

INTEGRAÇÃO MORFOLÓGICA E MODULARIDADE
EM CRÂNIOS DAS ESPÉCIES DO GRUPO *RHINELLA*
GRANULOSA (LISSAMPHIBIA:ANURA:BUFONIDAE)

Candidata: Monique Nouailhetas Simon

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Henrique Marroig Zambonato

Colaboradores: Prof. Dr. Miguel Trefaut Rodrigues

Prof. Dr. Carlos Arturo Navas Iannini

Resumo

A teoria da integração morfológica considera os organismos em sua totalidade, sustentando que as mudanças evolutivas em um caráter são dependentes das mudanças em outros caracteres do organismo. Os complexos de caracteres que compartilham uma função e/ou via de desenvolvimento formam uma unidade modular semi-independente e podem ser estudados por padrões e magnitudes de correlação entre os caracteres (Olsson e Miller, 1958). Por meio dos modelos da genética quantitativa, com a construção de matrizes de variância e covariância genética e fenotípica, a diversificação morfológica de um táxon pode ser estudada quanto às forças evolutivas envolvidas, como deriva, seleção direcional ou estabilizadora (Lande, 1979). Considerando o desenvolvimento como mediador dos efeitos genéticos na organização modular, percebemos que tanto mutações quanto efeitos ambientais podem influenciar a integração morfológica e modularidade dos organismos (West-Eberhard, 2003; Klingenberg, 2008). Essa abordagem torna interessante o estudo de seres que apresentam plasticidade fenotípica, especialmente no desenvolvimento, pois os efeitos do ambiente nesse sistema podem resultar em uma alteração do padrão modular. Esse é o caso dos anfíbios, pois muitas espécies apresentam plasticidade do crescimento e desenvolvimento na fase larval diante de fatores como a temperatura. A plasticidade das larvas tem o potencial de modificar partes dos adultos dependendo das taxas de desenvolvimento (Gomez-Mestre e Buchholz, 2006). Porém, poucos autores estudaram a integração e modularidade em anfíbios, e não existem trabalhos que mostrem as forças evolutivas envolvidas na diversificação destes vertebrados. A proposta desse projeto é de estudar a integração morfológica e modularidade em crânios de anfíbios anuros do grupo *Rhinella granulosa*, que se distribui em vários tipos de habitats. Utilizaremos matrizes genéticas e fenotípicas para descrever o padrão modular das espécies e determinar as causas de suas divergências com o uso de matrizes de filogenia, ecologia (fatores climáticos, especialmente relacionados com temperatura) e desenvolvimento. Hipotetizamos que o padrão de correlação dos caracteres será similar entre as espécies, mas com diferenças nas magnitudes de integração; que o fator ecologia explicará grande parte da divergência entre as espécies; e que os caracteres de desenvolvimento compartilhado serão mais correlacionados entre si.

Introdução

1. Integração morfológica e Genética quantitativa

Estudos em evolução morfológica buscam responder como surge, mantém-se e se transforma a variação genética e fenotípica dos organismos. Quando o interesse volta-se para a variação contínua, na qual há segregação de múltiplos genes que afetam um caráter, utilizamos os modelos e métodos da genética quantitativa (Falconer e Mackay, 1996). Investigar complexos de caracteres, em vez de caracteres isolados, é fundamental em evolução morfológica, uma vez que mudanças em um caráter não são independentes de mudanças em outros caracteres do organismo (Olson e Miller, 1958). Esta é a ideia delineada pelo conceito de integração morfológica: “...estudos que exploram a evolução dos animais como organismos totais (...) por meio da concepção do animal como uma abstração baseada em associações de medidas” (Olson e Miller, 1958, pág. 20). Estas associações de medidas são representadas por correlações fenotípicas (uma vez que o fenótipo fornece informações sobre os fatores e fenômenos evolutivos), e segundo a teoria da integração morfológica, os agrupamentos de caracteres formados por correlações acima de um determinado nível (grupos- ρ) possuem significado biológico. A relevância dos grupos- ρ é empiricamente comprovada quando há intersecção entre estes e os grupos-F, formados por caracteres que compartilham uma mesma função e/ou via de desenvolvimento (Olson e Miller, 1958). A teoria da integração morfológica, portanto, mostra que podemos determinar e estudar complexos de caracteres, biologicamente importantes em termos de função e desenvolvimento, por meio de padrões de correlação.

Cheverud (1996) destaca quatro níveis de integração morfológica em duas esferas que se relacionam: no indivíduo – integração funcional e de desenvolvimento – e na população – integração genética e evolutiva. A integração funcional resulta da interação de caracteres afetando o desempenho de uma função do organismo (a mastigação, por exemplo). A integração pelo desenvolvimento é originada pela interação dos caracteres ao longo da ontogenia por meio do processo epigenético (a tradução mecânica do genótipo e do ambiente no fenótipo, Cheverud, 1984). A integração genética é refletida pelas correlações genéticas, que ocorrem por pleiotropia – a ação de um único gene sobre mais de um caráter – e/ou desequilíbrio de ligação –

tendência a co-herança de dois genes que afetam caracteres diferentes (Falconer e Mackay, 1996). Finalmente, a integração evolutiva significa a resposta coordenada dos caracteres à seleção natural. Esses quatro níveis de integração relacionam-se entre si conforme a Figura 1.

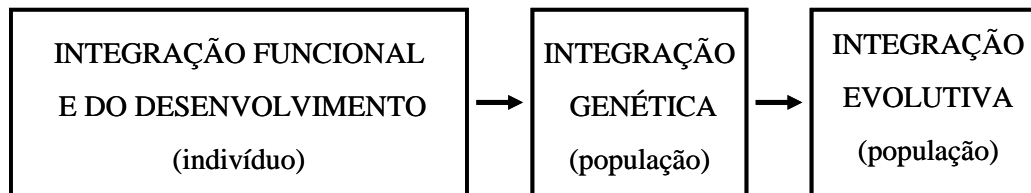


Figura 1. Os quatro níveis de integração morfológica e suas relações. A integração funcional e do desenvolvimento podem ser consideradas conjuntamente no indivíduo, uma vez que a primeira provavelmente ocorre por consequência da segunda. Na integração genética, os genes são considerados como unidades de herança, e por isso o nível é populacional. Ela se dá pelos efeitos comuns dos genes atuando em processos epigenéticos, por meio do desenvolvimento. Logo, a integração do desenvolvimento estrutura a integração genética. A integração genética pode determinar a integração evolutiva devido à herança conjunta de caracteres, porém a última também pode se dar pela seleção conjunta de caracteres com segregação independente.

Os modelos da genética quantitativa especificam estas relações entre os níveis de integração morfológica, utilizando expressões quantitativas das integrações genética e fenotípica, como matrizes de covariâncias e de correlações entre caracteres (Cheverud, 1996). Modelos para a evolução fenotípica simultânea de vários caracteres foram criados por meio de generalizações multivariadas da ação da seleção natural em um único caráter (Lande, 1979). Ao tratarmos da evolução de um único caráter, as forças de seleção são melhor representadas por um vetor de coeficientes de regressão parcial (β_i) entre a aptidão e o caráter. Estes coeficientes descrevem a dependência da aptidão relativa de um determinado caráter, sem os efeitos correlacionados dos demais caracteres (Lande e Arnold, 1983). Porém, ao lidarmos com vários caracteres, a resposta à seleção pode ser determinada pela seguinte equação de evolução multivariada (Lande, 1979):

$$\Delta z = G P^{-1} S \quad (1),$$

na qual Δz representa o vetor das diferenças entre as médias dos caracteres antes e depois da ação da seleção; G é a matriz de variâncias e covariâncias genéticas aditivas; P é a matriz de variâncias e covariâncias fenotípicas; e S é o diferencial de seleção, que contabiliza todos os coeficientes β_i mais as respostas correlacionadas.

A variância genética aditiva é uma propriedade da população responsável pela semelhança fenotípica entre pais e prole, pois é baseada nos valores de acasalamento - o somatório dos efeitos médios de todos os alelos que afetam um caráter, efeitos estes herdados dos pais (Falconer e Mackay, 1996). A resposta à seleção direta em um caráter é proporcional à variância aditiva (Lande, 1979). A covariância genética aditiva reflete o grau de pleiotropia e desequilíbrio de ligação de genes subjacente à variação de dois caracteres. A resposta correlacionada de um caráter à seleção direta em outro caráter é proporcional à covariância aditiva (Lande, 1979). A matriz **G** contribui na determinação da taxa e da direção de evolução, enquanto a matriz **P** fornece informação sobre padrões e magnitudes de variação disponível para a seleção natural (Cheverud e Marroig, 2007). Ambas são importantes para a compreensão da integração morfológica e sua evolução.

2. *Integração morfológica em escala macro-evolutiva*

A equação de resposta à seleção natural (1) elaborada por Lande (1979) pode ser estendida para a forma macro-evolutiva, na qual comparações de matrizes **G** entre espécies e níveis taxonômicos maiores podem ser feitas:

$$\beta = G^{-1} (z_i - z_j) \quad (2),$$

sendo que o gradiente de seleção, $\beta = P^{-1} S$, e $(z_i - z_j)$ representa a diferença nos vetores de médias entre as espécies *i* e *j*. Na prática, se a equação acima é aplicada para estudos de diferenças entre espécies o gradiente de seleção representa as diferenças na seleção sofrida por cada linhagem independentemente. Todavia, para que essa equação seja efetivamente aplicada em estudos comparativos de integração morfológica, é preciso assumir/verificar a constância ou semelhança da matriz **G** entre os grupos a serem comparados (premissa de homogeneidade de variâncias e covariâncias genéticas aditivas, Lande, 1979). A constância das covariâncias pode advir de um balanço entre seleção natural e/ou deriva genética, reduzindo a variação, e mutações pleiotrópicas e recombinação gênica repondo a variação (Lande, 1979; Arnold, 1981). Mesmo assim, segundo Turelli (1988), a constância de **G** deve ser comprovada empiricamente.

A construção de matrizes **G** para um grande número de espécies, e mesmo para diversos grupos animais que já são extintos ou de tempo longo de geração, é uma empreitada bastante difícil ou impossível. Entretanto, uma vez que a matriz **P** possa ser utilizada em seu lugar, a coleta de dados é muito facilitada (com o uso de coleções de

museu, por exemplo) e o teste de sua constância entre espécies é viável. Seguindo esse raciocínio, as matrizes **G** e **P** de uma população devem ser similares para que a segunda substitua a primeira na equação (Lande, 1979). Em teoria, a similaridade entre essas matrizes indica que fatores genéticos e ambientais afetam os caracteres por vias fisiológicas similares (Falconer e Mackay, 1996, pág. 315). Na ausência de informação genética ou dissimilaridade entre as matrizes, a inferência sobre forças seletivas passadas deve ser feita com cautela. Em caso de similaridade, a eventual constância da matriz **P** entre espécies e outros taxa indica constância também na matriz **G**, se esta for um componente importante do fenótipo (Lande, 1979).

Dada a constância da matriz **P** entre os grupos a serem estudados, os padrões de integração e as suas magnitudes podem ser comparados para se compreender a evolução da integração morfológica e as forças evolutivas envolvidas, como deriva, seleção natural e restrições.

3. Dualidade integração-modularidade

Olson e Miller (1958) já ponderavam sobre as relações entre magnitude de integração e evolução, perguntando-se sobre a influência da intensidade de integração na evolução de organismos mais complexos e no grau de adaptabilidade destes. Pensando em magnitudes de integração, esses autores compreenderam a relevância da dualidade integração-modularidade no potencial de evolução morfológica.

Modularidade refere-se às propriedades de discrição e dissociabilidade entre partes e integração dentro das partes [de um organismo] (West-Eberhard, 2003, pág. 56). Günter P. Wagner (1996) ressaltou que é preciso haver uma razão biológica para que o plano corpóreo dos organismos seja organizado de maneira tão obviamente modular, tornando facilmente reconhecíveis suas unidades naturais (como mostrado pela nossa capacidade de apontar estruturas homólogas). Para ele, considerar as unidades naturais como unidades de transformação evolutiva (ou seja, a modularidade como uma propriedade variacional do genoma) traz o sentido biológico dessa organização. Segundo ele, três critérios precisam ser satisfeitos para um complexo de caracteres ser considerado como uma unidade modular: (1) servir a uma função primária; (2) ser integrado por efeitos pleiotrópicos; e (3) ser relativamente independente de outras unidades (Figura 2).

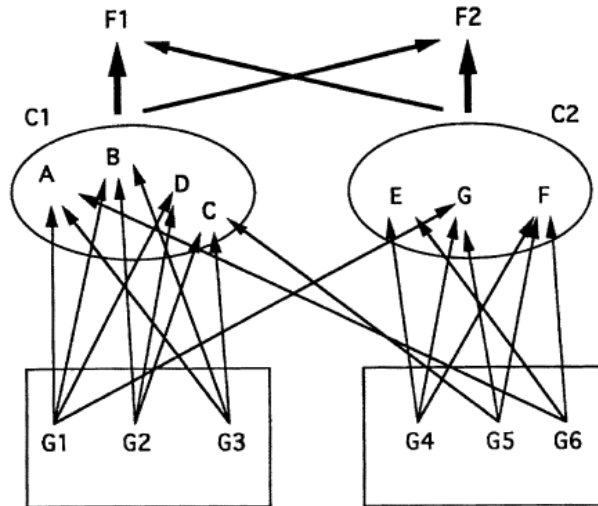


Figura 2. Unidades modulares de um organismo e o padrão pleiotrópico subjacente. C1 e C2 são duas unidades modulares, compostas por distintos complexos de caracteres (letras A a F), que desempenham conjuntamente diferentes funções F1 e F2. Os efeitos pleiotrópicos dos genes (G1 a G6) dentro de uma unidade são mais frequentes que entre as unidades, conferindo-lhes certa independência uma da outra (Wagner, 1996).

Wagner (1996) propôs dois processos pelos quais a modularidade pode evoluir, dependendo do estado primitivo de integração total: (1) Se era de alta integração, a modularidade pode ter surgido por parcelamento, a eliminação diferencial de efeitos pleiotrópicos entre caracteres pertencentes a distintos complexos funcionais; (2) Se era de baixa integração, o processo pode ter sido o próprio aumento da integração entre os caracteres de um complexo, com o incremento dos efeitos pleiotrópicos entre eles. Quando pensamos nas forças evolutivas envolvidas, a seleção direcional nos complexos funcionais é o fator que pode eliminar efeitos pleiotrópicos entre unidades modulares, e a seleção estabilizadora mantém a pleiotropia entre os caracteres de um mesmo complexo (Cheverud, 1984; Wagner e Altenberg, 1996). A seleção estabilizadora atua nas covariâncias genéticas, correlacionando caracteres positiva ou negativamente (Lande e Arnold, 1983).

Em uma revisão recente sobre modularidade, Wagner *et al.* (2007) expandiram o conceito para uma abstração que se refere tanto aos padrões de interações funcionais e moleculares (redes de proteínas, partes de moléculas como o RNA), quanto para a distribuição de efeitos mutacionais no fenótipo. Os autores mostraram que a modularidade refere-se a diferentes conexões e elementos: interações físicas moleculares (entre proteínas, por exemplo) levam a conexões dinâmicas, como as vias

de desenvolvimento, que por sua vez levam a conexões de variação entre caracteres fenotípicos macroscópicos; sendo uma propriedade biológica que se manifesta em diversos níveis hierárquicos. Também especularam sobre a origem da modularidade, apresentando modelos neutros e de seleção natural correntes na literatura, e concluíram que ainda existem dúvidas se ela afeta a aptidão dos organismos (Wagner *et al.*, 2007).

Uma previsão sobre como a modularidade dos sistemas vivos poderia influenciar sua aptidão refere-se ao conceito de evolvabilidade, a habilidade de um genoma de produzir variantes adaptativos: a organização modular pode impedir o aparecimento de potenciais interações desvantajosas entre partes e a interferência entre sistemas funcionais distintos, acelerando a taxa de evolução e possibilitando o surgimento de adaptações complexas (Wagner e Altenberg, 1996).

4. Integração morfológica e Modularidade em Mamíferos

As indagações levantadas por Olson e Miller (1958) a respeito da evolução da integração morfológica começaram a ser respondidas com estudos da diversificação morfológica do crânio em grupos de mamíferos (por exemplo: Marroig e Cheverud, 2001; Marroig e Cheverud, 2004; Marroig e Cheverud, 2005; Goswami, 2006; Porto *et al.*, 2009; Marroig *et al.*, 2009). O crânio é um bom sistema para esses estudos, pois apresenta várias funções – olfato, visão, respiração, mastigação e deglutição – e há muita informação sobre a origem embrionária de suas partes, assim como das interações entre tecidos e modos de ossificação; sendo possível realizar previsões teóricas dos padrões de associação entre caracteres (Marroig e Cheverud, 2001).

No trabalho de Marroig e Cheverud (2001), os padrões de variância/covariância e de correlações fenotípicas (matrizes **P**) entre 39 medidas do crânio de várias espécies de macacos do Novo Mundo (infra-ordem Platyrrhini) foram comparados, em vários níveis taxonômicos, e foram testadas a influência da filogenia, da ecologia e do desenvolvimento na evolução desses padrões. Matrizes de similaridade de padrões de integração foram comparadas com matrizes de distância filogenética, de dieta (porcentagem da dieta composta de frutas, folhas, insetos, sementes e extrato de planta) e com matrizes teóricas de desenvolvimento compartilhado entre os caracteres. Os autores encontraram uma similaridade geral no padrão de integração morfológica dos crânios nos macacos do Novo Mundo, sendo que a maior similaridade ocorreu em níveis de subfamília e família, sugerindo independência do parentesco filogenético

(Marroig e Cheverud, 2001). Apesar dessa estabilidade dos padrões de covariâncias fenotípicas, os crânios são morfologicamente diversos entre grupos de diferentes dietas, e a estrutura de correlações fenotípicas foi associada com esse fator. Os caracteres se apresentaram integrados pelo desenvolvimento, uma vez que as correlações entre caracteres de uma mesma região de desenvolvimento foram duas vezes maiores que entre regiões distintas (Marroig e Cheverud, 2001). Esse estudo também mostrou que a integração morfológica evolui - algumas espécies apresentaram maior integração da face, enquanto outras, do neurocrânio - e que a alometria do crânio é similar entre os grupos de mesma dieta.

Dada a constância da matriz **P** encontrada nos dados coletados por Marroig e Cheverud (2001), análises de reconstruções de forças seletivas puderam ser feitas para se compreender os fatores que levaram a diversificação morfológica dos crânios dos Platyrrhini (Marroig e Cheverud, 2004). A seleção natural foi detectada como o fator dominante, e os autores sugeriram que existe uma associação entre evolução do tamanho corpóreo e a diversificação da dieta nos macacos do Novo Mundo, já que seleção forte nesse fator foi suficiente para descartar o modelo de deriva genética (Marroig e Cheverud, 2004). Investigando mais a fundo o fator tamanho alométrico, Marroig e Cheverud (2005) descobriram que a diversificação morfológica entre gêneros segue a linha alométrica intrapopulacional, sendo esta uma linha de menor resistência evolutiva (como estudado por Schluter, 1996), que acelera a mudança evolutiva. Marroig e Cheverud (2005) também encontraram uma correlação entre tamanho e dieta, mostrando que as maiores transições de tamanho foram associadas com a invasão de novas zonas adaptativas de dieta.

Poucos autores estudaram a modularidade nos mamíferos em uma escala evolutiva ainda maior que Marroig e Cheverud (2001). Goswami (2006) expandiu o estudo da integração e modularidade nos mamíferos com a coleta de dados do crânio de espécies de monotremados (como o ornitorrinco), marsupiais e placentários, sendo nove delas fósseis. A autora determinou dois módulos no crânio dos monotremados e seis nos demais vertebrados, por meio de análise de cluster das matrizes de medidas, e concluiu que a modularidade evolui nessa classe (Goswami, 2006). Porém, o conceito de módulo dessa autora não está fundamentado na correlação de caracteres, e sim no critério dos caracteres mudarem na mesma direção (Klingenberg, 2008). Já Porto *et al.* (2009) estudaram espécies de 15 ordens, sendo 5 delas da infra-classe dos Metatheria e o restante dos Eutheria, incluindo a espécie *Homo sapiens* nos primatas. Nesse estudo,

além das comparações de matrizes de covariâncias e correlações fenotípicas, uma matriz genética também foi comparada (**G**-Rodentia), bem como a magnitude de integração, por meio de um índice que é a média dos coeficientes de correlação ao quadrado (r^2). O padrão de integração morfológica manteve-se similar na diversificação do crânio dos mamíferos (inclusive considerando a matriz **G**), mesmo em uma escala que abrange 60 milhões de anos de evolução. Para os autores, essa estabilidade reflete a preservação do desenvolvimento e da função do crânio. Os desvios do padrão ocorreram somente em sub-regiões específicas do crânio, ou seja, apenas em algumas unidades modulares.

Novamente, apesar das mesmas relações entre os caracteres, a morfologia do crânio é bastante diversificada nessa escala dos mamíferos. Segundo Porto *et al.* (2009), as diferenças nas magnitudes das correlações permitem essa variedade de formas dos crânios: quanto menor as magnitudes, maior a chance de respostas em várias direções de evolução. Os Metatheria foram o grupo que apresentou os maiores valores de integração geral, portanto, o crânio com maior restrição à evolução (ou seja, as suas respostas desviaram mais dos vetores de seleção aplicados e foram condizentes com a linha de tamanho alométrico). No outro extremo da escala, a espécie de menor integração geral foi o *Homo sapiens*, apresentando o crânio mais modular e mais responsivo à seleção natural (Porto *et al.* 2009).

Em uma análise das consequências evolutivas dos resultados de Porto *et al.* (2009), Marroig *et al.* (2009) verificaram que em taxa altamente integrados, as respostas tendem a ser relacionadas com tamanho, independente do vetor de seleção aplicado na matriz **P**. Já os mamíferos com altas razões de modularidade obtiveram maior flexibilidade evolutiva (habilidade de seguir a direção de seleção) e autonomia (mudança somente em um módulo e estabilidade nos demais). Esse resultado empírico confirma a previsão de Wagner e Altenberg (1996), de que a modularidade facilita a evolução adaptativa.

5. Integração morfológica e Modularidade em Anfíbios

O mapeamento genótipo-fenótipo subjacente à organização modular elaborado por Wagner (1996) pode ser expandido com o acréscimo do desenvolvimento como mediador dos efeitos genéticos (West-Eberhard, 2003; Klingenberg, 2008; Figura 3).

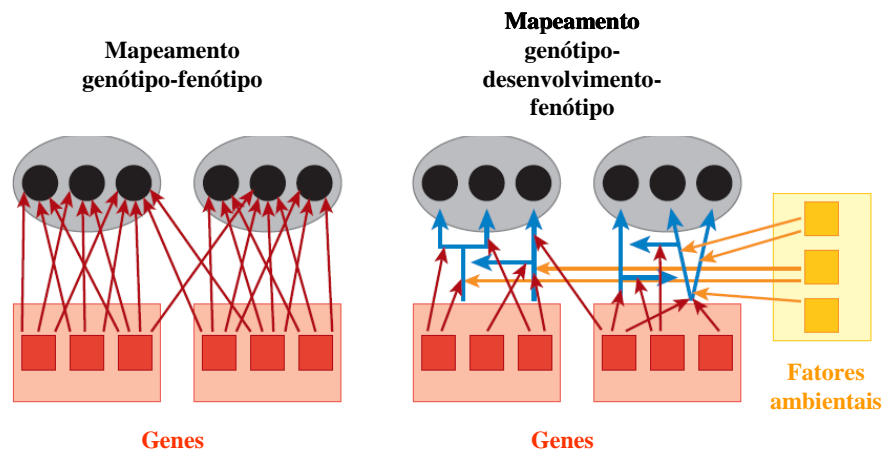


Figura 3. Mapeamentos de arquitetura genética subjacentes à modularidade. O esquema à esquerda é o de efeitos pleiotrópicos diferenciais, de Wagner (1996), culminando em duas unidades modulares funcionais. O esquema à direita inclui o fator desenvolvimento como mediador dos efeitos genéticos no fenótipo. Segundo esse mapeamento, os efeitos dos genes (setas vermelhas) não são diretos nos caracteres fenotípicos (círculos pretos), mas sim nas vias de desenvolvimento (setas azuis) que originam esses caracteres. Dessa maneira, os fatores ambientais (setas laranjas) podem ser incluídos no mapeamento através de sua regulação sobre as vias de desenvolvimento (West-Eberhard, 2003).

Segundo West-Eberhard (2003), as unidades modulares são determinadas por pontos de bifurcação – “switches” - que organizam os caracteres de um determinado módulo, regulando seu padrão de expressão gênica por meio de um limiar. Estímulos que ultrapassem o limiar (de concentração de hormônio, por exemplo) alteram o padrão de relação entre os caracteres daquele módulo, e podem ser tanto genéticos quanto ambientais. A similaridade entre os padrões de correlação genética e ambiental encontrados em mamíferos suporta a ideia de que fatores genéticos e ambientais afetam a morfologia pelas mesmas vias de desenvolvimento (Cheverud, 1988).

A consideração dos fatores ambientais como importantes na expressão de fenótipos modulares está relacionada com o fenômeno da plasticidade fenotípica, a habilidade de um genótipo alterar seu fenótipo diante de condições ambientais distintas (West-Eberhard, 2003). As diferenças no ambiente alteram a expressão de vias de desenvolvimento, resultando em alteração da expressão de unidades modulares (West-Eberhard, 2003; Klingenberg, 2008). Essa abordagem da modularidade torna bastante interessante o estudo desse fenômeno em vertebrados que possuem alta plasticidade fenotípica, como os anfíbios. Larvas de anfíbios anuros são muito estudadas quanto à plasticidade fenotípica. Existem diversos estudos empíricos que investigaram a ação de

fatores ambientais nas taxas de crescimento e diferenciação das larvas, especialmente da temperatura (Morey e Reznick, 2000; Álvarez e Nicieza, 2002; Buchholz e Hayes, 2002; Olsson e Uller, 2002; Niehaus *et al.*, 2006).

O estudo de Gomez-Mestre e Buchholz (2006) é um bom exemplo da relação entre plasticidade fenotípica das larvas e a consequente alteração do fenótipo nos adultos, com potencial para diversificação evolutiva. Os autores verificaram que a diversificação morfológica entre as espécies de Paleobatoidea foi correlacionada com as diferenças intra-específicas causadas por respostas plásticas da taxa de desenvolvimento à variação da temperatura. Eles encontraram relações alométricas significativas entre contrastes independentes do comprimento do rostro e dos membros posteriores (resíduos das medidas pelo tamanho corpóreo, representando, portanto, a forma) com os contrastes das taxas de desenvolvimento dentro das espécies e entre as espécies (utilizando a menor taxa de desenvolvimento de cada espécie); esta última caracterizando uma relação alométrica evolutiva. Apesar de Gomez-Mestre e Buchholz (2006) mostrarem o potencial da plasticidade das larvas de alterar as formas de partes dos adultos conforme o tempo de desenvolvimento, eles não abordaram a modularidade de forma explícita, tampouco esclareceram as forças evolutivas envolvidas na diversificação do grupo estudado.

Estudos de integração morfológica e modularidade com uso dos modelos da genética quantitativa são raros em anfíbios. Os poucos que apresentaram matrizes **G** as construíram com escassos caracteres larvais (tempo de desenvolvimento, massa na metamorfose, tamanho corpóreo na metamorfose e comprimento da cauda), sendo inviável uma análise da modularidade (por exemplo: Phillips, 1998; Cano *et al.*, 2004). Cano *et al.* (2004) comparou matrizes **G** de duas populações de *Rana temporaria* que habitam diferentes ambientes, mas as análises foram distintas das utilizadas em estudos de mamíferos, sendo difícil realizar comparações. Além disso, conhecemos somente um grupo que comparou matrizes **P** em espécies de salamandra, utilizando diversos caracteres dos adultos (Ivanovic *et al.* 2005, 2007), porém com interesse principal nas mudanças de modularidade do crânio ao longo da ontogenia e em referência ao fenômeno da pedomorfose. Percebemos, então, que não sabemos como são os padrões de integração/modularidade e sua evolução em anfíbios.

O complexo de espécies de *Rhinella granulosa* é um grupo de anfíbios promissor para o estudo de integração morfológica e modularidade. Em uma recente revisão taxonômica do grupo, doze espécies foram identificadas por caracteres morfológicos, e são

distribuídas por todos os domínios sul-americanos de área aberta (Narvaes e Rodrigues, 2009). Esses domínios apresentam clima bastante diverso entre si, tornando interessante a construção de matrizes de fatores climáticos para testes de similaridade. Além disso, o crânio das espécies desse grupo é bastante ossificado e com várias crestas, tornando a determinação dos marcos morfológicos mais simples. Finalmente, todas as espécies do grupo de *R. granulosa* possuem reprodução explosiva, logo após as primeiras chuvas de verão, reunindo em um mesmo corpo de água dezenas a centenas de casais desovando. Por conseguinte, diversas desovas podem ser coletadas de uma vez, junto dos pais, para a construção de matrizes **G**.

2. Bibliografia

Falconer, D.S., e T.F.C. Mackay. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. 4th ed. Longman, Essex, U.K.

Olsson, E.C., e R.L. Miller. 1958. Morphological Integration. Univ. of Chicago Press, Chicago, IL.

Cheverud, J.M. 1996. Developmental integration and the evolution of pleiotropy. Am. Zool. 36: 44-50.

_____ 1984. Quantitative genetics and developmental constraints on evolution by selection. J. Theor. Biol. 110: 155-171.

Lande, R. 1979. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain: body size allometry. Evolution 33: 402-416.

Lande, R. e S.J. Arnold. 1983. The measurement of selection on correlated characters. Evolution 37: 1210-1226.

Cheverud, J.M. e G. Marroig. 2007. Comparing covariance matrices; random skewed method compared to the common principal component model.

Arnold, S.J. 1981. Behavioral variation in natural populations. I. Phenotypic, genetic and environmental correlations between chemoreceptive responses to prey in the garter snake *Tamnopholis elegans*. Evolution 35: 489-509.

Turelli, M. 1988. Phenotypic evolution, constant covariances and the maintenance of additive variance. Evolution 43: 1342-1347.

West-Eberhard, M.J. 2003. Developmental Plasticity and Evolution. Oxford Univ. Press, NY, U.S.

- Wagner, G.P. 1996. Homologues, natural kinds and evolution of modularity. *Am. Zool.* 36: 36-43.
- Wagner, G.P. e L. Altenberg. 1996. Perspective: complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution* 50: 967-976.
- Wagner, G.P., M. Pavlicev e J.M. Cheverud. 2007. The road to modularity. *Nature Genetics* 8: 921-932.
- Marroig, G. e J.M. Cheverud. 2001. A comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology and ontogeny during cranial evolution of New World monkeys. *Evolution* 55: 2576-2600.
- _____. 2004. Did natural selection or genetic drift produce the cranial diversification of New World monkeys? *Am. Nat.* 163: 417-428.
- _____. 2005. Size as a line of least evolutionary resistance: diet and adaptive morphological radiation in New World monkeys. *Evolution* 59: 1128-1142.
- Goswami, A. 2006. Notes and Comments: Cranial modularity shifts during mammalian evolution. *Am. Nat.* 168: 270-280.
- Porto, A., F.B. de Oliveira, L.T. Shirai *et al.* 2009. The evolution of modularity in the mammalian skull I: Morphological integration patterns and magnitudes. *Evol. Biol.* 36: 118-135.
- Marroig, G., L.T. Shirai, A. Porto *et al.* 2009. The evolution of modularity in the mammalian skull II: Evolutionary consequences.
- Klingenberg, C.P. 2008. Morphological integration and developmental modularity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 39:115-132.
- Morey, S. e D. Reznick. 2000. A comparative analysis of plasticity In larval development in three species of spadefoot toads. *Ecology* 81: 1736-1749.
- Alvarez, D. e A. G. Nicieza. 2002. Effects of induced variation in anuran larval development on postmetamorphic energy reserves and locomotion. *Oecologia* 131: 186-195.
- Buchholz, D. R. e T. B. Hayes. 2002. Evolutionary patterns of diversity in spadefoot toad metamorphosis (Anura : Pelobatidae). *Copeia* 8: 180-189.
- Olsson, M. e T. Uller. 2002. Developmental stability and genetic architecture: a comparison within and across thermal regimes in tadpoles. *Evol. Biol.* 15: 625-633.
- Niehaus, A. C., R. S. Wilson, *et al.* 2006. Short- and long-term consequences of thermal variation in the larval environment of anurans. *Anim. Ecol.* 75: 686-692.

- Gomez-Mestre, I e D.R. Buchholz. 2006. Developmental plasticity mirrors differences among taxa in spadefoot toads linking plasticity and diversity. PNAS 103: 19021-19026.
- Phillips, P.C. 1998. Genetic constraints at the metamorphic boundary: morphological development in the wood frog, *Rana sylvatica*. Evol. Biol. 11: 453-463.
- Cano, J.M., A. Laurila, J. Palo i. 2004. Population differentiation in **G** matrix structure due to natural selection in *Rana temporaria*. Evolution 58: 2013-2020.
- Ivanovic, A., M.L. Kalezic e I. Aleksic. 2005. Morphological integration of cranium and postcranial skeleton during ontogeny of facultative paedomorphic European newts (*Triturus vulgaris* and *T. alpestris*). Amphibia-Reptilia 26: 485-495.
- Ivanovic, A., T.D. Vukov, G. Dzukic et al. 2007. Ontogeny of skull size and shape changes within a framework of biphasic lifestyle: a case study in six *Triturus* species (Amphibia, Salamandridae). Zoomorphology 126: 173-183.
- Narvaes, P. e M. T. Rodrigues. 2009. Taxonomic revision of *Rhinella granulosa* species group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a description of a new species. Arq. Zool. Mus. Zool. USP 40: 1-73.

3. Justificativa

Existe uma lacuna na literatura de estudos sobre integração morfológica e modularidade em anfíbios, um grupo potencialmente importante de ser investigado por ser suscetível a alterações de suas vias de desenvolvimento e de sua organização modular, tanto por mutações quanto pelo ambiente. Não sabemos se as descobertas encontradas para os mamíferos, como similaridade entre matrizes **G** e **P** e a importância da seleção natural na diversificação morfológica do crânio, são também aplicáveis aos anfíbios. Hipotetizamos que o padrão de correlação dos caracteres será similar entre as espécies, mas com diferenças nas magnitudes de integração; que os fatores ecologia e tamanho alométrico explicarão grande parte da divergência entre as espécies; e que os caracteres de desenvolvimento compartilhado serão mais correlacionados entre si.

4. Objetivos

1. Construção das matrizes de covariância e correlação genética (**G**) e fenotípica (**P**) da espécie *Rhinella granulosa*, com caracteres do crânio;
2. Teste de similaridade entre as matrizes **G** e **P** de *R. granulosa*;
3. Construção e comparação de matrizes **P** de todas as espécies do grupo *R. granulosa*;
4. Determinação do padrão modular e da integração geral do crânio das espécies de *R. granulosa*;
5. Diferenciação das causas da diversificação do crânio das espécies de *R. granulosa*: filogenia, ecologia (fatores climáticos) e/ou desenvolvimento (ontogenia do crânio).

5. Material e Métodos

1. Espécies

O complexo de espécies de *R. granulosa* pertence à família Bufonidae, ordem Anura. As características marcantes são glândula paratóide pequena, pele rugosa e cristas cefálicas queratinizadas bem desenvolvidas (Narvaes e Rodrigues, 2009). A distribuição do grupo é bem ampla, associada a formações abertas da América do Sul e do Panamá: caatinga – *R. granulosa*, cerrado – *R. mirandariberoi*, restinga – *R. pygmaea*, chaco – *R. bergi*, *R. major*, *R. azarai* e *R. fernandazae*, pampa – *R. fernandezae* e *R. dorbignyi*, llanos – *R. humboldti*, savanas do nordeste – *R. major*, *R. nattereri*, *R. merianae* e Panamá – *R. centralis*. O fato de algumas espécies possuírem distribuição geográfica muito restrita, fortemente associada a um único tipo de bioma, sugere que sua especiação tenha sido relacionada com os fatores ambientais diversos desses biomas, como topografia, tipo de solo e clima (Narvaes e Rodrigues, 2009). As espécies diferem principalmente quanto ao tamanho corpóreo e à morfologia do crânio (forma do rosto, tipo e configuração das cristas, granulação, glândulas paratóides). Uma filogenia do grupo ainda não foi publicada, porém está em construção (Pereyra, M. – comunicação pessoal).

2. Hipóteses de modularidade e marcos morfológicos no crânio

A determinação dos marcos morfológicos depende do padrão modular que hipotetizarmos para as espécies do grupo *R. granulosa*, uma vez que é importante realizarmos uma distribuição de medidas morfométricas em diferentes módulos de maneira balanceada. As hipóteses de modularidade são baseadas em dados de desenvolvimento do crânio (origem embrionária e vias de crescimento) ou função (Cheverud *et al.*, 1989). Olsson e Hanken (1996) determinaram um modelo de padrão ancestral do desenvolvimento da cabeça de anfíbios anuros por meio do estudo da migração celular da crista neural em larvas de *Bombina orientalis*. Eles observaram três vias de migração de células progenitoras das cartilagens do condocrânio: mandibular ou rostral, hióide e branquial; sendo esse padrão conservado evolutivamente (Figura 4).

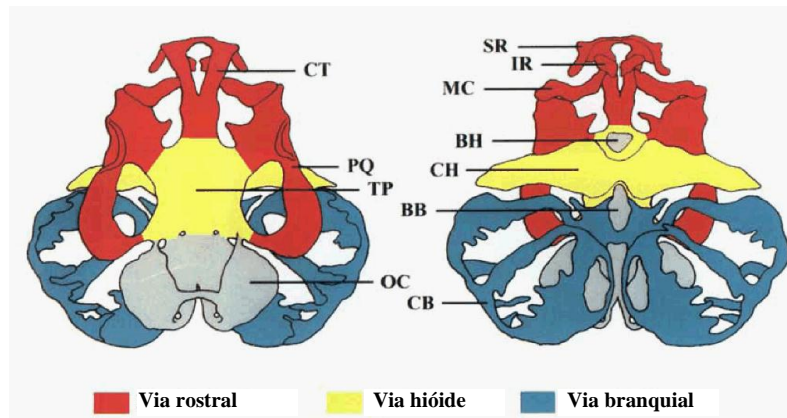


Figura 4. Vias de migração celular da crista neural no crânio de anfíbio. O crânio da larva da rã *Bombina orientalis* em visões dorsal e ventral. As cores representam as diferentes vias de migração: vermelha – rostral, amarela – hióide, azul – branquial e cinza – componentes não derivados da crista neural. Abreviações: BB – basobranquial, BH – basohial, CB – ceratobranquial, CH – ceratohial, CT – cornua trabécula, IR – infrarostral, MC – cartilagem de Meckel, OC – cápsula ótica, PQ – palatoquadrado, SR – suprarostrais, TP – placa trabecular (Olsson e Hanken, 1996).

Marcos dentro destes três módulos podem ser utilizados em uma primeira hipótese, seguindo o desenvolvimento do condocrânio, que em anuros que realizam metamorfose, transforma-se no crânio ossificado após a embriogênese (Hanken e Gross, 2005). Visto que mais de uma hipótese de modularidade pode ser testada, uma segunda hipótese pode ser similar à adotada em mamíferos por Cheverud (1982; 1995), considerando dois módulos maiores - o neurocrânio e a face - segundo os padrões de crescimento neural e somático, respectivamente; e dentro destes, módulos menores - o teto do crânio, a base do crânio e a órbita, no neurocrânio; e as regiões oral, nasal e zigomática, na face (Cheverud, 1995). Esta segunda hipótese pode corresponder também aos anfíbios se os efeitos de fatores epigenéticos forem semelhantes aos em mamíferos. Porém, como a captura de alimento é diferente nesses dois grupos e os anfíbios não mastigam as presas, existe uma chance desse padrão ser inverossímil para os anfíbios.

Em colaboração com os professores Miguel Trefaut-Rodrigues e Carlos Navas Iannini, do Instituto de Biociências da USP, faremos um piloto de determinação dos marcos morfológicos do crânio em 20 adultos da espécie *R. granulosa*. Esses animais serão coletados na região de Angicos (RN), no sertão da caatinga. Faremos as medidas nos crânios dos animais com a pele e posteriormente sem a pele (direto no esqueleto) para compararmos os valores e determinarmos se ocorrem distorções devido à presença da pele. Esse piloto é muito relevante, pois as coleções de anfíbios são depositadas com

pele. Inicialmente, utilizaremos os mesmos marcos morfológicos determinados por Ivanovic *et al.* (2007) no crânio de salamandras, mostrados na Figura 5:

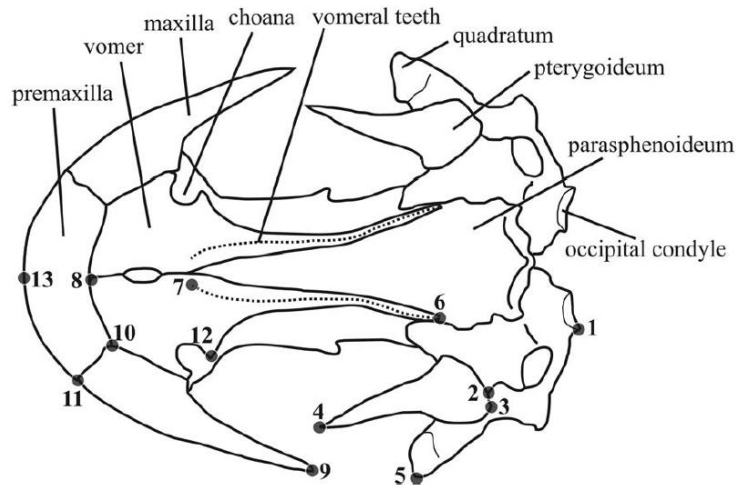


Figura 5. Marcos morfológicos a serem testados nos crânios das espécies do grupo *Rhinella granulosa*. Crânio da salamandra *Triturus sp.* em posição ventral. 1. Ponta lateral do côndilo occipital; 2. Ponto lateral de encontro entre a base do crânio e o pterigoide posterior; 3. Extremidade posterior do pterigoide; 4. Ponta anterior do pterigoide; 5. Extremidade lateral do quadrado; 6. Extremidade posterior dos dentes vomerais; 7. Extremidade anterior dos dentes vomerais; 8. Extremidade anterior do vômer; 9. Ponta posterior da maxila; 10. Extremidade posterior da pré-maxila (sutura entre maxila e vômer); 11. Parte anterior da sutura entre pré-maxila e maxila; 12. Pontos laterais do vômer que formam a margem da coana; 13. Extremidade anterior da pré-maxila (ponta do rostro).

3. Matriz de covariância e correlação genética de *R. granulosa*

Faremos a construção da matriz **G** com a espécie *R. granulosa*, que habita o bioma da caatinga. Na época reprodutiva, coletaremos casais em amplexo e os depositaremos separadamente em bacias com água para a oviposição. Esse método já foi posto em prática anteriormente (Simon, 2010). Os casais e suas respectivas desovas serão transportados ao laboratório para que os crânios dos primeiros sejam digitalizados e medidos, e os segundos desenvolvam-se em ambiente controlado. Após a metamorfose, manteremos os juvenis até atingirem um tamanho mínimo no qual possamos realizar as medidas no crânio. Com as medidas dos pais e prole, as herdabilidades, médias e variâncias dos caracteres podem ser estimadas (Falconer e Mackay, 1996) e a matriz **G** construída via REML (máxima verossimilhança restrita).

4. Matrizes fenotípicas de covariância e correlação das espécies do grupo *R. granulosa*

As matrizes **P** das espécies serão construídas com as medidas realizadas nos crânios de indivíduos depositados em coleções de museu. As coleções de anfíbios são depositadas com pele, sendo importante, portanto, que os crânios das espécies do grupo *R. granulosa* sejam bem ossificados. Após a construção das matrizes **P**, estas serão comparadas com a matriz **G** de *R. granulosa* e entre si.

5. Matrizes de filogenia, ecologia e desenvolvimento

As matrizes de filogenia, ecologia e desenvolvimento serão construídas para a realizarmos testes de similaridade entre as espécies. A primeira será uma matriz de distâncias filogenéticas entre os taxa (sendo realizada no momento por um grupo de pesquisa chefiado pelo professor Julian Faivovich, do Museu Argentino de Ciências Naturais). A matriz de ecologia será de fatores climáticos, como temperatura média, variação média diária e anual da temperatura, pluviosidade anual e umidade relativa do ar média. Esses dados podem ser obtidos por meio de estações climáticas. Os dados de temperatura dos microhabitats de desenvolvimento serão coletados com a colaboração do professor Carlos Navas Iannini, com o uso de carregadores de dados (Hobo, Onset Computer Corporations, USA). Finalmente, as matrizes de desenvolvimento seguem as hipóteses de modularidade, sendo que os pares de caracteres de um mesmo módulo tem valor um e os de módulos distintos tem valor zero (Cheverud et al. 1989; Cheverud, 1995). Testaremos a associação entre as medidas de similaridade das matrizes **P** e as três acima, para evidenciarmos a relevância relativa destes fatores na diversificação do crânio das espécies estudadas.

6. Testes estatísticos

Faremos os testes de similaridade de matrizes de correlação das espécies e das matrizes de filogenia, ecologia e desenvolvimento por meio de correlações de Pearson entre matrizes. Determinaremos a significância das correlações com testes de aleatorização, como o teste de Mantel (Cheverud *et al.*, 1989). A similaridade entre matrizes de covariância não pode ser testada por aleatorizações de suas colunas e linhas (como no Mantel), pois cada linha tem uma escala diferente, por se referir a diferentes

caracteres. Utilizaremos, então, o método de vetores aleatórios, no qual as correlações entre os vetores de gradientes de seleção natural, aplicados às matrizes, e os vetores resposta serão determinadas, com o uso da equação de resposta multivariada à seleção natural. Determinaremos a significância por meio de uma distribuição nula de correlações entre os vetores de resposta e 1000 vetores de seleção aleatórios (Marroig e Cheverud, 2001). Além disso, o teste recente introduzido por Marroig *et al.* (Evolutionary Biology, “online early” 2011) chamado de SRD (selection response decomposition) será usado para testar aonde as semelhanças e diferenças entre as matrizes estão concentradas.

6. Plano de trabalho e Cronograma

1. Disciplinas: agosto a novembro/2011; fevereiro a novembro de 2012;
2. Piloto para determinação dos marcos morfológicos: agosto a outubro/2011;
3. Coleta de dados climáticos para construção da matriz de clima: agosto/2011 a agosto/2012;
4. Coleta de casais e desovas de *R. granulosa* para construção da matriz genética: fevereiro/2012 a abril/2012;
5. Medição dos crânios dos adultos de *R. granulosa*: abril/2012;
6. Criação das larvas e juvenis de *R. granulosa* em laboratório: abril/2012 a abril/2013;
7. Construção da matriz genética de *R. granulosa*: mai/2013 a ago/2013;
8. Medição dos crânio das espécies do grupo de *R. granulosa* com espécimes de coleções de museu: janeiro/2012 a julho/2013;
9. Construção das matrizes fenotípicas: agosto/2013 a dezembro/2013;
10. Testes de similaridade e correlação entre matrizes: janeiro/2014 a março/2014;
11. Redação da tese: janeiro/2014 a agosto/2014.