezes maiores que a do outro homólogo em mais de 90% das células analisadas (56 de 60 no LG 488, e 45 de 48 no LG 511, Figura 3d).

Blocos heterocromáticos sutis foram observados nas regiões centroméricas e teloméricas da maioria dos pares de *A. ameiva*, *C. ocellifer* e *K. paulensis* após o bandamento C (Figura 4). O uso da 5-BrdU em cultura de fibroblastos nos permitiu identificar precisamente cada par cromossômico de *A. ameiva*, *C. ocellifer*, *K. calcarata* e *K. vanzoi*, assim como realizar análises comparativas entre os maiores cromossomos com base no padrão de replicação (bandamento RBG). Pares 1 a 13 de *A. ameiva*, *K. calcarata* e *K. paulensis* são homólogos em seu comprimento todo e a comparação entre estes e os cromossomos de *C. ocellifer* revelaram que a condição com dois braços desta espécie deve-se a eventos múltiplos de inversão pericêntrica envolvendo a porção proximal dos cromossomos (Figura 5a, b).

Discussão

Esse artigo é o primeiro que aplica técnicas de coloração diferencial para estudar os cariótipos de diversas espécies de teídeos e reforça a importância dessa abordagem para uma melhor compreensão das tendências da evolução cromossômica neste grupo de lagartos neotropicais.

Coloração convencional

Ameiva ameiva apresentou o mesmo número diplóide ($2n=50$) anteriormente descrito na literatura para espécimes de outras localidades (PECCININI-SEALE & ALMEIDA 1986, GORMAN 1970, BEÇAK *et al.* 1972, SCHMID & GUTTENBACH 1988, SITES *et al.* 1990, VERONESE *et al.* 2003). Todos esses autores descreveram o cariótipo de *A. ameiva* como formado por macro e microcromossomos acrocêntricos.

Como não há uma clara separação de tamanho entre esses dois grupos de cromossomos, nós preferimos classificar-los como uma série gradual de cromossomos acrocêntricos. VERONESE *et al* (2003) encontrou três pequenos pares metacêntricos em espécimes de Santarém, estado do Pará (Brasil), que levaram-na a postular que “a presença de uma média de três pares de pequenos cromossomos metacêntricos podem ser indicados como um marcador citogenético para toda a família”. Nós consideramos essa sugestão duvidosa, pois algumas espécies de teídeos apresentam todos os cromossomos acrocêntricos (*e.g. Kentropyx*), e a classificação morfológica dos menores elementos do cariótipo são pouco precisas. Além disso, nenhuma homologia entre esses pequenos cromossomos pode ser inferida em coloração convencional ou mesmo coloração RBG. Nós preferimos considerar essa variação como um polimorfismo da espécie *A. ameiva*.

Cnemidophorus ocellifer é um nome de conveniência usado por um complexo de espécies (Rodrigues 1987, Rocha *et al.* 2000). Apesar de algumas espécies novas desse complexo terem sido descritas, como *C. nativo*, *C. litorallis*, *C. mumbuca*, muitas outras permanecem desconhecidas. O cariótipo de *Cnemidophorus ocellifer* aqui descrito difere no número diplóide daqueles descritos para outras duas espécies do complexo *ocellifer*: *C. nativo* ($2n=48$, ROCHA *et al.* 1997) e *C. littoralis* ($2n=46$, XY, PECCININI-SEALE *et al.* 2004) ambos com ao menos cinco pares com dois braços. Como a diferenciação cromossômica entre ambas subfamílias de Teiidae envolveu provavelmente múltiplas fissões cêntricas em macrocromossomos, resultando no cariótipo todo acrocêntrico semelhante a *A. ameiva/Kentropyx*, a ocorrência de cromossomos com dois braços pode representar uma sinapomorfia do grupo *ocellifer*, uma vez que *C. lemniscatus* (do grupo *lemniscatus*) apresenta, em algumas populações e muitas vezes em estado polimórfico, somente o par 1 com dois braços (LOWE *et al.*

1970, PECCININI-SEALE & FROTA-PESSOA 1974), e os pares 3 e 14 a 16 em *C. lacertoides* (do grupo *lacertoides*, VERONESE *et al.* 2003).

Os cariótipos de *Kentropyx paulensis* e *K. vanzoi* são também descritos aqui pela primeira vez e compartilham o mesmo número diplóide ($2n=50$) e morfologia cromossômica daqueles descritos para espécimes de *Kentropyx calcarata* do Brasil (este estudo) e Suriname (COLE *et al.* 1995), assim como *Kentropyx borckiana* e *K. striata* das Guianas (COLE *et al.* 1995).

Coloração diferencial

Apesar das similaridades cariotípicas em coloração convencional, bandamento C e R entre *A. ameiva* e as espécies de *Kentropyx* estudadas aqui, ambos os gêneros diferem na localização das Ag-NORs.

Todos os espécimes de *A. ameiva*, amostrados aqui de diversas localidades brasileiras, mostraram Ag-RONs exclusivamente na região telomérica do braço longo do par 7, em concordância com os dados apresentados por VERONESE *et al.* (2003) para espécimes de Santarém, estado do Pará, e por SCHMID & GUTTENBACH (1988), usando hibridação *in situ* com sondas ribossomais. Entretanto, PECCININI-SEALE & ALMEIDA (1986) e SITES *et al.* (1990) descrevem variação inter-individual no número de RONS envolvendo os pares 1, 2, 7, 16, 18, 19 e alguns pequenos cromossomos em espécimes de Santarém e Capanema, estado do Pará, e Urucurituba, estado do Amazonas. Nós suspeitamos que a maioria dos sinais de Ag-RONs observados por esses autores não são verdadeiramente sítios de RONS, porque os espécimes de Santarém analisados por VERONESE *et al.* (2003), apresentam apenas um único par portador das Ag-RONs (par 7). Além disso, existem algumas incertezas acerca da universalidade da coloração de prata na identificação de sítios ativos das

RONs, uma vez que esta técnica parece revelar sítios Ag-positivos que não correspondem necessariamente a sítios de rDNA, como regiões heterocromáticas (DOBIGNY *et al.* 2002).

Os cariótipos de *K. calcarata*, *K. paulensis* e *K. vanzoi* exibem Ag-RONs na região telomérica do braço longo do par 1, a mesma região da constrição secundária. Similarmente, COLE *et al.* (1995) observaram constrições secundárias nessa mesma região para as espécies Sul americanas *K. calcarata*, *K. striata* e *K. borckiana*.

Nossas descobertas sobre a localização das RONs em espécies de teíneos estão de acordo com PORTER *et al.* (1991) que ressalta que a distribuição das seqüências de DNAr mudou diversas vezes durante a evolução dos Squamatas apesar da morfologia conservada de seus cromossomos, indicando que a distribuição das RONs pode representar um importante marcador para os gêneros de lagartos teíneos. Nos gêneros relacionados, *Tupinambis* (VERONESE *et al.* 2003) e *Crocodilurus* (SANTOS *et al.*, artigo 3 dessa tese) pertencentes a subfamília Tupinambinae, Ag-RONs ocorrem na região da constrição secundária no braço longo do par 2. Apesar da falta de dados de coloração por nitrato de prata, nos demais gêneros *Callopiastes*, *Dicrodon* e *Dracaena*, a presença da constrição secundária na par 2 também é descrita (GORMAN 1970).

Considerando que o braço longo do par 2 é o maior braço do cariótipo dos tupinambíneos, é possível que o par 1 portador das Ag-RONs dos teíneos *C. lemniscatus* e as espécies do gênero *Kentropyx* pode corresponder ao braço longo do par 2, portador da Ag-RON dos Tupinambinae. Se esse for o caso, o par 1 portador da Ag-RON deve representar um carácter plesiomórfico dentre os Teiinae. A distribuição das RONs também corroboram o estado parafilético do gênero *Ameiva* proposto por REEDER *et al.* (2002), uma vez que a espécie da América central e do norte *Ameiva*

auberi apresenta seqüências de DNAr em um par de microcromossomos (PORTER *et al.* 1991, 1994), enquanto que na espécie Sul americana *A. ameiva* a RON está no par 7.

Ag-RONs na região terminal do braço longo do par 5 foram encontrados na cariótipo de *C. ocellifer*. As RONs foram heteromórficas em tamanho nos espécimes da Bahia, enquanto que nas demais populações eram homomórficas. Infelizmente, devido a dificuldade em se obter metáfases de boas qualidades em lagartos, a descrição das RONs para *C. nativo* (ROCHA *et al.* 1997) e *C. littoralis* (PECCININI-SEALE *et al.* 2004) são muito duvidosas. Em *C. littoralis*, as RONs foram localizadas na região terminal do braço longo do 8, mas considerando que o tamanho dos pares 4 a 9 são muito similares, especialmente em preparações de células epiteliais de intestino, como as apresentadas nesses artigos, nós não descartamos a possibilidade de que as Ag-RONs possam ser homólogas. Estudos futuros envolvendo a localização das RONs nessas espécies e em outras populações de *C. ocellifer* são necessárias para a elucidação desta variação, mas é evidente que a localização das RONs representam um caracter diagnóstico e importante na diferenciação dos Teiinae. A recente descrição de novas espécies de *Cnemidophorus* do grupo *ocellifer* (ROCHA *et al.* 1997, 2000, DIAS *et al.* 2002, COLLI *et al.* 2003 a,b) confirma que *C. ocellifer* é um complexo de espécies e que a variação nas Ag-RONs detectadas podem contribuir para definir algumas espécies (KASAHARA *et al.* 1987, PELLEGRINO *et al.* 2005).

A. ameiva, *C. ocellifer* e *K. paulensis* compartilham padrões similares de bandas C caracterizados por bandas positivas na maioria das regiões pericentroméricas e algumas teloméricas. Esses resultados, juntamente com o bandamento R, indicam que a condição com dois braços em *C. ocellifer* não se deve a eventos de adição/deleção de heterocromatina constitutiva. Além disso, a ausência de heteromorfismo na distribuição da heterocromatina constitutiva entre pares homólogos corrobora dados meióticos que

não revelaram cromossomos sexuais heteromórficos nessa espécie. Em teídeos, cromossomos sexuais foram descritos para a espécie *Aspidoscelis tigris* (XX:XY BULL 1978) após bandamento C, e em *C. littoralis* em coloração convencional (XX:XY, PECCININI-SEALE *et al.* 2004).

Padrões de bandas R revelaram completa homologia entre os pares 1 a 13 de *A. ameiva*, *C. ocellifer*, *K. calcarata* e *K. paulensis*, apesar das diferenças na localização das Ag-RONs. A análise comparativa dessas quatro espécies de Teiinae revelou que a condição com dois braços presentes no cariótipo de *C. ocellifer* deve-se a eventos múltiplos de inversões pericêntricas em um cariótipo acrocêntrico ancestral semelhante aos de *Ameiva* ou *Kentropyx*. Esse mesmo processo foi sugerido para a diferenciação entre os cariótipos dos geonídeos brasileiros *Phyllopezus periosus* e *P. pollicaris* (PELLEGRINO *et al.* 1997, PELLEGRINO *et al.* 1999). Padrões de bandas R tem sido descritos para poucas espécies de lagartos revelando diversos caracteres como sítios frágeis (SANTOS *et al.* 2003), cromossomos sexuais (BERTOLOTTO *et al.* 2001), cromossomos supernumerários (BERTOLOTTO *et al.* 2004) assim como bandas longitudinais que contribuem significativamente para a compreensão da evolução cromossômica especialmente dentro dos Gymnophthalmidae (YONENAGA-YASSUDA *et al.* 1996, 2005).

Finalmente, reforçamos a importância do aumento na qualidade das preparações cromossômicas em espécies neotropicais da família Teiidae, essenciais não somente para a compreensão da evolução cromossômica, ou mesmo a proposta de hipóteses filogenéticas, como também para avaliar a diversidade nesse grupo de lagartos, especialmente dentro do complexo *Cnemidophorus ocellifer*.

Agradecimentos

Os autores são gratos a Vinícius Xavier da Silva, Gabriel Skuk, Dante Pavan, José Manuel Martins e Felipe Curcio por ajuda em campo, e a Renata C. Amaro-Ghilardi, Carolina E. V. Bertolotto and Cyntia Esteves de Lima por auxílio técnico. Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Referências Bibliográficas

- Beçak ML, Beçak W, Denaro L (1972) Chromosome polymorphism, geographical variation and karyotypes in Sauria. *Caryologia* 25:313-326.
- Bickham JW (1976) Patterns and modes of chromosomal evolution in reptiles. In: *Chromosomes in Evolution of Eukaryotic Groups*. Eds. Sharma, A. K. & Sharma, A., 1984. vol. II, p.13-39.
- Bertolotto CEV, Rodriguez MT, Yonenaga-Yassuda Y (2001) Banding patterns, múltiple sex chromosome system and localization of telomeric (TTAGGG)_n sequences by FISH on two species of *Polychrus* (Squamata, Polychrotidae). *Caryologia*, 54(3): 217-226.
- Bertolotto CEV, Pellegrino KCM, Yonenaga-Yassuda (2004) Occurrence of B chromosomes in lizards: A review. *Cytogenetics and Genome Research*, 106: 243-246.
- Bull JJ (1978) Sex chromosome differentiation: an intermediate stage in a lizard. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 20: 205-209.
- Colli GR, Caldwell JP, Costa GC, Gainsbury AM (2003)a A new species of *Cnemidophorus* (Squamata, Teiidae) from the Cerrado biome in central Brazil. *Occasional Papers Of The Oklahoma Museum Of Natural History*, 14: 1-14.
- Colli, GR, Costa GC, Garda AA (2003)b. A critically endangered new species of *Cnemidophorus* (Squamata, Teiidae) from a Cerrado enclave in southwestern Amazonia, Brazil. *Herpetologica* 59(1): 76-88.
- Cole CJ, Dessauer HC (1993) Unisexual and bisexual whiptail lizards of the *Cnemidophorus lemniscatus* complex (Squamata: Teiidae) of the Guyana Region, South America, with the description of new species. *American Museum Novitates* 3081: 1-30.
- Cole CJ, Dessauer HC, Townsend CR, Arnold MG (1995) *Kentropyx borckiana* (Squamata: Teiidae): an unisexual lizard of hybrid origin in the Guyana Region, South America. *American Museum Novitates* 2671: 1-5.

- Dias EJR, Rocha CFD, Vrcibradic D (2002) New *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae) from a Cerrado enclave in Southwestern Amazonia, Brazil. *Herpetologica* 59(1):76-88.
- Denton R, O'Neill R (1995) *Prototeius stageri*, gen. et sp. Nov., a new Teiid lizard from the Upper Cretaceous marshalltown Formation of New Jersey, with a preliminary phylogenetic revision of the Teiidae. *Journal of Vertebrate Paleontology* 15(2): 235-253
- Dobigny G, Ozouf-Costaz C, Bonillo C, Volobouev V (2002) Ag-NORs are not always true NORs: new evidence in mammals. *Cytogenetics and Genome Research* 98:75-77 .
- Dutrillaux B, Couturier J (1981) *La pratique de l'analyse chromosomique*. Paris: Masson.
- Estes R (1983) Sauria terrestria, Amphisbaenia. In: *Handbuch der Paleoherpetologie, Teil 10A*. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag.
- Estes R, Queiroz K, Gauthier J (1988) Phylogenetic relationships within Squamata. - In: *Phylogenetic relationships of the lizard families* (eds Estes E. and Pregill G.), California: Stanford, p.119-281.
- Feltrim AC, Lema T (2000) Uma nova espécie de *Cnemidophorus* Wagler, 1830 do estado do rio Grande do Sul, Brasil (Sauria, Teiidae). *Biociências* 8:103-114.
- Giugliano LG, Teixeira RD, Colli GR, Bão SN (2002) Ultrastructure of spermatozoa of the lizard *Ameiva ameiva*, with considerations on polymorphism within the family Teiidae (Squamata). *Journal of Morphology* 253(3): 264-271.
- Gorman GC (1970) Chromosomes and the systematics of the family Teiidae (Sauria: Reptilia). *Copeia*, 2:230-245.
- Kasahara S; Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT (1987) Geographical karyotypic variations and chromosome banding patterns in *Tropidurus hispidus* (Sauria, Iguanidae) from Brazil. *Caryologia*, 40: 43-57.
- Lowe CH, Wright JW, Cole CJ, Bezy RL (1970) Chromosomes and evolution of the species groups of *Cnemidophorus* (Reptilia: Teiidae). *Systematic Zoology* 19: 114-127.
- Markezich AL, Cole CJ, Dessauer HC (1997) The blue and green whiptail lizards (Squamata: Teiidae: *Cnemidophorus*) of the Peninsula de Paraguana, Venezuela: systematics, ecology, descriptions of two new taxa, and relationships to whiptails of the Guianas. *American Museum Novitates*. 3207: 1-60.
- Olmo E. (1986) Reptilia.- In: *Animal Cytogenetics* (ed. B. John) Berlin, Gebruder, Borntraeger.
- Peccinini-Seale D, Frota-Pessoa O (1974) Structural heterozygosity in parthenogenetic populations of *Cnemidophorus lemniscatus* (Sauria: Teiidae) from the Amazonas valley. *Chromosoma* 47:439-451.
- Peccinini-Seale D, Almeida TMB (1986) Chromosomal variation nucleolar organizers and constitutive heterochromatin in the genus *Ameiva* and *Cnemidophorus* (Sauria, Teiidae). *Caryologia* 39:227-239.
- Peccinini-Seale D, Rocha CFD, Almeida TMB, Araújo AFB, De Sena MA (2004) Cytogenetics of the Brazilian whiptail lizard *Cnemidophorus littoralis* (Teiidae) from a restinga area (Barra de Marica) in Southeastern Brazil. *Braz. J. Biol.* 64(3B): 661-667.

- Pellegrino KCM, Kasahara S, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y (1997) Pericentric inversion events in karyotypic distinction of Brazilian lizards of genus *Phyllorhynchus* (Squamata, Gekkonidae) detected by chromosomal banding patterns. *Hereditas* 127:255-262.
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y (1999) Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of the genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas* 131:1-21.
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yonenaga-Yassuda Y, Sites Jr JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Hereditas* 127:255-262.
- Porter CA, Meredith JH, Sites JW Jr, Baker RJ (1991) Location of ribosomal DNA in chromosomes of squamate reptiles: systematic and evolutionary implications. *Herpetologica* 27: 271-280.
- Porter CA, Haiduk MW, Queiroz K (1994) Evolution and phylogenetic significance of ribosomal gene location in chromosomes of squamate reptiles. *Copeia* 302-313.
- Pough HF, Andrews RM, Cadle JE, Crump ML, Savitzky AM, Wells KD (2001) *Herpetology*, Second edition. New Jersey: Prentice Hall.
- Presch W (1974) Evolutionary relationships and biogeography of the macroteiid lizards (Family Teiidae, Subfamily Teiinae). *Bull. South. Cal. Acad. Sci.* 73: 23-32.
- Presch W (1983) The lizard family Teiidae: is it a monophyletic group? *Zoological J. Linnean Society*, 77: 189-197.
- Reeder TW, Cole CJ, Dessauer HC (2002) Phylogenetic Relationships of whiptail lizards of the genus *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae): A test of monophyly, reevaluation of karyotypic evolution, and review of hybrid origins. *American Museum Novitates* 3365:1-61.
- Rieppel O (1980) *The phylogeny of anguimorph lizards*. Switzerland: Birkhauser Verlag.
- Rocha CFD, Bergallo HG, Peccinini-Seale D (1997) Evidence of a unisexual population of the Brazilian whiptail lizard genus *Cnemidophorus* (Teiidae), with description of a new species. *Herpetologica* 53:374-382.
- Rocha CFD, Araújo AFB, Vrcibradic D, Costa EMM (2000). New *Cnemidophorus* (Squamata; Teiidae) from coastal Rio de Janeiro Estado, Southeastern Brazil. *Copeia* 2:501-509.
- Rodrigues MT (1987) Sistemática, Ecologia e Zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo *torquatus* ao sul do Rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia* 31(3):105-230.
- Santos RML, Bertolotto CEV, Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda (2003) Chromosomal studies on sphaerodactyl lizards of genera *Gonatodes* and *Coleodactylus* (Squamata, Gekkonidae) using differential staining and fragile sites analyses. *Cytogenetics and Genome Research* 103:128-134.
- Schmid M, Guttenbach M (1988) Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosomes bands in vertebrates. *Chromosoma* 97:101-114.

- Sites JW Jr, Peccinini-Seale DM, Moritz C, Wright JW, Brown WM (1990) The evolutionary history of parthenogenetic *Cnemidophorus lemniscatus* (Sauria: Teiidae). I. Evidence for a hybrid origin. *Evolution* 44: 906-921.
- Soares M, Silva AHB, Valdujo VN, et al (2003) A new species of *Cnemidophorus* (Squamata, Teiidae) from the Cerrado biome in central Brazil. *Occ. Pap. Okl. Mus. Nat. His.* 14: 1-14.
- Teixeira RD, Scheltinga DM, Trauth SE, Colli GR, Bão SN (2002) A comparative ultrastructural study of spermatozoa of the teiid lizards, *Cnemidophorus gularis gularis*, *Cnemidophorus ocellifer*, and *Kentropyx altamazonica* (Reptilia, Squamata, Teiidae). *Tissue & Cell* 34(3): 135-142.
- Veronese LB, Freitas TRO, Krause L (2003) Cytogenetic studies of four Brazilian species of lizards (Squamata, Teiidae). *Caryologia* 56(1):107-114.
- Yonenaga-Yassuda Y, Kasahara S, Chu TH, Rodrigues MT (1988) High-resolution RBG-banding pattern in the genus *Tropidurus* (Sauria, Iguanidae). *Cytogenet Cell Genet* 48: 68-71.

Tabelas

Tabela 1. Espécies, localidades, espécimes e sexo, e número LG dos lagartos teíneos amostrados nesse estudo.

Espécie	Localidade	Espécimes e sexo	Número LG
<i>Ameiva ameiva</i>	Pimenteiras do Oeste, RO	2 M	1062/ 1086
	Niquelândia, GO	2 M e 1 F	1081/ 1082/ 1090
	Aripuanã, MT	1 M	1196
	Lajeado, TO	5 F	1816/ 1843/ 1891/ 1898/ 1917
<i>Cnemidophorus ocellifer</i>	Arinos, MG	1 F	104
	Morro do Chapéu, BA	1 M	488
	Santo Amaro das Brotas, SE	1 M e 3 F	170/ 171/ 172/ 174
	Subaúma, BA	1 M	511
<i>Kentropyx calcarata</i>	Aripuanã, MT	1 M e 1 F	1175/ 1197
	Ilhéus, BA	1 M	2054
	Lajeado, TO	6 F e 2 M	1997/ 1998/ 1999/ 2015/ 2016/ 2021/ 2044/ 2045/
<i>Kentropyx paulensis</i>	São José dos Campos, SP	2 F e 1 M	502/ 1014/ 426
<i>Kentropyx vanzoi</i>	Vilhena, RO	1 M	1176

F=fêmea, M=macho, BA= Estado da Bahia, MG= Estado de Minas Gerais, MT= Estado do Mato Grosso, PA= Estado do Pará, RO= Estado de Rondônia, RR= Estado de Roraima, SE= Estado de Sergipe, TO= Estado do Tocantins, SP= Estado de São Paulo; Números LG = código dos exemplares no Laboratório de Citogenética de Vertebrados (IBUSP, São Paulo, Brasil).

Legenda das Figuras

Figura 1. Cariótipos de espécies de Teiinae coradas convencionalmente. (a) *Ameiva ameiva*, $2n=50$, fêmea de Palmas, TO; (b) *Kentropyx vanzoi*, $2n=50$, macho de Vilhena, RO; (c) *Cnemidophorus ocellifer*, $2n=50$, macho de Morro do Chapéu, BA.

Figura 2.. Células diplotênicas com 25 bivalentes após coloração convencional de: a) *Kentropyx vanzoi*, b) *K. calcarata* e c) *Cnemidophorus ocellifer*.

Figura 3. Metáfases mitóticas mostrando cromossomos portadores de Ag-RONs (setas): a) Par 7 de *Ameiva ameiva*, b) Par 1 de *Kentropyx calcarata*; c) Homomórfica no par 5 de *Cnemidophorus ocellifer* da Bahia e d) Heteromórfica no par 5 de *C. ocellifer* de Sergipe e Minas Gerais.

Figura 4. Metáfases em bandas C de: a) *Ameiva ameiva* e b) *Cnemidophorus ocellifer*; c) Cariótipo em bandas C de *Kentropyx paulensis*, $2n = 50$.

Figura 5. Padrões comparativos de replicação de bandas RBG. (a) Homeologias entre os cromossomos 1 a13 de *Ameiva ameiva* (AAM), *Cnemidophorus ocellifer* (COC), *Kentropyx calcarata* (KCA) e *K. paulensis* (KPA); (b) Possíveis pontos de quebra (setas) e posição centromérica (asterisco) envolvidos na inversão pericêntrica, ilustradas pelos cromossomos 1 e 6.

Figuras

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figura 4

Figura 5

II. Variações no padrão de bandas C e no número de microcromossomos em lagartos da subfamília Tupinambinae (Squamata: Teiidae).

Abstract

Karyotypes of four Neotropical teiid lizard species (Tupinambinae) were herein studied after conventional as well as silver staining and CBG banding: *Crocodilurus amazonicus* (2n=34), *Tupinambis teguixin* (2n=36), *T. merianae* and *T. quadrilineatus* (2n=38). The karyological data for *T. quadrilineatus* as well as those obtained using differential staining for all species were unknown until now. The karyotypes of all species presented 12 macrochromosomes identical in morphology, but differed in the number of microchromosomes: 22 in *C. amazonicus*, 24 in *T. teguixin* and 26 in *T. quadrilineatus* and *T. merianae*. The Ag-NOR located at the secondary constriction at the distal end of pair 2 is shared by all species, contrasting with the variability observed for this character in species of the related Teiinae. CBG-banding revealed a species-specific pattern in *T. quadrilineatus* with conspicuous interstitial C-blocks at the proximal region of the long arm of pair 4 and the whole heterochromatic short arm of pair 6. The karyological data reported here corroborate the relationship hypothesis obtained for *Tupinambis* based on molecular characters. *T. teguixin* presents the putative ancestral karyotype for the genus with 2n=36 whereas *T. merianae* and *T. quadrilineatus* exhibit 2n=38, due to an additional pair of microchromosomes.

Key words: Chromosomal evolution, karyotype, *Tupinambis*, lizards, Teiidae,.

Resumo

Cariótipos de quatro espécies neotropicais de lagartos teídeos (subfamília *Tupinambinae*) foram estudados após coloração convencional e por nitrato de prata, mais padrões de bandas CBG: *Crocodylurus amazonicus* ($2n=34$), *Tupinambis teguixin* ($2n=36$), *T. merianae* e *T. quadrilineatus* ($2n=38$). Dados cariotípicos para *T. quadrilineatus* assim como aqueles obtidos com a aplicação de técnicas de coloração diferencial para *C. amazonicus*, *T. teguixin* e *T. quadrilineatus* eram inéditos até o momento. Os cariótipos de todas as espécies apresentam 12 macrocromossomos idênticos morfológicamente, mas diferem no número de microcromossomos: 22 em *C. amazonicus*, 24 em *T. teguixin* e 26 em *T. quadrilineatus* e *T. merianae*. As Ag-RONs localizadas na constrição secundária na região distal do braço longo do par 2 são compartilhadas por todas as espécies, contrastando com a variabilidade apresentada por esse caractere em espécies da subfamília irmã *Teiinae*. Bandas CBG revelaram padrão espécie-específico em *T. quadrilineatus* com blocos intersticiais conspícuos C-positivos na região proximal do braço longo do par 4 e no braço curto inteiro do par 6. Os dados cariotípicos aqui apresentados contribuem para o esclarecimento de cariótipos conflitantes de *Tupinambinae* presentes na literatura e apontam um relacionamento próximo entre *T. merianae* e *T. quadrilineatus*.

Palavras chave: Evolução cromossômica, cariótipo, *Tupinambis*, lagartos, *Teiidae*.

Introdução

A família Teiidae compreende cerca de 120 espécies de lagartos reunidos em 10 gêneros de lagartos atuais restritos ao continente americano (REEDER et al. 2002). Duas radiações distintas em nível de subfamílias são atualmente reconhecidas: A subfamília Tupinambinae compreende *Callopiastes*, *Crocodilurus*, *Dracaena*, e *Tupinambis* enquanto que a subfamília Teiinae compreende *Ameiva*, *Aspidoscelis* (o único gênero a atingir a América do Norte e recentemente separado de *Cnemidophorus*), *Cnemidophorus*, *Dicrodon*, *Kentropyx*, e *Teius* (VANZOLINI & VALENCIA, 1965; GORMAN, 1970; PRESCH, 1974; ESTES, 1988; RIEPPEL, 1980; DENTON & O'NEIL, 1995).

Conhecidos informalmente como macroteídeos, os teídeos são grupo irmão dos Gymnophthalmidae (microteídeos) e junto com suas formas fósseis correlacionadas estão incluídos no clado Teiioidea (corredores do novo mundo), que por sua vez constitui o grupo monofilético Lacertiformes (Infra-ordem Scincomorpha), juntamente com a família Lacertidae (corredores do velho mundo). Essa visão tem mudado recentemente após uma análise molecular abrangente dos Squamata, sugerindo que o clado Teiioidea (Teiformata) é uma linhagem basal irmã aos Lacertídeos mais as Anfisbenas (Lacertibaenia) (VIDAL et al., 2005; FRY et al., 2006; TOWNSEND et al., 2004).

Apesar do claro monofiletismo entre as subfamílias Teiinae e Tupinambinae, as relações filogenéticas entre os gêneros que as compõem são controversas. Por exemplo, mesmo incluindo somente quatro gêneros, existem 4 hipóteses filogenéticas distintas propostas para os Tupinambinae (GORMAN, 1970; PRESCH, 1974; RIEPPEL, 1980; DENTON & O'NEIL, 1995).

O número diplóide dos *Tupinambinae* varia de 34 a 38 cromossomos, com uma clara distinção entre 10 a 12 macrocromossomos e 22 a 26 microcromossomos puntiformes (GORMAN, 1973). A fórmula cromossômica $2n=36$ com 12 macrocromossomos e 24 microcromossomos (12M + 24m), pares 1, 3 e 4 metacêntricos e 2, 5 e 6 submetacêntricos e a presença de uma constrição secundária conspícua na região distal do braço longo do par 2, encontrada em três das quatro Infra-Ordens de lagartos tradicionalmente aceitas (Anguimorpha, Iguania e Scincomorpha), assim como em cobras, anfisbenas e dibamídeos. Essa ampla distribuição do cariótipo $2n=36$ (12M+24m) levou muitos autores a considerá-lo como homólogo e ancestral dentro dos Squamata (OLMO, 1986). Apesar de sua ampla ocorrência, poucos estudos envolvendo técnicas de bandamento cromossômico em espécies portadoras do suposto cariótipo ancestral tem sido realizados (PELLEGRINO *et al.*, 1994; KASAHARA *et al.*, 1987; 1996; BERTOLOTTO *et al.*, 2002). Esse tipo de abordagem poderia facilitar o estabelecimento de homologias precisas entre os cariótipos de espécies próximas.

Muita confusão caracteriza a taxonomia do gênero *Tupinambis*, que atualmente compreende seis espécies de acordo com a recente revisão de PÉRES & COLLI (2004): *T. duseni* (LÖNNBERG & ANDERSSON, 1910), *T. longilineus* (ÁVILA-PIRES, 1995), *T. quadrilineatus* (MANZANI & ABE, 1997), *T. rufescens* (GÜNTHER, 1871) e *T. teguixin* (Linnaeus, 1758). A atribuição de nomes envolvendo *T. teguixin* e *T. rufescens* (ÁVILA-PIRES, 1995; PÉRES & COLLI, 2004) e *T. teguixin* e *T. merianae* (ÁVILA-PIRES, 1995), levou a identificação errada de táxons e conseqüente conclusões falsas em estudos comparativos posteriores. Como exemplo, DE SMET (1981) descreve *T. teguixin* com cariótipo $2n=36$ (12M+24m), enquanto que BEÇAK (1972) identifica $2n=38$ (12M+26m). Similarmente, *T. nigropunctatus*, atualmente um sinônimo júnior de *T. teguixin* (ÁVILA-PIRES 1995), foi descrito como possuindo

cariótipo $2n=36$ e $2n=38$ (GORMAN, 1970; DE SMET, 1981). VERONESE *et al.* (2003) encontrou $2n=38$ cromossomos em *T. merianae*.

No presente estudo, *Crocodilurus amazonicus*, *Tupinambis merianae*, *T. quadrilineatus* e *T. teguixin*, foram analisados após coloração convencional e por nitrato de prata assim como bandamento CBG. Considerando que estudos citogenéticos prévios nessas espécies são controversos ou inexistentes, o presente artigo apresenta importantes contribuições tanto pra a taxonomia quanto para a compreensão da evolução cromossômica dos teídeos, tidos até o momento como conservados cromossomicamente. Além disso, o artigo contribui para o esclarecimento de alguns cariótipos conflitantes de Tupinambinae presentes na literatura.

Materiais e métodos

Análises citogenéticas foram realizadas em um total de 20 espécimes de *Crocodilurus amazonicus*, *Tupinambis merianae*, *Tupinambis quadrilineatus* e *Tupinambis teguixin*, cujas localidades de coleta estão na Tabela 1. Os espécimes foram depositados na coleção herpetológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de medula óssea, intestino, fígado (KASAHARA *et al.*, 1987), ou de cultura de fibroblastos a partir do músculo caudal (YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1988). Análises meióticas foram realizadas em preparações de testículo. O número diplóide e morfologia cromossômica foram estabelecidos após coloração convencional e os cromossomos mitóticos foram analisados após coloração por nitrato de prata e bandamento CBG segundo técnicas de rotina.

Resultados

Três diferentes cariótipos com números diplóides variando entre $2n=34$ a 38 foram encontrados após coloração convencional.

$2n=34$ (12M+22m)

Esse cariótipo é exclusivo de *Crocodylus amazonicus* e conta com 12 macrocromossomos, sendo os pares 1, 3, 4 e 5 metacêntricos e pares 2 e 6 submetacêntricos, mais 22 microcromossomos (pares 7 a 17), a maioria deles com dois braços (Figura 1a). Em algumas metáfases foi identificada constrição secundária na região distal do braço longo do par 2.

$2n=36$ (12M+24m)

O cariótipo de *Tupinambis teguixin* é constituído por 12 macrochromosomes, com pares 1, 3, 4 e 5 metacêntricos, pares 2 e 6 submetacêntricos e 24 microcromossomos (pares 7 a 18), alguns deles com dois braços (Figura 1b). Foi observada constrição secundária na região distal do braço longo do par 2 em algumas metáfases.

$2n=38$ (12M+26m)

Tupinambis merianae e *Tupinambis quadrilineatus* apresentam cariótipo composto de 12 macrocromossomos, com pares 1, 3, 4 e 5 metacêntricos, pares 2 e 6 submetacêntricos e 26 microcromossomos (pares 7 a 19), a maioria deles com dois

braços. Existe uma constrição secundária conspícua na região distal do braço longo do par 2 (Figura 1c; 1d).

Coloração por Nitrato de Prata e Bandamento CBG

Todas as espécies estudadas apresentaram Ag-RONs localizadas nas constrições secundárias na região distal do braço longo do par 2, representados na Figura 2 por *Crocodylus amazonicus*, $2n=34$ (A) e *Tupinambis merianae*, $2n=38$ (B).

Em *Crocodylus amazonicus* o bandamento CBG revelou a presença de blocos heterocromáticos sutis nas regiões pericentroméricas de todos os macrocromossomos. (Figura 3a). Já o padrão de bandas C em *T. merianae* é caracterizado por blocos conspícuos nas regiões pericentroméricas de todos os macrocromossomos e em alguns microcromossomos e na região da constrição secundária no par 2. Um microcromossomo se apresentou completamente heterocromático (Figura 3b).

O cariótipo de *T. quadrilineatus* apresenta pequenas bandas C positivas nas regiões pericentroméricas de todos os macrocromossomos, exceto o par 6 que apresentou seu braço curto completamente heterocromático. Blocos conspícuos heterocromáticos intersticiais também ocorrem na região proximal do braço longo do par 4. A região da constrição secundária no par 2 também apresentou-se positivamente corada. Todos os microcromossomos apresentam heterocromatina constitutiva nas regiões teloméricas ou centroméricas (Figura 3c).

Discussão

Cariótipos com $2n=34$, 36 e 38 cromossomos foram encontrados entre as espécies *Crocodylus amazonicus*, *Tupinambis merianae*, *T. quadrilineatus* e *T. teguixin* aqui estudadas. Todos os cariótipos apresentam 12 macrocromossomos

metacêntricos ou submetacêntricos, mas diferem no número de microcromossomos, que varia de 22 a 26. O cariótipo de *Tupinambis quadrilineatus* em coloração convencional e os padrões de bandas obtidos para essas quatro espécies de *Tupinambinae* eram desconhecidos até o momento.

O cariótipo de *Crocodilurus amazonicus* ($2n=34$, $12M+22m$) é idêntico ao descrito por GORMAN (1970) para um espécime brasileiro (localidade não mencionada) que sugere que o cariótipo com $2n=34$ tenha derivado a partir do ancestral $2n=36$ ($12M+24m$) através da perda de um par de microcromossomos. O autor também aponta que a morfologia conservada dos macrocromossomos e a presença de constrição secundária na região distal do braço longo do par 2 é compartilhada por muitas espécies de teídeos do grupo *Dracaena* (atualmente *Tupinambinae*), o que indica seu *status* conservador. A falta de variação na distribuição das Ag-NORs nos *Tupinambinae* contrasta com sua subfamília irmã *Teiinae*, que apresenta variação intergenérica considerável nesse caractere (SANTOS *et al.*, 2007).

Dois cariótipos diferentes com $2n=36$ e $2n=38$ foram encontrados para *Tupinambis*, após coloração convencional, como descritos na literatura (BEÇAK, 1972; GORMAN, 1970; DE SMET, 1981). No entanto, existe uma difícil associação do cariótipo a uma correta identificação taxonômica, considerando a atribuição caótica de nomes características da sistemática de *Tupinambis* até recentemente. Assim, na ausência de localidades precisas de coleta e espécimes registrados, dependemos da análise cariotípica para sua confirmação. Nossos dados claramente demonstram que *T. teguixin* apresenta $2n=36$, como descritos por DE SMET (1981) e GORMAN (1970), e que *T. merianae* e *T. quadrilineatus* compartilham cariótipo com $2n=38$, semelhante ao descrito por VERONESE *et al.* (2003) para *T. merianae*. Isso quer dizer que o cariótipo $2n=38$ descrito por BEÇAK *et al.* (1972) para *Tupinambis teguixin*, deveria ser

atribuído a *T. merianae*, e não à espécie amazônica atualmente reconhecida como *T. teguixin* (PÉRES & COLLI, 2004), que possui $2n=36$. De modo semelhante, acreditamos que o cariótipo $2n=38$ descrito por DE SMET (1981) para *Tupinambis nigropunctatus* (atualmente um sinônimo júnior de *Tupinambis teguixin*) deveria ser a *Tupinambis merianae* ou a *Tupinambis quadrilineatus*, ambos com $2n=38$. Nossos dados também sugerem que a identificação de VERONESE *et al.* (2003) foi correta.

FITZGERALD *et al.* (1999) estudaram as relações filogenéticas no gênero *Tupinambis* empregando seqüências do DNA mitocondrial e encontrou dois clados distintos: um formado por *T. longilineus* e *T. teguixin*, outro incluindo *T. merianae*, *T. rufescens* e *T. duseni*. Diferentemente das conclusões de PÉRES & COLLI (2004), os autores não encontraram diferenças moleculares que suportassem a separação entre *rufescens* e *duseni*, um resultado que pode também ser atribuído a identificações errôneas.

Ambos clados de *Tupinambis* reconhecidos na análise anterior também encontram embasamento citogenético: por um lado *T. teguixin* com $2n=36$, e do outro *T. merianae*, *T. quadrilineatus* e *T. rufescens* (dados para a última espécie segundo HERNANDO, pess. com), todos com um par adicional de microcromossomos com cariótipo $2n=38$.

Junto às diferenças relacionadas ao número diplóide em *Tupinambis*, existem dois padrões de bandas C diferentes nos cariótipos $2n=38$. Exemplares de *T. quadrilineatus* apresentam um evidente bloco intersticial na região proximal do braço longo do par 4 e o braço curto inteiro do par 6 heterocromáticos. *T. merianae*, por sua vez apresenta bandas C predominantemente nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos, semelhante ao padrão observado para *Crocodylus amazonicus*.

Assim, sugerimos que o padrão de bandas observado em *T. quadrilineatus* é espécie-específico.

Nos Gymnophthalmidae e Lacertidae, padrões de bandas têm sido considerados filogeneticamente informativos. Os microteídeos *Procellosaurinus erythrocerus*, *P. tetradactylus* e *Vanzosaura rubricauda* (YONENAGA-YASSUDA *et al.*, 1996), apresentam cariótipos muito similares tanto em coloração convencional quanto em bandamento R, mas padrões distintos de distribuição da heterocromatina constitutiva. Esse foi um caractere diagnóstico que corroborou a divisão das espécies em dois gêneros diferentes, propostos com base em morfologia.

Após uma ampla revisão sobre bandas C e padrões de Ag-RONs em espécies de lacertídeos, OLMO *et al.* (1990) apontaram diversos padrões espécie-específicos presentes na literatura (CAPULA *et al.*, 1989; CARDONE *et al.*, 1990) e juntamente com dados de enzimas de restrição, ajudaram a alcançar uma melhor compreensão sobre as relações filogenéticas nesse grupo de lagartos. A variabilidade detectada nos padrões de bandas C nas famílias Lacertidae, Gymnophthalmidae e agora nos Teiidae indica que este caractere pode ser útil para a citotaxonomia e compreensão sobre a evolução cromossômica nos grupos de lagartos.

Acknowledgements

The authors are grateful to Vinícius Xavier da Silva, Gabriel Skuk, Dante Pavan, José Manuel Martins and Felipe Curcio for help in field, and to Renata C. Amaro-Ghilardi, Carolina E. V. Bertolotto and Cyntia Esteves de Lima for technical assistance. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- ÁVILA-PIRES, T. C. S. Lizards of Brazilian Amazônia (Reptilia: Squamata). *Zoologische Verhandelingen, Leiden* 299: 3-706, 1995.
- BEÇAK ML, BEÇAK W, DENARO L. Chromosome polymorphism, geographical variation and karyotypes in Sauria. *Caryologia* 25:313-326, (1972).
- BERTOLOTTO, C. E. V.; PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Comparative cytogenetics and supernumerary chromosomes in the Brazilian lizard genus *Enyalius* (Squamata, Polychrotidae). *Hereditas* 136: 51-57, 2002.
- CAPULA, M.; LAPINI, L.; CAPANNA, E. The karyotype of *Lacerta horvathi* (Reptilia, Sauria, Lacertidae). *Genetica* 79: 11-16, 1989.
- CARDONE, A.; CAPRIGLIONE, T.; ODIERNA, G.; REDI, C. A.; GARAGNA, S. Genomic intraspecific variations in some populations of *Podarcis s. sivilica*. In: *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles* (ed. E. OLMO), Birkhäuser Verlag, Berlin, 1990. p. 247-254.
- DE SMET, W. H. O. Description of the orcein stained karyotypes of 36 lizard species (Lacertilia, Reptilia) belonging to the families Teiidae, Scincidae, Lacertidae, Cordylidae and Varanidae (Autarchoglossa). *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia* 76: 73-118, 1981.
- DENTON R.; O'NEILL R. *Prototeius stageri*, gen.et sp. Nov., a new Teiid lizard from the Upper Cretaceous marshalltown Formation of New Jersey, with a preliminary phylogenetic revision of the Teiidae. *Journal of Vertebrate Paleontology* 15(2): 235-253, 1995.
- ESTES R.; QUEIROZ K.; GAUTHIER J. Phylogenetic relationships within Squamata. - In: *Phylogenetic relationships of the lizard families* (eds Estes E. and Pregill G.), California: Stanford, p.119-281, 1988.
- FITZGERALD, L.A., COOK, J.A. & AQUINO, A.L. Molecular phylogenetics and conservation of *Tupinambis*. *Copeia* (4): 894-905, 1999.
- FRY, B. G.; VIDA, N.; NORMAN, J.; VONK, F. J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, R.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S. B.; RICHARDSON, W. C.; HODGSON, W.C.; IGNJATOVIC, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. Early evolution of the venom system in lizard and snakes. *Nature* 439: 584-588, 2006.
- GORMAN, G. C. Chromosomes and the systematics of the family Teiidae (Sauria: Reptilia). *Copeia*, 2:230-245, 1970.
- GORMAN, G. C. The chromosomes of the Reptilia, a cytotaxonomic interpretation. In *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. CHIARELLI, A. B. and CAPANNA, E. (eds.), London, Academic Press, 1973, p. 349-424.
- GÜNTHER, A. Description of a new species of *Tejus* (*Tejus rufescens*) from Mendoza. In *Scientific Meetings of the Zoological Society of London*, London, Messrs. Longmans, Green, Reader, and Dyer, 1871, p. 541-543.
- KASAHARA, S.; YONENAGA-YASSUDA, Y., RODRIGUES, M. T. Geographical karyotypic variations and chromosome banding patterns in *Tropidurus hispidus* (Sauria, Iguanidae) from Brazil. *Caryologia*, 40: 43-57, 1987.
- KASAHARA, S.; PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; YONEGA-YASSUDA, Y. Comparative cytogenetic studies of eleven species of the *Tropidurus torquatus* group (Sauria, Tropiduridae), with banding patterns. *Hereditas* 125: 37-46, 1996.
- LINNAEUS, C. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. 10th ed., 1758, tomus I. Stocholm.

- LÖNNBERG, E.; ANDERSSON, G. A new lizard and a new frog from Parana. *Arkiv For Zoologi* 6: 1-11, 1910.
- MANZANI, P. R.; ABE, S. A new species of *Tupinambis* Daudin, 1802 (Squamata, Teiidae) from central Brazil. *Boletim Museu Nacional Rio de Janeiro Zoologia* 1-10, 1997.
- OLMO, E. Reptilia.- In: *Animal Cytogenetics*. B. John (ed.), Berlin, Gebruder, Borntraeger, 1986.
- OLMO, E.; ODIERNA, G.; CAPRIGLIONE, T.; CARDONE, A. DNA and chromosome evolution in lacertid lizards.- In: *Cytogenetics of amphibians and reptiles*, E. OLMO (ed.), Birkhäuser Verlag, Berlin, 1990. p. 181-204.
- PELLEGRINO, K. C. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Cytogenetic studies in six species of Tropiduridae (Sauria).- *Revista Brasileira de Genética* 17: 401-408, 1994.
- PÉRES, A. K. Jr.; COLLI, G. R. The taxonomic status of *Tupinambis rufescens* and *T. duseni* (Squamata: Teiidae), with a redescription of the two species. *Occasional papers, Sam noble Oklahoma museum of natural history* 15: 1-12, 2004.
- PRESCH, W. Evolutionary relationships and biogeography of the macroteiid lizards (Family Teiidae, Subfamily Teiinae). *Bull. South. Cal. Acad. Sci.* 73: 23-32, 1974.
- REEDER, T. W.; COLE, C. J.; DESSAUER, H. C. Phylogenetic Relationships of whiptail lizards of the genus *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae): A test of monophyly, reevaluation of karyotypic evolution, and review of hybrid origins. *American Museum Novitates* 3365:1-61, 2002.
- RIEPPPEL, O The phylogeny of anguimorph lizards. Switzerland: Birkhauser Verlag, 1980.
- SANTOS, R. M. L., PELLEGRINO K. C. M., RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Banding patterns and chromosomal evolution in five species of teiid lizards (Squamata: Teiidae). *Genetica* in press, 2007)
- TOWNSEND, T.M.; LARSON, A.; LOUIS, E. e MACEY, R. Molecular Phylogenetics of Squamata: the position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the root of the Squamata tree.- *Syst. Biol.* 53 (5): 735-757, 2004.
- VANZOLINI, P. E.; VALENCIA, J. The genus *Dracaena*, with a brief consideration of macroteiid relationships (Sauria, Teiidae). *Arquivos de Zoologia* 13: 7-35, 1965.
- VERONESE, L. B.; FREITAS, T. R.O.; KRAUSE, L. Cytogenetic studies of four Brazilian species of lizards (Squamata, Teiidae). *Caryologia* 56(1):107-114, 2003.
- VIDAL, N.; HEDGES, S. B. The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *Evolution* 328: 1000-1008, 2005.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; KASAHARA, S.; CHU, T. H.; RODRIGUES, M. T. High-resolution RBG-banding pattern in the genus *Tropidurus* (Sauria, Iguanidae). *Cytogenet Cell Genet* 48: 68-71, 1988.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; MORI, L.; CHU, T. H.; RODRIGUES, M. T. Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid radiation: *Procellosaurinus* and *Vanzosaura* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Cytogenet. Cell Genet.* 74:203-210, 1996.

Tabelas e figuras

Tabela 1. Espécies, número LG e sexo dos espécimes utilizados nesse estudo, localidade dos lagartos da família Tupinambinae amostrados nesse estudo.

Espécie	Número do espécime (LG)/sexo	Localidade
<i>Crocodylurus amazonicus</i>	1411 (F), 1412 (F)	Reserva Biológica do Rio Trombetas, PA (01°30'S, 55°50'W)
<i>Tupinambis merianae</i>	1964(F)	Lajeado, TO (09°45'S, 48°21'W)
	L 85 (F)	Rio Claro, SP (22°24'S, 47°33'W)
	1469 (F)	Rosal, ES (19°38'S, 39°49'W)
	2304 (F)	Reserva Vale do Rio Doce, ES (19°23'S, 40°04'W)
<i>Tupinambis quadrilineatus</i>	1132 (M), 1133 (F)	Niquelândia, GO (14°28'S, 48°27'W)
	2287 (F), 2288 (F), 2289 (F), 2290 (F)	Peixe, TO (12°30'S, 48°21'W)
<i>Tupinambis teguixin</i>	1546 (F), 1547 (F)	Manso, MT (15°09', 55°04'W)
	1483 (M), 1484 (F)	Parque Nacional das Emas, GO (18°15'S, 52°53'W)
	1520 (F)	Uruçuí-Una, PI (07°13'S, 44°33'W)
	2284 (F), 2285 (F), 2286 (F)	Peixe, TO (12°30'S, 48°21'W)

M=macho; F=fêmea; ES = Estado do Espírito Santo; GO= Estado de Goiás; PA= Estado do Pará, PI= Estado do Piauí; SP = Estado de São Paulo; TO = Estado do Tocantins; números LG = código dos exemplares no Laboratório de Citogenética de Vertebrados (IBUSP, São Paulo, Brasil).

Legenda das Figuras

Figura 1. Cariótipos de espécies de *Tupinambinae*, após coloração convencional. (a) *Crocodilurus amazonicus*, macho, $2n=34$ (12M+22m); (b) *Tupinambis merianae*, fêmea $2n=36$ (12M+24m); (c) *Tupinambis teguixini*, macho, $2n=38$ (12M+26m); (d) *Tupinambis quadrilineatus*, fêmea, $2n=38$ (12M+26m). Observe a presença de constrição secundária na região distal do par 2 em a e b.

Figura 2. Ag-RONs de espécies de *Tupinambinae* localizadas na região das constrições secundárias na região distal do par 2 (setas). A) *Crocodilurus amazonicus*, macho, $2n=34$ e B) *Tupinambis merianae*, fêmea, $2n=38$.

Figura 3. Padrões de bandas C em espécies de *Tupinambinae*. (a) Metáfase de *Crocodilurus amazonicus* $2n=34$ (12M+22m); (b) Metáfase de *Tupinambis merianae* $2n=36$ (12M+24m) com bandas C positivas na região da constrição secundária no par 2 e um microcromossomo heterocromático (setas); (c) Cariótipo de *Tupinambis quadrilineatus*. Note os blocos intersticiais conspícuos no par 4 e o braço curto heterocromático do par 6.

Figuras

Figura 1

Figura 2

Figura 3

III Filogenia molecular de lagartos da família Teiidae, com ênfase na tribo cnemidophorini (Squamata)

Abstract

A molecular phylogeny was reconstructed for 17 species of lizards belonging to the Teiidae family using 1415 bp of mitochondrial (cyt B and ND4) and nuclear (*c-mos*) DNA sequences. We performed maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and bayesian inference (MB) analyses, and data partitions were analysed separately and in combination under MP. Robustness for the recovered nodes was assessed with bootstrap, partitioned Bremer support (PBS) and *a posteriori* probability (PP) analyses. The total molecular evidence for MP showed incongruences between individual gene trees due to the saturation found in the 3rd position for mitochondrial genes, but MP and MB hypothesis were identical and did not show incongruences when comparing the individual gene trees. The molecular phylogeny reconstructed revealed the monophyletic state of Teiidae family, as well as Tupinambinae and Teiinae subfamilies and Cnemidophorini tribe. In Cnemidophorini, *Ameiva* was monophyletic and basal. *Cnemidophorus* was found paraphyletic, once that *C. lemniscatus* was closely related with *Kentropyx*, monophyletic, with *K. calcarata* basal and *K. paulensis* sister group of *K. vanzoi*. The remaining species sampled belongs to the ocellifer group, sister group of *Kentropyx* + *C. lemniscatus*. Consequences from the recovered phylogeny on the chromosomal evolution in this group were also presented.

Key words: Phylogeny, lizards, Teiidae, molecular, karyotypes.

Resumo

Foi proposta uma filogenia molecular para 17 espécies de lagartos pertencentes à família Teiidae usando 1415 pb de seqüências do DNA mitocondrial (cyt B e ND4) e nuclear (*c-mos*). Nós realizamos análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e inferência bayesiana (MB), e a partição de dados foram analisadas independentes e conjuntamente em MP. A confiança nos nós recuperados foi representada por valores de bootstrap, Bremer particionado (PBS) e probabilidade *a posteriori* (PP). A evidência total para MP mostrou incongruências entre árvores as individuais devido a saturação encontrada para a 3ª posição nos genes mitocondriais, mas as hipóteses de MP e MB foram idênticas e não mostraram incongruências entre as árvores individuais. A árvore proposta recuperou o monofiletismo da família Teiidae, assim como para as subfamílias Tupinambinae e Teiinae e a tribo Cnemidophorini. Na tribo Cnemidophorini, onde o gênero *Ameiva* foi identificado como monofilético e basal dentre os demais cnemidophorinos. *Cnemidophorus* se mostrou parafilético, com a espécie *C. lemniscatus* mais relacionada ao gênero *Kentropyx*, identificado como monofilético, com a espécie *K. calcarata* basal e *K. paulensis* grupo irmão de *K. vanzoi*. As demais espécies que compõem o gênero *Cnemidophorus* formam grupo monofilético que corresponde ao grupo ocellifer, irmão do clado *Kentropyx* + *C. lemniscatus*. Conseqüências da filogenia obtida sobre a evolução cromossômica do grupo, são também discutidas.

Palavras chave: Filogenia, lagartos, Teiidae, molecular, cariótipos.

Introdução

A família Teiidae é um grupo de lagartos que se distribui da costa oeste dos Estados Unidos, passando pela América Central até o Norte da Argentina (POUGH *et al.* 2001). Junto com a família Gymnophthalmidae e com as formas fósseis correlacionadas constitui o clado Teiioidea (corredores do novo mundo), exclusivo atualmente à Região Neotropical (ESTES *et al.*, 1988). Apesar de autores como MORO & ABDALA (2000) sugerirem que *Pantodactylus* deveria ser incluído na família Teiidae, estudos moleculares na família Gymnophthalmidae apontam o monofiletismo de ambas famílias (PELLEGRINO *et al.* 2001). O clado Teiioidea, por sua vez, juntamente com a família Lacertidae (corredores do velho mundo) constitui o grupo monofilético Lacertiformes (Infra-ordem Scincomorpha) até que estudos moleculares abrangentes dos Squamata, sugerem que o clado Teiioidea (Teiformata) é uma linhagem basal irmã aos Lacertídeos mais as Anfisbenas (Lacertibaenia) (VIDAL *et al.*, 2005; FRY *et al.*, 2006; TOWNSEND *et al.*, 2004).

GORMAN (1970) sugeriu a divisão das cerca de 120 espécies atuais, distribuídas em dez gêneros, de Teiidae em dois grupos citogenéticos: o grupo *Dracaena* com cariótipo com $2n = 34-38$, caracterizado pela presença de macro e microcromossomos; e o grupo *Ameiva* com $2n = 30-56$, que apresenta uma série gradual de cromossomos. PRESCH (1974, 1983) com base em dados osteológicos, elevou ambos os grupos em duas tribos: Teiini, com os gêneros *Ameiva*, *Aspidoscelis*, *Cnemidophorus*, *Dicrodon*, *Kentropyx* e *Teius*, e Tupinambini (*Callopistes*, *Crocodylurus*, *Dracaena* e *Tupinambis*), posteriormente elevadas por ESTES (1983, 1988) às subfamílias Teiinae e Tupinambinae. Apesar do monofiletismo entre as subfamílias ser evidente, TEIXEIRA (2003) sugeriu a exclusão do tupinambinae *Callopistes* incluindo-o nos teíneos.

As relações filogenéticas entre os gêneros de teídeos são muito controversas. Para a subfamília Teiinae, GORMAN (1970) propõe *Cnemidophorus* como mais basal, seguido por *Kentropyx*, *Ameiva*, *Teius* e *Dicrodon*; PRESCH (1974) propõe *Teius* grupo irmão de *Dicrodon* e entre os cnemidophorini *Ameiva* grupo irmão de *Cnemidophorus*; RIEPPEL (1980) e DENTON & O'NEIL (1995) propõe a mesma filogenia, mas não resolvem a relação entre os cnemidophorini. Para a subfamília Tupinambinae, VANZOLINI & VALENCIA (1965) e GORMAN (1970) propõem *Crocodylurus* como gênero mais basal, seguido de *Callopistes* e *Tupinambis* como grupo irmão de *Dracaena*; DENTON & O'NEIL (1995) sugerem *Crocodylurus* como grupo irmão de *Callopistes* e *Tupinambis* como grupo irmão de *Dracaena*; PRESCH (1974) coloca *Callopistes* como basal, seguido de *Dracaena* e *Tupinambis* como grupo irmão de *Crocodylurus*; SULLIVAN & ESTES (1995) *Callopistes* como basal, seguido de *Tupinambis* e *Dracaena* como grupo irmão de *Crocodylurus*.

REEDER *et al.* (2002), buscando compreender as relações filogenéticas entre os teiíneos principalmente amostrando espécies centro e norte-americanas de *Cnemidophorus*, com base no seqüenciamento de regiões do gene ribossomal 12S (380 pb) e 16S (500 pb) do DNA mitocondrial, em alozimas e em dados morfológicos (10 caracteres em parte dos taxa estudados), encontrou evidência para o estado parafilético dos gêneros *Ameiva* e *Cnemidophorus*, onde este último teve suas espécies centro e norte-americanas re-aloçadas no novo gênero *Aspidoscelis*, enquanto que *Ameiva* permaneceu parafilético, como as espécies centro e norte-americanas mais relacionadas a *Aspidoscelis*. As relações entre os cnemidophorinos sul-americanos, no entanto, não puderam ser propostas devido à baixa amostragem na região, o que segundo o autor também não possibilitou recuperar o monofiletismo da família Teiidae, uma vez que

Tupinambis (Tupinambinae) se mostrou mais relacionado à espécie *Pholidobolus* (Gymnophthalmidae) do que às espécies da subfamília Teiinae.

FITZGERALD *et al.* (1999) recuperaram dois clados basais para espécies do gênero *Tupinambis*, pertencente a subfamília Tupinambinae, a partir do seqüenciamento de regiões dos genes mitocondriais citocromo *b* (300pb) e do gene ND4 (375 pb). O primeiro clado foi formado por espécies de ocorrência predominante no norte da América do Sul: *T. quadrilineatus* e *T. teguixim* (que apresentou estruturação entre as populações de Roraima/Brasil e do Equador), e o outro com espécies distribuídas mais ao sul: *T. merianae*, *T. rufescens* e *T. dreseni*, onde nessas duas últimas não se observaram diferenças moleculares que corroborassem sua distinção.

Estudos envolvendo o seqüenciamento do DNAm em espécies da subfamília Teiinae têm contribuído ao entendimento da origem e persistência de taxa partenogênicos, bem como na determinação dos taxa parentais envolvidos, já que a hipótese mais aceita de origem daqueles taxa é por hibridação entre duas espécies próximas (REEDER *et al.* 2002). Análises de genes nucleares também têm sido úteis na identificação das espécies parentais, como na espécie partenogênica triploide *Cnemidophorus flagellicaudatus* e suas espécies parentais bissexuais *C. inornatus* e *C. burti* (MORITZ *et al.*, 1989; revisto por AVISE, 1994).

Tendo em vista a carência de estudos envolvendo os teídeos sul-americanos e os diversos problemas sistemáticos e taxonômicos que têm caracterizado a família, o presente estudo pretende ampliar os caracteres moleculares disponíveis e investigar as relações de parentesco entre espécies de cnemidophorinos sul-americanos (gêneros *Ameiva*, *Cnemidophorus* e *Kentropyx*) com base em seqüências do DNA mitocondrial e nuclear assim como exemplares de *Tupinambis* e *Crocodylus*.

Material e Métodos

Amostragem e Procedimentos laboratoriais

O DNA genômico de 40 exemplares de teídeos foram extraídos de tecidos (fígado ou músculo) armazenados em ultra-freezer ou preservados em etanol 95% (FETZNER, 1999) e usados para investigar as relações filogenéticas entre os teídeos (Tabela 1). As espécies de gimnofthalmídeos *Iphisa elegans elegans* e *Colobosaura modesta* foram usados como externo no enraizamento das árvores. Sequências iguais foram descartadas e representadas por apenas um dos taxa nas análises moleculares.

A amplificação das seqüências-alvo deu-se através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* e regimes de temperatura específicos, realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (APPLIED Biosystems): gene nuclear *c-mos*: G73 (GCG GTA AAG CAG GTG AAG AAA) e G74 (TGA GCA TCC AAA GTC TCC AAT C), denaturação inicial 94°C/5 min, 45 ciclos de desnaturação 94°C/3 min, hibridação 48°C/45 s, extensão 72°C/1 min; e extensão final a 72°C/45 s (SAINT *et al.*, 1998); gene mitocondrial citocromo b: LGL765 (GAA AAA CCA YCG TTG TWA TTC AAC T) e H15149 (TGC AGC CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA), 40 ciclos de desnaturação a 95°C / 25 segundos; hibridação 48°C / 1 minuto, extensão final a 72°C / 2 minutos (BICKHAM *et al.* 1995); gene mitocondrial ND4 (CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC) e Leu (CAT TAC TTT TAC TTG GAT TTG CAC CA), denaturação inicial 94°C/1 min, 40 ciclos de desnaturação 94°C/25 segundos, hibridação 48°C/1minuto, extensão 72°C/2 minutos; e extensão final a 72°C/45 s (ARÉVALO *et al.*, 1994).

A amplificação das seqüências-alvo deu-se através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* específicos e testando diferentes estratégias de

amplificação, buscando otimizar o uso dos reagentes, até obtermos com sucesso seqüências de cerca de 415 pb para o c-mos, 420 pb para o citocromo B e 750 pb para o ND4. A concentração ideal de DNA foi de 40ng/μl e o volume de produto amplificado de 50 μl. Para cada amostra foram usadas nas reações de amplificação (50μl): 8,0 μl de dNTPs (5mM); 5,0 μl de Buffer 10x; 5,0 μl de MgCl₂ (25mM); 4,0 μl de cada *primer* 21,5 μl de H₂O milli q⁺; 0,5 μl de *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (5 U/μl) e 2,0 μl de DNA. O resultado das amplificações e seqüenciamento dos genes mitocondriais citocromo b, NADH e do gene nuclear c-mos para pelo menos 15 espécies de teídeos está resumido na Tabela 1.

Alinhamento das seqüências e análises filogenéticas

As seqüências de cadeias leve e pesada obtidas após seqüenciamento foram editadas e alinhadas manualmente e comparativamente utilizando o programa Sequence Navigator^{TM} (APPLIED Biosystems). Depois de alinhadas, foi conduzida pesquisa comparativa de similaridade no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para verificar se não houve contaminação das amostras ou se o fragmento seqüenciado correspondia de fato ao gene seqüenciado. Foram feitos alinhamentos automáticos usando o programa Clustal X (JEANMOUGIN *et al.*, 1998), revisados manualmente a seguir nos programas Seq APP (GILBERT, 1992), Se-Al (RAMBAUT, 1996). O quadro de leitura das seqüências obtidas foi inferido utilizando o programa MACCLADE (MADDISON & MADDISON 2001), buscando minimizar códons de parada.

Os gráficos de saturação foram obtidos com o programa MEGA 2.1 “Molecular Evolutionary Genetics Analyzes” (KUMAR *et al.*, 2001) e os dados de frequência de

nucleotídeos e análise dos códons empregou o programa DAMBE “Data Analysis in Molecular Biology and Evolution” (XIA & XIE, 2001).

Os dados alinhados foram particionados por região gênica, e os 27 pb correspondentes à região do proto-oncogene *c-mos* onde ocorrem deleções foram excluídos das análises e analisados nas filogenias como um caractere a parte. Foi usado o programa Modeltest 3.06 (POSADA & CRANDALL, 1998) para selecionar o modelo de evolução molecular mais apropriado para cada conjunto de dados, identificado pelo critério akaike de informação (AIC), tanto individualmente quanto nas seguintes combinações: seqüência nuclear, seqüências mitocondriais e todos os dados combinados. As análises individuais e particionadas foram usadas para comparar diferentes métodos de alinhamento e avaliar quaisquer conflitos entre os genes antes de combiná-los numa matriz única, segundo a análise qualitativa sugerida por WIENS (1998).

As análises filogenéticas de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) foram executadas no programa PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 1998). Para MP não foram atribuídos pesos e foi utilizada busca heurística com 1000 réplicas aleatórias com o algoritmo *tree bisection reconnection* (TBR). Para ML foi utilizada busca heurística com 500 réplicas aleatórias da adição par a par (*stepwise addition*) utilizando o algoritmo *tree bisection reconnection* (TBR). O suporte para os nós recuperados nas topologias geradas por MP e ML foi representado por valores de *bootstrap* (BS; FELSENSTEIN, 1985), por meio de reamostragem dos dados usando o programa PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 2003). Para parcimônia, usamos 1000 pseudoréplicas e para verossimilhança 250 pseudoréplicas. Valores de *bootstrap* menores que 50% não foram mostrados nas árvores obtidas, sendo representadas por politomias. Valores de suporte de bremer particionados (BAKER & DE SALLE, 1997),

apresentando a contribuição de cada partição foram calculados para os nós da topologia combinada usando o programa TreeRot versão 2 (SORENSEN, 1999).

Análises bayesianas foram realizadas no programa MrBayes 3.0 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001) com 3.000.000 de gerações, quatro cadeias (três quentes e uma fria) e árvores amostradas a cada 1000 gerações para cada partição individualmente quanto nas combinações apresentadas anteriormente. Cada conjunto de dados foram submetidos a análise bayesiana, empregando os modelos de evolução nucleotídica obtidos pelo Modeltest. Duas análises independentes foram corridas para garantir consistência da análise e o ponto de corte foi determinado plotando graficamente os valores de ln L. Árvores inferiores à estabilização foram descartadas e um consenso de 50% de maioria foi obtido para todas as gerações restantes para obter a topologia final. O suporte para os nós é representado por probabilidades *a posteriori* (PP).

Resultados

Análises das seqüências obtidas

O proto-oncogene *c-mos*, apresentou duas grandes deleções contínuas, na mesma região, de 12 pb nos lagartos da subfamília Teiinae e de 18 pb nos espécimes grupo externo (Gymnophthalmidae), que não alteram o quadro de leitura do *c-mos* e foram excluídas das análises filogenéticas. A matriz resultante do alinhamento dos 417pb do gene nuclear *c-mos* apresentou 285 caracteres constantes, 132 caracteres variáveis, dos quais 97 são informativos para parcimônia, com uma razão aproximada de 3:2:8 nas taxas de substituição entre as posições do códon (Tabela 2). A matriz resultante do alinhamento do gene mitocondrial citocromo b contou com 330pb, dos quais 199 caracteres constantes, 30 caracteres variáveis e 101 informativos para

parcimônia, com uma razão aproximada de 6:1:34 nas taxas de suBstituições, onde das 27 transições, 21 (77,78%) envolveram os nucleotídeos citosina e timina (Tabela 2). Para o ND4, foram obtidas seqüências de 668 pb, com 387 caracteres constantes, 56 caracteres variáveis, e 208 informativos para parcimônia, encontrando uma razão aproximada de 5:1:21 nas taxas de suBstituições (Tabela 2).

Os genes mitocondriais citocromo b e ND4 se mostraram ricos em adeninas e timinas (frequência de 28,8% de ambas as bases para o citocromo b e 31,1% e 28,8%, respectivamente para o ND4), citosinas (26,9% e 26,2%) e guaninas, com apenas 15,4% e 13,9%. Esses valores são muito próximos aos oBServados por FITZGERALD *et al.* (1999) para lagartos do gênero *Tupinambis*. Foi oBServado viés na utilização de C ou T na segunda posição do códon (T2 ou C2; NAYLOR *et al.*, 1995), esperado para genes codificadores de proteínas, com 39,7% e 38,4% de T e 20,7% e 22,3% de C para o citocromo b e ND4 respectivamente, semelhante aos valores obtidos por PANG *et al.* (2003) para lagartos do gênero *Phrynosoma* (T2=44,0% e C2=20,7%). Outro viés oBServado foi contra a presença de guaninas na cadeia leve e que também é característica do genoma mitocondrial. Tais características oBServadas em nossas seqüências garantem a autenticidade da amplificação de genes mitocondriais e não genes parálogos nucleares (MACEY *et al.*, 2001; PANG *et al.*, 2003).

As relações entre ti (transições) e tv (transversões) foram plotadas graficamente (Figura 1) para verificação de possível saturação do sinal filogenético. Utilizamos para a elaboração do gráfico os modelos de suBstituição nucleotídica Kimura dois parâmetros (K 80) para o c-mos, o TN84 para o citocromo b e TN93 para o ND4. No total obtivemos para o c-mos uma taxa de ti:tv de 2,78, próxima a 3,05 oBServada por LOVETTE & BERMINGHAM (2000) em aves, para uma região de aproximadamente 600pb na qual está inserida a região por nós utilizada. Para o

citocromo b, a relação entre ti (transições) e tv (transversões) aponta uma taxa de 1,18, distante da proporção esperada de 3,0 para seqüências não saturadas, indicando uma saturação das seqüências, como observado também para o outro gene mitocondrial ND4, cuja relação entre ti (transições) e tv (transversões) aponta uma taxa de 2,0. O Teste Z de seleção, que compara a abundância relativa das substituições sinônimas e não-sinônimas, aponta seleção positiva sobre esta região do *c-mos*, seleção neutra sobre a região seqüenciada do citocromo b e do ND4.

Análises Filogenética empregando Máxima Parsimônia (MP)

Análises individuais de MP para cada conjunto de dados foram enraizadas utilizando os dois grupos externos (*Iphisa elegans* e *Colobosaura modesta*) e comparadas entre si. Como esperado, uma vez que verificamos saturações nas seqüências do DNA mitocondrial, verificamos algumas incongruências, devido provavelmente à atração de ramos longos. Tais diferenças ficaram evidentes quando comparamos com a árvore obtida para o gene *c-mos*, melhor resolvida, e que contribuiu de modo significativo para a topologia da árvore consenso (Figura 2). A Tabela 3 apresenta medidas de suporte para todos os nós da árvore de consenso de máxima parcimônia gerada pela análise combinada de todos os genes (Figura 2). As colunas apresentam as porcentagens de *bootstrap* (BS) e os valores de Bremer total e individuais. Valores individuais positivos e negativos indicam, respectivamente, apoio ou conflito para as relações recuperadas na árvore dos dados combinados quando comparados com topologias alternativas nas análises dos genes individuais. Valores nulos indicam indiferença do conjunto de dados para um determinado nó (BAKER & DESALLE, 1997; GATESY & ARCTANDER, 2000).

A atração de ramos longos, favorecida pela ocorrência de saturação pode ser observada para a espécie *Teius oculatus* que se mostrou mais relacionada aos Tupinambinae que aos Teiinae (nó “D”). Já os nós “O” que corresponde ao monofiletismo de *Ameiva* e “G” (monofiletismo do gênero *Kentropyx*) obtiveram suporte de 100 em todas as análises. Os nós “N” (monofiletismo de *Cnemidophorus natio*) e “L” (*C. natio* + *C. ocellifer* = monofiletismo do grupo ocellifer) obtiveram suporte principalmente pelos genes mitocondriais, e obtiveram *bootstrap* final (BS) de 100 e 99 (bremer 28 e 14), respectivamente. A espécie *C. sp.* mostrou-se relacionada ao grupo ocellifer com *bootstrap* de 60 e índice de bremer 4 (nó “K”) e o clado unindo os gêneros *Ameiva*, *C. lemniscatus* e as espécies do grupo ocellifer obteve *bootstrap* 80, com índice de bremer 2 (nó “J”).

Análise Filogenética empregando Máxima Verossimilhança (MV)

Para o proto-oncogene *c-mos* empregamos o modelo de substituição nucleotídica Kimura dois parâmetros (K 80), para o citocromo B e o NADH empregamos o modelo *General time-reversible model* (GTR), proposto por LAVAGNE *et al.* (1984) e revisado por RODRIGUEZ *et al.* (1990), que emprega frequências de bases diferentes e seis tipos de substituições, acrescentado de distribuição Gama e sítios invariáveis, como sugerido pelo programa Modeltest.

Análises individuais de ML para cada conjunto de dados foram enraizadas utilizando os dois grupos externos (*Iphisa elegans* e *Colobosaura modesta*) e comparadas entre si buscando identificar possíveis incongruências. Como os resultados obtidos para os genes separados e concatenados através da inferência bayesiana foram bastante similares, representamos na Figura 3 a árvore concatenada de todos os genes.

A árvore proposta recuperou o monofiletismo da família Teiidae (BS = 100), com as subfamílias que a compõe também monofiléticas (Tupinambinae BS = 88 e Teiinae BS = 55). A tribo cnemidophorini se mostrou monofilética (BS = 99), onde o gênero *Ameiva* foi identificado como monofilético (BS = 100) e basal dentre os demais cnemidophorinos (PP = 84). *Cnemidophorus* se mostrou parafilético, com a espécie *C. lemniscatus* (pertencente ao grupo *lemniscatus*) mais relacionada às espécies de *Kentropyx* (BS = 60). *Kentropyx* também foi identificado como monofilético (BS = 100), com a espécie *K. calcarata* basal e *K. paulensis* grupo irmão de *K. vanzoi* (BS = 82). As demais espécies que compõem o gênero *Cnemidophorus* formam grupo monofilético que corresponde ao grupo ocellifer (BS = 92), irmão do clado *Kentropyx* + *C. lemniscatus* (BS = 58), com *C. sp.* basal e *C. nativo*, grupo irmão de *C. ocellifer* (BS = 100), ambos monofiléticos.

Análise Filogenética empregando Inferência Bayesiana (MB)

Para o proto-oncogene *c-mos* empregamos o modelo de suBstituição nucleotídica Kimura dois parâmetros (K 80), para o citocromo B e o NADH empregamos o modelo *General time-reversible model* (GTR), proposto por LAVAGNE *et al.* (1984) e revisado por RODRIGUEZ *et al.* (1990), que emprega frequências de bases diferentes e seis tipos de substituições, acrescentado de distribuição Gama e sítios invariáveis, como sugerido pelo programa Modeltest.

Análises individuais de MB para cada conjunto de dados foram enraizadas utilizando os dois grupos externos (*Iphisa elegans* e *Colobosaura modesta*) e comparadas entre si buscando identificar possíveis incongruências. Como os resultados obtidos para os genes separados e concatenados através da inferência bayesiana foram bastante similares, representamos na Figura 4 a árvore concatenada de todos os genes,

consenso de maioria entre as 2.985 árvores obtidas a partir do ponto de corte em 15.000 de 3.000.000 de gerações.

A árvore proposta é idêntica à árvore de ML e também recuperou o monofiletismo da família Teiidae (PP=100), com as subfamílias que a compõe também monofiléticas (Tupinambinae PP=100 e Teiinae PP=98). A tribo cnemidophorini se mostrou monofilética (PP=100), onde o gênero *Ameiva* foi identificado como monofilético (PP=100) e basal dentre os demais cnemidophorinos (PP = 84). *Cnemidophorus* se mostrou parafilético, com a espécie *C. lemniscatus* (pertencente ao grupo lemniscatus) mais relacionada às espécies de *Kentropyx* (PP = 80). *Kentropyx* também foi identificado como monofilético (PP=100), com a espécie *K. calcarata* basal e *K. paulensis* grupo irmão de *K. vanzoi* (PP = 82). As demais espécies que compõem o gênero *Cnemidophorus* formam grupo monofilético que corresponde ao grupo *ocellifer* (PP = 100), irmão do clado *Kentropyx* + *C. lemniscatus* (PP = 100), com *C. sp.* basal e *C. nativo*, grupo irmão de *C. ocellifer* (PP = 100), ambos monofiléticos.

Discussão

O *c-mos* é um proto-oncogene altamente conservado, cópia única, sem íntrons, com pouco mais de 1000 pb. Este gene codifica para uma quinase envolvida na regulação do ciclo celular em vertebrados (SAINT *et al.*, 1998). GRAYBEAL (1990) sugere que o *c-mos* pode fornecer informações filogenéticas entre taxa que divergiram a pelo menos 400 milhões de anos, no entanto, homólogos do *c-mos* têm sido seqüenciados em uma ampla variedade de taxa para explorar diferentes tempos de divergência, como entre as infra-ordens de Squamata (SAINT *et al.*, 1998; HARRIS *et al.*, 1999), dentro da ordem Passeriformes (LOVETTE & BERMINGHAM, 2000), demonstrando que esse marcador também pode ser útil para divergências mais recentes.

PELLEGRINO *et al.* (2001), empregaram o *c-mos* para a elaboração de hipótese de relacionamento filogenético entre lagartos da família Gymnophthalmidae, grupo irmão da família Teiidae, obtendo uma grande quantidade de caracteres informativos.

O citocromo b é um gene mitocondrial codificador de uma enzima essencial no processo respiratório da mitocôndria, cópia única, sem íntrons, com pouco mais de 1000 pb. Diferentemente do gene nuclear *c-mos*, que fornece informações filogenéticas entre taxa que divergiram a pelo menos 400 milhões de anos (GRAYBEAL, 1990), o citocromo b tem sido usado para reconstruções filogenéticas para divergências bem mais recentes, da ordem de 80 milhões de anos. Assim, diversos estudos recentes em Squamata o têm empregado em nível populacional (GLOR *et al.* 2001), intragenérico (REEDER *et al.*, 2002; HODGES & ZAMUDIO, 2003) e mesmo intrafamiliar (FITZGERALD *et al.*, 1999; FU 2000, PELLEGRINO *et al.* 2001;). Neste último trabalho, PELLEGRINO *et al.* (2001) empregaram o citocromo b para a elaboração de hipótese de relacionamento filogenético entre lagartos da família Gymnophthalmidae, grupo irmão da família Teiidae, obtendo uma grande quantidade de caracteres informativos. Já REEDER, utilizou as seqüências obtidas para o citocromo b como uma das evidências para a separação das espécies Centro e Norte americanas de *Cnemidophorus* em um novo gênero: *Aspidoscelis*.

O NADH é um gene mitocondrial codificador de uma enzima essencial na cadeia respiratória da mitocôndria durante o processo de fosforilização oxidativa na cadeia transportadora de elétrons. É um gene, cópia única, dividido em 5 subunidades das quais apenas a subunidade 4 tem sido empregada em estudos filogenéticos, possuindo cerca de 1500 pb. Diferentemente do gene nuclear *c-mos* e semelhante ao citocromo b, o ND4 tem sido usado para reconstruções filogenéticas para divergências mais recentes, da ordem de 80 milhões de anos.

O monofiletismo da família Teiidae, e das suas subfamílias (Teiinae e Tupinambinae), foi bem apoiado nas árvores filogenéticas de evidência total por inferência Bayesiana e em menor grau por máxima verossimilhança, uma vez que ambas metodologias adotam modelos de evolução nucleotídica que minimizam o efeito da saturação observada nos genes mitocondriais. Este resultado está de acordo com a maioria dos estudos realizados com Teiidae (VANZOLINI & VALENCIA, 1965; GORMAN, 1970; PRESCH, 1974; PRESCH, 1983; RIEPPEL, 1980).

As relações filogenéticas obtidas para as espécies da subfamília Tupinambinae apontam *Tupinambis merianae* e *T. teguixim* como grupos irmão, mas a relação entre estas e *T. quadrilineatus* e *Crocodylus lacertinus*, não foram esclarecidas. FITZGERALD *et al.* (1999) a partir do seqüenciamento dos mesmos genes mitocondriais aqui estudados citocromo *b* (300pb) e do gene ND4 (375 pb) encontraram *T. quadrilineatus* como irmão de *T. teguixim* e SANTOS *et al.* (2º. artigo da presente tese), sugere *T. quadrilineatus* como irmão a *T. merianae*. A taxonomia do gênero *Tupinambis* tem sofrido mudanças freqüentes, com novas espécies descritas e constante mudança nomenclatural (PERES & COLLI, 2004). Assim, tendo em vista as diferentes topologias apresentadas por diferentes abordagens metodológicas, acreditamos que problemas amostrais e taxonômicos possam estar influenciando os resultados presentes na literatura até o momento. Estudos multidisciplinares mais amplos envolvendo maiores amostragens nas espécies que compõem o gênero *Tupinambis*, que ocupam extensas distribuições geográficas na América do Sul, são necessários para o real estabelecimento de cada entidade taxonômica.

Diferentemente dos Tupinambinae, os teíneos tiveram uma boa resolução filogenética, com o gênero *Teius* apontando uma radiação mais basal dentro do grupo irmão da tribo monofilética Cnemidophorini, que reúne os gêneros *Ameiva*,

Cnemidophorus e *Kentropyx*, semelhante aos dados de PRESCH (1974, 1983), RIEPPEL (1980), DENTON & O'NEIL (1995) e REEDER *et al.* (2005). O gênero *Ameiva* foi identificado como monofilético e basal dentre os demais cnemidophorinos e grupo irmão de *Cnemidophorus*, parafilético, e *Kentropyx*, monofilético. Essa topologia difere de PRESCH (1974, 1983), que aponta *Ameiva* como grupo irmão de *Cnemidophorus*.

Cariótipos de espécies neotropicais da tribo cnemidophorini foram estudados citogeneticamente por SANTOS *et al.* (3º. artigo desta tese) cujos resultados foram plotados na árvore de máxima verossimilhança obtida no presente estudo (Figura 5). O gênero *Ameiva* se mostrou monofilético em todas as árvores obtidas e são caracterizadas citogeneticamente por Ag-RONs no par 7. As espécies do gênero *Kentropyx* formaram um grupo monofilético e apresentaram a mesma hipótese de relacionamento filogenético em todas as análises, com a espécie *K. calcarata* como mais basal, apesar de pouco sustentada, com a espécie *K. paulensis* mais relacionada a *K. vanzoi*. As espécies desse gênero apresentam Ag-RONs no par 1 (SANTOS *et al.*, 3º. artigo desta tese).

O gênero *Cnemidophorus* se mostrou parafilético, com uma grande divergência entre a espécie partenogenética *C. lemniscatus*, pertencente ao complexo *lemniscatus*, mais proximamente relacionada a *Kentropyx*, do que as espécies do complexo *ocellifer*. Segundo PECCININI-SEALE (1989), a espécie *C. lemniscatus* apresenta Ag-RONs no par 1, semelhante ao observado por SANTOS *et al.* (3º. artigo desta tese) para espécies de *Kentropyx*, e o número diplóide varia de $2n=48$ a $2n=50$ pela perda de microcromossomos e o número fundamental varia de $NF=49$ a 52 devido a ocorrência de inversões pericêntricas heteromórficas no par 1.

As demais espécies estudadas do gênero *Cnemidophorus* formam grupo monofilético bem sustentado que corresponde ao grupo *ocellifer*, irmão do clado *Kentropyx* + *C. leminiscatus*. SANTOS *et al.*, (3º. artigo desta tese) aponta como características do grupo a presença de Ag-RONs no par 5 e um número variável de pares com dois braços, resultante de eventos múltiplos de inversões pericêntricas. *C. sp.*, uma nova espécie de cauda azul proveniente de Santo Inácio, ocupou uma posição basal dentro do grupo *ocellifer*, diferindo de exemplares da espécie *C. ocellifer* provenientes da mesma região, que se posicionaram ao lado de *C. nativo*. Esses resultados corroboram a atribuição de *C. nativo* ao complexo *ocellifer* (ROCHA *et al.*, 1997) e resultados morfológicos preliminares que apontam *C. sp* como uma nova espécie. Estudos mais aprofundados envolvendo diversas populações de lagartos do gênero *Cnemidophorus* estão em andamento e devem elucidar tais hipóteses.

Agradecimentos

Os autores são gratos a authors are grateful to Vinícius Xavier da Silva, Gabriel Skuk, Dante Pavan, José Manuel Martins and Felipe Curcio for help in field, and to Renata C. Amaro-Ghilardi and Carolina E. V. Bertolotto por assistência técnica. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Referências Bibliográficas

- ARÉVALO, E.; DAVIS, S. K.; SITES, J. W. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in Central Mexico.- *Syst. Biol.* 43: 387-418, 1994.
- AVISE, J.C. *Molecular Markers, Natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York, 511pp. 1994.
- BAKER, R. H.; DESALLE, R. Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. *Systematic Biology* 46(4): 654-673, 1997.
- BICKHAM, J.W.; WOOD, C. C.; PATTON, J. C. Biogeographic implications of cytochrome *b* sequences and allozymes in sockeye (*Oncorhynchus nerka*). *The Journal of Heredity* 86(2): 140-144, 1995.
- DENTON R.; O'NEILL R. *Prototeius stageri*, gen.et sp. Nov., a new Teiid lizard from the Upper Cretaceous marshalltown Formation of New Jersey, with a preliminary phylogenetic revision of the Teiidae. *Journal of Vertebrate Paleontology* 15(2): 235-253, 1995.
- ESTES, R. The fossil record and early distribution of lizards. In: *Advances in Herpetology and Evolutionary Biology: Essays in Honor of Ernest E. Williams*. A. RHODIN and K. MIYATA (eds), Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 1983. p. 365-398.
- ESTES, R.; QUEIROZ, K.; GAUTHIER, J. Phylogenetic relationships within Squamata. In: *Phylogenetic relationships of the lizard families*, E. ESTES and G. PREGILL (eds), Stanford, California, 1988. p.119-281.
- FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791, 1985.
- FETZNER, J. Extracting high-quality DNA from shed reptile skins: a simplified method. *BioTechniques* 26: 1052-1054, 1999.
- FITZGERALD, L.A., COOK, J.A. & AQUINO, A.L. Molecular phylogenetics and conservation of *Tupinambis*. *Copeia* (4): 894-905, 1999.
- FRY, B. G.; VIDAL, N.; NORMAN, J. A.; VONK, F. J.; SCHEIB, H.; RAMJAM, S. F. R.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S. B.; RICHARDSON, M. K.; HODGSON, W. C.; IGNJATOVIC, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature* 439: 584-588, 2006.
- FU, J. Toward the phylogeny of the family Lacertidae- why 4708 base pairs of mtDNA sequences cannot draw the picture. *Biol. J. Linn. Soc.* 71, 203-217, 2000.
- GATESY, J.; ARCTANDER, P. Hidden morphological support for the phylogenetic placement of *Pseudoryx nghetinhensis* with bovine bovids: a combined analysis of gross anatomical evidence and DNA sequences from five genes. *Systematic Biology* 49(3): 515-538, 2000.
- GILBERT, C. R. Evolution and phylogeny. In *The physiology of fishes*. Evans, D. H. (ed.), CRC Press, Ann Arbor, 1992, pp. 1-46.

- GLOR, R. E.; VITT, L. J.; LARSON, A. A molecular phylogenetic analysis of diversification in Amazonian *Anolis* lizards. *Molecular Ecology* 10(11): 2661-2668, 2001.
- GORMAN, G. C. Chromosomes and the systematics of the family Teiidae (Sauria: Reptilia). *Copeia*, 2:230-245, 1970.
- GRAYBEAL, A. Evaluating the phylogenetic utility of genes: a search for genes informative about deep divergences among vertebrates. *Syst. Biol.* 43(2) : 174-193, 1990.
- HARRIS, D.J.; SINCLAIR, E. A.; MERCADER, N. L.; MARSHALL, J. C.; CRANDALL, K. A. Squamate relationships based on C-mos nuclear DNA sequences. *Herpetology* 9: 147-151, 1999.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. R. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755, 2001.
- JEANMOUGIN, F.; THOMPSON, J. D.; GOUY, M.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* 23: 403-405, 1998.
- KUMAR, S.; KOICHIRO, T.; JACOBSEN, I. B.; NEI, M. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245, 2001.
- LAVAGNE, A.; ARCHILOQUE, A.; BOREL, L.; DEVAUX, J. P.; MOUTTE, P.; CADEL, G. La végétation du Parc naturel régional du Queyras, commentaries de la carte phytocologique au 50,000°. *Revue biologie-ecologie méditerranéenne* 10: 175-248, 1984.
- LOVETTE, I. J.; BERMINGHAM, E. C-mos variation in songbirds: molecular evolution, phylogenetic implications, and comparisons with mitochondrial differentiation. *Molecular biology and evolution* 17: 1569-1577, 2000.
- MACEY, J. R.; STRANSBURG, J. L.; BRISSON, J. A.; VREDENBURG, B. T.; JENNINGS, M.; LARSON, A. Molecular phylogenetics of western north american frogs of the *Rana boylei* species group. *Molecular Phylogenetic Evol* 19: 131-143, 2001.
- MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. MacClade, Analysis of Phylogeny and character evolution, version 4.03. Sinauer, Sunderland, M.A. 2001.
- MORITZ, C.; WRIGH, J.W.; BROWN, W. M. Mitochondrial DNA analyses and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (genus *Cnemidophorus*). III. *C. velox* and *C. exsanguis*. *Evolution* 43: 958-968, 1989.
- MORO, S.; ABDALA, V. Cladistic analysis of Teiidae (Squamata) based on myological characters, Russian. *Journal of Herpetology* 7: 87-102, 2000.
- PANG, J.; WANG, Y.; ZHONG, Y.; HOELZEL, A. R.; PAPENFUSS, T. J.; ZENG, X.; ANANJEVA, N. B.; ZHANG, Y.-P. A phylogeny of chinese species within the genus *Phrynocephalus* (Agamidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenetic Evol* 27: 398-409, 2003.
- PECCININI-SEALE, D. Genetic studies on bisexual and unisexual populations of amazonian *Cnemidophorus*. In: *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*. New York State University Press, Albany, New York, 1989, pp. 241-251.

- PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; SITES, J. W. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family.- *Biological J. of the Linnean Society* 74: 315-338, 2001.
- PÉRES, A. K. Jr.; COLLI, G. R. The taxonomic status of *Tupinambis rufescens* and *T. duseni* (Squamata: Teiidae), with a redescription of the two species. *Occasional papers, Sam Noble Oklahoma museum of natural history* 15: 1-12, 2004.
- POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818, 1998.
- Pough HF, Andrews RM, Cadle JE, Crump ML, Savitzky AM, Wells KD (2001) *Herpetology*, Second edition. New Jersey: Prentice Hall.
- PRESCH, W. Evolutionary relationships and biogeography of the macroteiid lizards (Family Teiidae, Subfamily Teiinae). *Bull. South. Cal. Acad. Sci.* 73: 23-32, 1974.
- PRESCH, W. The lizard family Teiidae: is it a monophyletic group *Zoological J. Linnean Society* 77: 189-197, 1983.
- RAMBAUT, A. E. Se-AI: sequence alignment editor. Acesso em: <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software/Se-AI>., 1996.
- REEDER, T. W.; COLE, C. J.; DESSAUER, H. C. Phylogenetic relationships of whiptail lizards of genus *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae). *American Museum Novitates*, 3365: 1-61, 2002.
- RIEPPPEL, O. *The phylogeny of anguimorph lizards*, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1980, 86p.
- ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; PECCININI-SEALE, D. Evidence of na unisexual population of the Brazilian whiptail lizard genus *Cnemidophorus* (Teiidae), with description of a new species. *Herpetologica* 53:374-382, 1997.
- HODGES, W. L.; ZAMUDIO, K. R. Horned lizard (*Phrynosoma*) phylogeny inferred from mitochondrial genes and morphological characters: understanding conflicts using multiple approaches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 961-971, 2004.
- RODRIGUEZ, F. J.; OLIVER, J. L.; MARÍN, A.; MEDINA, J. R. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142: 485-501, 1990.
- SAINT, K. M.; AUSTIN, C. C.; DONNELLAN, S. C.; HUTCHINSON, M. N. C-mos, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 259-263, 1998.
- SORENSEN, M.D. TreeRot, ver. 2. Boston: Boston University, 1999.
- SULLIVAN, R. M.; ESTES, R. A reassessment of the fossil Tupinambinae. In: *Vertebrate paleontology in Neotropical*. KAY, R. F.; CIFELLI, R. L.; FLYNN, J. J. (eds.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 1995, p. 100-112.
- SWORFFORD, D. L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), ver.4. Sunderland: Sinauer Assoc., 2003.

- TEIXEIRA, R. D.; SCHELTINGA, D. M.; TRAUTH, S. E.; COLLI, G. R.; BÁO, S. N. A comparative ultrastructural study of spermatozoa of the teiid lizards, *Cnemidophorus gularis gularis*, *Cnemidophorus ocellifer*, and *Kentropyx altamazonica* (Reptilia, Squamata, Teiidae). *Tissue & Cell* 34(3): 135-142, 2002.
- TOWNSEND, T.M.; LARSON, A.; LOUIS, E. e MACEY, R. Molecular Phylogenetics of Squamata: the position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the root of the Squamata tree.- *Syst. Biol.* 53 (5): 735-757, 2004.
- VANZOLINI, P. E.; VALENCIA, J. The genus *Dracaena*, with a brief consideration of macroteiid relationships (Sauria, Teiidae). *Arquivos de Zoologia* 13: 7-35, 1965.
- VIDAL, N.; HEDGES, S. B. The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *Evolution* 328: 1000-1008, 2005.
- WIENS, J. J. Combining data sets with differential phylogenetic histories. *Syst Biol* 47: 568-681, 1998.
- XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution.- *Journal of heredity* 92: 371-373, 2001.

Tabelas

Tabela 1. Relação dos exemplares de teídeos seqüenciados para os genes citocromo b, NADH e *c-mos*.

ID	Espécie	Localidade	Código	Cit b	ND4	c-mos
LG 1185*	<i>Ameiva ameiva</i>	Aripuanã, MT	AamAriMT	S	S	S
LG 1196	<i>Ameiva ameiva</i>	Aripuanã, MT		S	N	N
LG 1843	<i>Ameiva ameiva</i>	Aripuanã, MT		S	S	S
MRT 3680	<i>Ameiva sp</i>	Ilha do Gado Bravo, BA		S	S	S
MRT 3675*	<i>Ameiva sp</i>	Ilha do Gado Bravo, BA	AspIgbBA	S	S	S
MRT 3678	<i>Ameiva sp</i>	Ilha do Gado Bravo, BA		S	S	S
MRT 3679	<i>Ameiva sp</i>	Ilha do Gado Bravo, BA		S	S	S
MRT 3676	<i>Ameiva sp</i>	Ilha do Gado Bravo, BA		S	S	S
MRT 926270	<i>Cnemidophorus lemniscatus</i>	Oriximiná, PA	-	S	S	S
MRT 926900*	<i>Cnemidophorus lemniscatus</i>	Oriximiná, PA	CleOriPA	S	S	S
MRT 926398	<i>Cnemidophorus lemniscatus</i>	Oriximiná, PA	-	S	S	S
MRT 926399	<i>Cnemidophorus lemniscatus</i>	Oriximiná, PA	-	S	S	S
MRT 3276*	<i>Cnemidophorus ocellifer</i>	Santo Inácio, BA	CocSIBA	S	S	S
MRT 3277	<i>Cnemidophorus ocellifer</i>	Santo Inácio, BA	-	S	N	S
MRT 3377	<i>Cnemidophorus ocellifer</i>	Santo Inácio, BA	-	S	S	N
MRT 11310	<i>Cnemidophorus ocellifer</i>	Icatu, BA	-	S	N	N
MRT 11312	<i>Cnemidophorus ocellifer</i>	Icatu, BA	-	N	S	S
MRT 11311*	<i>Cnemidophorus ocellifer</i>	Icatu, BA	CocIbiBA	S	S	S
MRT 12423	<i>Cnemidophorus natio</i>	CVRD, ES	-	S	N	S
MRT 12424	<i>Cnemidophorus natio</i>	CVRD, ES	-	S	S	N
MRT 12425*	<i>Cnemidophorus natio</i>	CVRD, ES	CnaVrdES	S	S	S
MRT 12539*	<i>Cnemidophorus natio</i>	Una, BA	CnaUnaBA	S	S	S
MRT 12558	<i>Cnemidophorus natio</i>	Una, BA	-	N	S	S
MRT 3462*	<i>Cnemidophorus sp</i>	Santo Inácio (Encantado), BA	CspSIEBA	S	S	S
MRT 3463	<i>Cnemidophorus sp</i>	Santo Inácio (Encantado), BA	-	S	S	N
MRT 968462*	<i>Iphisa elegans elegans</i>	Aripuanã, MT	Ielegans	S	S	S
LG 1411*	<i>Crocodylus lacertinus</i>	Rio Trombetas, PA	ClaTroPA	S	N	S
LG 1412	<i>Crocodylus lacertinus</i>	Rio Trombetas, PA	-	S	N	S
LG 1145*	<i>Colobosaura modesta</i>	Niquelândia, GO	Cmodesta	S	S	S
MRT 968391	<i>Kentropyx calcarata</i>	Apiacás, MT	-	S	S	S
MRT 968392*	<i>Kentropyx calcarata</i>	Apiacás, MT	KcaApiMT	S	S	S
LG 2054*	<i>Kentropyx calcarata</i>	Ilhéus, BA	KcaIlhBA	N	S	S
LG 1014*	<i>Kentropyx paulensis</i>	São José dos Campos, SP	KpaSjcSP	S	S	S
MRT 976725*	<i>Kentropyx vanzoi</i>	Gaúcha do Norte, MT	KvaGNoMT	S	N	S
MRT 976636	<i>Kentropyx vanzoi</i>	Gaúcha do Norte, MT	-	S	N	S
LG 1100*	<i>Teius oculatus</i>	San Miguel Contes, Argentina	TocSmcAr	S	S	S
LG 1983*	<i>Tupinambis merianae</i>	Lajeado, TO	TmeLajTO	S	S	S
LG 1984	<i>Tupinambis teguixim</i>	Lajeado, TO	-	N	S	S
LG 2030*	<i>Tupinambis teguixim</i>	Lajeado, TO	TteLajTO	N	S	S
LG 1132*	<i>Tupinambis quadrilineatus</i>	Niquelândia, GO	TquPeiMT	N	S	S

*= Espécime utilizado para as construções filogenéticas. S=Satisfatório e N=Não satisfatório

Tabela 2. Resumo das suBStituições nucleotídicas oBServadas.

Gene	Posição do códon	Ti	Tv	Razão Ti:Tv
c-mos	1 ^a . base	26	06	$\cong 4,34$
	2 ^a . base	15	06	$\cong 2,50$
	3 ^a . base	59	25	$\cong 2,36$
	Total	103	37	$\cong 2,78$
CytB	1 ^a . base	04	02	$\cong 1,8$
	2 ^a . base	01	00	-
	3 ^a . base	22	12	$\cong 1,8$
	Total	27	15	$\cong 1,8$
ND4	1 ^a . base	09	04	$\cong 2,2$
	2 ^a . base	02	00	-
	3 ^a . base	41	21	$\cong 1,95$
	Total	52	25	$\cong 2,1$

Tabela 3. Medidas de suporte para todos os nós da árvore de consenso de máxima parcimônia gerada pela análise combinada de todos os genes (ver Figura 2).

Nó	Bootstrap	Valor Total de Bremer	Valores Individuais de Bremer		
			Citb	ND4	Cmos
A	88	1	-0.33	1.83	-0.5
B	74	1	-0.33	1.83	-0.5
C	55	2	0.0	-6.5	8.5
D	<50	1	-1.0	5.5	-3.5
E	100	32	-0.5	7.5	39
F	80	5	-1.0	4.5	1.5
G	100	11	7.0	0.5	3.5
H	<50	1	-0.44	6.0	-2.6
I	73	2	0.0	0.0	2.0
J	80	2	0.0	3.9	-1.9
K	60	4	0.0	-7.5	11.5
L	99	14	7.83	9.83	-3.66
M	96	8	-0.33	5.16	3.16
N	100	28	13.0	15.5	-0.5
O	100	31	22.0	0.5	8.5

Legenda das Figuras

Figura 1. Gráficos de substituição para as regiões gênicas analisadas. Curvas das transições em azul (s) e das transversões em verde (v) para: a) *c-mos*, b) ND4 e c) *cit b*.

Figura 2. Reconstrução filogenética com base nas seqüências de todos os genes concatenados (*c-mos*, ND4 e *cit b*). Árvores consenso entre três mais parcimoniosas, com 1384 passos, índice de consistência de 0,55 e índice de retenção de 0,53. As letras acima dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* e índices de bremer apresentados na tabela 3.

Figura 3. Única árvore de máxima verossimilhança, obtida com base nas seqüências de todos os genes concatenados (*c-mos*, ND4 e *cit b*), com LnL13852.30486. Os valores acima dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap*.

Figura 4. Árvore consenso de maioria de 2985 árvores empregando método bayesiano, obtida com base nas seqüências de todos os genes concatenados (*c-mos*, ND4 e *cit b*). Ponto de corte foi de 15000 gerações e os valores acima dos ramos correspondem aos valores de probabilidade *a posteriori*.

Figura 5. Árvore de máxima verossimilhança, com dados citogenéticos descritos para os Teiinae (SANTOS *et al.*, artigo 1 desta tese). NF= número fundamental, 2n= número diplóide.

Figuras

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figura 4

Figura 5

IV Deleções parciais no proto-oncogene *c-mos* podem favorecer a reprodução partenogenética nos Squamatas?

Abstract

Parthenogenesis means virgen birth and it is a very special reproductive mechanism by with the egg develops without fertilization. This is to say that for a sexual species reproduce parthenogenetically, the main problem is to avoid the haploid reduction reduction of the egg during meiosis, once that viable haploid egg are unknown in vertebrates. Many investigations about the citological aspects presents in oogenesis of trully parthenogenetical species were performed without any important conclusions, once that apomitic and automitic process were considered. This work describes a hypothesis about how delections found on *c-mos* proto-oncogene may enables partenogenetic reproduction, in facultative automitic parthenogenesis, in lacertiformes and Squamata. Once that Mos, *c-mos* product, is a key regulatory protein of vertebrates meiosis and fullfils the requirements as “parthenogenesis gene”, as sugest by genetical models presents in literature. We present here a hipothesis where delections in this gene may favour the occourence of meiosis II fails leading to non-disjunction and parthenogenetic ativation in lizards.

Key words: Parthenogenesis, c-mos, lizards.

Resumo

O termo partenogênese quer dizer reprodução virginal e é um tipo muito especial de processo reprodutivo, pelo qual um óvulo se desenvolve sem fertilização. Assim, para uma espécie sexuada se reproduzir por partenogênese, o maior problema é evitar a redução do número de cromossomos durante a meiose, uma vez que óvulos haplóides são inviáveis em vertebrados. Diversos estudos citológicos tentaram descrever os eventos meióticos sem chegar a nenhum processo já que mecanismos apomíticos e automíticos parecem estar presentes, apesar de uma maior fonte de dados corroborar a segunda hipótese. Assim, esse trabalho descreve em detalhes uma hipótese sobre como deleções no proto-oncogene *c-mos* podem favorecer a reprodução partenogenética, na forma da partenogênese automítica facultativa (PAF), nos lacertiformes e nos Squamata. Uma vez que a proteína Mos, produto do proto-oncogene *c-mos*, é um dos reguladores centrais da meiose em oócitos de vertebrados e atende os requisitos a “gene da partenogênese”, como sugerido por modelos genéticos da literatura, formulamos hipótese onde deleções presentes na seqüência desse gene podem favorecer a ocorrência de falhas durante a meiose II induzindo a não disjunção e a ativação partenogenética nos lagartos.

Palavras chave: Partenogênese, *c-mos*, lagartos.

Introdução

Este trabalho descreve em detalhes uma hipótese sobre como deleções no proto-oncogene *c-mos* podem favorecer a reprodução partenogenética, na forma da partenogênese automítica facultativa (PAF), nos lacertiformes e nos Squamata. A hipótese foi formulada reunindo fatos recentes descritos no campo da genética molecular com as descrições citológicas e modelos genéticos propostos sobre a reprodução partenogenética nos lagartos.

Fatos

I. Base citológica da partenogênese

O termo partenogênese foi cunhado por OWEN, em 1849 (do grego: παρθενος = virgem; e γενεσις = origem) e quer dizer reprodução virginal. Conhecida também por telitoquia (nascimento feminino), é um tipo muito especial de processo reprodutivo, pelo qual um óvulo se desenvolve sem fertilização. Esse mecanismo reprodutivo se expressa de forma diferenciada entre os diversos grupos de metazoários, o que reflete uma condição filogenética independente, cuja homoplasia é a capacidade de formar descendência a partir unicamente do material genético contido na célula germinativa da gônada feminina (SIMON *et al.* 2003). Assim, para uma espécie sexuada se reproduzir por partenogênese, o maior problema é evitar a redução do número de cromossomos durante a meiose, uma vez que óvulos haplóides são inviáveis em vertebrados.

Tendo como base os mecanismos que podem evitar a redução do número diplóide, SUOMALAINEN *et al.* (1987) propõe a classificação da partenogênese em vertebrados como 1) Apomítica: quando o conjunto cromossômico não sofre redução meiótica, encontrada em espécies de peixes; 2) Automítica: quando os cromossomos se emparelham no zigóteno, ocorre o *crossing over* e eles formam bivalentes. A redução meiótica ocorre e a diploidia é restaurada por fusão dos núcleos polares ou dos núcleos de clivagem, formação

de um núcleo de restituição, endomeiose ou duplicação pré-meiótica. Esse segundo mecanismo foi observado em salamandras e répteis.

WHITE *et al.* (1977) destaca que nos Metazoa os fenômenos citológicos responsáveis pela partenogênese, não apresentam um padrão de expressão claro, sendo, portanto, de difícil detecção. Assim, são raros os estudos buscando compreender a base citológica da partenogênese nos Squamata. CUELLAR (1971), estudando a espécie partenogenética *Aspidoscelis uniparens*, não encontrou indícios de alterações meióticas, devido as dificuldades envolvidas na obtenção e análise das divisões primárias dos oócitos, e atribuiu a manutenção da diploidia a eventos apomíticos (pré-meióticos) de restituição, como a duplicação pré-meiótica, sem desconsiderar, no entanto, eventos automíticos como a incorporação do 2º. corpúsculo polar ou a não-disjunção. PECCININI-SEALE (1972, 1989), não comprovou a duplicação pré-meiótica como mecanismo citológico responsável pela partenogênese e apontou fenômenos automíticos como fusão do 2º. corpúsculo polar ou a não-disjunção como o processo mais provável, apesar de não comprovados. HARDY *et al.* (1989) também buscaram elucidar tais mecanismos na espécie *Gymnophthalmus underwoodi*, mas não encontraram resultados precisos.

Um exemplo das dificuldades envolvidas no estudo da meiose feminina, foi expresso por CUELLAR (1987). Segundo o autor, “Com as grandes dificuldades presentes numa precisa análise meiótica .... parece que a nossa seleção de um mecanismo [citológico] apropriado é determinado mais pela conveniência e disponibilidade dos dados do que pelo processo meiótico por si só”.

II. Origem da partenogênese nos Squamata

As dificuldades dos estudos meióticos, em elucidar completamente os mecanismos citológicos envolvidos na reprodução partenogenética, permitiram o surgimento de duas

hipóteses para explicar a origem da partenogênese nas cerca de 40 espécies de *Squamatas* que apresentam relatos comprovados deste modo de reprodução, tanto por hibridação quanto espontânea (Tabela 1).

A hipótese de hibridação foi proposta por LOWE & WRIGHT (1966) e aponta a hibridização interespecífica entre espécies bissexuais aparentadas como responsável pela origem das espécies unisexuais. Segundo essa teoria, híbridos diplóides são formados primeiro e essa hibridação propicia o desenvolvimento da partenogênese nos híbridos diplóides por falhas meióticas, propiciando a criação de oportunidades para a seleção de processos citológicos que recuperam a produção do oócito primário (VRIJENHOEK, 1989). A subsequente fecundação do ovócito não reduzido, hipoteticamente produzido pelo híbrido diplóide partenogenético recém surgido, com o espermatozóide haplóide normal de uma das espécies parentais, origina indivíduos triplóides.

Essa hipótese é baseada em estudos citogenéticos e moleculares em lagartos teídeos do gênero *Aspidoscelis*, que parecem ter se originado por hibridação entre espécies que não representam, necessariamente, grupos irmãos. A espécie partenogenética diplóide *A. tessalatus*, por exemplo, surgiu a partir de hibridações entre *A. tigris* e *A. septemvittatus*. A seguir, populações triplóides de *A. tessalatus* surgiram por uma nova hibridação da forma diplóide partenogenética com uma terceira espécie *A. sexlineatus* (WRIGHT & LOWE, 1968). Híbridos partenogenéticos resultantes dos cruzamentos entre espécies bissexuais apresentam uma alta heterozigozidade e alelos típicos das duas espécies parentais, e de acordo com os modelos citológicos propostos.

A hipótese alternativa foi proposta por PECCININI (1971), onde para explicar a diversidade citogenética e em aloenzimas da espécie partenogenética amazônica *Cnemidophorus lemniscatus*, a autora sugere que fêmeas partenogenéticas surgem espontaneamente dentro da população bissexual, podendo permanecer sintópicas a esta

população, pois a própria partenogênese seria uma barreira ao fluxo genético, podendo assim originar novas espécies próximas. Dados foram confirmados por CASE (1990), que descreve a coexistência de espécies irmãs de *Aspidosceles* que se reproduzem dos dois modos e formam híbridos nas regiões de contato, demonstrando o equilíbrio adaptativo dos dois tipos de reprodução em um estágio avançado de evolução seguindo o modelo de PECCININI (1971).

CUELLAR (1974), também propõe que a hibridização pode não ser a causa direta da partenogênese em vertebrados, baseado em quatro premissas: (1) Observações a partir de invertebrados partenogenéticos, (2) produção espontânea de linhagens partenogenéticas, (3) proposta destes trabalhos de que a partenogênese surge antes da hibridação e da poliploidia, (4) a falta de espécies híbridas unisexuais de vertebrados e invertebrados independentes de hibridações recorrentes entre os parentais. Tais obstáculos para a formação de uma espécie unisexual por meio da hibridação permanecem e foram revistos por MANNING *et al.* (2005): (1) a produção de híbridos entre espécies bissexuais de *Aspidoscelis* é tão raro e exclusivo de “instances of secondary intergradation” que nenhum foi identificado até o momento; (2) não há evidência de que os híbridos podem ser capazes de estabelecer uma população estável; (3) não há evidência de que podem ter sucesso na competição direta com os parentais.

Assim, apesar da existência de uma maior quantidade de dados apontar a origem espontânea da partenogênese como o mecanismo mais provável, os diversos autores que acreditavam na origem híbrida acumularam diversas evidências onde este mecanismo estava presente (COLE, 1975; UZELL & DAREVSKY, 1975; BICKHAM *et al.*, 1976, LESLIE & VRIJENHOEK, 1977; DOWNS, 1978; WRIGHT, 1978; BROWN & WRIGHT, 1979; VRIJENHOEK, 1979; TURNER *et al.*, 1980; COLE *et al.*, 1983; WRIGHT *et al.*, 1983; DESSAUER & COLE, 1984; GOOD & WRIGHT, 1984; MORITZ, 1991; MORITZ *et al.*,

1992; COLE & DESSAUER, 1993; MURPHY *et al.*, 2000; entre outros). Esse volume de dados levou ao quase desaparecimento da hipótese espontânea, que se limitou a registros zoológicos ocasionais em espécimes cativos, uma vez que indivíduos partenogenéticos produzidos assim são improváveis de serem encontrados na natureza, e passou a ser caracterizado como facultativa.

SCHUETT *et al.* (1997), descrevendo a ocorrência de partenogênese em espécies bissexuais de cobras, propõe a partenogênese em perus domésticos como um modelo para os Squamatas. O modelo da partenogênese automítica facultativa (PAF) corresponde a um tipo de partenogênese melhor conhecido em perus domésticos, uma vez que dependendo da raça, o desenvolvimento partenogenético pode alcançar 40% dos ovos não fertilizados (OLSEN, 1975). No entanto, tais estatísticas abrangem uma grande parte de partenógenos, que geralmente morrem em 24 horas de incubação como uma massa de células epiteliais desorganizadas e são classificados como desenvolvimento positivo (CASSAR *et al.*, 1998). Os raros embriões verdadeiramente partenogenéticos existentes são sempre machos e mais de 87% de suas células são diplóides (CASSAR *et al.* 1998).

Como as fêmeas das aves são o sexo heterogamético e somente machos são formados na PAF, os mecanismos de origem são necessariamente automíticos, como apresentados por CASSAR *et al.* (1998): “Na PAF, os aspectos iniciais da meiose das fêmeas são mantidos, mas ocorre a supressão da meiose II ou re-entrada do segundo corpúsculo polar, restaurando a diploidia”. Como tais mecanismos automíticos, são os mesmos propostos citologicamente por PECCININI (1971), PECCININI-SEALE & FROTA-PESSOA (1974) e por CUELLAR (1974) e geneticamente por SCHUETT *et al.* 1997, acreditamos que na realidade tais processos sejam os mesmos. Esta hipótese ganha força quando consideramos que devido a ocorrência do *crossing-over* durante a meiose I, os indivíduos resultantes deste processo apresentam alto grau de heterigozidade (OLSEN,

1975), como comprovado para a ampla maioria das espécies partenogenéticas de lagartos (DAREVSKY, 1985; MORITZ, 1991; MORITZ *et al.*, 1992; COLE & DESSAUER, 1993; MURPHY *et al.*, 2000).

No entanto, um caso recente de partenogênese facultativa na espécie de cobra *Python molorus bivittatus* (GROOT *et al.* 2003), ilustra bem a variedade de mecanismos meióticos que podem propiciar partenogênese. A espécie apresenta sistema de determinação sexual do tipo ZZ:ZW (onde a fêmea é o sexo heterogamético), e a prole partenogenética era apenas constituída de fêmeas, sendo portanto clones maternos. GROOT *et al.* (2003) propuseram mecanismos apomíticos para a origem da partenogênese, uma vez que a falha meiótica ocorreria antes da primeira divisão. Tais eventos seriam a fusão do núcleo de clivagem, fusão do 1º. corpúsculo polar com o núcleo do oócito secundário e duplicação pré meiótica.

CUELLAR (1974), em sua extensa revisão sobre os fatores citogenéticos envolvidos na origem da partenogênese nos vertebrados, afirma que a ticopartenogênese (produção acidental e espontânea de fêmeas por ovos não fertilizados, que estamos sinonimizando a PAF), e não a hibridação seria a fonte original de evolução da partenogênese. Assim, apesar de sua teoria não possuir apoio factual, o autor aponta os pressupostos genéticos necessários para que tal mecanismo reprodutivo exista:

- 1) A penetração do espermatozóide não é essencial para o início da clivagem, e, portanto, os ovos da maioria dos animais podem se clivar espontaneamente. Assim, segundo o autor, parece que ao menos o gatilho para o início da clivagem reside no próprio ovo, ou seja, possui um **controle genético**.
- 2) Divisões abortivas são um fenômeno comum na meiose de espécies bissexuais, e essas **falhas** na seqüência dos eventos meióticos ocasionalmente

produzem ovos diplóides. Assim, a meiose em todos os animais é flexível e sujeita a erros que provocam a formação de ovos diplóides.

- 3) Os fatores responsáveis por tais falhas estão sob controle genético, provavelmente como **mutações nos genes** que controlam a formação do fuso e outros aspectos da citocinese.

Hipótese: Deleções no proto-oncogene *c-mos* podem aumentar a possibilidade de falhas na meiose II, favorecendo a ocorrência de partenogênese espontânea (PAF) em lagartos?

Em organismos sexuais, a integridade genômica é mantida nas sucessivas gerações pela coordenação entre a mitose e a meiose. As células meióticas são caracterizadas por duas fases consecutivas, meiose I e meiose II, sem uma fase S intermediária, resultando na produção de gametas haplóides. A fertilização recupera a diploidia e após o término da meiose II, o ciclo celular embrionário, que consiste na alternância de fases S e M, é iniciado nas células do zigoto. Neste processo, a proteína Mos, produto do proto-oncogene *c-mos*, é um dos reguladores centrais da meiose em oócitos de vertebrados (SAGATA *et al.* 1989) e é um candidato a “gene da partenogênese” como sugerido por CUELLAR (1974).

No fim da meiose I, a célula já adquire competência para seguir em um ciclo celular mitótico embrionário, com seu específico mecanismo de controle, mas o produto do *c-mos*, a kinase pp39^{mos}, atua ativando uma cascata de proteínas como betaciclinas e kinases (CDK1, p34^{cdc2}) que previnem a ativação partenogenética fazendo com que a célula entre em meiose II (Figura 1) (TACHIBANA *et al.*, 2000).

Os oócitos dos cordados superiores param na metáfase da segunda divisão meiótica antes da fertilização. Esta parada ocorre devido uma atividade conhecida por Fator Citostático (FC) atribuída ao *c-mos*, que evita o término da meiose II até que o

espermatozóide, por meio de um sinal de CA^{2+} citoplasmático, degrade as betaciclinas envolvidas, induzindo o término da meiose II e levando à recuperação do ciclo celular mitótico embrionário (Figura 1).

O Fator Promotor da Maturação (FPM) orienta a transição das células somáticas em mitose e dos oócitos em meiose. Durante a meiose II, o FPM é estabilizado e mantido dentro dos limites fisiológicos pela cascata do *c-mos* (MADGWICK & JONES, 2007), em concentração nem tão alta para que a parada em metáfase não possa ser desbloqueada, ou nem tão baixa para induzir uma ativação partenogenética.

A descoberta recente do mecanismo de ação do proto-oncogene *c-mos* durante a meiose, atende ao primeiro pressuposto de CUELLAR (1974), de que o gatilho para o início da clivagem reside no próprio ovo. O segundo pressuposto do autor propõe que falhas nesse controle genético favorecem a ocorrência de partenogênese e foi comprovado por SAGATA *et al.* (1988; 1989) em oócitos do anfíbio *Xenopus* e por COLLEGE *et al.* (1994) e HASHIMOTO *et al.* (1994) que demonstraram que ratas cujas seqüências de *c-mos* foram desligadas por *knockout*, desenvolveram teratomas em seus ovários. A análise detalhada desses oócitos revelou a ocorrência de ativação partenogenética imediatamente após a meiose I. Estas descobertas corroboraram estudos anteriores que apontavam que alterações no *c-mos*, e a perda da kinase $pp39^{mos}$, levava a uma descondensação dos cromossomos metafásicos, reconstituição nuclear após meiose I e clivagem em duas células filhas somáticas, consistente com as alterações necessárias para a iniciação prematura do ciclo celular mitótico imediatamente após a meiose I (O'KEEFE *et al.*, 1989; TACHIBANA *et al.*, 2000).

Como vimos anteriormente, o *c-mos* atende os dois primeiros pressupostos genéticos da hipótese de origem espontânea da partenogênese. No entanto, existem mutações nesse gene que explicariam a ocorrência desse fenômeno?

Teste da Hipótese: Existem mutações no proto-oncogene c-mos relacionadas à partenogênese em lagartos?

Os lagartos da infra-ordem Lacertiformes (incluindo as famílias Gymnophthalmidae, Lacertidae e Teiidae) abrangem a grande maioria das espécies partenogenéticas conhecidas (Tabela 1) e podem fornecer importantes pistas sobre a base genética deste mecanismo reprodutivo. Os lagartos lacertídeos, representados na Figura 2 pelas espécies *Lacerta oxicephala* e *Takydromus septentrionalis*, apresentam como autapomorfia uma deleção de 18 pb numa região do *c-mos*, correspondente aos pares de base 727 a 768 da sequência do *c-mos* de humanos. Sequências obtidas para o *c-mos* de lagartos teídeos, revelam a existência de uma deleção contínua de 12 pb como autapomorfia da subfamília Teiinae, que abrange diversas espécies e populações partenogenéticas. Entretanto, nenhuma deleção ocorre na subfamília Tupinambinae, que não possui espécies partenogenéticas. Os lagartos da família Gymnophthalmidae por sua vez apresentam uma variação mais extensa nas deleções: a subfamília Gymnophthalmidae (PELLEGRINO *et al.*, 2001) apresenta deleção de 12 pb em todas suas espécies, exceto *Ranchisaurus* (basal). Deleções subsequentes de um códon reúnem as espécies dos gêneros *Micrablepharus*, *Tretioscincus*, *Vanzosaura* e *Procellosaurinus* e de dois códons presentes no gênero *Gymnophthalmus* que possui espécie partenogenética. Outra deleção é encontrada nas espécies da tribo Eubleopini, exceto *Arthrosaura* que ocupa posição basal neste clado, que compreende as espécies partenogenéticas do gênero *Leposoma*. É importante ressaltar que essas deleções, envolvem sempre múltiplos de três pares de bases e assim não alteram o quadro de leitura do *c-mos*.

Tendo em vista o papel do *c-mos* na manutenção da ploidia, e as características ecológicas observadas em lagartos teídeos (subfamília Teiinae), lacertídeos e

gymnophthalmídeos, parece-nos possível sugerir uma relação entre espécies partenogenéticas de lagartos e as mutações no *c-mos* ora observada, onde apesar de nem todas as espécies portadoras de tal deleção serem partenogenéticas, tais espécies apresentam a potencialidade de se reproduzir facultativamente dessa forma.

A deleção observada poderia dificultar a manutenção do FPM dentro dos limites fisiológicos, induzindo a partenogênese, semelhante ao observado em animais *knockout* (SAGATA *et al.* 1988, 1989; COLLEGE *et al.* 1994; HASHIMOTO *et al.* 1994). No entanto, o *Mos* mutante ainda poderia ser capaz de manter seu papel como fator citostático (FC), regulando a passagem do ciclo celular meiótico (estacionado em metáfase) para o ciclo mitótico embrionário regular, e assim, evitar a formação contínua de ovos.

A manutenção do papel citostático do *Mos* mutante (regulando o “término da meiose” e o início do ciclo somático) dependente do espermatozóide, poderia explicar os diversos casos de hibridação observados em diversas espécies de lagartos, assim como a origem híbrida de muitas espécies partenogenéticas. Esse mecanismo não difere muito do mecanismo classicamente descrito para a ginogênese, um sistema descrito para salamandras do complexo *Ambystoma jeffersonianum* (HEDGES *et al.* 1992, BOGART & KLEMENS 1997), onde as fêmeas devem obrigatoriamente copular com machos de uma espécie bissexual simpátrica de modo a se reproduzir com sucesso. Apesar dos autores não apresentarem uma hipótese sobre essa limitação reprodutiva, acreditamos que, tal como na partenogênese, a obrigatoriedade do cruzamento mesmo sem a fusão do material genético está relacionada ao desbloqueio do *Mos* nos oócitos, promovendo o estabelecimento do ciclo mitótico normal e assim a formação do embrião.

No entanto, uma vez que o *Mos* necessita do estímulo do espermatozóide para dar prosseguimento à formação do oócito, como tal processo poderia ocorrer em espécies de

lagartos estritamente unisexuais e nas que apresentam partenogênese facultativa, uma vez que não existem machos?

Nas espécies bissexuais, o espermatozóide degrada as betaciclinas produzidas pelo *c-mos*, por meio de um sinal de CA^{2+} citoplasmático. No entanto, segundo o primeiro pressuposto de CUELLAR (1974), a penetração do espermatozóide não é essencial para o início da clivagem e os ovos da maioria dos animais podem clivar-se espontaneamente. Realmente, vários tratamentos artificiais podem mimetizar os efeitos desencadeados pelo espermatozóide e induzir o desenvolvimento partenogenético em oócitos secundários como etanol, eletro-estímulos, injeção de cálcio, ionomicina ou inositol 1,4-5 trifosfato (MITALIPOV *et al.*, 2001).

Estudos comportamentais em espécies partenogenéticas de *Aspidoscelis* (CREWS & FITZGERALD, 1980; WENNSTRON & CREWS, 1995; SAKATA *et al.* 2003) mostram que indivíduos de espécies e/ou populações partenogenéticas, apesar de possuírem uma aparente autonomia reprodutiva, carecem de estímulos externos, normalmente executados por outra fêmea ou machos de outras espécies próximas na forma de rituais de acasalamento, para gerarem ovos viáveis. CREWS & SAKATA (2000) e SAKATA *et al.* (2003) verificaram que em todas as espécies de *Aspidoscelis* partenogenéticas estudadas, as fêmeas possuem ciclos hormonais de progesterona e testosterona alternados de forma a algumas se comportarem como macho, enquanto outras permanecem como fêmeas e assim garantir a manutenção da espécie. Acreditamos que tal controle hormonal está diretamente relacionado à hipótese ora apresentada, uma vez que tais comportamentos parecem refletir uma evidente adaptação à falta de espermatozoides necessários para a desativação do *mos*, e assim, regular por si só a geração de embriões viáveis.

O mecanismo proposto pode ser expandido aos demais Squamata?

Comparando as seqüências apresentadas aqui para os Lacertiformes com as apresentadas por SAINT *et al.* (1998) para uma amostra incluindo taxa de diversas famílias e ordens de Squamata, comprovamos a ocorrência de deleções nessa região de 41 pb (727-768 pb da seqüência do *c-mos* de humanos). Quatro dessas deleções envolviam um códon, e foi observada em três espécies de cobras e uma espécie de lagarto do gênero *Lipinia* (Família Scincidae). A outra deleção observada envolveu 12pb para a espécie de teídeo *Aspidoscelis tigris*, que devido ao seu tamanho e considerando estar presente em um gene nuclear importante no ciclo celular, foi considerada pelos autores como “improvável” e potencialmente contaminada, o que contradiz os dados obtidos para os demais gêneros da subfamília Teiinae (Santos *et al.*, artigo 3 desse capítulo). HAN *et al.* (2004) propõe uma filogenia para os lagartos geconídeos e identifica deleções de 12pb como autapomorfia para o gênero *Hemidactylus frenatus* (Figura 2), cujo gênero possui espécies partenogenéticas. Deleções de 12pb foram encontradas também para *Gehyra* e uma deleção de 21 pb representa uma autapomorfia de *Bunopus*, *Cyrtodactylus* e *Stenocercus*.

As distribuições das deleções nas diferentes filogenias propostas concordam em um ponto: todas espécies de Squamata sabidamente partenogenéticas apresentam deleções envolvendo pelo menos quatro códons (Figura 2). No entanto, a falta de dados de seqüenciamento do *c-mos* para todas as espécies partenogenéticas conhecidas é um fator limitante a considerações mais amplas. Deleções em um códon do *c-mos* também foram observadas em aves do gênero *Dendroica* e *Basileurus* (LOVETTE & BERMINGHAM, 2000) e em *Rhea* (COOPER & PENNY, 1997) na mesma região das descritas por SAINT *et al.* (1998) sendo portanto homoplásticas. Essas deleções, apesar de ocorrerem na mesma região das aqui descritas para teídeos, são menores e devem ter efeitos de menor impacto sobre a funcionalidade do *c-mos*.

Conclusões e perspectivas futuras

Como apresentado anteriormente, podemos estabelecer algumas características gerais da reprodução partenogenética:

- 1) O modelo da partenogênese automítica facultativa (OLSEN, 1975), apesar de não ser o único aparentemente presente nos Squamata (e.g. GROOT *et al.* 2002), compreende a teoria híbrida e a teoria espontânea da origem da partenogênese nos Squamata;
- 2) Os diferentes tipos de partenogênese existentes, como ginogênese e partenogênese, podem ser associados as diferentes formas de ativação meiótica, expressos pelo proto-oncogene *C-mos*;
- 3) O proto-oncogene *C-mos* atende ao modelo genético da partenogênese espontânea proposto por CUELLAR (1974), apresentando mutações em suas seqüências (na forma de deleções), que parecem aumentar a incidência de falhas na meiose II, em especial a não disjunção, favorecendo a reprodução partenogenética.

Estudos complementares mais aprofundados envolvendo uma caracterização melhor do *C-mos* e de seu produto nas diversas espécies partenogenéticas são necessárias para o esclarecimento da base genética da partenogênese. A descoberta dos mecanismos pelos quais os genes envolvidos nas transições somático-reprodutivas atuam e são expressos nas diferentes espécies de Squamata também podem fornecer valiosas informações sobre esse modo de reprodução.

Referências Bibliográficas

- ADAMS M, FOSTER R, HUTCHINSON M.N., HUTCHINSON R.G., & DONNELLAN S.C. The Australian scincoid lizard *Menetia greyii*: a new instance of widespread vertebrate parthenogenesis. *Evolution*, 57, 2619–2627, 2003.
- BEZY, R. L. Karyotypic variation and evolution of the lizards in the family Xantusidae. *Contrib. Sci. Nat. Hist. Mus. Los Angeles Country* 227: 1-29, 1972.
- BICKHAM, J.W., McKINNEY & MATTHEWS, M. F. Karyotypes of the partenogenetic whiptail lizard *Cnemidophorus laredoensis* and its presumed parental species (Sauria: Teiidae), *Herpetologica* 32: 395-399, 1976.
- BOGART, J. P.; KLEMENS, M. W. Hybrids and genetic interactions of mole salamanders (*Ambystoma jeffersonianum* and *A. laterale*) (Amphibia: Caudata) in New York and New England. *American museum Novitates* 3218: 1-78, 1997.
- BROWN, W. M.; WRIGHT, J. W. Mitochondrial DNA analyses and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (genus *Cnemidophorus*). *Science* 203: 1247-1249, 1979.
- CASE, T.J. Patterns of coexistence in sexual and asexual species of *Cnemidophorus* lizards. *Oecologia*, 83(2): 220-227, 1990.
- CASSAR, G.; MOHAMMED, M.; JOHN, T. M.; GAZDZINSKI, P.; ETCHES, R. J. Differentiating between parthenogenetic and “Positive development” embryos in turkeys by molecular sexing. *Poultry Science* 77: 1463-1468, 1998.
- COLE, C. J. Evolution of parthenogenetic species of reptiles. In: Intersexuality in the animal kingdom. REINBOTH, R. (ed.), Springer Verlag, Berlin and New York, 1975, p. 340-355.
- COLE, C. J.; DESSAUER, H. C.; TOWNSEND, C. R. Isozymes reveal hybrid origin of neotropical unisexual lizards. *Isozyme Bull.* 16: 74, 1983.
- COLE, C. J. & H. C. DESSAUER. Unisexual and bisexual whiptail lizards of the *Cnemidophorus lemniscatus* complex (Squamata: Teiidae) of the Guiana region, South America, with descriptions of new species. *American Museum Novitates*, 3081: 1-30, 1993.
- COLLEGE, W. H.; CARLTON, M. B. L.; UDY, G. B.; EVANS, M. J. Disruption of *c-mos* causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *NATURE* 370: 65-68, 1994.
- COLE, C. J.; DESSAUER, H. C.; TOWNSEND, C. R. & ARNOLD, M. G. *Kentropyx borckiana* (Squamata, Teiidae) : a unisexual lizard of hybrid origin in the Guiana region, South America. *American Museum novitates* 3145:1-23, 1995.
- COOPER A. & PENNY D. Mass survival of birds across the Cretaceous-Tertiary boundary: Molecular evidence. *Science*. 275:1109–1113. 1997.
- CREWS, D; FITZGERALD, K. Sexual behavior in parthenogenetic lizards (*Cnemidophorus*). *PNAS* 77(1):499-502. 1980.
- CREWS, D; SAKATA, J. Evolution of brain mechanisms controlling sexual behavior. IN> MATSUMOTO, A. (Ed), Sexual differentiation of the brain. *J. Neurosci.* 15:7247-7352. 2000.

- CUELLAR, O. Reproduction and the mechanism of meiotic restitution in the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus unipares*. *J. Morphology* 133: 139-165, 1971.
- CUELLAR, O. On the origin of parthenogenesis: The cytogenetic factors. *Am. Nat.* 108: 625-648, 1974.
- CUELLAR, O. The evolution of parthenogenesis: A historical perspective. In: Meiosis. MOENS, P. B. (ed.). Academic Press. Inc. London, p. 43-97, 1987.
- CUELLAR, O.; KLUGE, A. G. Natural parthenogenesis in the gekkonoid lizard *Lepidodactylus lugubris*. *Journal of Genetics* 61: 14-28, 1972.
- DAREVSKY, I. S.; KUPRIYANOVA, L. A. Natürliche Parthenogenese in der polymorphen Gruppe der Kaukasischen Felseidechse (*Lacerta saxicola* Eversmann). *Zool. Jahrb. Abt. Syst. Oekol. Geogr. Tiere* 89: 119-176, 1961.
- DAREVSKY, I. S.; KUPRIYANOVA, L. A.; ROSHCHIN, V. V. A new all-female triploid species of gecko and karyological data on the bisexual *Hemidactylus frenatus* from Vietnam. *Journal of Herpetological* 18: 277-284, 1984.
- DAREVSKY, I.S., KUPRIYANOVA, L.A., UZZELL, T.: Parthenogenesis in reptiles. In: *Biology of the Reptilia* 15, (eds Gans, C.; Billett, F.) Development B. Willey, New York. p. 411-526, 1985.
- DESSAUER, H. C.; COLE, C. J. Influence of gene dosage on electrophoretic phenotypes of proteins from lizards of the genus *Cnemidophorus*. *Comp. Biochem Physiol.* 77: 181-189, 1984.
- DOWNS, F. L. Unisexual ambystoma from the Bass Island of lake Erie. *Occas. Pape. Mus. Zool. Univ. Mich.* 685: 1-36, 1978.
- DUBACH, J.; SAJEWICZ, A.; PAWLEY, R. Parthenogenesis in the Araucarian Filesnake (*Acrochordus arafurae*). *Herpetol Nat Hist* 5: 11-18, 1997.
- FRITTS, T. H. The systematics of the parthenogenetic lizards of the *Cnemidophorus cozumela* complex. *Copeia* 519-535, 1969.
- FRYE, F. L.; MADDEN, H. S. The immaculate deception. *Reptiles* 3: 32-38, 1995.
- FRITZ, T.H. The systematics of the parthenogenetic lizards of the *Cnemidophorus cozumela* complex. *Copeia* 3:519-535, 1969.
- FU, J.; MACCULLOCH, R. D.; DAREVSKY, I. S.; KUPRIYANOVA, L. A.; DANIELYAN, F. The parthenogenetic rock lizard *Lacerta unisexualis*: an example of limited polymorphism. *Journal of Molecular Evolution* 46: 127-130, 1998.
- GOOD, D. A.; WRIGHT, J. W. Allozymes and the hybrid origin of the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus exsanguis*. *Experientia* 40: 1012-1014, 1984.
- GROOT, TVM; BRUINS E; BREEUWER, JAJ. Molecular genetic evidence for parthenogenesis in the Burmese python, *Python molurus bivittatus*. *Heredity* 90: 130-135, 2003.
- HALL, W. P. Three probable cases of parthenogenesis in lizards (Agamidae, Chamaeleontidae, Gekkonidae). *Experientia* 26: 1271-1273, 1970.

- HARDY, L. M.; COLE, C. J.; TOWNSEND, C. R. Parthenogenetic reproduction in the neotropical unisexual lizard, *Gymnophthalmus underwoodi* (Reptilia: Teiidae). *Journal of Morphology* 201:215-234, 1989.
- HAN, D.; ZHOU, K.; BAUER, A. M. Phylogenetic relationships among gekkotan lizards inferred from C-mos nuclear DNA sequences and a new classification of the Gekkota *Biological Journal of the Linnean Society* 83 (3), 353-368. 2004.
- HASHIMOTO, N.; WATANABE, N.; FURUTA, Y.; TAMEMOTO, H.; SAGATA, N.; YOKOYAMA, M.; OKAZAKI, K.; NAGAYOSHI, M.; TAKEDA, N.; IKAWA, Y.; ALZAWA, S. Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature* 370: 68-71, 1994.
- HEDGES, SB; BOGART, JP; MAXSON, LR. Ancestry of unisexual salamanders. *Nature* 356:708-710. 1992.
- KLUGE, A. G.; ECKARDT, M. J. Hemidactylus garnoti: a triploid all-female species of gekkonid lizard. *Copeia* 651-664, 1969.
- LENK, P.; EIDENMUELLER, B.; STAUDTER, H.; WICKER, R.; WINK, M. A parthenogenetic Varanus. *Amphibia-Reptilia* 26: 507-514, 2005.
- LESLIE, J. F.; VRIJENHOEK, R. C. Genetic analysis of natural populations of *Poeciliopsis monacha*. *J. Hered* 68: 301-306, 1977.
- LOVETTE, I. J., & BERMINGHAM. E.; C-mos variation in songbirds: Molecular evolution, phylogenetic implications, and comparisons with mitochondrial differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1569-1577. 2000
- LOWE, C.H.; WRIGHT, J.W. Chromosomes and karyotypes of *Cnemidophorus teiid* lizards. *Mamm. Chromosome Newsl.* 22: 199-200, 1966.
- LOWE, C.H.; WRIGHT, J.W.; COLE, C.L. & BEZY, R.L. Chromosomes and evolution of the species group *Cnemidophorus* (Reptilia: Teiidae). *Systematic Zoology*, 19:114-127, 1970.
- MACCULLOCH, R. D.; MURPHY, R. W.; KUPRIYANOVA, L. A.; DAREVSKY, I. S.; DANIELYAN, F. Clonal variation in the parthenogenetic rock lizard *Lacerta armeniaca*. *Genome* 38: 1057-1060, 1995.
- MADGWICK, S.; JONES, K. T. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals cytostatic factor. *Cell Divison* 2 (4); 1-7, 2007.
- MANNING, G. J.; COLE, C. J.; DESSAUER, H. C.; WALKER, J. M. Hybridization between parthenogenetic lizards (*Aspidoscelis neomexicana*) and Gonochoristic lizards (*Aspidoscelis sexlineata viridis*) in New Mexico: ecological, morphological, cytological and molecular context. *American Museum Novitates* 3492, 1-56, 2005.
- McKINNEY, C. O.; KAY, F. R.; ANDERSON, R. A. A new all-female species of the genus *Cnemidophorus*. *Herpetologica* 29: 361-366, 1973.
- MITALIPOV, S. M.; NUSSER, K. D.; WOLF, D. P. Parthenogenetic activation of rhesus monkey oocytes and reconstructed embryos. *Biology of reproduction* 65: 253-259, 2001.
- MORITZ, C. Parthenogenesis in the endemic Australian lizard *Heteronotia binoei* (Gekkonidae). *Science* 220: 735-737, 1983.

- MORITZ, C. The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* (Gekkonidae). *Chromosoma* 89: 151-162, 1984.
- MORITZ, C. The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* (Gekkonidae): evidence for recent and localized origins of widespread clones. *Genetics* 129: 211-219, 1991.
- MORITZ, C.; WRIGHT, J. W.; BROWN, W. M. Mitochondrial DNA analyses and the origin and relative age of parthenogenetic *Cnemidophorus*: Phylogenetic constraints on hybrid origins. *Evolutin* 46: 184-192, 1992.
- MURPHY RW, FU J, MACCULLOCH RD, DAREVSKY IS, KUPRIYANOVA LA. A fine line between sex and unisexuality: the phylogenetic constraints on parthenogenesis in lacertid lizards. *Zool J Linn Soc* 130:527-549. 2000.
- NEAVES, W. B. Adenosine deaminase phenotypes among sexual and parthenogenetic lizards in the genus *Cnemidophorus* (Teiidae). *J. Exp. Zool.* 171: 175-183, 1969.
- MANRIQUEZ-MORAN, N. L.; VILLAGRAN-SANTA CRUZ, M & MENDEZ-DE LA CRUZ, F. R.. Origin and Evolution of the Parthenogenetic Lizards, *Cnemidophorus maslini* and *C. cozumela*. *Journal of Herpetology*, 34:4, pp. 634-637. 2000.
- NUSSBAUM, R. A. The brahminy blind snake (*Ramphotyphlops braminus*) in the Seychelles archipelago: distribution, variation, and further evidence for parthenogenesis. *Herpetologica* 36: 215-221, 1980.
- O'KEEFE, S. J.; WOLFES, H.; KIESSLING, A. A.; COOPER, G. M. XXXXX *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7038-7042, 1989.
- OLSEN, M. W. Avian parthenogenesis. *Agr. Res. Service, USDA, ARS-NE-65*: 1-82, 1975.
- OTA, H.; HIKIDA, T.; MATSUI, M.; MORI, A.; WYNN, A. H. Morphological variation karyotype and reproduction of the parthenogenetic blind snake, *Ramphotyphlops braminus*, from the insular region of East Asia and Saipan. *Amphibia-Reptilia* 12: 181-193, 1991.
- OWEN, R. On parthenogenesis, or the successive production of procreating individuals from a single ovum. London: van Voorst, 1490pp. 1849.
- PECCININI, D. Chromosome variation in populations of *Cnemidophorus lemniscatus* in the Amazon Valley. *Cienc. Cult. (São Paulo)* 23: 133-136, 1971.
- PECCININI-SEALE, D. and FROTA-PESSOA, O. Structural heterozygosity in parthenogenetic populations of *Cnemidophorus lemniscatus* (Sauria, Teiidae) from the Amazonas Valley.- *Chromosoma* 1974. 47: 439-451.
- PELLEGRINO, K. C. M; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; SITES, J. W. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family.- *Biological J. of the Linnean Society* 74: 315-338, 2001.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T. & YONENAGA-YASSUDA, Y. 2003. The triploid karyotype of *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae).- *J. Herpetology* 37 (1): 197-199.
- PETERS, G. Die intragenerischen Gruppen und die Phylognese der Schmetterlingsagamen (Agamidae: Leiolepis). *Zool Jahrb* 98: 11-130, 1971.

- ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; PECCININI-SEALE, D. Evidence of a unisexual population of the Brazilian whiptail lizard genus *Cnemidophorus* (Teiidae), with description of a new species. *Herpetologica*, 1997. 53:374-382.
- SAGATA, N.; OSKARSSON, M.; COPELAND, T.; BRUMBAUGH, J.; VANDE WOUDE, G. F. Nature 335: 519-525, 1988.
- SAGATA, N.; WATANABE, N.; WOUDE, G. F.; IKAWA, Y. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrates eggs. *Nature* 342:512-518. 1989.
- SAINT, K.M., Austin, C.C., Donnellan, S.C., Hutchinson, M.N. C-mos, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. *Mol. Phyl. Evol.* **10**: 259-263. 1998.
- SAKATA, J.T.; WOOLLEY, S.C.; GUPTA, A.; CREWS, D. differential effects of testosterone and progesterone on the activation and retention of courtship behavior in sexual and parthenogenetic whiptail lizards. *Hormones and Behavior*. 43:523-530. 2003.
- SCHUETT, G. W.; FERNEZ, P. J.; GERGITS, W. F.; CASNA, N. J.; CHISZAR, D.; SMITH, H. M.; MILTON, J. B.; MACKESSY, S. P.; ODUM, R. A.; DEMLONG, M. J. Production of offspring in the absence of males: evidence for facultative parthenogenesis in bisexual snakes. *Herpertol. Nat. Hist.* 51: 1-10, 1997.
- SCUDDAY, J. F. A new species of lizard of the *Cnemidophorus tesselatus* group from Texas. *J. Herpetol.* 7: 363-371, 1973.
- SIMON, J. C.; DELMOTTE, F.; RISPE, C.; CREASE, T. Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 151-163, 2003.
- SUOMALAINEN, E.; SAURA, A.; LOKKI, J. *Cytology and evolution in Parthenogenesis*. CRC Press: Boca Raton, FL. 1987.
- TACHIBANA, K.; TANAKA, D.; ISOBE, T.; KISHIMOTO. C-mos forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes. *PNAS* 97(26): 14301-14306, 2000.
- TURNER, B. J.; BRETT, B. H.; MILLER, R. R. Interspecific hybridization and the evolutionary origin of a gynogenetic fish, *Poecilia formosa*, the Amazon molley. *Evolution* (Lawrence. Kans) 34: 246-258, 1980.
- UZZELL, T. M.; DAREVSKY, I. S. Biochemical evidence for the hybrid origin of the parthenogenetic species of the *Lacerti saxicola* complex (Sauria Lacertidae), with a discussion of some ecological and evolutionary implications. *Copeia* 204-222, 1975.
- VRIJENHOEK, R. C. Factors affecting clonal diversity and coexistence. *Am. Zool.* 19: 787-797, 1979.
- VRIJENHOEK, R. C.; DAWLEY, R. M.; COLE, C. J.; BOGART, J. P. A list of the known unisexual vertebrates. In: *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*. Dawley, R. M.; Bogart, J. P. (eds), New York State Museum, Albany, New York, 1989, p. 19-23.
- WATTS, P. C.; BULEY, K. R.; SANDRESON, S.; BOARDMAN, W.; CIOFI, C.; GIBSON, R. Parthenogenesis in komodo dragons. *Nature* 44: 21-28, 2006.

- WENNSTRON, K. L.; CREWS, D. Making males from females: the effects of aromatase inhibitors on a parthenogenetic species of whiptail lizard. *General and comparative endocrinology* 99: 316-322, 1995.
- WHITE, M. J. D.; CONTRERAS, N.; CHENEY, J.; WEBB, G. C. Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper Warramaba (formerly Moraba) virgo and its bisexual relatives. *Chromosoma* 61: 127-148, 1977.
- WRIGHT, J. W. A new uniparental whiptail lizard (*Cnemidophorus*) from Sonora, México. *J. Ariz. Acad. Sci.* 4: 185-193, 1967.
- WRIGHT, J. W. Parthenogenetic lizards. *Science* 201: 1152-1154, 1978.
- WRIGHT, J.W.; SPOLSKY, C.; BROWN, W. M. The origin of the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus laredoensis* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Herpetologica* 39: 410-416, 1983.
- YONENAGA-YASSUDA, Y. VANZOLINI, P.E.; RODRIGUES, M.T.; CARVALHO, C.M. Chromosome banding patterns in the unisexual microteiid *Gymnophthalmus underwoodi* in two related sibling species (Gymnophthalmidae, Sauria). *Cytogenet. Cell Genet.*, 1995. 70:29-34.

Tabelas

Tabela 1. Lista de espécies de Squamata partenogenéticas, ploidia (2N=diplóide, 3N=triplóide), mecanismo de origem e referência.

Família	Espécie / Ploidia	Origem	Referência
Acrochordidae	<i>Acrochordus arafurae</i> (2N)	Espontânea	DUBACH <i>et al.</i> (1997)
Agamidae	<i>Leiolepis triploida</i> (3N)	Espontânea	PETERS (1971)
Boidae	<i>Python molurus bivittatus</i> (2N)	Espontânea	GROOT <i>et al.</i> (2003)
Chamaelonidae	<i>Brookesia spectrum</i> (-)	Espontânea	HALL (1970)
Colubridae	<i>Thamnophis elegans</i> (-)	Espontânea	SCHUETT <i>et al.</i> 1997
	<i>T. marcianus</i> (-)	Espontânea	SCHUETT <i>et al.</i> 1997
Gekkonidae	<i>Gehyra variegata</i> (3N)	Híbrida	HALL, 1970
	<i>Hemidactylus garnoti</i> (3N)	Híbrida	KLUGE & ECKARDT (1969)
	<i>H. vietnamensis</i> (2N)	Espontânea	DAREVSKY <i>et al.</i> (1984)
	<i>H. karenorum</i> (-)		DAREVSKY <i>et al.</i> (1984)
	<i>Heteronotia binoei</i> (3N)	Híbrida	MORITZ (1983, 1984, 1991)
	<i>Lepidodactylus lugubris</i> (-)	Espontânea	CUELLAR & KLUGE (1972)
Iguanidae	<i>Iguana iguana</i> (-)	Espontânea	FRYE & MADDEN (1995)
Gymnophthalmidae	<i>Gymnophthalmus underwoodi</i> (2N)	Híbrida / Espontânea	DESSAUER & COLE (1984) / YONENAGA-YASSUDA <i>et al.</i> (1995)
	<i>Leposoma percarinatum</i> (3N)	Híbrida	PELLEGRINO <i>et al.</i> , 2003
Lacertidae	<i>Darevskia dahli</i> (2N)	Híbrida	DAREVSKY & KULIKOVA (1961), MURPHY <i>et al.</i> (2000)
	<i>D. armeniaca</i> (2N)	Híbrida	DAREVSKY & KULIKOVA (1961), FU <i>et al.</i> (1998), MURPHY <i>et al.</i> (1999)
	<i>D. rostombekovi</i> (2N)	Híbrida	DAREVSKY & KULIKOVA (1961), MURPHY <i>et al.</i> (1999)
	<i>D. unisexualis</i> (2N)	Híbrida	DAREVSKY & KULIKOVA (1961), MACCULLOCH <i>et al.</i> (1995), MURPHY <i>et al.</i> (1999)
Scincidae	<i>Menetia greyii</i> (-)	Híbrida	ADAMS <i>et al.</i> (2003)
Teiidae	<i>Aspidoscelis velox</i> (3N)	Híbrida	LOWE <i>et al.</i> (1970)
	<i>A. uniparens</i> (3N)	Híbrida	LOWE <i>et al.</i> (1970)
	<i>A. exsanguis</i> (3N)	Híbrida	NEAVES (1969)
	<i>A. opatae</i> (3N)	Híbrida	WRIGHT (1967)
	<i>A. flagelicauda</i> (3N)	Híbrida	LOWE <i>et al.</i> (1970)
	<i>A. sonora</i> (3N)	Híbrida	LOWE <i>et al.</i> (1970)
	<i>A. tessellatus</i> (2N, 3N)	Híbrida	NEAVES (1969)
	<i>A. dixonii</i> (3N)	Híbrida	SCUDDAY (1973)
	<i>A. neomexicanus</i> (3N)	Híbrida	LOWE & WRIGHT (1966)
	<i>A. cozumela</i> (3N)	Híbrida	FRITTS (1969)
	<i>A. maslini</i> (3N)	Híbrida	MANRIQUEZ-MORAN <i>et al.</i> (2000)
	<i>A. rodecki</i> (2N)	Híbrida	FRITTS (1969)
	<i>A. laredoensis</i> (3N)	Híbrida	MCKINNEY <i>et al.</i> (1973)
	<i>Cnemidophorus lemniscatus</i> (2N)	Espontânea / Híbrida	PECCININI (1971) / COLE & DESSAUER (1993)
	<i>C. natio</i> (2N)		ROCHA <i>et al.</i> (1997)

Typhlopidae	<i>Kentropyx borckaniana</i> (2N)	Híbrida	COLE <i>et al.</i> (1995)
	<i>Ramphotyphlops braminus</i> (-)	Híbrida	NUSSBAUM (1980), OTA <i>et al.</i> (1991)
Varanidae	<i>Varanus komodoensis</i> (2N)	Espontânea	WATTS <i>et al.</i> (2006)
	<i>V. panoptes</i> (2N)	Espontânea	LENK <i>et al.</i> (2005)
Viperidae	<i>Crotalus horridus</i> (-)	Espontânea	SCHUETT <i>et al.</i> (1997)
	<i>C. unicolor</i> (-)	Espontânea	SCHUETT <i>et al.</i> (1997)
Xantudidae	<i>Lepidophyma flavimaculatum</i> (-)	Híbrida	BEZY (1972)

Legenda das Figuras

Figura 1: Mecanismo de ação do Mos proposto por TACHIBANA *et al.*, 2000.

Figura 2: Sequências alinhadas do proto-oncogene *c-mos* em lacertídeos (*), teiíneos (#), tupinambíneos (♣), microteídeos (♦) e no geconídeo *Hemidactylus frenatus* (♥), mostrando as regiões das deleções.

Figuras

Figura 1

Figura 2

Lacerta_oxicephala *	GGCTATTAACGGCTAAAAAGATGATCG	TTGGCTATAGCTCAAGTCTGG
Takydromus_septentrionalis *	GGCTATTAACGGCTAAAAAGATGATCG	TTGGCTATAGCTCAAGTCTGG
Aspidoscelis_tigris #	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Ameiva_ameiva #	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Cnemidophorus #	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Kentriacalca #	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Teiusteiurus #	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Tupia #	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Crocodylus #	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Alopoglossus_atriventris ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Arthrosaura_reticulata ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Bachia_dorbignyi ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Placosoma_cordylinum ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Ptychocheilus_brevifrons ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Pantodon_schreibersii_albostriatus ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Anolis_brachycephalus ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Heterodon_nigricaudus ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Colobodactylus_646newseq ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Iphisa_elegans_elegans ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Psilophthalmus ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Nothobachia ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Callisaurus ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Gymnophthalmus_leuco ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Micramys ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Vanzosaurus ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Procelotetra ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Ecpleopus ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Anolis ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Colobosauroides ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Leposaurus ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Leposaurus ♦	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG
Hemidactylus_frenatus ♥	GAATGTGTGAAAAAGGGTAAAGG	CATGTCAATTTGAACTTAATGCAATGCTGG

Capítulo IV – Considerações finais

Considerações finais

A família Teiidae é restrita à região neotropical e possui cerca de 110 espécies distribuídas em dez gêneros das quais, aproximadamente 70% apresentam cariótipos descritos. Apesar de recentes trabalhos demonstrarem o potencial das técnicas de coloração diferencial na citogenética de teídeos, permitindo identificar padrões diagnósticos e fornecer importantes contribuições para a compreensão da evolução cromossômica no grupo, tais estudos são ainda muito raros, restritos a menos de 10% das espécies.

Estudos moleculares, juntamente com citogenéticos e morfológicos e as recentes descrições de novas espécies, apontam para uma necessidade urgente de estudos multidisciplinares mais amplos que caracterizem melhor a grande diversidade nos Teiidae, especialmente quanto a espécies brasileiras, de modo a fornecer importantes contribuições à sistemática, evolução cromossômica e possibilitar a formulação de hipóteses filogenéticas mais robustas.

Dessa forma, os dados cariotípicos aqui apresentados fornecem importantes informações sobre a diversidade cariotípica na família Teiidae, contribuindo para o esclarecimento de cariótipos conflitantes e possibilitando a comparação entre algumas dessas espécies. Tais comparações permitem uma melhor compreensão da evolução cromossômica e da sistemática do grupo como um todo. Os principais resultados citogenéticos seguem apresentados a seguir:

- 1) *Ameiva ameiva* apresenta $2n=50$ cromossomos acrocêntricos, com Ag-RONs no par 7;
- 2) *K. calcarata*, *K. paulensis* e *K. vanzoi* apresenta $2n=50$ cromossomos acrocêntricos, com Ag-RONs no par 5;

- 3) *Cnemidophorus ocellifer* apresenta $2n=50$ cromossomos com dois braços, com Ag-RONs no par 5;
- 4) A diferenciação morfológica entre os cromossomos dos três gêneros deu-se devido a eventos múltiplos de inversão pericêntrica em *C. ocellifer*;
- 5) *Crocodilurus lacertinus* apresentou $2n=34$ ($12M + 22m$) e Ag-RONs no par 2;
- 6) *Tupinambis teguixim* apresentou $2n=36$ ($12M + 24m$) e Ag-RONs no par 2;
- 7) *T. merianae* e *T. quadrilineatus* apresentaram $2n=38$ ($12M + 26m$) e Ag-RONs no par 2, mas *T. quadrilieatus* apresentou padrão espécie-específico na quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva;

A filogenia molecular proposta para a família também apresenta resultados importantes, nas análises de máxima verossimilhança (MV) e inferência bayesiana (MB) e corroboram os dados citogenéticos descritos anteriormente, sobretudo para a família Teiinae:

- 1) A família Teiidae se apresentou monofilética, assim como as subfamílias Tupinambinae e Teiinae e a tribo Cnemidophorini;
- 2) O gênero *Ameiva* foi identificado como monofilético e basal dentre os demais cnemidophorinos;
- 3) *Cnemidophorus* se mostrou parafilético, com a espécie *C. lemniscatus* mais relacionada ao gênero *Kentropyx*;
- 4) *Kentropyx* foi identificado como monofilético, com a espécie *K. calcarata* basal e *K. paulensis* grupo irmão de *K. vanzoi*;

- 5) As espécies *C. ocellifer* e *C. nativo*, formam grupo monofilético que corresponde ao grupo ocellifer, junto com *C. sp*;
- 6) O grupo ocellifer é irmão do clado *Kentropyx* + *C. leminiscatus*;
- 7) Conseqüências da filogenia obtida sobre a evolução cromossômica do grupo, são também apresentados, demonstrando o potencial das Ag-RONs para a citotaxonomia dos teíneos.

Tendo em vista que os lagartos teídeos, e em especial espécies de *Cnemidophorus*, constituem um excelente modelo para estudos sobre a partenogênese em répteis, foi proposta uma hipótese sobre como deleções no proto-oncogene *c-mos* poderiam favorecer a reprodução partenogenética, na forma da partenogênese automítica facultativa (PAF), nos lacertiformes e nos Squamata, uma vez que a proteína Mos, produto do proto-oncogene *c-mos*, é um dos reguladores centrais da meiose em oócitos de vertebrados e atende os requisitos a “gene da partenogênese”, como sugerido por modelos genéticos da literatura. Apesar de poucas espécies sabidamente partenogenéticas terem sido seqüenciadas para esse gene, observamos a ocorrência de deleções em clados com espécies partenogenéticas, as quais podem favorecer a ocorrência de falhas durante a meiose II induzindo a não disjunção e a ativação partenogenética nos lagartos.