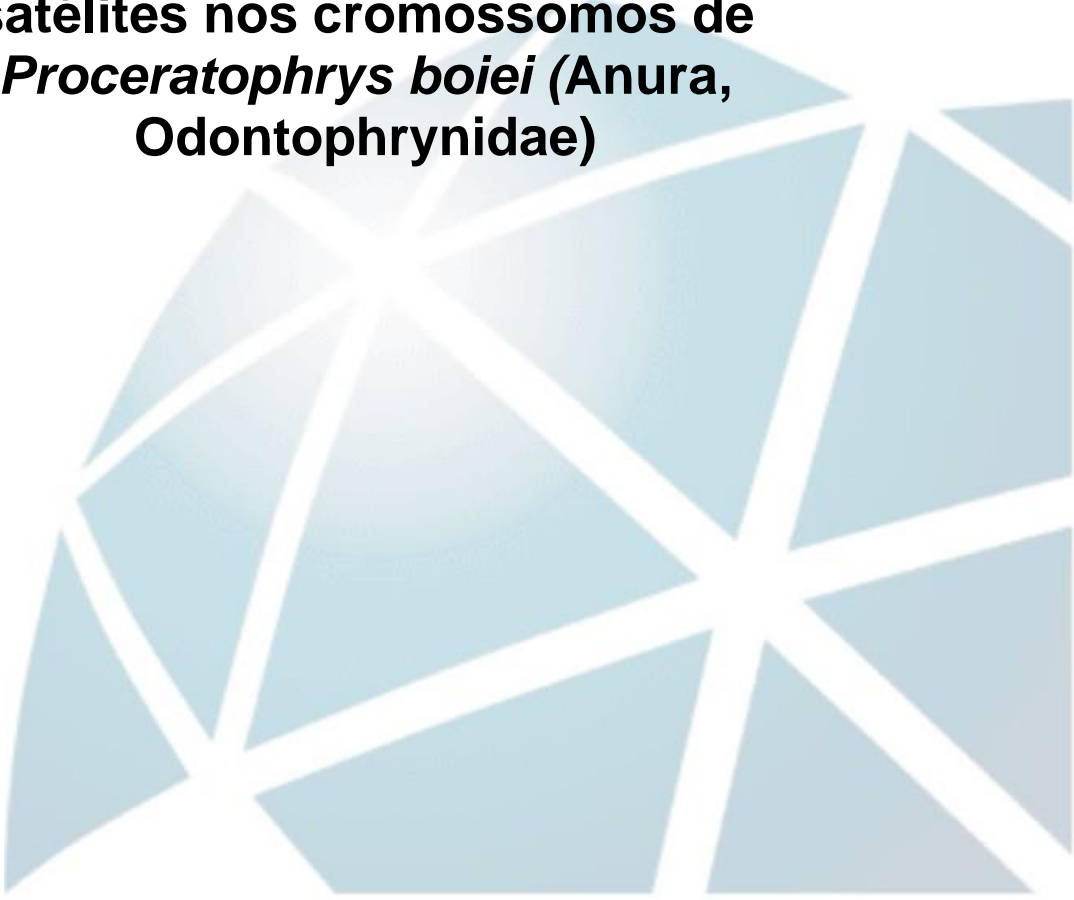

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Raquel Fogarin Destro

**Organização e localização de DNAs
satélites nos cromossomos de
Proceratophrys boiei (Anura,
Odontophrynidae)**



Rio Claro
2019

RAQUEL FOGARIN DESTRO

ORGANIZAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE DNAs SATÉLITES NOS
CROMOSSOMOS DE *PROCERATOPHRYS BOIEI* (ANURA,
ODONTOPHRYNIDAE)

Orientador: Prof. Dr.^a Patricia Pasquali Parise-Maltempi
Co-orientador: Me. Marcelo João da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de
bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2019

D477o Destro, Raquel Fogarin
Organização e localização de DNAs satélites nos cromossomos de
Proceratophrys boiei (Anura, Odontophrynidae) / Raquel Fogarin Destro. -- Rio
Claro, 2019
35 p. : il., tabs., fotos, mapas + 1 CD-ROM

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Patricia Pasquali-Parise Maltempi
Coorientador: Marcelo João da Silva

1. Citogenética. 2. Biologia molecular. 3. Anura. 4. Evolução. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio
Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço imensamente a minha mãe, Márcia e ao meu pai, Marcelo que apesar de todas as dificuldades, me apoiaram com muito amor e carinho, imprescindíveis nesta jornada. Ao meu irmão, Fábio, por todas as conversas amigas e de força.

Agradeço também a todos os amigos que viveram comigo a graduação, especialmente aos meus amigos queridos da Gangue do Marrocos, em especial a Mayara com quem tive o imenso prazer de dividir meu lar nos primeiros anos de faculdade. Que em todos os momentos foi muito mais que amiga, mas conselheira, irmã e companheira dos piores e melhores momentos.

Agradeço imensamente a minha melhor amiga Juu, por nossa amizade de muitos anos, minha amiga desde da época da Monteiro. Juu já vivemos tantas coisas que tenho certeza que nossa amizade é pra vida toda. Obrigada por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos, em muitas alegrias, doideras e caos. Muito obrigado por todas as verdades duras e palavras de força. Por acreditar em mim, minha amiga de coração, minha irmã de alma.

Agradeço imensamente a República Dauhma, minha família de coração de São Carlos. Com vocês, vivi os momentos mais intensos, de muitas doideras, carinho, reflexões, mais loucuras. Onde pude ser quem eu era/sou e que nesses anos de amizade foi se transformando na pessoa que sou hoje, que leva um pedacinho de cada um de vocês, moradores, ex-moradores e agregadas, seja por termos vivido uma conversa louca, uma viagem, uma festa caótica ou uma manhã/tarde/noite/madrugada na sala. Amo vocês demais.

A República Gandaia por ser meu lar nestes últimos anos de graduação. Mudar para esta casa foi uma das mais loucas e melhores decisões que já tomei na vida, cada um, Gian, Lys, Sorriso e Frita (ela não podia não estar aqui) com seu jeito único e peculiar fizeram desta casa um lar, de muito amor, conversas, reflexões, aprendizados, sentimentos, confusões e crescimento. Sou imensamente grata a cada um de vocês por serem quem vocês são, amo vocês.

Agradeço também a República Sertão, com todas as pessoas que ali moraram, por ser minha segunda casa em Rio Claro, por todo o acolhimento de primeira, todas as conversas sobre o que é e o que deveria ser a graduação. Principalmente meu companheiro Osasco, Nico, Nickinho, por desde o primeiro momento ser exatamente meu companheiro, por todos os conselhos, amor e carinho incondicional nesta fase conturbada, que em todos os momentos, por mais difíceis que fossem, esteve lá por mim.

Agradeço, a Professora Dra. Patrícia Pasquali Parise-Maltempi, por toda sua orientação, ensinamentos, incentivos e muito apoio nestes anos de graduação, por sempre estar ali para escutar diante das aflições deste período e sempre me orientando com muita dedicação. Agradeço ao Rafael Borba por ter me acolhido em meus primeiros meses no laboratório, por ser a primeira pessoa que me passou ensinamentos da citogenética e por todas as horas dedicadas a me mostrar os experimentos.

Agradeço imensamente ao meu co-orientador Me. Marcelo João da Silva, me faltam palavras pra descrever o quanto sou grata a todo o apoio que me deu neste trabalho, com toda a calma do mundo você me mostrou esse mundo que é a pesquisa, com dificuldades, mas muitas alegrias. Com seu jeito tranquilo e paciente fomos nos conhecendo, desenvolvendo este trabalho juntos e nos momentos de mais aflições você sempre esteve lá para me ajudar. Marcelo você é uma pessoa incrível e serei pra sempre, muito grata por ter te conhecido. Muito obrigada mesmo.

Agradeço a todos os companheiros de laboratório, Luciana, Carol, Evelin, Giselle, Luiza, Murilo, Mateus, Marcelo (de novo sim) por todas as conversas, crises e alegrias divididas no dia-a-dia do lab. Obrigada por sempre me escutarem nos momentos de anseios, por nos momentos difíceis de experimentos que não davam certo, sempre estarem lá, pra tentar pensarmos juntos o que poderia ser feito.

Agradeço pôr fim a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo) e à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento que possibilitou a realização deste trabalho

RESUMO

A heterocromatina de organismos eucariotos é normalmente composta por sequências de DNAs repetitivos. Um tipo especial destes é o DNA satélite, que constitui uma fração não codificadora do genoma, consistindo em longas matrizes de sequências repetidas em tandem, localizadas preferencialmente na heterocromatina das regiões cromossômicas pericentroméricas e subteloméricas. O presente trabalho teve como objetivo estudar a organização genômica e a localização cromossômica de sequências de satDNAs presentes no genoma da espécie de sapo *Proceratophrys boiei* (Wied-Neuwied, 1825), que se mostra bastante interessante do ponto de vista genético e citogenético, uma vez que em estudos anteriores foi identificado um heteromorfismo cromossômico ligado à diferenciação de cromossomos sexuais em fêmeas de uma população da espécie. Para isso, foi realizada previamente uma extensiva análise no genoma tanto de macho quanto de fêmea sequenciado da espécie, utilizando ferramentas de bioinformática, da qual foi isolado um grande número de possíveis satDNAs. Para este trabalho foram escolhidos dois satDNAs da fêmea de *P. boiei* e dois do macho, sendo eles nomeados como: PboSat40-165, PboSat51-39, PboSat57-97 e PboSat58-155, estes passaram por análises de PCR e hibridação fluorescente *in situ* cromossômica (FISH) a fim da validação e mapeamento dessas. Apenas os satélites PboSat40-165 e PboSat57-97 mostraram marcações visíveis na técnica de FISH em preparações tanto de macho quanto de fêmea da espécie. O satélite PboSat40-165 foi localizado na região subtelomérica do par cromossômico 5 e o PboSat57-97 foi localizado nas regiões centroméricas e pericentroméricas de todos os cromossomos. Assim, ambos ocupam áreas heterocromáticas, como descrito anteriormente para estas sequências por outros autores. O isolamento de sequências repetitivas, sobretudo de satDNAs, constitui uma ferramenta importante para obter dados que contribuirão estudos evolutivos em anuros, podendo revelar novidades à cerca da organização genômica e cromossômica nesses organismos, uma vez que ainda são poucos os trabalhos envolvendo este tipo de estudo em anuros.

Palavras-chave: DNA repetitivo, cromossomos sexuais, evolução cariotípica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. <i>Proceratophrys</i> : características gerais e taxonomia.....	6
1.2. Citogenética e citogenômica de <i>Proceratophrys</i>	7
1.3. Cromossomos sexuais em anfíbios.....	10
1.4. Sequências repetitivas.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Material.....	13
3.2. Extração de DNA genômico de tecidos sólidos.....	15
3.3. Sequenciamento Genômico.....	15
3.4. Análise das sequências.....	15
3.5. Construção de oligonucleotídeos específicos e amplificação em cadeia.....	16
3.6. Hibridação Florescente <i>in situ</i> (FISH).....	17
3.6.1. Tratamento nas lâminas.....	17
3.6.2. Desnaturação dos cromossomos e das sondas.....	17
3.6.3. Lavagens e Detecção.....	18
3.6.4. Montagem das lâminas.....	18
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Identificação de satDNAs e caracterização de sequências.....	19
4.2. Escolha de satDNAs para serem analisados.....	21
4.3. Amplificação das sequências por PCR.....	11
4.4. Localização cromossômica dos satDNAs.....	22
4.5. Similaridades com outras sequências de DNAs repetitivos.....	23
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÃO.....	27
7. REFERÊNCIAS.....	26

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Proceratophrys*: características gerais e taxonomia

É o mais representativo dos gêneros da família, com um grande número de representantes de pequenos e médios sapos, atualmente constituído por 41 espécies, distribuídas no leste e sul do Brasil, nordeste da Argentina e Paraguai, sendo encontradas em ambientes florestais e áreas abertas (PRADO & POMBAL, 2008; FROST, 2019). Entretanto, a riqueza de espécies do gênero *Proceratophrys* provavelmente está subestimada em relação ao número de espécies, como indicado pela constante descoberta e descrição de novas espécies (PRADO & POMBAL, 2008; MARTINS & GIARETTA, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2012; CRUZ *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2013; GODINHO *et al.*, 2013; MARTINS & GIARETTA, 2013; MÂNGIA *et al.*, 2014; MÂNGIA *et al.*, 2018).

A taxonomia e sistemática de *Proceratophrys* ainda é bastante conflitante e a classificação foi realizada até o momento com base em aspectos de similaridade morfológica externa de adultos, com espécies agrupadas em quatro grupos fenéticos ou complexos de espécies: *P. boiei*, *P. appendiculata*, *P. bigibbosa* e *P. cristiceps* (IZECKSOHN *et al.*, 1999; GIARETTA *et al.*, 2000 ; KWET & FAIVOVICH, 2001; PRADO & POMBAL, 2008), mesmo com evidências moleculares apontando para a natureza não monofilética dos grupos (PRADO & POMBAL, 2008; AMARO *et al.*, 2009; PYRON & WIENS, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2013; PYRON, 2014), exceto para o grupo *P. bigibbosa*, único grupo recuperado como monofilético (AMARO *et al.*, 2009; PYRON & WIENS, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2013; PYRON, 2014).

Algumas espécies não estão associadas a nenhum desses grupos (FROST, 2019), como por exemplo, *P. rondonae* Prado e Pombal, 2008, *P. minuta* Napoli, Cruz, Abreu e Del Grande, 2011, *P. redacta* Teixeira, Amaro, Recoder, Vechio e Rodrigues, 2012, e *P. schirchi* (Miranda-Ribeiro, 1937), por apresentarem características peculiares que não se enquadram em nenhum dos grupos anteriores (PRADO & POMBAL, 2008; NAPOLI *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012; MÂNGIA *et al.*, 2014).

A espécie *P. boiei* (Wied-Neuwied, 1825) está distribuída desde o estado de Santa Catarina até o sul dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. É endêmica do Brasil e ocorre apenas em áreas de Mata Atlântica e remanescentes dessa (PRADO & POMBAL, 2008; AMARO, *et al.*, 2012). Dados sobre a ecologia de *P. boiei* ainda são pouco conhecidos, porém, sabe-se que esses anuros ocupam folhiços e rochas, apresentando comportamento semi-fossorial. Além disso, apresentam dimorfismo sexual, marcado por fêmeas maiores que os machos, e que durante o período reprodutivo associam-se em riachos no interior das bordas de mata (CARNAVAL, 2002; PRADO & POMBAL, 2008).



Figura 1. Indivíduo de *Proceratophrys boiei*. Foto: Célio F. B. Haddad.

1.2. Citogenética e citogenômica de *Proceratophrys*

Os dados genéticos e citogenéticos de *Proceratophrys* ainda são escassos na literatura quando comparados a alguns outros grupos de anuros, e até o momento estão limitados apenas ao número e morfologia dos cromossomos, com base na coloração convencional com Giemsa que mostram que *P. boiei*, *P. renalis* e *P. appendiculata* apresentam número diploide de $2n = 22$ cromossomos (KING, 1990; KURAMOTO, 1990; ANANIAS *et al.*, 2007; AMARO *et al.*, 2012). No entanto, para *P. boiei* já foram realizados mais estudos, que mostraram, a presença de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ:ZW, além de diferenças na quantidade de heterocromatina constitutiva e posição das NORs entre populações do sul e sudeste do Brasil (ANANIAS *et al.*, 2007; AMARO *et al.*, 2012).

Além disso, recentemente, Silva (2019), descreveu o cariótipo de três novas espécies de *Proceratophrys*, aumentando assim o número de espécies cariotipadas para seis. Essas foram *P. schirchi*, *P. laticeps*, *P. melanopogon*, que também revelaram número diploide de $2n = 22$ cromossomos, regiões heterocromáticas predominantemente no centrômero dos cromossomos e NOR única, no par 8, com exceção de *P. melanopogon*, cuja localização da NOR está localizada no par 4.

Neste mesmo trabalho, Silva (2019) analisou indivíduos de *P. boiei* de uma população de Mogi das Cruzes, São Paulo e encontrou resultados corroborando com os descritos por Ananias e colaboradores (2007) e Amaro e colaboradores (2012) que revelaram um padrão incomum de distribuição da heterocromatina constitutiva para esta espécie por meio de Bandamento C. Nesses estudos os autores mostraram um polimorfismo em um par de cromossomos das fêmeas que foi relacionado à um heteromorfismo sexual. O par de cromossomos homólogos envolvido nesse heteromorfismo, tem o mesmo tamanho e morfologia sob coloração convencional, mas são distinguidos um do outro pela presença de uma grande quantidade de heterocromatina em um dos cromossomo do par, enquanto seu homólogo apresenta bandas C apenas na região pericentromérica, o que levou os autores a sugerirem um sistema de diferenciação de cromossomos sexuais do tipo ZZ:ZW para *P. boiei* (ANANIAS *et al.*, 2007; SILVA, 2019).

Análises citogenéticas e filogenética envolvendo sequências mitocondriais e nucleares do genoma de *P. boiei* foram realizadas por Amaro e colaboradores (2012), em populações do sul e sudeste do Brasil, que também confirmaram o número diploide $2n = 22$ para a espécie e relataram a presença do heteromorfismo cromossômico relacionado à heterocromatina constitutiva observada em um par de cromossomos homólogos em fêmeas de populações da região sudeste do Brasil e que está ausente em populações do sul do país (AMARO *et al.*, 2012).

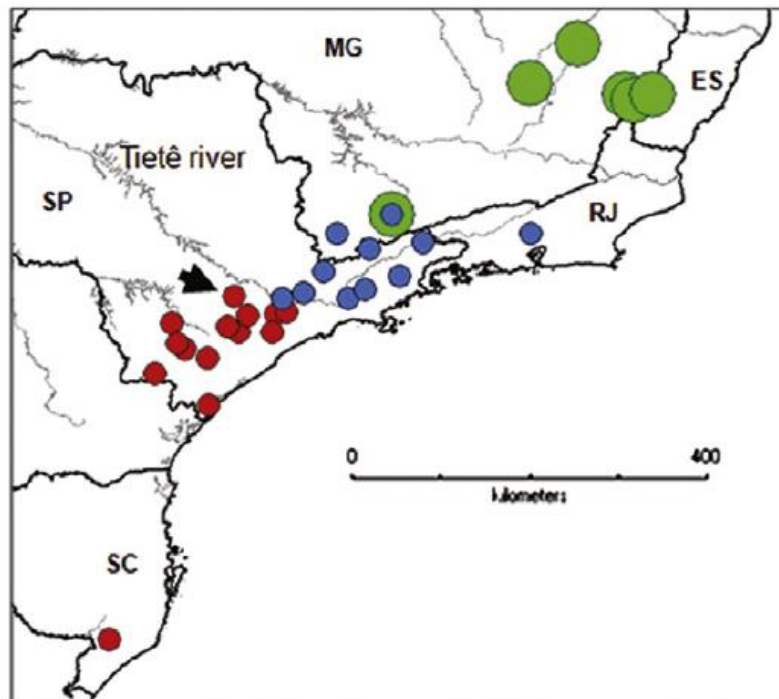


Figura 2: Mapa retratando localidades amostradas no trabalho de Amaro et al., (2012), identificadas por cores para mostrar os representantes das populações Sul (vermelho), Norte 1 (verde) e Norte 2 (azul). A seta aponta para Iperó (SP), onde os dados cariotípicos mostram a hibridização entre as populações do Sul e do Norte. Fonte: Amaro *et al.*, 2012.

Os dados apresentados sobre os cromossomos de diferentes populações de *P. boiei* (sul e sudeste) são muito interessantes, principalmente no caso dos anfíbios, uma vez que seus representantes geralmente apresentam pouca heterocromatina constitutiva em seus cariótipos e poucos deles apresentam cromossomos sexuais diferenciados (SCRALT *et al.*, 2016). A grande quantidade de heterocromatina presente em um dos homólogos do par sexual pode ser usada como ponto de partida para aumentar o conhecimento sobre a origem e evolução dos cromossomos sexuais em anfíbios, por exemplo, estudando com mais precisão os componentes dessa heterocromatina que é composta principalmente de DNA repetitivo (GARRIDO-RAMOS, 2017; PLOHL *et al.*, 2014). Dessa forma, os dados citogenéticos obtidos por Ananias e colaboradores (2007), Amaro e colaboradores (2012) e Silva (2019) para *P. boiei* levantaram hipóteses interessantes para futuros estudos genéticos e citogenéticos comparativos e evolutivos neste grupo de anuros.

1.3. Cromossomos sexuais em anfíbios

A presença de cromossomos sexuais heteromórficos é uma característica considerada rara em anuros. Scharl e colaboradores (2016) afirmam que apenas 4% das espécies de anfíbios analisadas citogeneticamente têm cromossomos sexuais estruturalmente diferenciados e o heteromorfismo muitas vezes só é reconhecido após a utilização de técnicas de coloração diferencial, como bandamento C para evidenciar regiões heterocromáticas. Apesar disso, tanto espécies com sistemas sexuais do tipo XX/XY quanto com sistemas ZZ/ZW e até com sistemas múltiplos de cromossomos sexuais já foram encontradas, e essas espécies que apresentam esta característica, exibem um cromossomo Y ou W com acúmulo de heterocromatina (SCHMID *et al.*, 2003, 2010, 2012; SCHARL *et al.*, 2016; GATTO *et al.*, 2016; GAZONI *et al.*, 2018).

As análises citogenéticas realizadas até o momento em anfíbios, revelaram que a maioria das espécies carece de cromossomos sexuais diferenciados morfologicamente, implicando que eles ainda não desenvolveram diferenças supramoleculares a ponto de se tornar evidente no nível citológico. Embora a maioria das espécies de anfíbios estudadas possuam cromossomos sexuais homomórficos, em algumas espécies de anuros, mudanças estruturais sutis que indicam um estágio inicial de diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais, são aparentes (SCHARL *et al.*, 2016).

Ainda com relação aos cromossomos ligados ao sexo, pode-se afirmar que eles tendem a acumular uma grande quantidade de sequências repetitivas, mas não se tem certeza da provável causa destas sequências amplificarem preferencialmente nestes cromossomos. Uma das teorias mais bem aceitas é de que o acúmulo de sequências repetitivas em um dos cromossomos do par sexual facilite a supressão da recombinação entre os homólogos, protegendo assim as mutações sexualmente benéficas (OHNO, 1967; BULL, 1983). Por outro lado, é igualmente plausível que rearranjos cromossômicos, assim como acúmulo e amplificação de sequências repetitivas, possam ocorrer perto de *locus* de determinação do sexo como resultado da supressão da recombinação em vez de induzi-la (EZAZ & DEAKIN, 2014).

Além do heteromorfismo entre cromossomos aparentemente homólogos, a presença de grandes blocos de heterocromatina associada a esses, é muito interessante, pois envolve um acúmulo de sequências repetidas que levantam questões ligadas a processos de expressão gênica (LIU *et al.*, 2001; PEASTON *et al.*, 2004; HAN & BOEKE, 2005; VOLFF, 2006), a origem e evolução de cromossomos sexuais (LYON, 2000; BACHTROG, 2005; STEINEMANN; STEINEMANN, 2005; PARISE-MALTEMPI *et al.*, 2007; CIOFFI *et al.*, 2010), além de serem ainda utilizados como marcadores citogenéticos importantes em estudos de evolução, organização do genoma e na identificação de rearranjos cromossômicos em diversos grupos de organismos (BIÉMONT & VIEIRA, 2006; MARTINS, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

1.4. Sequências repetitivas

A heterocromatina é normalmente composta por sequências de DNA repetitivos e, na maioria dos organismos, o DNA repetitivo compreende uma fração considerável do genoma. Esse tipo de sequência presente nos genomas é classificado de acordo com suas principais características, em sequências codificantes e não-codificantes, sendo as sequências codificantes representadas pelas famílias multigênicas, que estão envolvidas na codificação de importantes proteínas e RNAs, e as não-codificantes, representadas por sequências que apresentam repetições em tandem, tais como DNAs satélites (satDNA), minissatélites e microssatélites, além de transposons e retrotransposons, que são sequências que apresentam repetições dispersas ao longo do genoma (CHARLESWORTH *et al.*, 1994; JURKA *et al.*, 2005; LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012).

Especificamente, satDNAs constituem uma fração não codificadora do genoma, consistindo em longas matrizes de sequências repetidas em tandem, localizadas preferencialmente na heterocromatina das regiões cromossômicas pericentroméricas e subteloméricas, embora sua presença em regiões eucromáticas já tenha sido relatada (LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012; PLOHL *et al.*, 2012; GARRIDO-RAMOS, 2015; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016; RUIZ-RUANO *et al.*, 2018), além de também ser encontrada em cromossomos específicos, como

cromossomos sexuais (GARRIDO-RAMOS, 2017; PALACIOS-GIMENEZ *et al.*, 2017; GATTO *et al.*, 2018; CREPALDI, 2019).

Atualmente, o sequenciamento de nova geração (NGS) junto com análises de alto rendimento em Bioinformática, como a utilização do software *RepeatExplorer*, tem sido utilizado para vários tipos de estudos, incluindo a identificação e caracterização de sequências de satDNA por leitura de *clusterings* baseado em similaridade (NOVÁK *et al.*, 2010; MACAS *et al.*, 2011; PAGÁN *et al.*, 2012; CAMACHO *et al.*, 2015; GARCÍA *et al.*, 2015; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016; UTSUNOMIA *et al.*, 2017, 2018; RUIZ-RUANO *et al.*, 2018, GARRIDO-RAMOS, 2017; SILVA, 2019; CREPALDI, 2019). O isolamento de sequências repetitivas, sobretudo de satDNA utilizando a metodologia citada acima, é um estudo inovador para anfíbios, constituindo uma ferramenta importante para estudos evolutivos em anuros, por meio da localização e organização de sequências repetitivas, podendo revelar mecanismos envolvidos na dinâmica molecular desses organismos.

A partir da leitura do genoma da espécie, o *RepeatExplorer* separa porções com mesmas repetições em *clusters*, identificando semelhanças de leitura, e realizando comparações entre pares, registrando todos os pares lidos com sobreposições de sequência que excedem um limite específico. Essa informação é então usada para construir um gráfico, no qual os vértices correspondem a leituras de sequência. Leituras de sobreposição são conectadas com arestas e seu score de similaridade é expresso como um peso de aresta, e a partir disso, é possível observar gráficos específicos de satDNAs constituindo grupos de nós mutuamente conectados, devido às freqüentes sobreposições de leituras agrupadas de suas múltiplas cópias (NOVÁK *et al.*, 2013).

Vários trabalhos recentes com o uso do *RepeatExplorer* para análises de alto rendimento e identificação de DNAs repetitivos vêm mostrando interessantes resultados nos mais diversos organismos. Como exemplo, análises realizadas por Ruiz-Ruano e colaboradores (2018) no gafanhoto *Pyrgomorpha conica* revelaram 87 variantes de satDNAs agrupados em 76 famílias diferentes, representando 9,4% do genoma da espécie. Em outro trabalho, Palacios-Gimenez e colaboradores (2017) examinaram o satelitoma no grilo *Eneoptera surinamensis* para caracterizar a evolução molecular de seus cromossomos neo-sexuais e encontraram um número

anormalmente alto de 45 famílias de satDNAs, representando cerca de 14% do genoma e mostrando diferentes estruturas modulares e alta diversidade de matrizes.

Da mesma forma, Crepaldi (2019) encontrou, 69 sequências de DNAs satélites através do *RepeatExplorer* que correspondem a cerca de 5.6% do genoma de uma fêmea do peixe *Megaleporinus elongatus*, e a partir dos dados gerados foi possível estudar a diversidade da composição desses satDNAs presentes nos cromossomos da espécie. Ainda, Silva (2019) buscou sequências repetitivas e estudou localização cromossômica dos satélites mais abundantes em uma população do sapo *P. boiei* de Tijucas do Sul (Paraná) e revelou uma grande quantidade de elementos repetitivos, sobretudo satDNAs.

Dessa forma, a combinação de sequenciamento genômico e análises de alto rendimento em bioinformática vêm possibilitando novas abordagens no que diz respeito à identificação de DNAs satélites e outras sequências repetitivas em diversos organismos. Com isso a importância de estudos que busquem entender como estas sequências estão organizadas, nos cromossomos das diferentes classes, com objetivo de uma melhor compreensão dos mecanismos evolutivos que envolvem estas, e que podem contribuir sobretudo para o entendimento de como pode estar ocorrendo evolutivamente a diferenciação de cromossomos sexuais.

2. OBJETIVOS

O estudo teve por objetivo principal estudar a organização genômica e a localização cromossômica de algumas sequências de satDNAs presentes no genoma da espécie de sapo *P. boiei*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Os espécimes de *Proceratophrys boiei* utilizados neste trabalho foram coletados na natureza, através de busca ativa noturna nas cidades brasileiras de Mogi das Cruzes – SP (23°29'31.8"S 46°14'51.1"W) e em Camanducaia – MG (22°45'28.3"S 46°07'56.1"W). Foram coletados 09 machos e uma fêmea na primeira localidade e um macho e 05 fêmeas na segunda. A eutanásia dos espécimes foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA – IB – UNESP – CRC), sob o

protocolo 4752, e as autorizações para coleta de espécimes da fauna silvestre foram concedidas pelo ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, sob os números 59449 e 60972 (documentos concedidos a Marcelo J. Silva).



Figura 3. Locais aproximados de coleta dos indivíduos. Fonte: *Google Maps*, adaptado.

Os indivíduos coletados foram identificados pelo Prof. Dr. Célio F. B. Haddad, do Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, catalogados e depositados na Coleção CFBH do referido Departamento.

As preparações cromossômicas foram obtidas de células da medula óssea, fígado e testículo, quando machos, injetados intraperitonealmente com solução de colchicina 1%, (na proporção de 0,01mL/g de massa corpórea), tendo os tratamentos duração de cerca de quatro horas, como descrito em Baldissera Jr. e colaboradores (1993). Foram analisados cromossomos de exemplares adultos de ambos os sexos.

As preparações dos indivíduos de Mogi das Cruzes – SP já se encontravam armazenados em freezer (-20°C) no laboratório de citogenética. Já as preparações dos indivíduos de Camanducaia – MG, coletados por Célio B. F. Haddad foram realizadas no decorrer do presente trabalho. Ambas foram utilizadas para preparação de lâminas e experimentos de hibridação *in situ* por fluorescência.

3.2. Extração de DNA genômico de tecidos sólidos

O DNA total foi obtido a partir de amostras de fígado utilizando o *kit* comercial “*WizardGenomic DNA Purification Kit*” – *Promega*, seguindo as determinações do fabricante. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% juntamente com 1 μ L de *Blue Juice (6X)* (*Invitrogen*®). A avaliação da qualidade das amostras foi realizada através da visualização das bandas resultantes em um transiluminador de luz ultravioleta.

3.3. Sequenciamento Genômico

Um sequenciamento de genoma de baixa cobertura foi realizado previamente através da plataforma *Illumina*® (*Illumina Inc.*, San Diego, CA, EUA) pela empresa *Macrogen Inc.* (Seul, República da Coréia) para uma fêmea e um macho de Mogi das Cruzes, usando *Illumina*® *HiSeq*™ 4000 (2 x 101 bp paired-end) e *TruSeq* 3000 4000 SBS *Kit* v3. As leituras obtidas a partir do sequenciamento foram unidas usando o programa *FASTQ-join* do *FASTX-toolkit* (GORDON & HANNON, 2010) com as opções básicas de entrada de dados.

3.4. Análise das sequências

Antes da análise de *clustering* baseada em gráficos do *RepeatExplorer*, a qualidade “*paired-ends reads*” foi processada e verificada usando o *FastQC* (*FastQC*, versão 0.10.1, 2012). O pré-processamento das leituras foi realizado seguindo os parâmetros padrão na plataforma pública: <https://repeatexplorerelixir.cerit-sc.cz/galaxy/> (NOVÁK *et al.*, 2013). As leituras foram processadas com uma “*quality trimming tool*”, “*FASTQ interlacer*” *in paired end reads*, “*FASTQ to FASTA*” e “*RepeatExplorer clustering*”, todos com opções padrão recomendadas (NOVÁK *et al.*, 2013).

Posteriormente, foram examinados os *clusters* que exibiam densidade gráfica característico de satDNA na saída de resumo *RepeatExplorer* para identificar famílias de satDNAs (NOVÁK *et al.*, 2010) sendo selecionados em uma primeira triagem. Dentro de cada *cluster*, os *contigs* com sequências em tandem foram selecionados usando a ferramenta de alinhamento gráfico *dotplot* implementada em *Dotlet* (JUNIER & PAGNI, 2000) para confirmar sua organização em tandem.

O monômero de consenso de cada família de satDNA foi usado para consultar dois bancos de dados, *GenBank* pela ferramenta *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.gov/Blast/>) e *Repbase* (<http://www.girinst.org/repbase/>), para verificar similaridade com outras sequências repetitivas descritas e depositadas. As superfamílias (SF) foram consideradas comparando-se o consenso do monômero de cada satDNA de forma independente, utilizando a ferramenta *Geneious* v4.8.5 (JUNIER & PAGNI, 2000), de acordo com os parâmetros estabelecidos por Ruiz-Ruano e colaboradores (2016).

O alinhamento sequencial das cópias dos satDNAs foi realizado usando a ferramenta *Muscle* (EDGAR, 2004) implementado no MEGA7 (TAMURA et al., 2011) e este também foi usado para realizar cálculo do conteúdo de A + T. Para a nomenclatura de cada satDNA Seguindo o critério sugerido por Ruiz-Ruano e colaboradores (2016), cada satDNA foi nomeado de acordo, em ordem decrescente de abundância.

3.5. Construção de oligonucleotídeos específicos e amplificação em cadeia

As sequências consensos de cada satDNA foram usadas para projetar manualmente *primers* com direções opostas. Para verificar a presença dos satDNAs no genoma de *P. boiei* foram feitas reações em cadeia da polimerase (PCR) dos satDNAs escolhidos previamente.

As PCRs foram realizadas usando 6,65 µL de H₂O Mili-Q 1 µL de 10X *Taq Reaction Buffer* (Tris-HCl, [200 mM], pH 8.4, KCl [500 mM]); 0,2 µL de MgCl₂, [50 mM]; 0,5 µL de *deoxynucleotide triphosphates* [2mM] (dNTPs); 0,5 µL de cada *primer* [µM] (*forward* e *reverse*), 0,1 µL de *Taq Platinum DNA Polymerase* [1U] (*Invitrogen*, San Diego, CA, USA) e 0,5 µL de DNA total à 50–100 ng/µL, obtido por extração, perfazendo volume final de 10 µL.

As condições de PCR no termociclador incluíram desnaturação a 94°C nos 5 minutos iniciais, 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento do primer a 50-60° C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 20 segundos com uma extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1%.

3.6. Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH)

Os estudos de Hibridação Fluorescente *in situ* foram conduzidos utilizando sondas de produtos amplificados por PCR. As sondas foram marcadas em uma reação de 20 µL contendo, 3 µL de DNA *polymerase I*/DNase I (*ThermoFisher*®); 0,52 µL de digoxigenina-11-dUTP / biotina-14-dATP; 8,14 µL de H₂O Mili-Q; 0,4 µL de dCTP (0,2 mM); 0,4 µL de dATP (0,2 mM); 0,4 µL de dGTP (0,2 mM); 0,14 µL de dTTP (0,2 mM); e 2 µL de NT *Buffer* (10X). As marcações com digoxigenina-11-dUTP foram detectadas usando antidigoxigenina-rodamina (*Roche*®) e as sondas marcadas com biotina-14-dATP foram detectadas usando estreptavidina conjugada com *Alexa Fluor 488* (*Invitrogen*).

Seguindo protocolo padrão de marcação por *nick-translation*, nas condições gerais de 16°C durante 60 minutos, seguidos de 10 minutos a 65°C e temperatura de manutenção a 10°C, de acordo com o protocolo de Pinkel e colaboradores (1986). Os experimentos de FISH também foram realizados de acordo com a técnica descrita por Pinkel e colaboradores (1986) com modificações de Silva e colaboradores (2012).

3.6.1. Tratamento das lâminas

As preparações citológicas foram pingadas em lâminas em um banho Maria a 60°C e as lâminas foram deixadas com a suspensão de células em estufa a 37°C por pelo menos 1 hora. O material foi desidratado em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos e incubado em 100 µl de RNase (0,4 % RNase/2xSSC) a 37°C por 1 hora em câmara úmida. O material foi então lavado três vezes por 5 minutos em 2xSSC e desidratado em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos.

3.6.2. Desnaturação dos cromossomos e das sondas

O DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70% em 2xSSC, a 70°C. Em geral, o tempo de desnaturação foi de 50 segundos. As lâminas foram desidratadas em série alcoólica gelada 70, 90 e 100% por 5 minutos. As sondas foram desnaturadas com uma solução de hibridação preparada com 3 µL da sonda marcada e 27 µL do tampão de hibridação (*Hybuffer*) por lâmina. A solução de hibridação foi desnaturada em termociclador a 95°C por 10 minutos e cada lâmina foi montada com 30 µL de solução de hibridação contendo a sonda, cobertas com

lamínula, e o conjunto mantido voltado para baixo *overnight* a 37°C em câmara úmida.

3.6.3. Lavagens e Detecção

As lamínulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas foram lavadas em 2xSSC a 72°C por 10 minutos e uma vez com PBD (1g de leite em pó + 20 µL de 20xSSC + 500 µL de Triton + 100 µL de água) a 45°C por 5 minutos. Cada lâmina foi incubada com 0,5 µL de antidigoxigenina rodamina/ou *Alexa fluor* + 100 µL PBD por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Foram feitas três lavagens por 5 minutos com PBD a 45°C.

3.6.4. Montagem das lâminas

Para montagem das lâminas foram colocados aproximadamente 10 µL de solução de DAPI + *antifading* (*Vectashiled*) sobre cada lâmina. Essas foram cobertas com lamínula, e armazenadas em geladeira no escuro. Os cromossomos e os sinais de hibridação foram observados usando microscópio de fluorescência (*Olympus BX61*) equipado com conjuntos de filtros apropriados. As imagens em preto e branco foram gravadas usando uma câmera digital resfriada DP71. As imagens pseudo-coloridas em azul (cromossomos) e vermelho ou verde (sinais), mescladas e otimizadas para brilho e contraste usando o *Adobe Photoshop CS6*. Para a montagem dos cariótipos e análises cromossômicas, foram analisadas as metáfases de *P. boiei* macho e fêmea, com um número variável entre 5 e 10 metáfases analisadas por lâmina.

4. RESULTADOS

O trabalho se deu a partir das análises genômicas de um indivíduo fêmea e um macho de *P. boiei* da população de Mogi das Cruzes, na qual há a presença do heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo. As análises prévias foram realizadas em conjunto com o doutorando Marcelo J. Silva, e revelaram um grande número de sequências repetitivas, sobretudo de satDNAs. Devido à grande quantidade de dados obtidos, parte deles estão sendo analisados pelo Marcelo J. Silva e outros foram selecionadas para serem exploradas neste trabalho, de acordo com os objetivos propostos.

4.1. Identificação de satDNAs e caracterização de sequências

O sequenciamento *Illumina* para a fêmea de Mogi das Cruzes produziu 19.382.286 leituras em pares, com um total de 1,957,610,886 nucleotídeos (nt), sendo conteúdo de G + C de 44,48% e A + T de 55,52%, Q20 é de 95,34% e Q30 é de 90,25%. A análise de agrupamento por meio do *RepeatExplorer* usou 1.000.000 de leituras aleatórias unidas como entrada e gerou 37,776 *clusters* que correspondiam às sequências repetitivas mais abundantes em *P. boiei*, incluindo satDNAs e outros elementos repetitivos não caracterizados. O número de sequências de *singletons* foi 33,855. As leituras totais foram 71,631 (Figura 4).

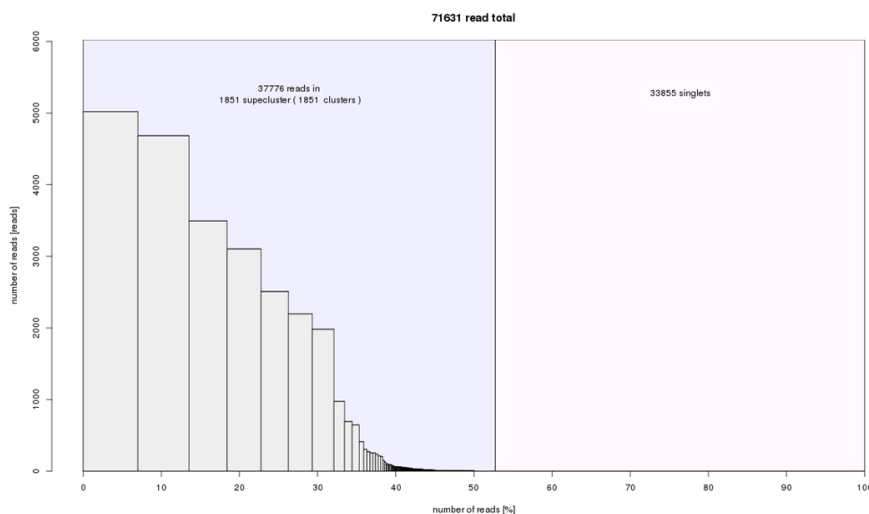


Figura 4. Histograma com os *clusters* repetitivos encontrados pelo *RepeatExplorer* no genoma de fêmea de *P. boiei*.

Para o indivíduo macho foram produzidas 14,326,566 leituras em pares, com um total de 1,446,983,166 nucleotídeos (nt). O conteúdo de G+C foi 43,289% e A+T foi 56,71% e Q20 de 98,903% e Q30 de 96,501%. A análise de agrupamento por meio do *RepeatExplorer* usou 1.000.000 de leituras aleatórias unidas como entrada e gerou 43,217 *clusters*. O número de sequências de *singletons* foi 43,287 e de leituras totais foi 86,504 (Figura 5).

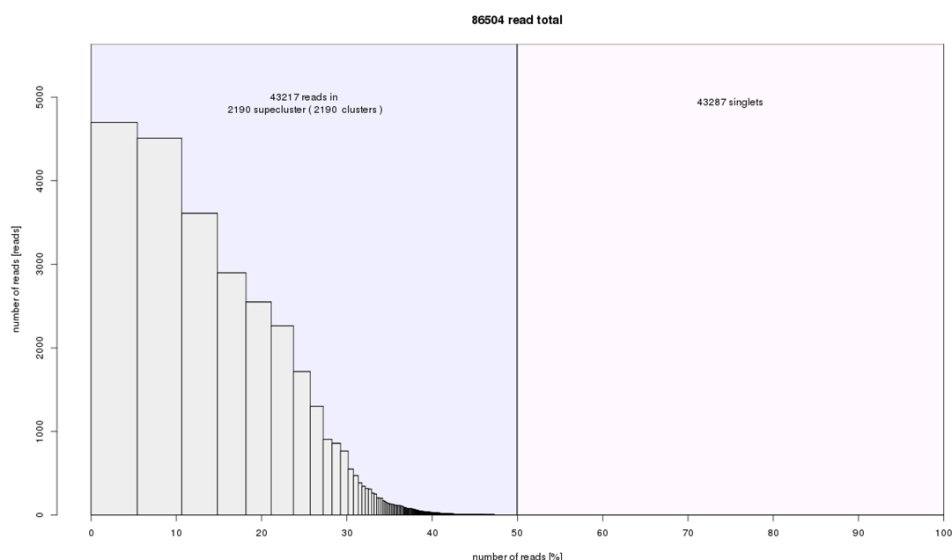






Figura 5. Histograma com os *clusters* repetitivos encontrados pelo *RepeatExplorer* no genoma de macho de *P. boiei*.

Para a pesquisa de satDNAs, foi utilizada uma análise detalhada dos agrupamentos que representam elementos repetitivos no *output* do *RepeatExplorer* para ambos os sexos. As análises da fêmea produziram 110 *clusters*, apresentando abundância no genoma variando de 0,028% a 7%, totalizando 41 % do genoma total. Através da análise de gráficos de pontos, foi confirmada a organização em tandem de 30 satDNAs. Estes foram agrupados em famílias de satDNA, de acordo com o decréscimo da abundância mostrada no *RepeatExplorer*. No macho, foram produzidos 144 *clusters*, com abundância entre 0,023% a 5,4%, também correspondendo a aproximadamente 41% do genoma total. Com as análises de gráficos, foi confirmada a presença de 23 satDNAs.

4.2. Escolha de satDNAs para serem analisados

Foram escolhidos dois satDNAs da fêmea de *P. boiei* e dois do macho para serem estudados neste trabalho, sendo eles nomeados como: PboSat40-165, PboSat51-39, PboSat57-97 e PboSat58-155 (Tabela 1).

Tabela 1. Características gerais dos DNAs satélites selecionados para estudo.

SATÉLITE	CLUSTER	TAMANHO	ABUNDÂNCIA	GRÁFICO REPEAT EXPLORER
PboSat51-39 (PBF MC 23)	Cluster 71 (Genoma fêmea)	39 pb	0,042%	
PboSat40-165 (PBF MC 12)	Cluster 22 (Genoma fêmea)	165 pb	0,140%	
PboSat57-97 (PBM 2)	Cluster 2 (Genoma macho)	97 pb	5,2%	
PboSat58-155 (PBM3)	Cluster 3 (Genoma macho)	155 pb	4,2%	

4.3. Amplificação das sequências por PCR

A confiabilidade de cada *primer* foi verificada a partir de Reação em Cadeia da Polimerase utilizando DNA genômico dos próprios indivíduos dos quais foram obtidos os genomas sequenciados. Para tal reação levou-se em conta a composição de cada *primer* quanto às suas proporções de pares de bases, a fim de encontrar uma temperatura de anelamento ideal para cada uma destas sequências durante a reação (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência consenso, proporção de bases A+T, primers e FISH dos satélites estudados.

SATÉLITE	CONSENSO	A+T	PRIMERS	FISH
PboSat51-39 (PBF MC 23)	CAGTGTCCATATATAC AGGATAAGAGAAGTG GTA CTGTG	58,9%	F: TATACAGGATAAG AGAAGTGGT R: TATGGACACTG CACAGTACC Temp.:54°C	Não clusterizado.
PboSat40-165 (PBF MC 12)	TGGCAGTACCCGGGAAGGCGTG TACCCATGGGCGATTAAGTGTCG GCTGCCGCCTTTAAGAGCCAGAG GACGAATCGGCCGCCCGCAGT CAGTCTACGCAGGGGCATGCAT TACCTCTCAGATGTCGGCATAGG AGCGCGATGGACACCGGGGGG AAGTC	37,6 %	F: GGGGGAAGTCTG GCAGTAC R: CGGTGTCCATCG CGCTCTCT Temp.:66°C	Exclusivo do par 5.
PboSat57-97 (PBM 2)	CACAAGTGATTTTTACTCGCAAA CCTGAAGAGTGCAACTCCTCCGA CTTGGTGTGGTAAAGGGTCATGG AAACAAGCCCTGGCAGCATTGAGT TTTC	53,6 %	F: CAAGCCTGGCAG CATTGAGT R: TTTCCATGACCCT TTACCAC Temp. 56°C	Região Centromérica. Em todos os cromossomos de macho e fêmea.
PboSat58-155 (PBM3)	GTTTCAGCACCTTCTGAAAAAAG TGATTTTCAGCCACAACCTGGATGC TCTTCTTCGCTTCCATAGGAATG AATGGGGAGGCAAGTGAGTGGAT TTTTCTCCCAAACCTGAAGAGTGG TGGCAAACCTCTCCGACTTGG TGTGGCTAAAGGGTC	53,6 %	F: CAAGCCTGGCAGC ATTGAGT R: TTTCCATGACCCT TACCAC Temp.: 57°C	Não amplificou.

4.4. Localização cromossômica dos satDNAs

Os satélites PboSat40-165, PboSat51-39, PboSat57-97 amplificaram e mostraram padrões característicos de DNAs satélites, com bandas monoméricas evidentes e padrões de escada. Já o PboSat58-155 não obteve amplificação satisfatória a ponto de prosseguir para marcação de sonda para FISH e ficou estacionado nas análises *in silico*.

O satélite PboSat57-97 teve sinais de hibridação na região centromérica e pericentromérica de todos os cromossomos de *P. boiei* e em ambos os sexos (Figura 6). Além disso, no cromossomo sexual W os sinais estão por toda a extensão da heterocromatina constitutiva, como observado previamente por Silva (2019). O satélite PboSat40-165 mostrou sinais positivos de hibridação na região distal dos braços curtos adjacente à região telomérica dos dois homólogos de um único par cromossômico, correspondendo ao par 5 (Figura 7). O PboSat51-39, foi

amplificado no genoma de *P. boiei*, porém na FISH mostrou um padrão não-*clusterizado*, com ausência de sinais de hibridação nos cromossomos.

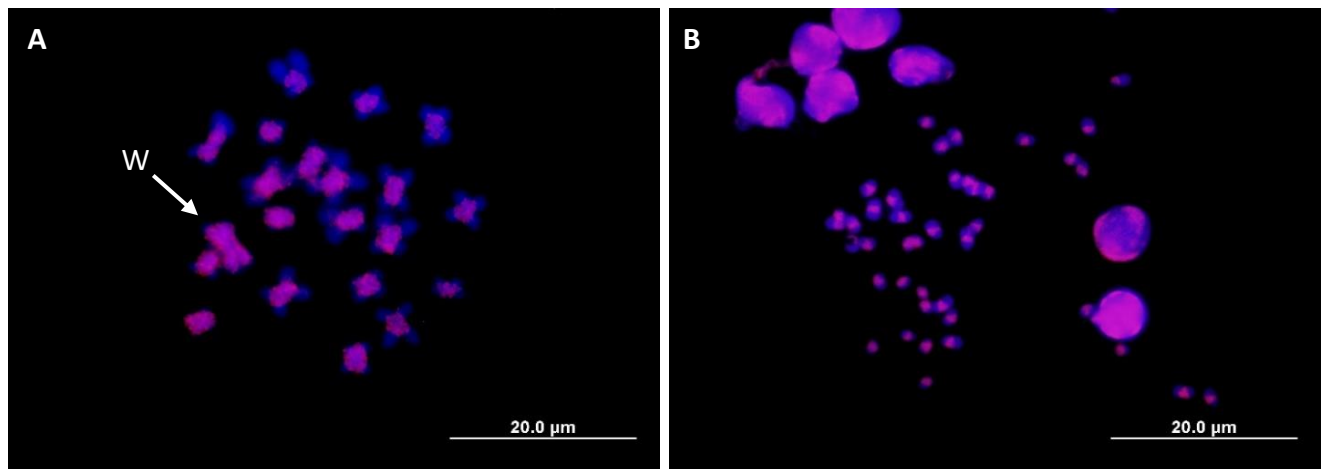


Figura 6. PboSat57-97 mapeado nos cromossomos de *P. boiei*. Sobreposição (DAPI + marcação). Em A: fêmea, seta evidenciando o cromossomo sexual W; B: macho.

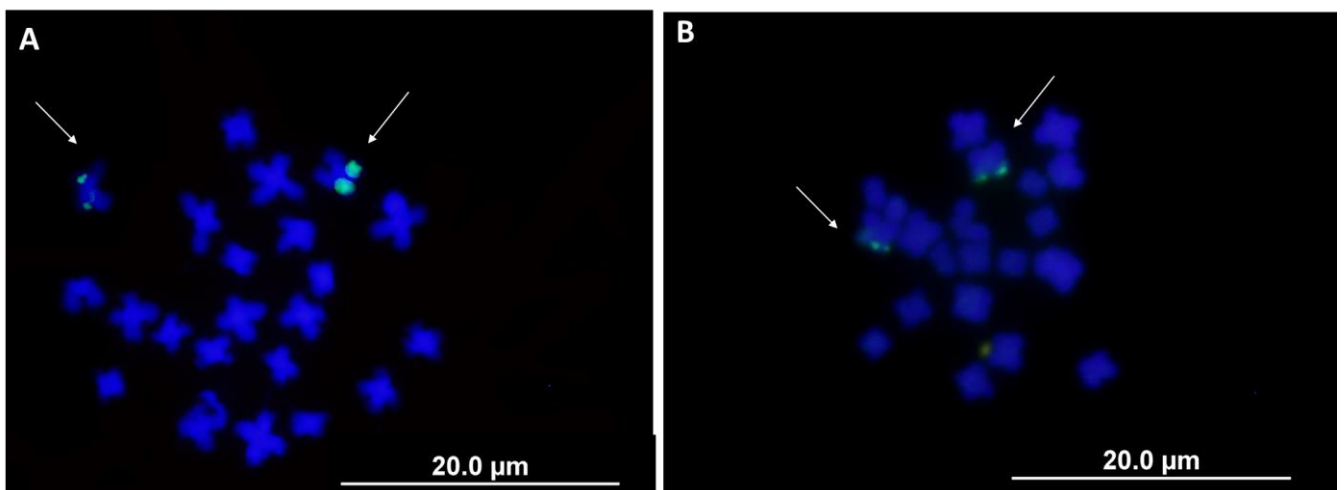


Figura 7. PboSat40-165 mapeado nos cromossomos de *P. boiei*. Sobreposição (DAPI + marcação). Em A: fêmea; B: macho. Setas evidenciando o PboSat40-165.

4.5. Similaridades com outras sequências de DNAs repetitivos

Foram feitas buscas por similaridades para os satélites PboSat40-165 e PboSat57-97, nos bancos de dados *GenBank* e *Repbase* e não foram encontradas sequências similares aos *contigs* encontrados para estes satDNAs pelo programa *Repeat Explorer*. Contudo foram feitos alinhamentos com as sequências encontradas por Silva (2019), que estão no processo de depósito no *GenBank*, e assim, o resultado mostrou que o PboSat57-97 possui 71.7% de similaridade com o PboSat2-173, 35.4% com o PboSat1-176 e 21.3% com o PboSat3-189 (Figura 8).

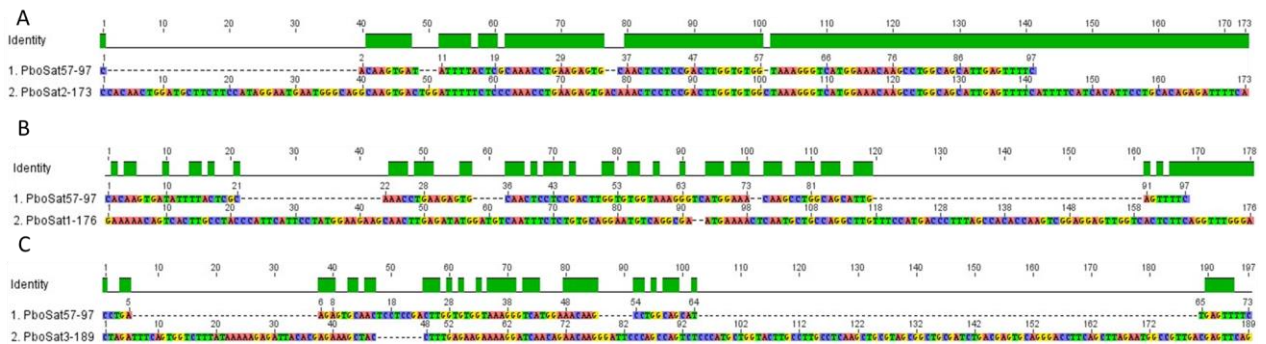


Figura 8. Alinhamentos com as seqüências encontradas em *P. boiei* por Silva (2019). A: PboSat57-97 e PboSat2-173 (similaridade de 71.7%); B: PboSat57-97 e PboSat1-176 (similaridade de 35.4%) e C: PboSat57-97 e PboSat3-189 (similaridade de 21.3%).

5. DISCUSSÃO

Os métodos usados no isolamento de seqüências repetitivas vêm sendo aprimorados cada vez mais com análises de alto rendimento de sequenciamento genômico, em conjunto com programas de bioinformática específicos, como o *RepeatExplorer* (NOVÁK *et al.*, 2010). Essa metodologia inovadora possibilita análises refinadas acerca de seqüências repetitivas, tais como satDNAs, uma vez que através das leituras dos dados gerados conseguem filtrar e juntar as seqüências que se repetem e ainda estimar a porcentagem destas nos genomas das espécies (NOVÁK *et al.*, 2010; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016; GARRIDO-RAMOS, 2017).

A quantidade de satDNAs pode variar significativamente entre as espécies, as vezes excedendo 50% de seu genoma total (ELDER & TURNER, 1995; SCHMIDT & HESPLOP-HARRISON, 1998). Para espécies de anuros, informações sobre a organização genômica associada a aspectos cromossômicos ainda são pouco conhecidas, assim estudos que envolvem a caracterização com abordagem citogenômica e a busca por compreensão acerca das diferentes classes de DNA, são questões importantes uma vez que podem ajudar em trabalhos futuros com diferentes enfoques (SILVA, 2019).

Silva (2019) sequenciou e analisou o genoma de uma fêmea de *P. boiei* de Tijuca do Sul – RJ (população sem heteromorfismo sexual) e por meio de ferramentas de bioinformática encontrou que 41% do genoma são de elementos repetitivos. Essa grande quantidade de seqüências repetitivas levou o autor a

considerar a espécie um bom modelo para estudo desse tipo especial de sequência. No trabalho, foi visto que do total de sequências repetitivas, 15% corresponde a 28 possíveis satDNAs (SILVA, 2019) e esses dados levantaram questões sobre as possíveis diferenças e similaridades genômicas desta com a população que apresenta heteromorfismo sexual, estudadas neste trabalho de conclusão de curso.

No presente trabalho encontramos para as fêmeas com presença de heteromorfismo sexual um total de 30 possíveis satDNAs, que correspondem a aproximadamente 29,2% do genoma total, sendo essa porcentagem realmente alta em comparação ao encontrado para a população com cromossomo sexual ausente. Assim corroborando com as diferenças de quantidade de heterocromatina vistas em análises citogenéticas por Bandamento C (ANANIAS *et al.*, 2007; AMARO *et al.*, 2012; SILVA, 2019).

Os sinais de hibridação observados para o satélite PboSat57-97 na região centromérica e pericentromérica de todos os cromossomos de *P. boiei* da população de Mogi das Cruzes - SP, coincidiram com a região heterocromática revelada por Bandamento C anteriormente descrita por Ananias e colaboradores (2007), Amaro e colaboradores (2012) e Silva (2019), destacando a abundância de sequências de satDNAs nessas regiões cromossômicas, que podem estar desempenhando funções cruciais para a manutenção, organização e estrutura de genomas. A abundância genômica de 5.2% gerada pelo *RepeatExplorer*, para o satélite PboSat57-97 mostra que esta é a sequência de satDNA com mais repetições encontradas para *P. boiei*.

Essa localização da sequência PboSat57-97 em todos os centrômeros está de acordo com o que foi sugerido por Plohl e colaboradores (2014) e Garrido-Ramos (2017) de que os monômeros de satDNA formam arranjos homogêneos, geralmente enriquecidos em regiões de heterocromatina constitutiva, como centrômeros e telômeros, e foram hipoteticamente relacionados à manutenção da função centromérica (PLOHL *et al.*, 2014). Da mesma forma, Silva (2019) mapeou para *P. boiei* três DNAs satélites (PboSat01-176, PboSat02-173 e PboSat03-189) que tiveram localização cromossômica semelhante com o PboSat57-97, todos centroméricos. A partir disso, foram feitos alinhamentos em busca de similaridade com o satélite PboSat57-97. Como o alinhamento resultou em 71.7% de similaridade

entre PboSat2-173 e PboSat57-97, e de acordo com parâmetros estabelecidos por Ruiz-Ruano e colaboradores (2016) pode-se considerar que esses dois satélites fazem parte de uma mesma superfamília.

Uma teoria que discute a especificidade de satDNAs entre os genomas das espécies é a hipótese da biblioteca de satDNAs, uma vez que explica a ocorrência de sequências com similaridade espécie-específica alta, como resultado de ampliações/ deleções dentro de um conjunto de sequências compartilhadas entre genomas próximos (MESTROVIC *et al.*, 1998; MESTROVIC *et al.*, 2006; FRY *et al.*, 1977). Pela dinâmica desses elementos genômicos, DNAs satélites sofrem mudanças rápidas, tanto em tamanho quanto na composição de suas matrizes (PLHOL *et al.*, 2012). Assim, por meio de mecanismos moleculares, surgem famílias de satDNAs, que implicam tanto no aumento do número de cópias por amplificação quanto na dispersão dessas sequências por diversos *locus* (PLOHL *et al.*, 2012).

Essa biblioteca pode persistir por um longo período evolutivo se houver redução desses mecanismos moleculares de trocas não-recíprocas (MESTROVIC *et al.*, 2006). Contudo, os satDNAs podem ser diferentemente amplificados em cada espécie, com uma subsequente realocação desse por outro em diferentes espécies. Esse modelo evolutivo pode explicar as diferentes ampliações em variantes monoméricas ou subfamílias de DNA satélite (GARRIDOS-RAMOS, 2015).

SatDNAs também são comuns nas regiões teloméricas, podendo estar adjacentes a estes (subteloméricas) ou associados aos telômeros propriamente ditos, ambas variam quanto ao tamanho de seus monômeros e número de cópias (ENDERSON, 1995; LOUIS & VERSHININ, 2005; LÓPEZ-FLORES, I. & GARRIDO-RAMOS, M. A, 2012), sendo sequências muito dinâmicas (TORRES *et al.*, 2011; RICHARD *et al.*, 2013), assim reorganizações e trocas de sequência entre extremidades cromossômicas não-homólogas, podem resultar na formação e ampliação de novas famílias de satDNAs ou na diversificação dessas existentes (MACAS *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2011)

O satélite PboSat40-165 aqui estudado, está localizado no braço curto, na porção subtelomérica apenas do par 5, tanto de machos, quanto em fêmeas de *P. boiei*, sendo então cromossomo-específico. Essas sequências podem não ter um

papel essencial para com as funções teloméricas, mas podem facilitar o pareamento na meiose ou agir como proteção contra a dinâmica do processo de amplificação e deleção telomérica (HENDERSON, 1995; LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012).

Ambos os satélites mapeados nos cromossomos de *P. boiei*, tanto nas preparações de machos quanto nas de fêmeas no presente trabalho, foram localizados em regiões heterocromáticas centroméricas, pericentroméricas e subteloiméricas como esperado para satDNAs conforme descrito por alguns autores (VITTORAZZI, 2011, 2014; GARRIDO-RAMOS, 2017).

Os dados obtidos no presente trabalho são importantes do ponto de vista citogenético e genômico e abrem caminho para estudos mais aprofundados sobre o conteúdo de sequências repetitivas do grupo estudado, contribuindo assim para a melhor compreensão sobre a organização genômica e distribuição de DNAs satélites em anuros.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos neste trabalho de conclusão de curso, ficou claro que o sequenciamento de nova geração (NGS) em conjunto com ferramentas de bioinformática possibilita análises refinadas acerca de determinadas sequências que compõem os genomas eucarióticos, permitindo assim discussões sobre como estas podem estar distribuídas, tanto em número de cópias quanto em relação as suas localizações cromossômicas. Assim, com o uso destas ferramentas, o presente trabalho contribui com resultados prévios acerca da organização genômica de *P. boiei*, uma vez que identifica e localiza dois satDNAs com características interessantes, dados estes que contribuem para a construção do satelitoma completo da espécie.

REFERÊNCIAS

- AMARO, R. C.; CARNAVAL, A. C. Q.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Demographic process in montane Atlantic rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, p. 880–888, 2012.
- AMARO, R. C.; PAVAN, D.; RODRIGUES, M. T. On the generic identity of *Odontophrynus moratoi* Jim & Caramaschi, 1980 (Anura, Cycloramphidae). **Zootaxa**, v. 2071, p. 61-68, 2009.
- AMARO-GHILARDI, R. C.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Polymorphism of C-bands heterochromatin and of the nucleolar organizer regions (NORs) in the leptodactylid frog *Proceratophrys boiei* (Amphibia, Anura). **Chromosome Research**, v. 10, p. 24, 2002.
- ANANIAS, F.; MODESTO, A. D. S.; MENDES, S. C.; NAPOLI, M. F. Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphism. **Hereditas**, v. 144, p. 206-212, 2007.
- BACHTROG, D. Sex chromosome evolution: molecular aspects of Y-chromosome degeneration in *Drosophila*. **Genome Research**, v.15(10), p.1393-1401, 2005.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. GENETICS. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, p. 521-524, 2006.
- BALDISSERA, F. A. JR.; OLIVEIRA, P. S. L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 335–345, 1993.
- BRANDÃO, R. A.; VAZ-SILVA, W.; CARAMASCHI, U.; FRANÇOSO, R. D. New distribution records of *Proceratophrys vielliardi* Martins & Giaretta 2011 (Amphibia, Anura, Cycloramphidae). **Herpetology Notes**, v. 5, p. 223–225, 2012.
- BULL, J.J. Evolution of Sex determining mechanisms. **Benjamin/Cummings Publishing Company**, Menlo Park, Calif, USA, 1983.
- CAMACHO, J. P. M.; RUIZ-RUANO, F. J.; MARTÍN-BLÁZQUEZ, R.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO J.; LORITE P.; et al. A step to the gigantic genome of the desert locust: chromosome sizes and repeated DNAs. **Chromosoma**, v. 124, p. 263–275, 2015.
- CARNAVAL, A.C.O.Q. Phylogeography of four frog species in forest fragments of Northeastern Brazil - A preliminar study. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 913–921, 2002.
- CHARLESWORTH, B; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215–220, 1994.

CIOFFI, M. B.; KEJNOVSKY, E.; BERTOLLO, L. A. C. The Chromosomal Distribution of Microsatellite Repeats in the Genome of the Wolf Fish *Hoplias malabaricus*, Focusing on the Sex Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, p. 289–296, 2010.

CREPALDI, C. **Estudo da origem e evolução dos cromossomos sexuais do gênero *Megaleporinus* a partir de sequências repetitivas**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2019.

CRUZ, C. A. G.; NUNES, I.; JUNCÁ, F. Redescription of *Proceratophrys cristiceps* (Müller, 1883) (Amphibia, Anura, Odontophrynidae), with description of two new species without eyelid appendages from Northeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 7, p. 110–122, 2012.

CUADRADO, A.; JOUVE, N. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and Cbanding in 6x-tritricale. **Chromosome Research**, v. 2, p. 331–338, 1994.

DIAS, P. H.; DOS, S.; AMARO, R. C.; DE CARVALHO-E-SILVA, A. M. P. T.; RODRIGUES, M. T. Two new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura; Odontophrynidae) from the Atlantic forest, with taxonomic remarks on the genus. **Zootaxa**, v. 3682, p. 277–304, 2013.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792–1797, 2004.

ELDER, J.F.; TURNER, B.J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. **The Quarterly Review of Biology**, v.70, p. 297–320, 1995.

EZAZ, T. & DRAKIN, J.E. Repetitive sequence and sex chromosome evolution in vertebrates. **Advances in Evolutionary Biology**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6 (9 January 2013). **American Museum of Natural History**, New York, USA, 2017. Electronic Database. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Acesso em: 23 setembro, 2019.

FRY, K.; SALSER, W. Nucleotide sequences of HS- alpha satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell**, v.12, p. 1069– 1084, 1977.

GARCÍA, G.; RÍOS, N.; GUTIÉRREZ, V. Next-generation sequencing detects repetitive elements expansion in giant genomes of annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). **Genetica**, v. 143, p. 353–360, 2015.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in Plants: More than Just Rubbish. **Cytogenetic Genome Research**, v. 146, p. 153–170, 2015.

GARRIDO-RAMOS. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, (8)9, 2017.

GATTO, K. P.; MATTOS, J. V.; SEGER, K. R.; LOURENÇO, L. B. Sex Chromosome Differentiation in the Frog Genus *Pseudis* Involves Satellite DNA and Chromosome Rearrangements. **Frontiers in Genetics**, 9:301, 2018 doi: 10.3389/fgene.2018.00301. eCollection 2018.

GAZONI, T. et al. More sex than autosomes in the Amazonian frog *Leptodactylus pentadactylus*. **Chromosoma**, v. 127, n. 2, p. 269-278, 2018.

GIARETTA, A. A.; BERNARDE, P. S.; KOKUBUM, M. N. D. A new species of *Proceratophrys* (Anura: Leptodactylidae) from the Amazon Rain Forest. **Journal of Herpetology**, v. 34, p. 173–178, 2000.

GODINHO, L. B.; MOURA, M. R. D.; DE LACERDA, J. V. A.; FEIO, R. N. A new species of *Proceratophrys* (Anura: Odontophrynidae) from the middle São Francisco River, southeastern Brazil. **Salamandra**, v. 49, p. 63–73, 2013.

HAN, J. S.; BOEKE, J. D. LINE-1 retrotransposons: Modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? **BioEssays**, v. 27(8), p. 775–784, 2005.

HENDERSON, E. Telomere DNA structure, in Blackburn EH, Greider CW (eds): *Telomeres*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 11–34, 1995

IZECKSOHN, E.; CRUZ, C. A. G.; PEIXOTO, O. Sobre *Proceratophrys appendiculata* algumas espécies afins (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). **Revista da Universidade Rural, Serie Ciência da Vida**, v. 20, p. 37–54, 1999.

JUNIER, T. & PAGNI, M. Dotlet: diagonal plots in a web browser. **Bioinformatics**, v. 16, p. 178–9, 2000.

JURKA, J.; KAPITONOV, V.; PAVLICEK, A.; KLONOWSKI, P.; KOHANY, O.; WALICHIEWICZ, J. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and Genome Research**, v.110, p. 462–467, 2005.

KING, M. Amphibia. IN: JOHN, B. **Animal Cytogenetics. Amphibia, 4. Chordata** 2. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1990.

KURAMOTO, M. A list of chromosome numbers of anurans amphibians. **Bulletin of Fukuoka University of Education**, v. 39, p 83-127, 1990.

KWET, A.; FAIVOVICH, J. *Proceratophrys bigibbosa* species group (Anura: Leptodactylidae), with description of a new species. **Copeia**, v. 2001 n.1, p. 203–215, 2001.

LIU, Z.; LI, P.; KOCABAS, A.; KARSI, A.; JU, Z. Microsatellite-Containing Genes from the Channel Catfish Brain: Evidence of Trinucleotide Repeat Expansion in the Coding Region of Nucleotide Excision Repair Gene *RAD23B*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289(2), p. 317–324, 2001.

LÓPEZ-FLORES, I. & GARRIDO-RAMOS, M. A. “The repetitive DNA content of eukaryotic genomes,” in *Repetitive DNA*, ed. M. A. Garrido-Ramos, Basel: **Karger Publishers**, v.7, p. 1–28, 2012.

LOUIS, E.J.; VERSHININ, A.V. Chromosome ends: different sequences may provide conserved functions. **BioEssays**, v. 27, p.685–697, 2005.

LYON, MF. LINE-1 elements and X chromosome inactivation: A function for “junk” DNA? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p.6248–9, 2000.

MACAS, J; NAVRÁTILOVÁ, A; KOBLÍŽKOVÁ, A. Sequence homogenization and chromosomal localization of VicTR-B satellites differ between closely related *Vicia* species. **Chromosoma**, v. 115, p. 437–447, 2006.

MACAS, J.; KEJNOVSKÝ, E.; NEUMANN, P.; NOVÁK, P.; KOBLÍŽKOVÁ, A. & VYSKOT, B. Next generation sequencing-based analysis of repetitive DNA in the model dioecious plant *Silene latifolia*. **PLoS ONE**, v.6, e27335, 2011. doi: 10.1371/annotation/4ccaacb2-92d7-445a-87da-313cedf18feb.

MÂNGIA, S.; KOROIVA, R.; NUNES, P. M. S.; ROBERTO, I. J.; ÁVILA, R. W.; SANT’ANNA, A. C.; SANTANA, D. J.; GARDA, A. A. A new species of *Proceratophrys* (Amphibia: Anura: Odontophrynidae) from the Araripe Plateau, Ceará State, northeastern Brazil. **Herpetologica**, v. 74, p. 255–268, 2018.

MÂNGIA, S.; SANTANA, D. J.; CRUZ, C. A. G.; FEIO, R. N. Taxonomic review of *Proceratophrys melanopogon* (Miranda Ribeiro, 1926) with description of four new species (Amphibia, Anura, Odontophrynidae). **Boletim do Museu Nacional. Nova Serie, Zoologia. Rio de Janeiro**, v. 531, p. 1–33, 2014.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G. (Eds.). *Fish Cytogenetics*. Enfield, **New Hampshire: Science Publisher**, p. 421-453, 2007.

MARTINS, L. B. & GIARETTA, A. A. A new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) from central Brazil. **Zootaxa**, v. 2880, p. 41–50, 2011.

MARTINS, L. B.; GIARETTA, A. A. Morphological and acoustic characterization of *Proceratophrys goyana* (Lissamphibia: Anura: Odontophrynidae), with the description of a sympatric and related new species. **Zootaxa**, v. 3750, p. 301–320, 2013.

MESTROVIC, N.; CASTAGNONE-SERENO P.; PLOHL, M. Interplay of selective pressure and stochastic events directs evolution of the MEL172 satellite DNA library in root- knot nematodes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, p. 2316–2325, 2006

MESTROVIC, N.; PLOHL, M.; MRAVINIC, B.; UGARKOVIC, D. Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus* – experimental evidence for the ‘library’ hypothesis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p.1062– 1068, 1998.

NAPOLI, M. F.; CRUZ, C. A. G.; ABREU, R. O.; DEL-GRANDE, M. L. A new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) from the Chapada Diamantina, State of Bahia, northeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 3133, p. 37–49, 2011.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 78, 2010.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; PECH, J.; et al. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 1, p.1-2, 2013.

OHNO, S. **Sex chromosomes and sex-linked genes**. New York: Springer-Verlag., 1967.

OLIVEIRA, S. G; CABRAL-DE-MELLO, D. C; MOURA, R. C; MARTINS, C. Chromosomal organization and evolutionary history of Mariner transposable elements in *Scarabaeinae coleopterans*. **Molecular cytogenetics**, v. 6, p. 54, 2013.

PAGÁN, H. J. T.; MACAS, J.; NOVÁK, P.; MCCULLOCH, E. S.; STEVENS, R. D.; RAY D. A. Survey sequencing reveals elevated DNA transposon activity, novel elements, and variation in repetitive landscapes among vesper bats. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, p. 575–585, 2012.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; DIAS, G. B.; DE LIMA, L. G.; KUHN, G. C. S.; RAMOS, É.; MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*. **Scientific Reports**, 7(1):6422. doi: 10.1038/s41598-017-06822-8.

PARISE-MALTEMPI, P. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 116, p. 218-223, 2007.

PEASTON, A. E.; EVSIKOV, A. V.; GRABER, J. H.; DE VRIES, W. N.; HOLBROOK A. E.; SOLTER, D.; KNOWLES, B. B. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. **Developmental Cell**, v. 7(4), p. 597–606, 2004.

PINKEL D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1986.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. “Satellite DNA evolution,” in *Repetitive DNA*, ed. M. A. Garrido-Ramos. Basel: **Karger Publishers**, v.7, p.126–152, 2012.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Centromere identity from the DNA point of view. **Chromosoma**, v. 123, p. 313–325, 2014.

PRADO, G. M.; POMBAL, J.P. Espécies de *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 com apêndices palpebrais (Anura; Cycloramphidae). **Arquivos de Zoologia**, v. 39 p. 1-85, 2008.

PYRON, R. A. Biogeographic analysis reveals ancient continental vicariance and recent oceanic dispersal in amphibians. **Systematic Biology**, v. 63, p. 779–797, 2014

PYRON, R. A.; WIENS, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 61, p. 543-583, 2011.

RICHARD, M.M.S.; CHEN, N.W.G.; THAREAU, V.; PFLIEGER, E.; BLANCHET, S.; PEDROSA-HARAND, A.; IWATA, A.; CHAVARRO, C.; JACKSON, S.A.; GEFFROY, V. The subtelomeric khipu satellite repeat from *Phaseolus vulgaris*: lessons learned from the genome analysis of the Andean genotype G19833. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 109, 2013.

RUIZ-RUANO F. J. *et al.* High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, 6, 28333; 2016.
doi: [10.1038/srep28333](https://doi.org/10.1038/srep28333)

RUIZ-RUANO, F. J.; CASTILLO-MARTÍNEZ, J.; CABRERO, J.; GÓMEZ, R.; CAMACHO, J. P. M.; LÓPEZ-LEÓN, M. D. High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats. **Chromosoma**, 127(3):323-340, 2018
doi: 10.1007/s00412-018-0666-9.

SCHARTL, M.; SCHMID, M.; NANDA, I. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: From equal size to giants and dwarfs. **Chromosoma**, v. 125, p. 553–571, 2016.

SCHMID, M.; FEICHTINGER, W.; STEINLEIN, C.; VISBAL-GARCÍA, R.; FERNÁNDEZ-BADILLO, A. Chromosome banding in Amphibia. XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and a derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 101, p. 62–73, 2003.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; BOGART, J. P.; FEICHTINGER, W.; LEÓN, P.; LA MARCA, E.; DIAZ, L. M.; SANZ, A.; CHEN, S-H.; HEDGES, S. B. The chromosomes of Terraranan frogs: insights into vertebrate cytogenetics. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 130-131(1-8), p.1–568, 2010.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; BOGART, J. P.; FEICHTINGER, W.; HAAF, T.; NANDA, I.; DEL PINO, E. M.; DUELLMAN, W. E.; HEDGES, S. B. The Hemiphractid Frogs: phylogeny, embryology, life history, and cytogenetics. **Karger Publishers**, 2012

SILVA, M.J. **Estudo da organização estrutural de elementos repetitivos isolados do genoma de espécies de *Proceratophrys* (Amphibia, Anura, Odontophrynidae)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2019.

STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1-4, p. 134–143, 2005.

TAMURA, K. et al. MEGA: molecular evolutionary genetics using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731–2739, 2011.

TEIXEIRA, M.; AMARO, R. C.; RECODER, R. S.; DAL VECHIO, F.; RODRIGUES, M. T. A new dwarf species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura, Cycloramphidae) from highlands of Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3551, p. 25–42, 2012.

TORRES, G.A.; GONG, Z.; IOVENE, M.; HIRSCH, C.D.; BUELL, C.R.; BRYAN, G.J.; NOVÁK, P.; MACAS, J.; JIANG, J. Organization and evolution of subtelomeric satellite repeats in the potato genome. **G3 (Bethesda)**, v.1, p. 85–92, 2011.

UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F. J.; SILVA, D. M. Z. A.; SERRANO, É. A.; ROSA, I. F.; SCUDELER, P. E. S.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J. P. M.; FORESTI, F. A Glimpse into the Satellite DNA Library in Characidae Fish (Teleostei, Characiformes). **Frontiers In Genetics**, v. 8, p. 103, 2017.

VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; DEL-GRANDE, M. L.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, p. 101–107, 2011.

VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hylodid frogs. **BMC Genetics**, v.15, p.111, 2014.

VOLFF, J. N. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. **BioEssays**, v. 28(9), p. 913–922, 2006.