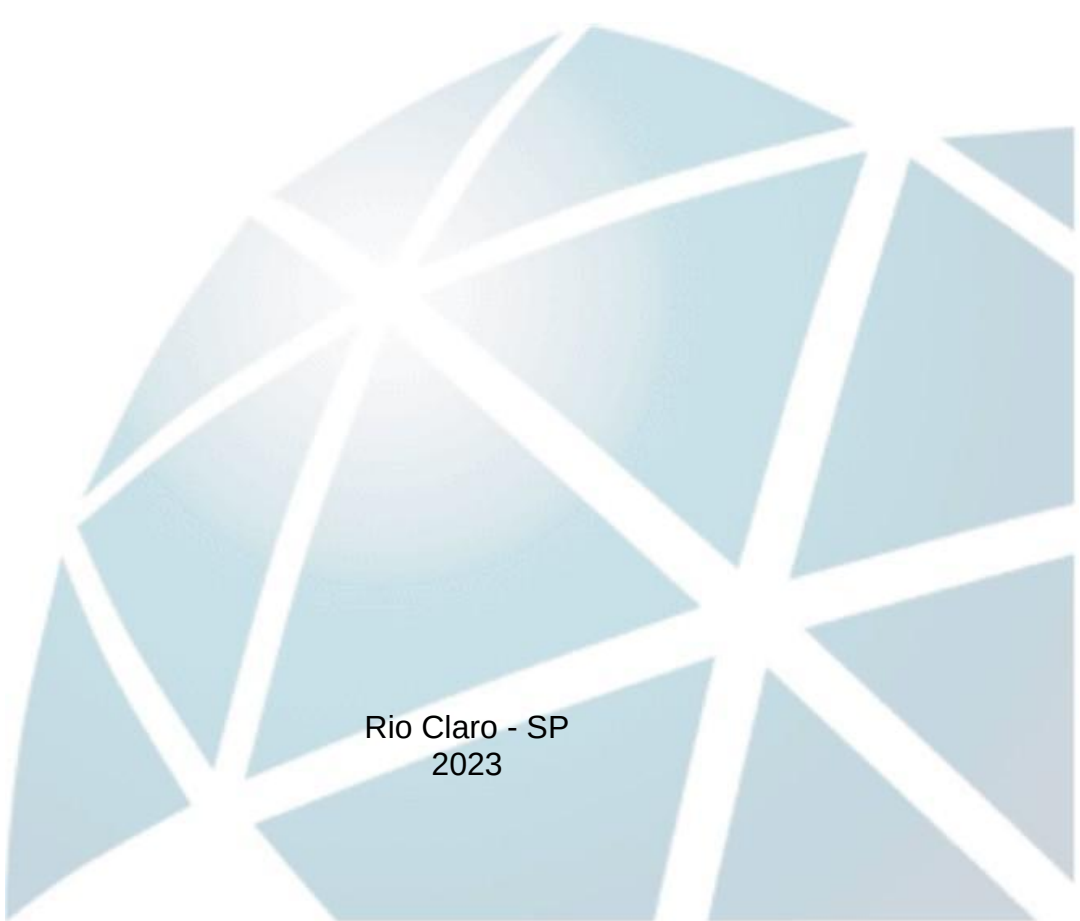

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS INTEGRAL

MURILO DURIGON SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA
SATÉLITE EM *Thoropa miliaris* (AMPHIBIA,
ANURA): UMA ABORDAGEM CITOGENÔMICA**



Rio Claro - SP
2023

MURILO DURIGON SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA SATÉLITE EM
Thoropa miliaris (AMPHIBIA, ANURA): UMA ABORDAGEM
CITOGENÔMICA**

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Patricia P. Parise-Maltempi

Coorientador: Marcelo João da Silva

Rio Claro - SP
2023

S237c	Santos, Murilo Durigon Caracterização do conteúdo de DNA satélite em <i>Thoropa miliaris</i> (Amphibia, Anura) : uma abordagem citogenômica / Murilo Durigon Santos. -- Rio Claro, 2023 45 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientadora: Patricia Pasquali Parise-Maltempi Coorientador: Marcelo João da Silva 1. Citogenética animal. 2. Bioinformática. 3. Evolução. 4. Anfíbios. 5. Anuros. 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.

MURILO DURIGON SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA SATÉLITE EM
Thoropa miliaris (AMPHIBIA, ANURA): UMA ABORDAGEM
CITOGENÔMICA**

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

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Patricia P. Parise-Maltempì

M.e. Marcelo João da Silva

Dra. Ariadne Fares Sabbag

Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi

Aprovado em: 08 de novembro de 2023

Assinatura do discente

Assinatura da orientadora

Assinatura do coorientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dra. Patricia Pasquali Parise-Maltempi, não apenas pela orientação neste trabalho, mas também por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa em junho de 2017 – no final do primeiro semestre de meu primeiro ano de graduação. Desde então, foram muitas pesquisas, monitorias e projetos em que atuamos juntos. Obrigado por ter me dado a chance de iniciar minha trajetória científica no Laboratório de Citogenética e Citogenômica Animal da UNESP e por ser uma boa “mãe científica”, como ela frequentemente se denomina.

Também agradeço imensamente aos meus coorientadores e grandes amigos Marcelo João da Silva, Carolina Crepaldi e Luiza Rieder Cholak, que acompanharam todo meu percurso durante a graduação. Obrigado por todo apoio, almoços, risadas, fofocas, cafés e companheirismo. Posso dizer com toda certeza que este trabalho (e muitos outros que realizei) não teria saído sem a ajuda de vocês. Não tenho palavras para expressar o quanto vocês são importantes para mim e gostaria que soubessem que cada um tem um espaço reservado no meu coração.

Não poderia deixar de agradecer a todos os amigos e colegas que passaram pelo Laboratório de Citogenética e Citogenômica Animal. Em especial, agradeço à Raquel Fogarin Destro pela grande amizade que temos e por todo auxílio que me forneceu nestes anos que trabalhamos juntos. Agradeço à Évelin Mariani Gonçalves, cuja energia contagiante e palhaçadas/atrapalhadas sempre alegraram meu dia, proporcionando ótimas risadas (muito obrigado, amiga). Ao Thiago Gazoni, agradeço por me passar sua vasta experiência na citogenética, por ter me ajudado a escrever um de meus primeiros projetos de pesquisa – pelo qual fui contemplado com bolsa FAPESP – e por sua amizade genuína.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello, que permitiu meu acesso ao servidor de seu grupo de pesquisa, possibilitando que muitas das análises apresentadas no presente trabalho fossem feitas. Também agradeço aos seus alunos, que sempre dividiram o laboratório, a rotina e, às vezes, até reagentes e protocolos comigo. Agradeço principalmente ao Diogo Milani, à Vanessa Bellini Bardella e à Ana Beatriz Stein Machado Ferretti, que me ajudaram com dicas de

laboratório, conselhos acadêmicos e discussões científicas. Também agradeço a todos os colegas e funcionários do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro.

Em relação aos amigos da graduação, agradeço imensamente à Alicia Gallo de Mitri, à Isabela Alavarces Reis, à Rafaela Reis Serafim e ao Roger Magrini da Silva – os componentes da República Kit 6. Vocês quatro estiveram comigo do começo ao fim. Só tenho a agradecer por todos os trabalhos – seja das disciplinas ou do Programa de Educação Tutorial (PET) Ciências Biológicas – que desenvolvemos juntos e por todos os cafés, cinemas, caronas, conselhos e fofocas. Obrigado por não me abandonarem jamais, por sempre estarem do meu lado e por terem se tornado minha família em Rio Claro.

Sem dúvida merecem minha gratidão todos os colegas da turma CBI017 (Ciências Biológicas Integral 2017). Em especial, gostaria de agradecer aos meus amigos Gabriel Bertoletti Barozzi, à Giovanna Segati Canizela, à Kemellyn Cristina Panchera, à Lívia Machado Lenci e à Maíra Coraci Bretas Minillo que me aguentaram desde o nosso primeiro ano de graduação e não desistiram de mim. Muito do meu desenvolvimento pessoal durante a graduação se deve a vocês cinco. Obrigado por todos os trabalhos que desenvolvemos juntos no PET e durante as disciplinas, pelas fofocas e risadas.

No campo familiar, não poderia deixar de agradecer à minha mãe, Sandra Aparecida Durigon, e ao meu pai, Roberto Teixeira Santos, por acreditarem em mim e nos meus sonhos e sempre incentivarem minha educação. À minha irmãzinha, Milena Durigon Santos, que, apesar de nossos desentendimentos, sempre está ao meu lado para o que der e vier. À minha irmã de coração, Pamela Cristina Cedro, que é minha fiel escudeira e que está sempre pronta para me defender ou para me contar alguma fofoca (risos). Ao meu avô, Arnaldo Durigon, e à minha tia, Silvia Regina Durigon, que, definitivamente, sempre me apoiaram em tudo. Aos meus tios, Isabel Durigon Magro e Argemiro Magro, e aos meus primos, Lucas Durigon Magro, Débora Durigon Magro Ferreira, Sophie Durigon Magro Ferreira e Josenil (Nyll) Ferreira Beserra, que sempre estiveram presentes na minha vida, me apoiando e torcendo por mim. Aos meus tios, Arnaldo de Oliveira e Elisabete Cristina Bertoluci de Oliveira,

cujas aulas sobre quem veio primeiro, o ovo ou a galinha, me ajudaram a ingressar pelo vestibular (risos). À minha tia, Maria Elisa Vieira Heibe, e minhas primas, Livia Vieira Heibe, Germania Vieira Heibe e Ceres (Tuca) Vieira Heibe, que, apesar da distância, sempre fizeram questão de estarem presentes na minha vida, me acompanhando e comemorando minhas conquistas. A todos vocês, muito obrigado por tudo. Não teria chegado onde cheguei sem cada um de vocês na minha vida.

Gostaria de fazer um agradecimento especial à minha avó, Iolanda Heibe Durigon, que foi uma das primeiras pessoas a acreditar em mim e me amar do jeito que sou. À minha avó de coração, Geni Lopes, que sempre me tratou como seu neto, fazendo questão de se fazer presente em todos os momentos importantes da minha vida. Ao meu tio, Ademir Heibe (Amendoim), que sempre fez de tudo para se fazer presente e me alegrar. Vocês não fazem ideia do quanto sinto a falta dos três. Queria eu que vocês ainda estivessem por aqui para prestigiar mais essa conquista.

Outro agradecimento essencial vai para meus alunos do projeto de extensão Universidade Aberta à Terceira Idade (UNATI). Como já mencionei inúmeras vezes, vocês dão sentido ao que fazemos na universidade. Não adiantaria nada frequentarmos as aulas ou desenvolvermos pesquisas se todo o conhecimento gerado ficar restrito à “bolha acadêmico”. Por isso, tentamos construir uma ponte com vocês, de modo que haja uma troca de saberes e que o conhecimento científico chegue para além dos muros da universidade. E, por todo carinho que sinto por vocês, deixarei registrado aqui o nome de cada um: Alice Gaiott Tamaoki, Ana Rosa Mari Pereira da Costa, Ana Thereza Giovaneti, Angela Regina Calderelli de Lima, Angelina Margarida Pizoli Grella, Antonio Gilberto Bordignon, Aparecida de Fátima Barbosa da Costa, Arioaldo Sant’Anna, Cisleide de Moraes Magalhães, Dalva Gatto, Damaris Bordignon, Leda Maria Antônio Pretoni, Lucilene Berbel, Luiz Alberto Gasbarro, Márcia Aparecida Herrera Roat, Maria Antônia de Medeiros, Marinês Alves Gasbarro, Moacir Antonio Cuvre, Neide Aparecida Silva Seneda, Olga Maria Giorgi Kleiner Bernardi, Raimunda Santiago da Silva, Roberto de Barros Jr., Ronald de Lima, Rosa Maria Mautone da Costa, Simone Benedita Chenta Padula, Vanice Mendonça Zadra, Vera Lúcia Souza de Santos, Ursulina Magalhães Battistuzzi, Zélia Maria do Prado Alves e Zoraide Cruz Thomé.

Não poderia deixar de agradecer também a Prof.^a Dra. Marcia Reami Pechula e a Prof.^a Dra. Eliris Cristina Rizziolli, que acompanharam grande parte da minha trajetória acadêmica – desde minha participação no PET até minha atuação na UNATI – me orientando em diversos trabalhos na área da educação e me auxiliando em tudo o que precisei. Sinto-me muito honrado por nossos caminhos terem se cruzado e saibam que sou muito grato por ter tido a oportunidade trabalhar com vocês.

Gostaria de agradecer ainda à equipe da Biblioteca, principalmente à Márcia Correa Bueno Degasperi, ao Renan Carvalho Ramos, à Angela Ferraz, à Célia Aparecida Rufino Gomes da Silva, à Gislaine Hermeni Galasse, ao Mauricio da Silva Pinheiro e à Josimeire Moura da Silva. Obrigado por sempre me auxiliarem a encontrar os livros nas prateleiras e por sempre me receberem tão bem. Agradeço também a todos os docentes, discentes (principalmente aqueles para quem fui monitor nas disciplinas de Biologia Celular, Histologia e Envelhecimento e Morte Celular) e funcionários – limpeza, manutenção, segurança e Restaurante Universitário – da UNESP de Rio Claro. Vocês todos sempre me trataram bem e sempre me chamaram pelo nome, fazendo-me sentir popular (risos) e muito querido pela comunidade unespiana.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à banca avaliadora, na figura do Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi e da Dra. Ariadne Fares Sabbag, cujos apontamentos contribuíram imensamente para a melhoria deste trabalho de conclusão de curso. Muito obrigado aos dois por lerem esta monografia de forma tão atenciosa e por participarem da minha formação como futuro biólogo.

Ressalto ainda que o presente trabalho foi desenvolvido com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

RESUMO

DNAs satélites são sequências de tamanho variável, repetidas em tandem, associadas geralmente às regiões heterocromáticas dos cromossomos. De acordo com a hipótese da biblioteca, organismos relacionados compartilham uma biblioteca comum de DNAs satélites, resultando em famílias de DNAs satélites que são compartilhadas entre vários táxons de um filo. O surgimento de ferramentas de bioinformática propiciou a identificação e caracterização de grandes coleções de DNAs satélites e possibilitou sua comparação entre diferentes espécies. No presente trabalho, foi realizada a caracterização completa *in silico* de DNAs satélites da espécie de anfíbio anuro *Thoropa miliaris*. Após o sequenciamento, a busca por clusters repetitivos no genoma de *T. miliaris* ocorreu pela plataforma RepeatExplorer2 e a discriminação de *clusters* que representassem potenciais DNAs satélites se deu pela ferramenta TAREAN. As sequências consenso foram usadas para consulta em dois bancos de dados (BLASTN e Repbase) com a finalidade de verificar similaridades com outras sequências já descritas. A abundância e divergência para os DNAs satélites identificados em *T. miliaris* foram estimadas por meio do *script* do RepeatMasker, gerando um gráfico *landscape*. Foram encontrados trinta e oito DNAs satélites para *T. miliaris*, nomeados de acordo com a ordem decrescente de abundância. Similaridades com outras sequências repetitivas já descritas foram verificadas pela consulta no BLASTN e no Repbase, apresentando dados que corroboram com a hipótese da biblioteca. Dessa forma, além de apresentar o satelitoma de *T. miliaris*, esta pesquisa contribui para um melhor entendimento da evolução de DNAs satélites em anfíbios anuros.

Palavras-chave: Bioinformática; DNA repetitivo; Evolução; Hipótese da Biblioteca.

ABSTRACT

Satellite DNAs are sequences of variable length, organized in tandem-repeat fashion and generally associated with the heterochromatic regions of chromosomes. According to the library hypothesis, related species may share a common library of satellite DNAs. Thus, families of satellite DNAs might be shared among several taxa of a phylum. The emergence of bioinformatics tools enabled the identification and characterization of large collections of satellite DNAs and further facilitated their comparison between species. In the present work, we carried out a complete *in silico* characterization of satellite DNAs of the anuran species *Thoropa miliaris*. After sequencing, the search for repetitive sequences in the *T. miliaris* genome was carried out by the RepeatExplorer2 platform and the discrimination of clusters that represented potential satellite DNAs was done by the tool TAREAN. The consensus sequences were used for consultation in two databases (BLASTN and Repbase) in order to verify similarities with other sequences already described. The abundance and divergence for the satellite DNAs identified in *T. miliaris* were estimated using the RepeatMasker script, generating a landscape graph. Thirty-eight satellite DNAs were found for *T. miliaris*, which were named according to decreasing order of abundance. Similarities with other repetitive sequences already described were verified by consulting BLASTN and Repbase, presenting data that corroborate the library hypothesis. Therefore, in addition to presenting the *T. miliaris* satellite content, this research contributes to a better understanding of the evolution of satellite DNAs in anuran amphibians.

Keywords: Bioinformatics; Evolution; Library Hypothesis; Repetitive DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da classificação de sequências repetitivas	14
Figura 2 – Esquema sobre o conceito de <i>molecular drive</i>	17
Figura 3 - Imagem de <i>Thoropa miliaris</i>	20
Figura 4 – <i>Landscape</i> repetitivo para <i>Thoropa miliaris</i>	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações obtidas pelo TAREAN	24
Tabela 2 – Características gerais dos 38 DNAs satélites recuperados do <i>Thoropa miliaris</i>	31
Tabela 3 – Resultados de similaridades entre os DNAs satélites recuperados de <i>Thoropa miliaris</i> e sequências previamente depositadas obtidos por meio de consulta nos bancos de dados BLASTN e Repbase.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

FISH	Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência (<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>)
rDNA	DNA ribossômico (<i>ribosomal DNA</i>)
satDNA	DNA satélite (<i>satellite DNA</i>)
TEs	Elementos transponíveis (<i>transposable elements</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
2.1	Sequenciamento do DNA genômico.....	22
2.2	Análises de bioinformática.....	22
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
5	REFERÊNCIAS.....	38

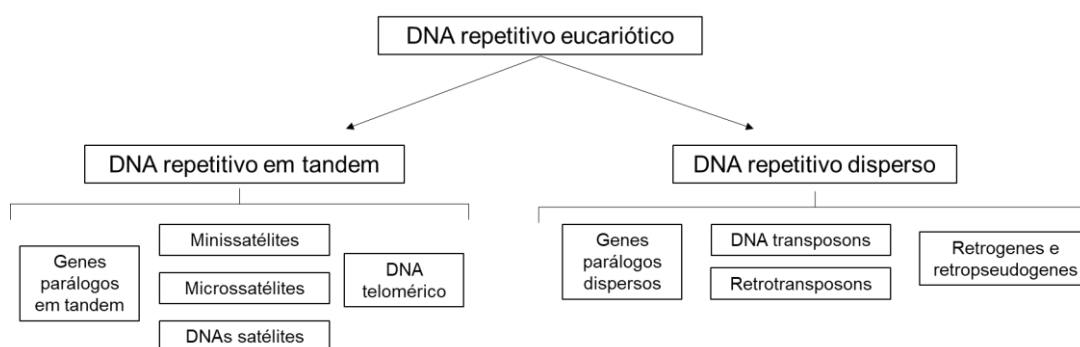
1 INTRODUÇÃO

O estudo pioneiro de Britten e Kohne (1968) revelou que algumas sequências de nucleotídeos são frequentemente repetidas no genoma de eucariotos. Apesar destes autores discordarem da ideia de que tais sequências não teriam um propósito no genoma, por muito tempo elas foram consideradas como “DNA lixo”, uma vez que a codificação de proteínas dificilmente é associada a elas (ORGEL; CRICK, 1980; PARDUE; HENNIG, 1990; UGARKOVIC; PLOHL, 2002; PLOHL *et al.*, 2008; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; KUHN, 2015). Somente com o aumento de genomas sequenciados, com o desenvolvimento de diversas abordagens metodológicas e com a pesquisa de base acumulada nos últimos anos é que este pensamento começou a mudar (LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ; PLOHL, 2023).

Já é sabido sobre o envolvimento de sequências repetidas em uma série de funções genômicas, que englobam desde a organização e emparelhamento dos cromossomos até questões atreladas ao metabolismo celular e a especiação, o que vem sendo apoiado por alguns estudos envolvendo diferentes organismos (FRY; SALSER, 1977; CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; ELDER; TURNER, 1995; SCHMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998; CSINK; HENIKOFF, 1998; NIJMAN; LENSTRA, 2001; UGARKOVIC; PLOHL, 2002; PALOMEQUE; LORITE, 2008; PLOHL *et al.*, 2008; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; KUHN, 2015; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016; GUZMÁN *et al.*, 2022; ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ; PLOHL, 2023). Embora anteriormente não tenha sido associada atividade transcricional para sequências de DNA repetitivo, esta já foi identificada em vários táxons de animais e plantas (SCHMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998; PALOMEQUE; LORITE, 2008; PLOHL *et al.*, 2008; KUHN, 2015). A título de exemplo têm-se as sequências repetidas de DNA ribossômico (rDNA), as quais codificam os componentes estruturais dos ribossomos (SCHMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998). Pequenos RNAs derivados de um tipo de sequência repetitiva centromérica parecem desempenhar um papel fundamental na formação e função dos centrômeros (MACAS *et al.*, 2010). Na verdade, a grande abundância de sequências repetidas nos centrômeros já indica a importância delas na expansão e estabilização destes componentes cromossômicos na evolução (PLOHL *et al.*, 2008; GUZMÁN *et al.*, 2022).

As sequências repetidas podem ser classificadas de acordo com sua organização: dispersas ou dispostas em tandem (Figura 1) (ELDER; TURNER, 1995; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; NOVÁK; NEUMANN; MACAS, 2020; ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ; PLOHL, 2023). Dentre as repetições dispersas destacam-se elementos transponíveis (TE), como transposons e retrotransposons; enquanto repetições em tandem incluem, por exemplo, os DNAs satélites (satDNAs) (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; KUHN, 2015). Estes últimos são comumente o principal componente da heterocromatina, embora também possam ser encontrados nas regiões eucromáticas dos cromossomos (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; PLOHL *et al.*, 2008; MACAS *et al.*, 2010; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; BUENO *et al.*, 2021; ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ; PLOHL, 2023). O termo “DNA satélite” provém da forma como este tipo de sequência foi isolado inicialmente, que se deu através de bandas satélites em experimentos com centrifugação por gradiente – algo que foi possível graças a sua composição de bases nitrogenadas ser significativamente distinta daquela do DNA menos repetido (FRY; SALSER, 1977; CSINK; HENIKOFF, 1998; PLOHL *et al.*, 2008; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016; ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ; PLOHL, 2023).

Figura 1 - Esquema adaptado de López-Flores e Garrido-Ramos (2012), que mostra a classificação dos diferentes tipos de sequências de DNA repetitivo encontrados no genoma de eucariotos.



Os DNA satélites constituem uma considerável parte dos genomas eucarióticos e, conseqüentemente, estão envolvidos na enorme variação de tamanho destes (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; MACAS; MÉSZÁROS; NOUZOVÁ, 2002; PLOHL *et al.*, 2008; MACAS *et al.*, 2010; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). Chambers, Schell e Skinner (1978) afirmaram que DNAs

satélites podem compreender menos de 1 % a mais de 66 % de tais genomas. Estima-se que até 20 % do DNA nuclear de plantas, por exemplo, seja constituído de DNAs satélites e proporções ainda maiores podem ser observadas no material genético de insetos e roedores (FRY; SALSER, 1977; INGHAM *et al.*, 1993; ELDER; TURNER, 1995; PONS *et al.*, 1997; MACAS; MÉSZÁROS; NOUZOVÁ, 2002; MACAS *et al.*, 2010). No entanto, López-Flores e Garrido-Ramos (2012) alertam que a abundância total de DNAs satélites é provavelmente subestimada na maioria dos genomas. Isto se deve a limitações dos métodos tradicionais usados para analisá-los e por ganharem pouca atenção em projetos genômicos (PLOHL *et al.*, 2008; MACAS *et al.*, 2010; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; NOVÁK *et al.*, 2013; KUHN, 2015; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016).

Em relação à localização cromossômica, os DNAs satélites são mais facilmente encontrados em regiões centroméricas, pericentroméricas e subteloméricas dos cromossomos (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; ELDER; TURNER, 1995; SCHMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998; PLOHL *et al.*, 2008; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). No entanto, podem também estar alocados em regiões intersticiais de cromossomos autossomos e na heterocromatina presente em cromossomos sexuais e em cromossomos supranumerários (cromossomos B) (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; GUTKNECHT; SPERLICH; BACHMANN, 1995; PARISE-MALTEMPI *et al.*, 2007; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; GATTO; BUSIN; LOURENÇO, 2016; PALACIOS-GIMENEZ *et al.*, 2020; CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2021). Bonaccorsi e Lohe (1991) afirmam que o cromossomo Y heterocromático de *Drosophila melanogaster* contém uma série de DNAs satélites, os quais correspondem a cerca de 80% do comprimento de tal cromossomo. Abdelaziz e colaboradores (2007) verificaram a presença de um DNA satélite nas regiões centroméricas de todos os cromossomos, incluindo os cromossomos B, de gafanhotos da espécie *Eyprepocnemis plorans*. Já DNAs satélites na região pericentromérica foram observados nos cromossomos de besouros das espécies *Palorus subdepressus* e *Palorus ratzeburgii* (PLOHL *et al.*, 1998; PALOMEQUE; LORITE, 2008).

Diferentemente dos micro e minissatélites, os DNA satélites são compostos de unidades básicas repetidas, ou monômeros, geralmente ricas em A + T, que

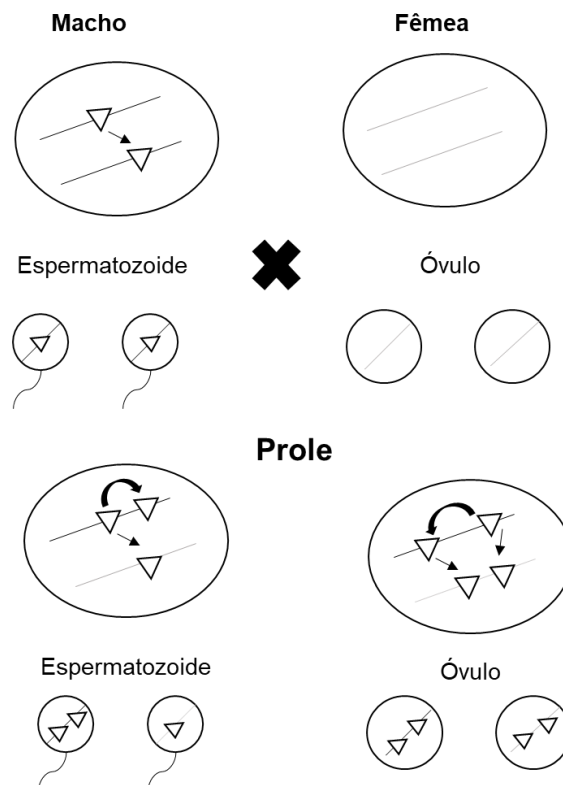
apresentam dezenas a centenas de nucleotídeos e que podem estar amplificadas em milhões de cópias (BACHMANN; SPERLICH, 1997; PONS *et al.*, 1997; PLOHL *et al.*, 1998; MACAS; MÉSZÁROS; NOUZOVÁ, 2002; PLOHL *et al.*, 2008; MACAS *et al.*, 2010). É importante destacar que o comprimento dos monômeros dos DNAs satélites, a sequência de nucleotídeos, seu grau de amplificação no genoma e sua distribuição nos cromossomos podem variar mesmo entre espécies evolutivamente relacionadas (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; ELDER; TURNER, 1995; PONS *et al.*, 1997; PLOHL *et al.*, 1998; MACAS; MÉSZÁROS; NOUZOVÁ, 2002; PLOHL *et al.*, 2008; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ; PLOHL, 2023). Por esta razão, Macas e colaboradores (2010) afirmam que as repetições do tipo satélite estão entre os componentes mais dinâmicos dos genomas eucarióticos, passando por rápidas alterações em suas sequências e abundâncias, o que resulta, muitas vezes, no surgimento de repetições específicas em gêneros ou mesmo em espécies.

Fry e Salser (1977) sugeriram que os organismos partilham uma biblioteca comum de sequências do tipo satélite, propondo, assim, a hipótese da biblioteca. De acordo com estes autores, o aparecimento de novos DNAs satélites provém da amplificação de satélites já presentes na biblioteca. Dessa forma, em cada espécie, certos DNAs satélites desta biblioteca podem ser amplificados, gerando alterações no número de cópias e na sequência (FRY; SALSER, 1977; UGARKOVIĆ; PLOHL, 2002; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; DE SILVA *et al.*, 2017; GUZMÁN *et al.*, 2022). Por este motivo, diversos DNAs satélites podem estar presentes em uma espécie e espécies relacionadas podem compartilhar uma coleção ou uma biblioteca de DNAs satélites (LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; DE SILVA *et al.*, 2017).

Ressalta-se que os monômeros de um determinado DNA satélite são mais homogêneos dentro de uma espécie do que entre espécies devido à evolução em concerto, isto é, devido à tendência das sequências repetidas evoluírem em uníssono (ZIMMER *et al.*, 1980; DOVER, 1982; ELDER; TURNER, 1995; GARRIDO-RAMOS *et al.*, 1999; NIJMAN; LENSTRA, 2001; MACAS *et al.*, 2010). A evolução em concerto é resultado de um processo de duas etapas chamado de *molecular drive*, em que primeiro as mutações são homogêneas por diversos mecanismos moleculares –

como cruzamento desigual, conversão gênica e transposição – e, posteriormente, fixadas por reprodução sexual (Figura 2) (DOVER, 1982; DOVER; FLAVELL, 1984; DOVER, 1986; ELDER; TURNER, 1995; DOVER, 2002; PALOMEQUE; LORITE, 2008; PLOHL *et al.*, 2008; VITTORAZZI; LOURENÇO; RECCO-PIMENTEL, 2014; ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ; PLOHL, 2023). Por conta disso, acredita-se que se trata de um processo estocástico, no qual as mutações se acumulam de forma gradual (PALOMEQUE; LORITE, 2008; PLOHL *et al.*, 2008; ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ; PLOHL, 2023). Este acúmulo gradual segue a filogenia em diferentes níveis hierárquicos (PLOHL *et al.*, 2008; ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ; PLOHL, 2023). No nível de espécie, por exemplo, DNAs satélites centroméricos foram informativos em estudos filogenéticos de três espécies do grupo *Drosophila obscura* e em estudos de peixes da família Sparidae (BACHMANN; SPERLICH, 1997; GARRIDO-RAMOS *et al.*, 1998; PLOHL *et al.*, 2008).

Figura 2 – Esquema adaptado de Dover (2002) para explicar o conceito de *molecular drive*. Uma mutação (triângulos) se espalha em uma população por reprodução sexual aliada a vários mecanismos, como conversão gênica e transposição.



Estas sequências repetidas em tandem apresentam sequências distintas dos demais componentes do material genético, permitindo seu isolamento por vários

métodos (CHAMBERS; SCHELL; SKINNER, 1978). Uma estratégia que foi muito empregada para detecção e caracterização destas sequências consiste na digestão do DNA genômico por endonucleases de restrição, seguida por eletroforese em gel, em que as bandas são selecionadas e purificadas para posterior clonagem, sequenciamento de nucleotídeos e mapeamento nos cromossomos (PARISE-MALTEMPI *et al.*, 2007; PLOHL *et al.*, 2008; VICARI *et al.*, 2010; DE SILVA *et al.*, 2017; RUIZ-RUANO *et al.*, 2019; GUZMÁN *et al.*, 2022). Foi por meio deste método que Vittorazzi e colaboradores (2011) isolaram um DNA satélite do genoma da espécie de anuro *Physalaemus cuvieri* e que Gusmán e colaboradores (2022) identificaram uma família de DNAs satélites em espécies de Bufonidae. Contudo, salienta-se que o principal problema desta técnica é testar um conjunto suficientemente grande de enzimas de restrição e encontrar DNAs satélites que tenham sequências correspondentes às enzimas empregadas (VICARI *et al.*, 2010). O advento do Sequenciamento de Nova Geração e o surgimento de ferramentas de bioinformática permitiram identificar e caracterizar grandes coleções de DNAs satélites em espécies não-modelos, possibilitando investigar a evolução intra e interespecífica destas sequências repetidas (MACAS *et al.*, 2010; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016; DE SILVA *et al.*, 2017; RUIZ-RUANO *et al.*, 2019; UTSUNOMIA *et al.*, 2019; NOVÁK; NEUMANN; MACAS, 2020; ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ; PLOHL, 2023).

No que se refere às ferramentas de bioinformática, Novák e colaboradores (2013) desenvolveram o RepeatExplorer, um *software* para caracterização de elementos repetitivos que pode ser acessado via interface *web*. Implementado na plataforma Galaxy e configurado em um servidor público, o RepeatExplorer utiliza um algoritmo de agrupamento de sequências baseado em imagens, ou grafos, para facilitar a identificação da repetição sem a necessidade de bancos de dados de referência (NOVÁK *et al.*, 2013). Estes grafos são construídos por meio da identificação de similaridades entre as múltiplas cópias das sequências repetitivas, registrando as sobreposições, que são agrupadas e conectadas (NOVÁK; NEUMANN; MACAS, 2010). Atualmente, uma nova versão do RepeatExplorer está disponível - o RepeatExplorer2 - que traz como novidades a identificação automatizada de repetições em tandem e a incorporação da ferramenta TAREAN (NOVÁK; NEUMANN; MACAS, 2020). O TAREAN trata-se de um analisador de repetições em tandem que,

através dos grafos, identifica prováveis DNAs satélites e reconstrói suas sequências consenso (NOVÁK *et al.*, 2017).

Outro *software* utilizado para análises de DNAs satélites é o RepeatMasker (SMIT; HUBLEY; GREEN, 2017), o qual necessita de um servidor específico para sua operacionalização. Visando identificar, classificar e quantificar elementos repetitivos, o RepeatMasker procura por repetições ao alinhar as sequências do genoma a uma biblioteca que contenha as sequências consenso de DNAs satélites conhecidos (TARAILO-GRAOVAC; CHEN, 2009).

Essas ferramentas de bioinformática têm sido utilizadas em estudos de DNAs satélites em diferentes organismos, como plantas (RUIZ-RUANO *et al.*, 2019; SULTANA *et al.*, 2020), insetos (RUIZ-RUANO *et al.*, 2016, 2017, 2018; MILANI *et al.*, 2018; BARDELLA; MILANI; CABRAL-DE-MELLO, 2020; FERRETTI *et al.*, 2020; PALACIOS-GIMENEZ *et al.*, 2020; CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2021; MILANI *et al.*, 2021; GASPAROTTO *et al.*, 2022; ANJOS *et al.*, 2023; PEREIRA; CABRAL-DE-MELLO; LOPES, 2023), peixes (DE SILVA *et al.*, 2017; UTSUNOMIA *et al.*, 2019; CREPALDI; PARISE-MALTEMPI, 2020; CREPALDI *et al.*, 2021; GOES *et al.*, 2022, 2023) e mamíferos (SENA *et al.*, 2020; GUTIÉRREZ *et al.*, 2023). No caso de anfíbios anuros, o trabalho pioneiro de Da Silva e colaboradores (2020) identificou sequências de DNAs satélites na espécie *Proceratophrys boiei* pelo RepeatExplorer. Posteriormente, estas análises foram refinadas por Da Silva e colaboradores (2023), utilizando outros métodos de bioinformática. Destro (2022) caracterizou DNAs satélites de três espécies do gênero *Proceratophrys* através do RepeatExplorer2. Já Gatto e colaboradores (2021) fizeram uso do RepeatMasker para estudar sequências repetitivas em cromossomos sexuais da espécie *Pseudis tocantins*.

Tendo em vista estes métodos de bioinformática para estudos de DNAs satélites em anfíbios anuros, o presente trabalho buscou realizar uma caracterização *in silico* de DNAs satélites de uma espécie do gênero *Thoropa* Cope, 1865 (Anura: Cycloramphidae). Este gênero é composto por sete espécies: *T. miliaris* (Spix, 1824), *T. petropolitana* (Wandolleck, 1907), *T. taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923), *T. lutzi* Cochran, 1938, *T. megatympnum* Caramaschi e Sazima, 1984, *T. saxatilis* Cocroft e Heyer, 1988 e *T. bryomantis* Assis, Lacerda, Guimarães, Peixoto, Luna, e Feio, 2021 (FROST, 2023). Estas espécies habitam predominantemente a Mata Atlântica, com

exceção de *T. megatympanum* que é apenas encontrada em campos rupestres (CARAMASCHI; SAZIMA, 1984; MALAGOLI, 2018; SABBAG *et al.*, 2018, 2022; FROST, 2023).

A espécie estudada no presente trabalho, *Thoropa miliaris* (Figura 3), foi a primeira a ser descrita para o gênero. É conhecida popularmente como rã-das-pedras, pois todos os estágios de vida desta espécie ocupam afloramentos rochosos úmidos ao nível do mar até altitudes próximas a 2.000m (BARTH, 1956; SAZIMA, 1971; ROCHA *et al.*, 2002; FEIO; NAPOLI; CARAMASCHI, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2006; FITZPATRICK *et al.*, 2009; NUNES-DE-ALMEIDA *et al.*, 2016; REBOUÇAS; DA SILVA; SANUY, 2018; CHOLAK; HADDAD, PARISE-MALTEMPI, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2023), mas também há relatos de indivíduos adultos desta espécie habitando a base de bromélias (TEIXEIRA; MILI; RÖDDER, 2006; PERTEL; TEIXEIRA; FERREIRA, 2010). Apresenta a mais ampla distribuição dentre as espécies do gênero, ocorrendo do sul da Bahia ao extremo sul do estado de São Paulo (GIARETTA; FACURE, 2004; FEIO; NAPOLI; CARAMASCHI, 2006; FROST, 2023).

Figura 3 – Fotografia de um macho da espécie *Thoropa miliaris* da Reserva Biológica Augusto Ruschi, localizada em Santa Tereza, Espírito Santo, Brasil. Esta imagem é de autoria do Prof. Dr. Célio F. B. Haddad, que a cedeu gentilmente para o presente trabalho.



As informações disponíveis na literatura sobre *T. miliaris* referem-se a questões reprodutivas, comportamentais e de biologia dos girinos (LUTZ, 1948; BARTH, 1956; COCROFT; HEYER, 1988; ROCHA *et al.*, 2002; GIARETTA; FACURE, 2004), dados morfológicos e morfométricos (COCROFT; HEYER, 1988; HEYER *et al.*, 1990; FEIO;

NAPOLI; CARAMASCHI, 2006; REBOUÇAS; DA SILVA; SANUY, 2018), dieta (SIQUEIRA *et al.*, 2006; PERTEL; TEIXEIRA; FERREIRA, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2023), parasitas (GIÓIA; LIMA, 1984; LOPES *et al.*, 2013; BARROS-BATTESTI, *et al.*, 2015; SÁ-HUNGARO *et al.*, 2017), predação (PERTEL; TEIXEIRA; FERREIRA, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2022), vocalização (NUNES-DE-ALMEIDA *et al.*, 2016), análises filogenéticas (FITZPATRICK *et al.*, 2009; SABBAG, 2013; NUNES-DE-ALMEIDA, 2015; SABBAG *et al.*, 2018, 2022) e relatos de malformações (MÔNICO; SILVA-SOARES; KOCH, 2019).

Do ponto de vista citogenético, até recentemente conhecia-se apenas o cariótipo sob coloração convencional de *T. miliaris* (BOGART, 1970; DENARO, 1972); até que o estudo realizado por Cholak, Haddad e Parise-Maltempo (2020) acrescentou dados sobre os cromossomos desta espécie por meio de análises convencionais e moleculares de diferentes populações. No campo da citogenômica, Pessoa (2019) e Cholak (2020) identificaram 21 DNAs satélites no genoma de um indivíduo de *T. miliaris* da população de Santa Teresa/ES, utilizando o RepeatExplorer, e mapearam alguns destes DNAs satélites nos cromossomos desta população e de uma população proveniente de Paraty/RJ.

Entretanto, cabe ressaltar que, além do RepeatExplorer usado por Pessoa (2019) e por Cholak (2020), existem outras ferramentas de bioinformática, como o RepeatExplorer2 e o RepeatMasker, que permitem análises genômicas mais refinadas e robustas para caracterizar sequências repetitivas. Assim, neste trabalho, foi realizada uma caracterização completa de DNAs satélites de *T. miliaris*, utilizando esta abordagem e fornecendo dados cruciais para o entendimento da organização genômica desta espécie e de anfíbios em geral.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Sequenciamento do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de amostras de fígado de um indivíduo macho de *T. miliaris* da população de Santa Teresa/ES, utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Foi realizado o sequenciamento de baixa cobertura pela empresa Macrogen Inc. (Seul, República da Coréia) através da plataforma Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA). A tecnologia de sequenciamento usada foi TruSeq 3000 4000 SBS Kit v3 Illumina® HiSeq™ 4000 (2x101bp *paired-end*).

2.2 Análises de bioinformática

Os dados resultantes do sequenciamento de *T. miliaris* foram analisados na plataforma online RepeatExplorer (<https://repeatexplorerelixir.cerit-sc.cz/galaxy/>). Os parâmetros e procedimentos foram de acordo com a versão mais recente da plataforma, o RepeatExplorer2 (NOVÁK; NEUMANN; MACAS, 2020), que realiza análises globais de DNAs repetitivos em leituras de sequências não ensambladas.

A busca por *clusters* repetitivos foi realizada com base nos gráficos de agrupamento de sequências por similaridade fornecidos pelo RepeatExplorer2, e os *clusters* que apresentaram uma densidade gráfica repetitiva, característico de sequências em tandem, foram analisados para a identificação das famílias de DNAs satélites. Acoplado ao RepeatExplorer2, o analisador de repetições em tandem, TAREAN, foi aqui empregado para discriminar *clusters* que representassem potenciais DNAs satélites de outros tipos de repetições em tandem, de modo a facilitar sua identificação e caracterização (NOVÁK *et al.*, 2017).

As sequências consenso geradas para cada família de DNA satélite foram analisadas e alinhadas para buscar homologia com aquelas descritas por Pessoa (2019) e por Cholak (2020), utilizando a ferramenta Muscle (EDGAR, 2004) no programa Geneious v4.8 (DRUMMOND *et al.*, 2009). Nos casos em que não se encontrou homologia, os DNA satélites obtidos nos estudos anteriores foram incorporados nas análises do presente trabalho. O monômero de consenso de cada família de DNA satélite foi usado para a consulta em dois bancos de dados públicos, o BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.gov/Blast/>) e o Repbase (<http://www.girinst.org>).

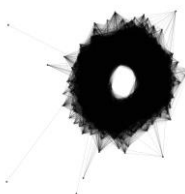
/repbase/), com a finalidade de verificar similaridades com outras sequências repetitivas já descritas.

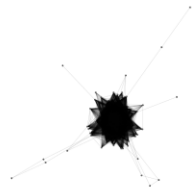
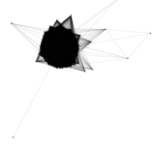
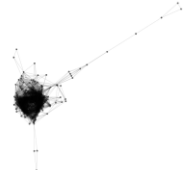
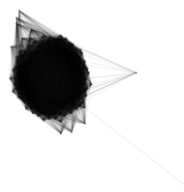
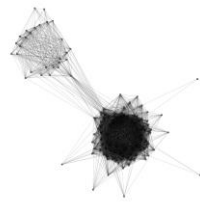
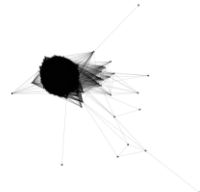
A abundância e divergência (Kimura-2-parameter - K2P) para os DNAs satélites caracterizados nos genomas de *T. miliaris* foram estimados através do *script* do RepeatMasker (SMIT; HUBLEY; GREEN, 2017) pelo servidor Kasahara-ICG Insect Cytogenomics Group localizado no Departamento de Biologia Geral e Aplicada, UNESP – Rio Claro (SP). O gráfico de abundância e divergência foi construído no programa RStudio (Versão 1.2.1335) utilizando os dados da quantificação resultante do RepeatMasker ajustados em tabelas de Excel (Microsoft®). Os DNAs satélites encontrados e quantificados foram nomeados como proposto por Ruiz-Ruano e colaboradores (2016).

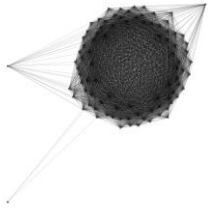
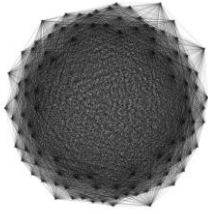
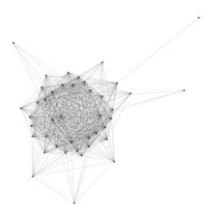
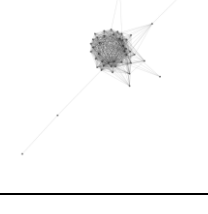
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

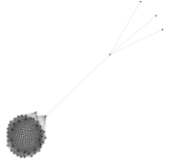
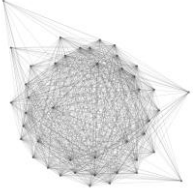
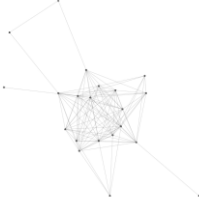
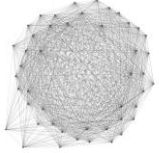
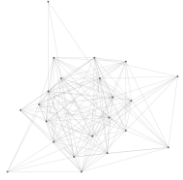
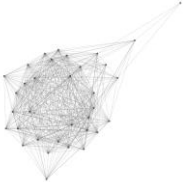
Atualmente, a estratégia que tem sido amplamente empregada na detecção de DNAs repetitivos é pelo agrupamento (*cluster*) de pequenos *reads* oriundos do Sequenciamento de Nova Geração, com baixa cobertura, no intuito de identificar apenas sequências representadas em múltiplas cópias, sem a necessidade da montagem do genoma (ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ; PLOHL, 2023). Com as análises realizadas no RepeatExplorer2, foram obtidos 105 *clusters* para o genoma de *T. miliaris*, sendo 33 deles apontados como potenciais DNAs satélites pelo TAREAN. A Tabela 1 apresenta as informações obtidas pelo TAREAN, bem como os respectivos grafos de cada um dos 33 DNAs satélites. Evidencia-se que as formas circulares dos grafos presentes nesta tabela são características de *clusters* de sequências repetidas em tandem, como os DNAs satélites (NOVÁK; NEUMANN; MACAS, 2010; ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ; PLOHL, 2023).

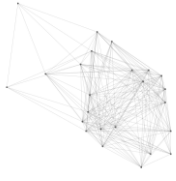
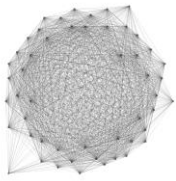
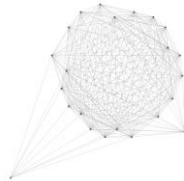
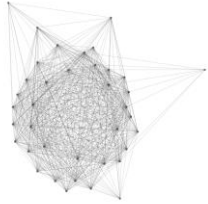
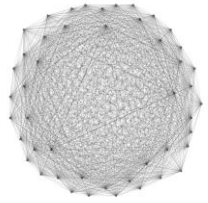
Tabela 1 – Informações obtidas pelo TAREAN. Os DNAs satélites TmiSat08-44, TmiSat10-32, TmiSat16-30, TmiSat19-40 e TmiSat30-77 são aqueles identificados nos trabalhos de Pessoa (2019) e de Cholak (2020), mas que não foram identificados pelo TAREAN nesta nova abordagem.

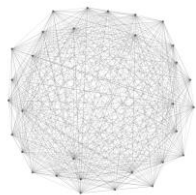
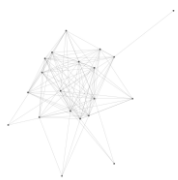
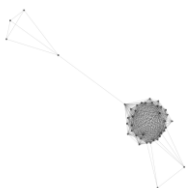
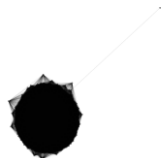
DNA satélite	Probabilidade TAREAN	Gráfico layout
TmiSat01-30	0,95900% High confidence	
TmiSat02-618	0,99200% High confidence	
TmiSat03-188	0,99200% High confidence	

TmiSat04-95	0,00292% Low confidence	
TmiSat05-35	0,01110% Low confidence	
TmiSat06-142	0,05460% Low confidence	
TmiSat07-49	0,00292% Low confidence	
TmiSat08-44	-	-
TmiSat09-65	0,24200% Low confidence	
TmiSat10-32	-	-
TmiSat11-37	0,70800% Low confidence	

TmiSat12-484	0,96800% High confidence	
TmiSat13-71	0,24600% Low confidence	
TmiSat14-27	0,13700% Low confidence	
TmiSat15-68	0,98100% High confidence	
TmiSat16-30	-	-
TmiSat17-28	0,01950% Low confidence	
TmiSat18-31	0,02990% Low confidence	
TmiSat19-40	-	-

TmiSat20-35	0,03850% Low confidence	
TmiSat21-47	0,01140% Low confidence	
TmiSat22-86	0,01060% Low confidence	
TmiSat23-36	0,04840% Low confidence	
TmiSat24-81	0,91500% High confidence	
TmiSat25-45	0, 6700% Low confidence	
TmiSat26-45	0,22500% Low confidence	

TmiSat27-43	0,74200% High confidence	
TmiSat28-36	0,61200% Low confidence	
TmiSat29-38	0,02520% Low confidence	
TmiSat30-77	-	-
TmiSat31-57	0,91500% High confidence	
TmiSat32-30	0,90100% High confidence	
TmiSat33-38	0,98100% High confidence	

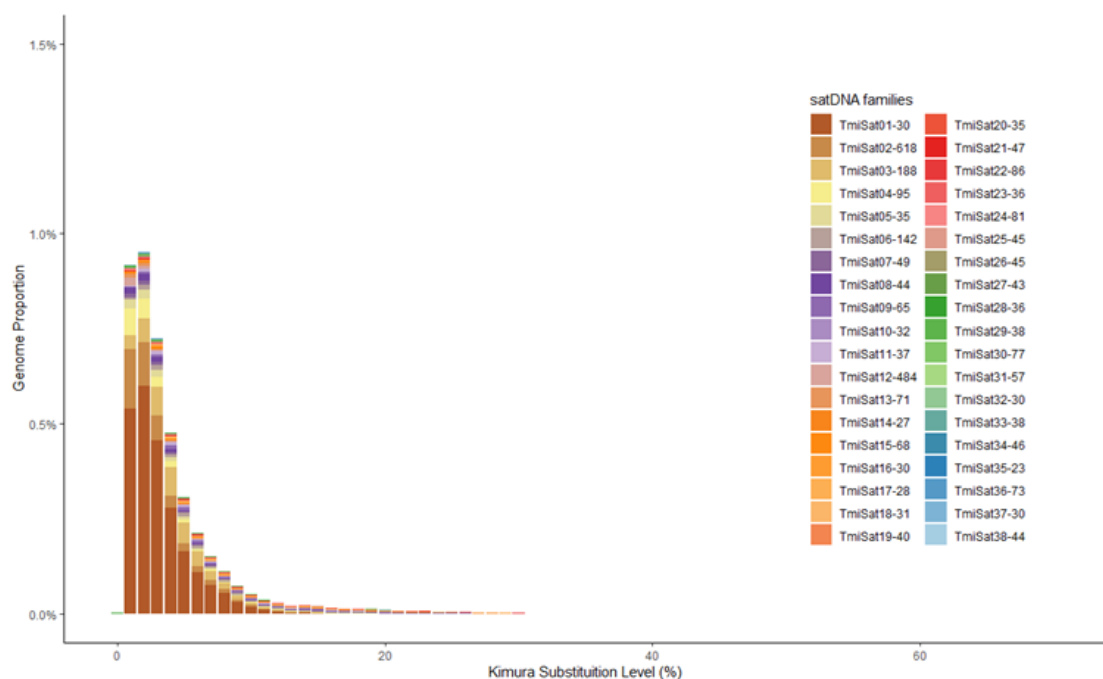
TmiSat34-46	0,24900% Low confidence	
TmiSat35-23	0,08850% Low confidence	
TmiSat36-73	0,95900% High confidence	
TmiSat37-30	0,07880% Low confidence	
TmiSat38-44	0,11900% Low confidence	

Por meio do programa Geneious, comparou-se as sequências consenso dos DNAs satélites indicados pelo TAREAN com aqueles identificados nos estudos de Pessoa (2019) e Cholak (2020), no intuito de encontrar similaridades entre as sequências. Com isso, observou-se que cinco DNAs satélites encontrados nestes dois estudos não foram recuperados pelo TAREAN no presente trabalho. Assim, estes cinco DNAs satélites foram incorporados nas análises, totalizando 38 DNAs satélites para *T. miliaris*. Na Tabela 1, verifica-se que estes cinco DNAs satélites acrescidos nas análises deste estudo são: TmiSat08-44, TmiSat10-32, TmiSat16-30, TmiSat19-40 e TmiSat30-77.

Por meio do RepeatMasker, obteve-se a abundância e a divergência para os 38 DNAs satélites no genoma de *T. miliaris*, possibilitando visualizar a proporção genômica de cada uma destas sequências repetitivas nesta espécie de anuro a partir do gráfico *landscape* (Figura 4). Este gráfico, em conjunto com a Tabela 2, permitiu organizar e nomear - ou renomear para o caso daqueles DNAs satélites já descritos por Pessoa (2019) e Cholak (2020) - os DNAs satélites de *T. miliaris* a partir de sua ordem decrescente de abundância no genoma, como proposto por Ruiz-Ruano e colaboradores (2016).

Com a Tabela 2, nota-se que o conteúdo de A + T destes DNAs satélites variou entre 28,9% e 73,3% (55,85% em média), indicando uma tendência de DNAs satélites ricos em A + T. Observa-se ainda que TmiSat01-30 trata-se do DNA satélite mais abundante no genoma de *T. miliaris*, compreendendo cerca de 2,35% da abundância genômica. O segundo DNA satélite mais abundante corresponde apenas a 0,45% da abundância genômica e todos os outros DNAs satélites apresentam abundâncias inferiores. Já os valores determinados pelo RepeatMasker para divergência variam entre 1,24% e 17,45% (7,6% em média).

Figura 4 – *Landscape* repetitivo para os 38 DNAs satélites encontrados em *T. miliaris*. Observe que cada DNA satélite é designado por uma cor. Neste *landscape* apresenta-se a divergência (eixo x) em relação à abundância no genoma (eixo y). As cópias agrupadas à esquerda do gráfico possuem menor divergência, indicando que são de ocorrência recente no genoma.



Ruiz-Ruano e colaboradores (2019) afirmam que gráficos *landscapes* são altamente informativos em relação à idade dos DNAs satélites, uma vez que a evolução destas sequências repetitivas é marcada por processos de amplificação e homeogeneização, que diminuem a divergência, e de mutações pontuais, as quais aumentam a divergência. Neste sentido, picos com valores de divergência mais baixos indicam uma origem mais recente, enquanto valores de divergência mais elevados representam origens mais antigas (RUIZ-RUANO *et al.*, 2019). No caso do gráfico *landscape* para os 38 DNAs satélites identificados em *T. miliaris*, a divergência de todas estas sequências repetidas em tandem é menor que 20%, como apresentado na Tabela 2 e na Figura 4, apontando para uma homogeneidade alta e uma amplificação recente no genoma da espécie. Resultado similar foi observado por Da Silva e colaboradores (2023) ao analisar 226 DNAs satélites recuperados na espécie de anuro *Proceratophrys boiei*, os quais também apresentam baixa divergência e sugerem eventos mais recentes de amplificação e diversificação no genoma desta espécie.

Tabela 2 – Características gerais dos 38 DNAs satélites recuperados do *T. miliaris*, apresentando tamanho, composição A + T, abundância e divergência.

DNA Satélite	Tamanho (pb)	A + T	Abundância	Divergência
TmiSat01-30	30	63,4%	2,3546%	3,00%
TmiSat02-618	618	62,8%	0,4536%	2,22%
TmiSat03-188	188	51,6%	0,4095%	4,44%
TmiSat04-95	95	59,0%	0,2024%	3,58%
TmiSat05-35	35	60,0%	0,1016%	3,58%
TmiSat06-142	142	28,9%	0,0878%	6,12%
TmiSat07-49	49	42,9%	0,0813%	9,41%
TmiSat08-44	44	59,0%	0,0697%	3,50%
TmiSat09-65	65	52,3%	0,0499%	5,48%
TmiSat10-32	32	58,1%	0,0436%	12,53%

TmiSat11-37	37	54,0%	0,0434%	6,09%
TmiSat12-484	484	67,6%	0,0386%	1,24%
TmiSat13-71	71	57,8%	0,0290%	3,69%
TmiSat14-27	27	62,9%	0,0283%	16,31%
TmiSat15-68	68	51,4%	0,0245%	3,17%
TmiSat16-30	30	53,4%	0,0238%	11,32%
TmiSat17-28	28	53,5%	0,0217%	8,83%
TmiSat18-31	31	58,1%	0,0202%	11,38%
TmiSat19-40	40	60,0%	0,0198%	14,61%
TmiSat20-35	35	60,0%	0,0148%	3,90%
TmiSat21-47	47	44,7%	0,0142%	6,97%
TmiSat22-86	86	61,6%	0,0142%	17,45%
TmiSat23-36	36	55,5%	0,0117%	12,32%
TmiSat24-81	81	50,6%	0,0117%	5,16%
TmiSat25-45	45	73,3%	0,0116%	12,01%
TmiSat26-45	45	48,9%	0,0103%	6,67%
TmiSat27-43	43	58,2%	0,0093%	6,96%
TmiSat28-36	36	63,9%	0,0074%	4,59%
TmiSat29-38	38	44,8%	0,0068%	11,24%
TmiSat30-77	77	52,0%	0,0065%	6,80%
TmiSat31-57	57	56,2%	0,0062%	7,09%
TmiSat32-30	30	50,0%	0,0052%	5,08%

TmiSat33-38	38	60,5%	0,0047%	7,04%
TmiSat34-46	46	58,7%	0,0046%	3,89%
TmiSat35-23	23	60,9%	0,0034%	11,36%
TmiSat36-73	73	53,4%	0,0030%	5,82%
TmiSat37-30	30	53,4%	0,0009%	15,83%
TmiSat38-44	44	59,0%	0,0002%	8,35%

Uma vez consultados os bancos de dados públicos BLASTN e Repbase (Tabela 3), verificou-se que três DNAs satélites tiveram similaridade com elementos transponíveis e seis apresentaram similaridade com outros DNAs satélites já descritos para anfíbios anuros, como, por exemplo, *P. boiei* (DA SILVA *et al.*, 2020). Dentre as similaridades encontradas, destaca-se a do TmiSat03-188 com o PcP190. Este último é um DNA satélite isolado por Vittorazzi e colaboradores (2011) no genoma da espécie *Physalaemus cuvieri* e que parece ser derivado do rDNA 5S. Posteriormente, tal DNA satélite também foi encontrado em cinco populações de *P. cuvieri*, em outras cinco espécies do gênero *Physalaemus* e nas espécies de anuros *Leptodactylus latrans* e *Crossodactylus gaudichaudii* (VITTORAZZI; LOURENÇO; RECCO-PIMENTEL, 2014).

A sequência PcP190 foi localizada por mapeamento cromossômico no braço longo do cromossomo W de *Pseudis tocantis*, sugerindo que este DNA satélite poderia estar envolvido na evolução dos cromossomos sexuais desta espécie (GATTO; BUSIN; LOURENÇO, 2016). Gatto e colaboradores (2018) indicaram que o PCP190 está presente em outras quatro espécies do gênero *Pseudis* e na espécie *Lysapsus limellum*, descrevendo heteromorfismo sexual para *P. bolbodactyla*. Já Gatto e colaboradores (2019) analisaram a localização cromossômica do PcP190 em três populações de *Pseudis fusca*, observando algumas diferenças entre elas. Da Silva e colaboradores (2020) constataram que PboSat3-189, DNA satélite identificado em *Proceratophrys boiei*, apresenta similaridade com o PcP190 e que está localizado nas regiões centroméricas e pericentroméricas de todos os cromossomos da espécie,

coincidindo com o Bandeamanto C. Bueno e colaboradores (2021), por sua vez, reportaram a presença do PcP190 na espécie de anuro *Cycloramphus bolitoglossus* e reforçaram sua associação com o rDNA 5S.

Tabela 3 – Resultados de similaridades entre os DNAs satélites recuperados de *T. miliaris* e sequências previamente depositadas obtidos por meio de consulta nos bancos de dados BLASTN e Repbase.

DNA satélite	Consenso	BLASTN	REPBASE
TmiSat01-30	AGCAGTGTTATGCAGTGTTAAGCTGTTATA	-	-
TmiSat02-618	ATTGTTTTGAATTCTGGTCTTTTCATTTTAAATGGTTGATGT GATTTTAGGCTATGGGAACCTTCCTGCTTTCTACTTATCAC AATAAGTGAAGCAAAGAATTGGTAAAGGAAACAGATTGG AGATGGTAAGGAAAGGCTGTAGGGGAGGAGGAGGCCTTT ATTTGAACACAATAACACATGTGTTGTTGTGTTCAAAATGT TTAATCCAGAAAATTTCCCATAGTCAGCCATCTATTTGTG AAATGTTTTGAGTTGTTACGACAATGAAGGGTGATGAGG TGTATATGTTGGTGCTCAAATTTGGAGGTAAGGTTGTGTTT TCTGAAACGGCACCATAATTGTTTTTGAGGACTTGAGTAGA CTGATTTGCTTGGGTAGGTCCTTGGATTTAACACATGTCTG CTGTTACTAGGACCCCTGGATATTTTCATGGTGTAGCTCCT CTTGATGGAGGGGGAGACATGTTAGTGGTCTTTTCATGAT AGGGTCAATTATTTATTATGTGTTTTAATTGACTAACTCAT TCTGATTTTATTTGGAATAAATTGTCAATCTTCTATTTTCG TGGTACCAGAGTATGGTGTGGTATGAAATCGACATGGGTT TCATGCA	-	hAT-17_Croc Chapaev-5_HM
TmiSat03-188	AGGTGATTTACAGGTCGTTTTTTGTAATTAATGAACAAAGC CGAGTTACAAGGTAAATCGAGGAGTCAATGGGACCTGG GATCCCAGCCAGTCTCCCATGCGGGTACTTGCCAGGCC TTAAGCTGTTTTCATCTGCTGCGATCTGACGAGGGCAGGC ACACTCAGCTTAGAATGGCCATTGACGTA	PcP190.	-
TmiSat04-95	GTACATACATTACATTACTTATCCTGTACTGATCCTGAGTT ACATCCTGTATTATACTCCAGAGCTGCACTCACTATTCTGC TGGTGGTCACTGT	<i>Proceratophrys boiei</i> satellite PboSat6-97 sequence - 98.85% - MN475841.1	-
TmiSat05-35	TATAACTACTATAATACCGCCCCCTATGTACAGGA	-	-
TmiSat06-142	GGCCGAGGCCGTGGAGCGGTCCCCGGCGTGACTGAGC GCGAGCCCCCGGTGATGAGCTCCGCCCGGGGAAAGTC AGATCCCTTGCCCGAGAAGGAGTTCCAGGAGAGCGGATA GAGGAGGCGGCGGACGAGCGGACGGT	-	Kibi-1_GA
TmiSat07-49	TCTAGTGGTGGCTGCAGGCAGTCAGTATACAGTCAGCTCC TGAGCTCCC	-	-
TmiSat08-44	AGCCGGTATAACCGGGCATCTCCTGTATATAATATATATG TAC	<i>Proceratophrys boiei</i> satellite PboSat12-91 sequence – 86.33% - MN475847.1	-
TmiSat09-65	AGCAATGTTCTGCAGATCTGTAGAGAGGTCACTGGTGTA TAATCTGCAGAGGTAGAGGGGGTAG	-	-
TmiSat10-32	CCCATCATCCATATATCACAGTGTATCAC	-	-
TmiSat11-37	CTCCATATATACAGGACAGGAGAAGTGGTACTGTGCA	-	-

TmiSat12-484	TTAAATGGCTTTAAGATGAGTTTTACATTCAACTCATGAGA AGACATGACGAAAACAGAACCACGTTACATGCTGTTCTCT AAAAACAAATTCCTTCAATTGGTTTATCTTTTGCTCATATTT TAATTACTAATCTTGTTAGTGTAGTTTCTTATTAGACTTAAT AGTTCTACTTCAGTGTGCTTTGTTTTTCTTCCCATTTAAA TTTGGTAAAGAAATAGTTCTTCTTCAAATGAAAGTCTTAG CTGATGCTTCTTATCTGGAAGGGATGTTAAACCAGTCACA AAAAAATATCGGACTCAACTTTTCATAAAACATATATTTT GAAACTTTTGGAAAAATTTACAAACACAAAAAGGGTTACAT GGTGTAAATGCTTAGCACTCTGGACTCTGAATCCAGCGATC CGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCTAATTTACTTTTCTCAATA TGAAACTTCTGTTTCTGCTTGCTTCAAATGG	-	Gypsy-66_MLP-I tRNA-Gln_AT
TmiSat13-71	ACTGTGTTATCTGTGGTGTACATAGGACTGCAGGTGACA CTACTACATTATCTGTAATCAGAGAGGTATC	<i>Bufo schneideri</i> microsatellite Rsch3 sequence - 94.00% - FJ847930.1 <i>Proceratophrys boiei</i> satellite PboSat22-43 sequence - 97.67% - MN475857.1	-
TmiSat14-27	GACAATGGAAACAATTGACACAATGGA	-	-
TmiSat15-68	CACACATACCTCACACTTCTCATACATACCACCTTTAAGC TTGGCCCTATAGAGGGTCTTGGGTGT	-	-
TmiSat16-30	CTCTACCTGTACTACATGTCCTGTACTGCT	-	-
TmiSat17-28	TACAGGATAATGACACTGACACTTGGGG	-	-
TmiSat18-31	GGGCAGTGTAATATACAGGATTATACATGGG	-	-
TmiSat19-40	GAGCTCCCCCTAGTGGTGACTGTATATAATTATATGTAGT	-	-
TmiSat20-35	TTATCTGTATATAGGTGTGAATGGTGGATCCTGTG	-	-
TmiSat21-47	GCAGCTCACTGGGTATGATAGAGAGGAGTCAGATCACAC CGGGCATC	-	-
TmiSat22-86	GAATGTATTTCGGTGACTACATCATTCTACAACATAGTACT ACAAGTACCAGCATTACCCTCTTCTCTAGATGGAGTAATTG CATG	-	-
TmiSat23-36	GACATCACAAACATTCCATGACCTCACAAACATTCCGT	-	-
TmiSat24-81	TCTAGTAATGTCCTACTGTCTACCCCCAGTGCTGGGGTCA CATACACCCTCATTACTGTGTATAATGTCCTCCCTGCTGCT	-	-
TmiSat25-45	ATATCACACTGCACTGTATAATGATATATAGTATATACACT GATA	-	-
TmiSat26-45	GGTGACATCACTGAGAATGCAGCCTATCCATCACTAGAGA GCAGC	<i>Proceratophrys boiei</i> satellite PboSat28-43 sequence - 97.44% - MN475863.1	-
TmiSat27-43	GTTATATTATACAGGAGGTGACATCACCGCTCCCCAGATA TAA	-	-
TmiSat28-36	CATATATTATATAGAGTCATTACAGACAGTGACCCC	-	-
TmiSat29-38	GCAGGGTCCTCTCTCCTGTAGAGTGTGAGCTCTTATGG	-	-
TmiSat30-77	CATAGTGATATATCCTGCAGAGTATTACACCCCTGACCTCT ACAGATCTGCAGAACATCGCTCTCCCCCTCCTGATA	-	-
TmiSat31-57	CCTCTGTAGTCACATGTACTATATACCATGTCTGGAGATAA TATATCCACAGCCGCC	-	-
TmiSat32-30	GTCTCTGTGTGGTGTAGTATAGAGGAGCT	-	-
TmiSat33-38	ACACCCCTGTATATAATGATAGGACACTGTGTATACAG	-	-

TmiSat34-46	CAGTATACTGTACAGCAGATAATACAGGTCTGTATAGGAG GAGAGA	-	-
TmiSat35-23	ATACCCCTCATCACCTGTATATT	-	-
TmiSat36-73	CGGGTTTTTTGCGCTTTTGCCTTGTTCCTGTGGATTGCAT CTGATGAAGACAGAAGATGGCTTCTTTTCGG	-	-
TmiSat37-30	GTAGTACAGGTAGAGAGCAGTACAGGACAT	-	-
TmiSat38-44	GGGTTATACCGGCTGTACATATATATTATATACAGGAGATG CCC	<i>Proceratophrys boiei</i> satellite PboSat12-91 sequence - 88.10% - MN475847.1	-

Dessa forma, as similaridades com outros DNAs satélites, observadas a partir da consulta ao BLASTN, vão de encontro com a ideia proposta pela hipótese da biblioteca, tendo em vista que os DNAs satélites estão sendo compartilhados entre os genomas de espécies de diferentes famílias de anfíbios anuros. Além disso, a similaridade entre o TmiSat03-188 e o PcP190 reforça os achados de Pessoa (2019) e Cholak (2020), que também verificaram similaridade entre estes DNAs satélites. Cholak (2020), ao mapear TmiSat03-188 (antigo TmiSat02-189) e rDNA 5S, por meio da técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), observou sobreposição entre estas duas sequências no cromossomo 1 de duas populações de *T. miliaris* (Santa Teresa/ES e Paraty/RJ) e em outras duas espécies do gênero *Thoropa* (*T. taophora* e *T. saxatilis*), reforçando a hipótese de Vittorazzi e colaboradores (2011) de que o PcP190 está relacionado com o rDNA 5S, algo que também foi realçado por Bueno e colaboradores (2021) em *C. bolitoglossus* - espécie pertencente à família Cycloramphidae, a mesma de *Thoropa*. Portanto, pode-se dizer que a análise de DNAs satélites em um grupo de organismos pode revelar informações sobre a evolução de sequências repetitivas, a presença de elementos conservados e auxiliar na compreensão das relações entre as diferentes espécies (INGHAM *et al.*, 1993; PLOHL *et al.*, 1998).

4 CONCLUSÃO OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além de apresentar o conteúdo de DNA satélite de *T. miliaris*, esta pesquisa contribui para um melhor entendimento da evolução destas sequências, através de comparações realizadas a partir das consultas aos bancos de dados públicos. Os resultados vão de encontro com a proposta da hipótese da biblioteca para este tipo de sequência, uma vez que observou-se similaridades entre os DNA satélites caracterizados para *T. miliaris* com outros satélites identificados em espécies de diferentes famílias de anfíbios anuros. O presente trabalho também reforça a importância de integrar dados genômicos e de bioinformática para diferentes grupos de anfíbios anuros, tendo em vista a eficácia em representar o conteúdo e dinâmica evolutiva de DNAs satélites em organismos distintos.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, M. *et al.* Physical mapping of rDNA and satDNA in A and B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* from a Greek population. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 119, n. 1-2, p. 143-146, 2007.
- ANJOS, A. *et al.* Evolution of satDNAs on holocentric chromosomes: insights from hemipteran insects of the genus *Mahanarva*. **Chromosome Research**, v. 31, n. 1, p. 1-15, 2023.
- BACHMANN, L.; SPERLICH, D. Gradual evolution of a specific satellite DNA family in *Drosophila ambigua*, *D. tristis*, and *D. obscura*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 647-659, 1993.
- BARDELLA, V. B.; MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Analysis of *Holhymenia histrio* genome provides insight into the satDNA evolution in an insect with holocentric chromosomes. **Chromosome Research**, v. 28, n. 3-4, p. 369-380, 2020.
- BARROS-BATTESTI, D. M. *et al.* *Ornithodoros faccinii* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 1-11, 2015.
- BARTH, R. Observações anatômicas sobre a larva de *Thoropa miliaris* (Amphibia, Leptodactylidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 54, p. 489-497, 1956.
- BOGART, J. P. Systematic problems in the amphibian family Leptodactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis. **Cytogenetics**, v. 9, n. 5, p. 369-383, 1970.
- BONACCORSI, S.; LOHE, A. Fine mapping of satellite DNA sequences along the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*: relationships between satellite sequences and fertility factors. **Genetics**, v. 129, n. 1, p. 177-189, 1991.
- BRITTEN, R. J.; KOHNE, D. E. Repeated sequences in DNA. **Science**, v. 161, n. 3841, p. 529-540, 1968.
- BUENO, G. P. *et al.* Cytogenetic characterization and mapping of the repetitive DNAs in *Cycloramphus bolitoglossus* (Werner, 1897): more clues for the chromosome evolution in the genus *Cycloramphus* (Anura, Cycloramphidae). **PLoS ONE**, v. 16, n. 1, p. 1-20, 2021.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C. *et al.* The role of Satellite DNAs in genome architecture and sex chromosome evolution in Crambidae moths. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 1-15, 2021.
- CARAMASCHI, U.; SAZIMA, I. Uma nova espécie de *Thoropa* da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 2, n. 3, p. 139-146, 1984.
- CHAMBERS, C. A.; SCHELL, M. P.; SKINNER, D. M. The primary sequence of a crustacean satellite DNA containing a family of repeats. **Cell**, v. 13, n. 1, p. 97-110, 1978.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-220, 1994.

CHOLAK, L. R. **Estudo citogenético de dois grupos de anuros brasileiros (Anura – Amphibia) envolvidos em problemáticas taxonômicas**. 2020. Tese (Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/192377>. Acesso em: 24 mai. 2022.

CHOLAK, L. R.; HADDAD, C. F. B.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Cytogenetic analysis of the genus *Thoropa* Cope, 1865 (Anura-Cycloramphidae) with evolutionary inferences based on repetitive sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 3, p. 1-9, 2020.

COCROFT, R. B.; HEYER, W. R. Notes on the frog genus *Thoropa* (Amphibia: Leptodactylidae) with a description of a new species (*Thoropa saxatilis*). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 101, n. 1, p. 209-220, 1988.

CREPALDI, C. *et al.* Genomic differences between the sexes in a fish species seen through satellite DNAs. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 1-11, 2021.

CREPALDI, C.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Heteromorphic sex chromosomes and their DNA content in fish: an insight through satellite DNA accumulation in *Megaleporinus elongatus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 1, p. 38-46, 2020.

CSINK, A. K.; HENIKOFF, S. Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. **Trend in Genetics**, v. 14, n. 5, p. 200-204, 1998.

DA SILVA, M. J. *et al.* Analysis in *Proceratophrys boiei* genome illuminates the satellite DNA content in a frog from the Brazilian Atlantic Forest. **Frontiers in Genetics**, v. 14, p. 1-11, 2023.

DA SILVA, M. J. *et al.* Great abundance of satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) revealed by genome sequencing. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 3, p. 141-147, 2020.

DESTRO, R. F. **Estudo de mecanismos evolutivos envolvendo sequências repetitivas presentes no genoma de espécies de *Proceratophrys* (Amphibia, Odontophrynidae)**. 2022. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2022.

DE SILVA, D. M. Z. A. *et al.* High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

DENARO, L. Karyotypes of Leptodactylidae anurans. **Journal of Herpetology**, v. 6, n. 1, p. 71-74, 1972.

DOVER, G. Molecular drive. **TRENDS in Genetics**, v. 18, n. 11, p. 587-589, 2002.

DOVER, G. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. **Nature**, v. 299, n. 5879, p. 111-117, 1982.

DOVER, G. A. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. **TRENDS in Genetics**, v. 2, p. 159-165, 1986.

DOVER, G. A.; FLAVELL, R. B. Molecular coevolution: DNA divergence and the maintenance of function. **Cell**, v. 38, n. 3, p. 622-623, 1984.

DRUMMOND, A. J. *et al.* Geneious v. 4.8 Biomatters Ltd. Auckland, New Zealand, 2009.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

ELDER, J. F. Jr.; TURNER, B. J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. **The Quarterly Review of Biology**, v. 70, n. 3, p. 297-320, 1995.

FEIO, R. N.; NAPOLI, M. F.; CARAMASCHI, U. Considerações taxonômicas sobre *Thoropa miliaris* (Spix, 1824), com revalidação e redescrição de *Thoropa taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional**, v. 64, n. 1, p. 41-60, 2006.

FERRETTI, A. B. S. M. *et al.* High dynamism for neo-sex chromosomes: satellite DNAs reveal complex evolution in a grasshopper. **Heredity**, v. 125, n. 3, p. 124-137, 2020.

FITZPATRICK, S. W. *et al.* Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 13, p. 2877-2896, 2009.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Versão 6.2. 2023. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>. Acesso em: 19 set. 2023.

FRY, K.; SALSER, W. Nucleotide sequences of HS-a satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell**, v. 12, n. 4, p. 1069-1084, 1977.

GARRIDO-RAMOS, M. A. *et al.* Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of the Sparidae family (Pisces, Perciformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 200-204, 1998.

GASPAROTTO, A. E. *et al.* A step forward in the genome characterization of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*: karyotype analysis, sex chromosome system and repetitive DNAs through a cytogenomic approach. **Chromosoma**, v. 131, n. 4, p. 253-267, 2022.

GATTO, K. P.; BUSIN, C. S.; LOURENÇO, L. B. Unraveling the sex chromosome heteromorphism of the paradoxical frog *Pseudis tocantins*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1-23, 2016.

- GATTO, K. P. *et al.* Satellite DNA mapping in *Pseudis fusca* (Hylidae, Pseudinae) provides new insights into sex chromosome evolution in paradoxical frogs. **Genes**, v. 10, n. 2, p. 1-19, 2019.
- GATTO, K. P. *et al.* Sequencing of laser captured Z and W chromosomes of the tocanins paradoxical frog (*Pseudis tocanins*) provides insights on repeatome and chromosomal homology. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 35, n. 12, p. 1659-1674, 2021.
- GATTO, K. P. *et al.* Sex chromosome differentiation in the frog genus *Pseudis* involves satellite DNA and chromosome rearrangements. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. 301, p. 1-12, 2018.
- GIARETTA, A. A.; FACURE, K. G. Reproductive ecology and behavior of *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Anura, Leptodactylidae, Telmatobiinae). **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1-10, 2004.
- GIÓIA, I.; LIMA, R. S. *Zelleriella ubatubensis*, sp. n. (Protozoa: Opalinatea): entozoário de *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Anura, Leptodactylidae) de Ubatuba, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 2, n. 3, p. 147-151, 1984.
- GOES, C. A. G. *et al.* Revealing the satellite DNA history in *Psalidodon* and *Astyanax* characid fish by comparative satellitomics. **Frontiers in Genetics**, v.13, p. 1-12, 2022.
- GOES, C. A. G. *et al.* The satellite DNA catalogues of two Serrasalminidae (Teleostei, Characiformes): conservation of general satDNA features over 30 million years. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2023.
- GUTIÉRREZ, J. *et al.* Satellitome analysis on *Talpa aquitania* genome and inferences about the satDNAs evolution on some Talpidae. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2023.
- GUTKNECHT, J.; SPERLICH, D.; BACHMANN, L. A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. **Chromosoma**, v. 103, n. 8, p. 539-544, 1995.
- GUZMÁN, K. *et al.* Identification and characterization of a new family of long satellite DNA, specific of true toads (Anura, Amphibia, Bufonidae). **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2022.
- HEYER, W. R. *et al.* Frogs of Boracéia. **Arquivos de Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 231-410, 1990.
- INGHAM, L. D. *et al.* Origin of the main class of repetitive DNA within selected *Pennisetum* species. **Molecular & General Genetics**, v. 238, n. 3, p. 350-356, 1993.
- KUHN, G. C. S. 'Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*'. **Heredity**, v. 115, n. 1, p. 1-2, 2015.

- LOPES, B. B. *et al.* *Adelina* sp. (Apicomplexa: Adeleidae), a pseudoparasite of *Thoropa miliaris* Spix (Amphibia: Cycloramphidae) in Southeastern Brazil. **Coccida**, v. 1, n. 2, p. 26-31, 2013.
- LÓPEZ-FLORES, I. GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Genome Dynamics**, v. 7, p. 1-28, 2012.
- LUTZ, B. Ontogenetic evolution in frogs. **Evolution**, v. 2, n. 1, p. 29-39, 1948.
- MACAS, J. *et al.* Global sequence characterization of rice centromeric satellite based on oligomer frequency analysis in large-scale sequencing data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 17, p. 2101-2108, 2010.
- MACAS, J.; MÉSZÁROS, T.; NOUZOVÁ, M. PlantSat: a specialized database for plant satellite repeats. **Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 28-35, 2002.
- MALAGOLI, L. R. **Anfíbios da Serra do Mar: diversidade e biogeografia**. 2018. Tese (Zoologia) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2018. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/157102>. Acesso em: 21 set. 2023.
- MILANI, D. *et al.* Out of patterns, the euchromatic B chromosome of the grasshopper *Abracris flavolineata* is not enriched in high-copy repeats. **Heredity**, v. 127, n. 5, p. 475-483, 2021.
- MILANI, D. *et al.* Satellite DNAs unveil clues about the ancestry and composition of B chromosomes in three grasshopper species. **Genes**, v. 9, n. 11, p. 1-15, 2018.
- MÔNICO, A. T.; SILVA-SOARES, T.; KOCH, E. D. Malformation in three anuran species from a preserved remnant of Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 14, n. 2, p. 213-220, 2019.
- NIJMAN, I. J.; LENSTRA, J. A. Mutation and recombination in cattle satellite DNA: a feedback model for the evolution of satellite DNA repeats. **Journal of Molecular Evolution**, v. 52, n. 4, p. 361-371, 2001.
- NOVÁK, P. *et al.* RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 29, n. 6, p. 792-793, 2013.
- NOVÁK, P. *et al.* TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 12, p. 1-10, 2017.
- NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, v. 15, n. 11, p. 1-32, 2020.
- NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Methodology article graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 378, p. 1-12, 2010.

NUNES-DE-ALMEIDA, C. H. L. **Phylogenetic reconstruction based on internal and external morphology of genus *Thoropa* Cope, 1865 (Anura, Cycloramphidae)**. 2015. Dissertação (Biologia Animal) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2015. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/952051>. Acesso em: 27 mai. 2021.

NUNES-DE-ALMEIDA, C. H. L. *et al.* Redescription of the advertisement call of five species of *Thoropa* (Anura, Cycloramphidae), including recordings of rare and endangered species. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1-12, 2016.

OLIVEIRA, H. J. *et al.* New predation records on *Thoropa miliaris* (Anura: Cycloramphidae), with a review of known predators. **Revista Latinoamericana de Herpetología**, v. 5, n. 4, p. 115-119, 2022.

OLIVEIRA, H. J. *et al.* Trophic ecology of *Thoropa miliaris* (Anura: Cycloramphidae) in two mountain ranges of south-eastern Brazil. **Austral Ecology**, p. 1-16, 2023.

ORGEL, L. E.; CRICK, F. H. C. Selfish DNA: the ultimate parasite. **Nature**, v. 284, n. 5757, p. 604-607, 1980.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M. *et al.* Eight Million years of satellite DNA evolution in grasshoppers of the genus *Schistocerca* illuminate the Ins and outs of the library hypothesis. **Genome Biology and Evolution**, v. 12, n. 3, p. 88-102, 2020.

PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Satellite DNA in insects: a review. **Heredity**, v. 100, n. 6, p. 564-573, 2008.

PARDUE, M. L.; HENNIG, W. Heterochromatin: junk or collectors item?. **Chromosoma**, v. 100, n. 1, p. 3-7, 1990.

PARISE-MALTEMPI, P. P. *et al.* 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, n. 3, p. 218-223, 2007.

PEREIRA, J. A.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; LOPES, D. M. The satellite DNAs populating the genome of *Trigona hyalinata* and the sharing of a highly abundant satDNA in *Trigona* genus. **Genes**, v. 14, n. 2, p. 1-12, 2023.

PERTEL, W.; TEIXEIRA, R. L.; FERREIRA, R. B. Comparison of diet and use of bromeliads between a bromelicolous and a bromeligenous anuran at an inselberg in the Southeastern of Brazil. **Caldasia**, v. 32, n. 1, p. 149-159, 2010.

PESSOA, G. P. **Identificação e caracterização de DNAs satélites presentes no genoma de *Thoropa* (Anura, Cycloramphidae)**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/235584>. Acesso em: 17 mar. 2021.

PLOHL, M. *et al.* Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. **Gene**, v. 409, n. 1-2, p. 72-82, 2008.

- PLOHL, M. *et al.* Similarity of structural features and evolution of satellite DNAs from *Palorus subdepressus* (Coleoptera) and related species. **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, n. 2, p. 234-239, 1998.
- PONS, J. *et al.* Conservation of satellite DNA in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Gene**, v. 205, n. 1-2, p. 183-190, 1997.
- REBOUÇAS, R.; DA SILVA, H. R.; SANUY, D. Froghood: postmetamorphic development of the rock river frog *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Anura, Cycloramphidae). **Acta Zoologica**, v. 99, n. 2, p. 151-157, 2018.
- ROCHA, C. F. D. *et al.* Microhabitat use and orientation to water flow direction by tadpoles of the leptodactylid frog *Thoropa miliaris* in southeastern Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 36, n. 1, p. 98-100, 2002.
- RUIZ-RUANO, F. J. *et al.* Characterization of the satellitome in lower vascular plants: the case of the endangered fern *Vandenboschia speciosa*. **Annals of Botany**, v. 123, n. 4, p. 587-599, 2019.
- RUIZ-RUANO, F. J. *et al.* High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats. **Chromosoma**, v. 127, n. 3, p. 323-340, 2018.
- RUIZ-RUANO, F. J. *et al.* High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v. 6, n. 28333, p. 1-14, 2016.
- RUIZ-RUANO, F. J. *et al.* Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. **Chromosoma**, v. 126, n. 4, p. 487-500, 2017.
- SÁ-HUNGARO, I. J. B. *et al.* Parasitism by *Ornithodoros faccinii* (Ixodida: Argasidae) on *Thoropa miliaris* (Anura: Cycloramphidae) in Brazil. **International Journal of Acarology**, v. 43, n. 3, p. 194-198, 2017.
- SABBAG, A. F. **Filogeografia de *Thoropa* grupo *miliaris* (Anura: Cycloramphidae)**. 2013. Dissertação (Biologia Animal) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/87555/000713955.pdf?sequence=1>. Acesso em: 14 mai. 2021.
- SABBAG, A. F. *et al.* Molecular phylogeny of neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 122, p. 142-156, 2018.
- SABBAG, A. F. *et al.* Sympatric and independently evolving lineages in the *Thoropa miliaris* – *T. taophora* species complex (Anura: Cycloramphidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 166, p. 1-32, 2022.
- ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ, E.; PLOHL, M. Satellite DNAs - from localized to highly dispersed genome components. **Genes**, v. 14, n. 3, p. 1-22, 2023.
- SAZIMA, I. The occurrence of marine invertebrates in the stomach contents of the frog *Thoropa miliaris*. **Ciência e Cultura**, v. 23, n. 5, p. 647-648, 1971.

SCHMIDT, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 5, p. 195-199, 1998.

SENA, R. S. *et al.* Identification and characterization of satellite DNAs in two-toed sloths of the genus *Choloepus* (Megalonychidae, Xenarthra). **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-11, 2020.

SIQUEIRA, C. C. Feeding ecology of *Thoropa miliaris* (Anura, Cycloramphidae) in four areas of Atlantic Rain Forest, southeastern Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 40, n. 4, p. 520-525, 2006.

SMIT, A. F. A.; HUBLEY, R.; GREEN, P. RepeatMasker Open-4.0. 2017. Disponível em: <http://www.repeatmasker.org>. Acesso em: 25 abr. 2022.

SULTANA, N. *et al.* Bioinformatic and molecular analysis of satellite repeat diversity in *Vaccinium* genomes. **Genes**, v. 11, n. 5, p. 1-25, 2020.

TARAILO-GRAOVAC, M.; CHEN, N. Using RepeatMasker to identify UNIT 4.10 repetitive elements in genomic sequences. **Current Protocols in Bioinformatics**, 2009.

TEIXEIRA, R. L.; MILI, P. S. M.; RÖDDER, D. Ecology of anurans inhabiting bromeliads in a saxicolous habitat of southeastern Brazil. **Salamandra Journal**, v. 42, n. 2-3, p. 155-163, 2006.

UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles - causes and effects. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 22, p. 5955-5959, 2002.

UTSUNOMIA, R. *et al.* Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

VICARI, M. R. *et al.* Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 5, p. 1094–1116, 2010.

VITTORAZZI, S. E. *et al.* Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 2, 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, n. 111, p. 1-11, 2014.

ZIMMER, E. A. *et al.* Rapid duplication and loss of genes coding for the α chains of hemoglobin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 4, p. 2158-2162, 1980.