

do grupo de espécies *P. aurisetus*, as quais estão restritas às áreas de vegetação xerófita na parte leste do Brasil. O objetivo principal deste projeto é verificar se a distribuição disjunta dessas populações é decorrente de migração e colonização das áreas atualmente ocupadas ou devido à fragmentação de populações com uma distribuição previamente contínua. Os resultados do presente projeto deverão servir como subsídio para estudos evolutivos em outros táxons animais e vegetais restritos às formações de vegetação xerófita na América do Sul.

221

### Biogeografia, filogeografia e diversificação de anuros endêmicos da Mata Atlântica do Brasil

João Miguel de Barros Alexandrino  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Universidade Estadual Paulista (Unesp)  
Processo 2005/52727-5  
Vigência: 1/12/2005 a 30/11/2009

O conhecimento dos processos que determinam padrões de diversidade biológica é fundamental para a conservação da biodiversidade como entidade evolutiva. Esse conhecimento pode, em princípio, ser alcançado por meio de estudos de diversidade genética molecular de populações naturais que visam revelar a biogeografia histórica das espécies – isto é, filogeografia. Esse tipo de estudos tem geralmente confirmado a hipótese de que a biogeografia histórica de muitos organismos foi influenciada pelas oscilações climáticas do período Quaternário. Atualmente, apesar de existirem já excelentes trabalhos de revisão sobre os processos evolutivos que determinaram a diversificação biológica em zonas temperadas da Europa e América do Norte e, em menor grau, em regiões tropicais da Austrália, da África e da América do Sul, muito pouco se conhece ainda sobre os neotrópicos. A Mata Atlântica do Brasil é considerada um *hotspot* mundial de biodiversidade e, no entanto, os processos evolutivos que originaram esse ecossistema extraordinariamente diverso permanecem quase desconhecidos. Os estudos filogeográficos são ainda nascentes na região, mas prevê-se que sejam fundamentais para revelar a história evolutiva de organismos de um dos biomas mais ameaçados do planeta. Assim, esta proposta de pesquisa prevê um estudo filogeográfico de seis espécies de anfíbios anuros amplamente distribuídos na Mata Atlântica do Brasil. Usando os anfíbios como organismos-modelo, os objetivos gerais serão: 1) descrever e comparar padrões de diversidade genética (mitocondrial e nuclear) e de diversidade fenotípica (morfologia e vocalização) de várias populações de anuros associados a ambientes de floresta da Mata Atlântica; e 2) usar metodologias de filogeografia e filogenética comparada associadas à modelação da distribuição das espécies em ambientes paleoclimáticos, para analisar os

padrões de diversidade biológica e testar hipóteses sobre os processos que a originaram, na pouco conhecida Mata Atlântica do Brasil. Especificamente, pretende-se avaliar se a biogeografia das várias espécies foi concomitante com as flutuações da distribuição geográfica da Mata Atlântica ao longo do Quaternário e em que medida os nossos resultados confirmarão hipóteses correntes sobre refúgios pleistocênicos. O conhecimento da história evolutiva de espécies de anfíbios será importante para a seleção de áreas prioritárias para a conservação do bioma da Mata Atlântica do Brasil.

222

### Estudos citogenéticos e moleculares em pequenos roedores neotropicais

Maria José de Jesus Silva  
Instituto Butantan  
Secretaria de Estado da Saúde  
Processo 2005/04557-3  
Vigência: 1/3/2007 a 28/2/2011

A região neotropical concentra a maior biodiversidade do nosso planeta. O Brasil ocupa uma posição de destaque nesse cenário por abrigar o maior número de espécies, particularmente de mamíferos, desta região. No entanto, pouco ainda se conhece dessa diversidade, incluindo roedores, uma vez que não há dados precisos a respeito da delimitação, quantidade e distribuição de espécies, gêneros e categorias taxonômicas mais elevadas, bem como registros sobre preferências por *habitats*, padrões reprodutivos, relações de parentesco ou história evolutiva dos grupos. Com o objetivo geral de estudar a fauna de pequenos roedores, buscando acessar a real biodiversidade brasileira, compreender suas relações filogenéticas e os processos evolutivos em diversos biomas, esse projeto propõe uma colaboração estreita entre os campos da citogenética, sistemática molecular, sistemática tradicional e biogeografia, pois, de modo geral, tem-se constatado que somente estudos interdisciplinares permitirão um conhecimento mais preciso acerca da diversidade cromossômica e gênica desse grupo, suas relações de parentesco e história evolutiva. Sua principal atuação será no desenvolvimento de análises citogenéticas, empregando técnicas de bandamento cromossômico e hibridação *in situ* fluorescente (Fish) com sondas específicas para estudos em roedores brasileiros. Nesse grupo de vertebrados, várias espécies novas têm sido detectadas com base na caracterização cromossômica, uma vez que o cariótipo desempenha o papel de marcador específico, particularmente em casos de espécies crípticas. Assim, além dos dados cromossômicos, com a definição de número diploide (2n), morfologia, estrutura, organização e localização de sequências específicas, a abordagem citogenética tem levantado e também solucionado vários problemas de evolução cromossômica em grupos afins e contribuído para a citotaxonomia. Serão desenvolvidos ainda estu-

dos moleculares, com base no sequenciamento de genes do DNA mitocondrial (especialmente o citocromo b) e, se necessário, do gene nuclear IRBP (Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein), os quais têm fornecido importantes contribuições para a sistemática molecular, permitindo acessar reconstruções filogenéticas (desde o nível de espécie até família) e o desenvolvimento de estudos filogeográficos. No Brasil, existem exemplos citogenéticos e filogenéticos clássicos entre os pequenos roedores que merecem a nossa atenção. Nos akodontinos, em que o cariótipo representa um marcador imprescindível para a caracterização de algumas espécies, o polimorfismo cromossômico de *A. cursor*, com as diferentes frequências dos rearranjos cromossômicos ao longo de sua área de distribuição geográfica na Mata Atlântica, tem contribuído para a compreensão do padrão de dispersão da espécie e de diferenças populacionais. Entre os orizomíneos, que representam um grupo extremamente complexo e cujo número de espécies e as relações de parentesco ainda são muito discutíveis, várias espécies novas têm sido detectadas, sendo o cariótipo e os dados moleculares (preponderantemente o citocromo b) fundamentais para a identificação de diferentes entidades taxonômicas; exemplos podem ser constatados em *oryzomys* dos grupos *nitidus*, *subflavus* e *capito*, entre outros; em *oligoryzomys* dos grupos *nigripes*, *fulvescens* e *microtis*; em *Nectomys squamipes* e *N. rattus*; *oecomys* etc. Da mesma forma, novas espécies também têm sido detectadas dentre os equimídeos e também com base em cariótipos e sequenciamento de DNA. De modo geral, as relações de parentesco têm sido mais bem compreendidas nos diferentes grupos com a integração das várias áreas do conhecimento (citogenética, biologia molecular, biogeografia, sistemática).

223

### Identificação das origens e da maquinaria de replicação em células de *Trypanosoma*

Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga  
Instituto Butantan  
Secretaria de Estado da Saúde  
Processo 2005/00154-1  
Vigência: 1/4/2006 a 31/3/2010

O processo de replicação do DNA em eucariontes inicia-se com o reconhecimento de uma origem de replicação por proteínas denominadas ORC (Origin Replication Complex). Esse complexo é formado por seis proteínas (ORC1-6) e, uma vez associado ao DNA, recruta a molécula CDC6 que, por sua vez, recruta, juntamente com fatores adicionais, o complexo MCM com atividade de helicase, fundamental tanto para a replicação do DNA quanto para o controle de uma única replicação por ciclo celular. Dentre os eucariontes, as sequências de DNA reconhecidas por ORCs só estão bem definidas em levedu-

ras. Nos demais organismos, incluindo *trypanosomas*, não são conhecidas as sequências responsáveis pelo início da síntese de DNA. Os *trypanosomas* são parasitas primitivos que divergiram muito cedo da linhagem eucarionte. Esse fato coloca os *trypanosomas* como organismos que devem apresentar características moleculares e mecânicas de um ancestral comum. De fato, uma análise do genoma de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* mostrou que diferentemente dos demais eucariontes, mas exatamente como em *Archea*, esses organismos não contêm genes para ORCs, mas apresentam uma única ORF que codificaria para uma proteína homóloga tanto a ORC1 quanto a CDC6 (ORC1/CDC6). É possível que esta proteína seja responsável, assim como é em *Archea*, pelo reconhecimento das origens de replicação nesses organismos. Uma vez que o genoma de *T. cruzi*, *T. brucei* e também *L. major* estão completos, este projeto pretende estabelecer uma nova linha de pesquisa pós-genômica relacionada ao controle da replicação desses protozoários. Assim, os objetivos deste trabalho são identificar as origens de replicação em *trypanosomas*, localizar essas origens no núcleo durante o ciclo celular e definir os componentes responsáveis pelo controle do início de replicação nesses organismos. Para a identificação das sequências de DNA que se associam a ORC1/CDC6 em *trypanosomas*, serão gerados anticorpos policlonais anti-ORC1/CDC6 que serão utilizados em ensaio de imunoprecipitação de cromatina. Os fragmentos de DNA imunoprecipitados serão marcados e utilizados como sonda em ensaios de *array* para determinação das sequências que compõem as origens de replicação. Essas regiões de início de replicação serão confirmadas por meio de géis bidimensionais que permitem a visualização de forquilhas de replicação. A associação dessas origens de replicação à ORC1/CDC6 será confirmada por meio de ensaio de *gel shift*. Para avaliar a localização nuclear das origens de replicação será realizado ensaio de hibridização *in situ* fluorescente (Fish) com sondas específicas em parasitas em diferentes fases do ciclo celular. Essas amostras serão também submetidas a ensaios de imunofluorescência, utilizando-se anticorpos anti-ORC1/CDC6 para localização nuclear da maquinaria de replicação. Mais do que isso, ensaios conjuntos de Fish e imunofluorescência esclarecerão o momento do ciclo celular e a localização nuclear onde ORC1/CDC6 se associa às origens de replicação. Estes dados fornecerão as bases moleculares e celulares da proliferação celular nesses organismos, o que não só enriquecerá substancialmente o conhecimento da biologia do *Trypanosoma*, como também abrirá novas perspectivas para o controle desses parasitas.

224

### Caracterização citogenética e reprodutiva de três gêneros do banco de germoplasma de plantas aromáticas do IAC