
Ciências Biológicas Integral

ÁGATA GARDINI DE SOUZA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MAPEAMENTO
CROMOSSÔMICO DE DNA SATÉLITE EM ESPÉCIES
DE *Leptodactylus* (Amphibia, Anura)**



Rio Claro - SP
2024

ÁGATA GARDINI DE SOUZA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MAPEAMENTO
CROMOSSÔMICO DE DNA SATÉLITE EM ESPÉCIES
DE *Leptodactylus* (Amphibia, Anura)**

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

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

Rio Claro - SP
2024

S729a

Souza, Ágata Gardini de

Análise citogenética e mapeamento cromossômico de DNA satélite em espécies de
Leptodactylus (Amphibia, Anura) / Ágata Gardini de Souza. -- Rio Claro, 2024
34 p. : il., tabs., fotos, mapas

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. Biologia molecular. 2. Cromossomos. 3. Hibridização in situ. 4. Citogenética animal. I.
Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

ÁGATA GARDINI DE SOUZA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MAPEAMENTO
CROMOSSÔMICO DE DNA SATÉLITE EM ESPÉCIES
DE *Leptodactylus* (Amphibia, Anura)**

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

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Patricia Pasquali Parise Maltempi
Dr. Marcelo João da Silva
Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral de Mello
Ms. Ana Elisa Gasparotto da Silva

Aprovado em: 06 de Junho de 2024

Ágata Gardini de Souza

Prof^a. Dr^a. Patricia Pasquali Parise Maltempi

Dr. Marcelo João da Silva

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Patricia Pasquali Parise Maltempi , pela oportunidade de ter sido Pati Team, pelos ensinamentos e pelo exemplo de resiliência. Ao co-orientador Dr. Marcelo João da Silva, pela paciência de um grande cientista e o auxílio de um grande guia.

À minha família Carla, Vó Marcia, Padrinho, Madrinha e Fernanda, por acreditarem no meu potencial e serem grandes exemplos de seres humanos.

Aos meus meninos, pela amizade mais forte e verdadeira que existe, e que me manteve sempre um sorriso no rosto para continuar.

Ao Eduardo, meu irmão de alma e maior presente que a UNESP me deu, pela cumplicidade de quem divide mil vivências em uma só vida.

Ao Diogo, minha outra metade, pelo apoio, pela certeza do amor, companheirismo e pela linda aventura que é viver com você.

Acima de tudo, à mamãe, por me ensinar a vida, por ser minha casa e pelo amor infinito que temos uma pela outra.

Por fim, agradeço profundamente à pesquisa brasileira, aos grandes exemplos de cientistas que temos na UNESP e no país. Obrigada pela história sólida de produção científica que serve de base a mim e a toda nossa nova geração. Tiro de nossas dificuldades o maior ensinamento que já tive: ciência não se faz sozinho.

“Tudo no mundo começou com um sim.
Uma molécula disse sim a outra molécula e nasceu a vida”.
(LISPECTOR, 1977, p.22)

RESUMO

Dentro das sequências de DNA dos eucariotos, podem ser encontradas cópias na totalidade do genoma ou em locais específicos, repetidas *in tandem*, ou seja, em sequência. Um exemplo dessas sequências repetidas é o chamado “DNA satélite” (DNAsat), presente em grande quantidade na maioria dos genomas de eucariotos. Conforme os estudos acerca dessas regiões de DNA avançam, identifica-se cada vez mais seu papel genético, que aborda desde funções celulares à processos evolutivos. Considerando a conservação dessas sequências no genoma, é interessante utilizar os DNAs satélite como guia para estudos comparativos de espécies animais principalmente mais aparentadas, no qual se faz necessário o uso de ferramentas citogenéticas para identificar diferenciações com resultados mais claros. É o caso, por exemplo, do gênero anuro *Leptodactylus*, em que semelhanças fenotípicas e de distribuição geográfica já fizeram com que espécies do mesmo grupo fossem confundidas na literatura. O presente projeto abordou citogeneticamente as espécies *Leptodactylus brevipes* e *Leptodactylus pentadactylus*, por meio extração de DNA, amplificação de sequências de DNAsat por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e análises de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Dessa forma, foi possível analisar a presença de ambos os DNAs satélites utilizados (LpeSat01-152 e LpeSat02-92) nas duas espécies estudadas pela amplificação em PCR. Também foi identificada a localização cromossômica do DNAsat LpeSat02-92 na espécie *L. pentadactylus* pela marcação na FISH. Esses resultados demonstram coerência à hipótese da biblioteca de DNAs satélites, uma vez que as duas espécies do mesmo gênero compartilham as sequências a partir de uma biblioteca ancestral. Além disso, ilustram a importância das técnicas moleculares aplicadas para os estudos de mapeamento cromossômico, bem como a possibilidade de caracterizar os DNAsats como marcadores moleculares para análises citogenéticas em anfíbios anuros.

Palavras-chave: Sequências repetitivas; Hibridização *in situ* fluorescente; Evolução; Cromossomos.

ABSTRACT

Within the eukaryotic DNA sequences, copies can be found in the totality or specific locations, repeated in tandem, i.e., in sequence. An example of these repeated sequences is called the “satellite DNA” (satDNA), present in great quantities in most eukaryotic genomes. As studies about these DNA regions progress, it's greater identified its genetic role, which approaches from cellular functions to evolutive processes. Considering the conservation of these sequences in the genome, it is interesting to use the satellite DNA as a guide to comparative studies of animal species, especially more related, where it becomes necessary to use cytogenetic tools to identify differentiations with clearer results. It could be the case, for example, of the anuran genus *Leptodactylus*, where similarities in phenotype and geographic distribution made species from the same group be mistaken in literature before. The present project approached cytogenetically the species *Leptodactylus brevipes* e *Leptodactylus pentadactylus*, with DNA extraction, amplification of sequences of satDNA by PCR (polymerase chain reaction) and analyses of Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH). Therefore, it was possible to analyze the presence of both satDNAs utilized (LpeSat01-152 e LpeSat02-92) on both species studied by PCR amplification. It was also identified the chromosomal location of satDNA LpeSat02-92 in the *L. pentadactylus* species by FISH marking. These results demonstrate coherency with the satellite DNA library hypothesis, as two species of the same genus share the sequences from an ancestral library. It also illustrates the value of the applied molecular techniques for chromosomal mapping studies, as well as the possibility to use satDNAs as molecular markers for cytogenetic analysis in anurans amphibians.

Key words: Repetitive sequences; *in situ* Hybridization; Evolution; Chromosomes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	O gênero <i>Leptodactylus</i> (Fitzinger, 1826) (Amphibia, Anura).....	10
1.2	Espécies <i>Leptodactylus pentadactylus</i> e <i>Leptodactylus brevipes</i>.....	13
1.3	Os DNAs satélite.....	16
2	OBJETIVO.....	18
3	METODOLOGIA.....	18
3.1	Material Citogenético.....	18
3.2	Extração de DNA total (gDNA).....	18
3.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	20
3.4	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	22
4	RESULTADOS.....	23
4.1	Extração de DNA.....	23
4.2	Reações de PCR de DNAs satélite.....	24
4.3	Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH) e imagens de microscopia UV	25
5	DISCUSSÃO.....	27
6	CONCLUSÃO.....	30
7	REFERÊNCIAS.....	31

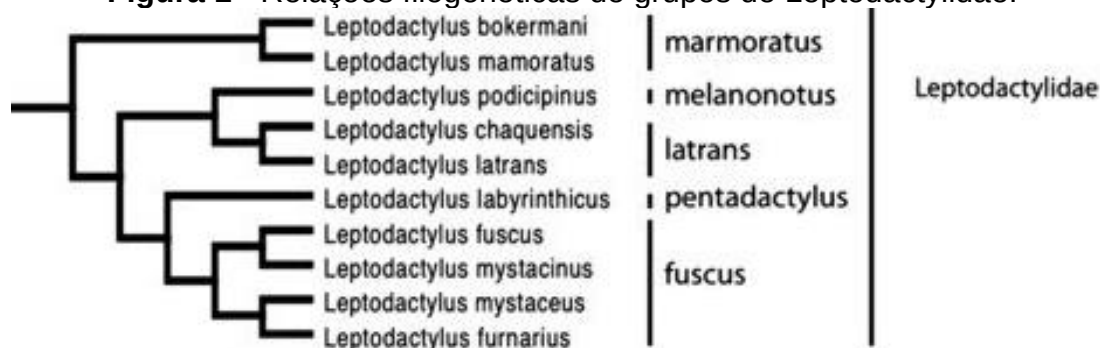
1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Leptodactylus* (Fitzinger, 1826) (Amphibia, Anura)

O gênero *Leptodactylus* (Fitzinger, 1826) envolve um grupo de espécies de sapos de clima neotropical, atualmente composto por 84 espécies, que alcançam tamanhos de médio a muito grande quando comparados à maioria dos anfíbios anuros da mesma região (De Sá *et al.*, 2014; Frost, 2024). As espécies do gênero estão distribuídas em 4 subgrupos: *L. fuscus*, *L. latrans*, *L. melanonotus* e *L. pentadactylus* (Heyer, 1969; De Sá *et al.*, 2014) (Figuras 1 e 2).

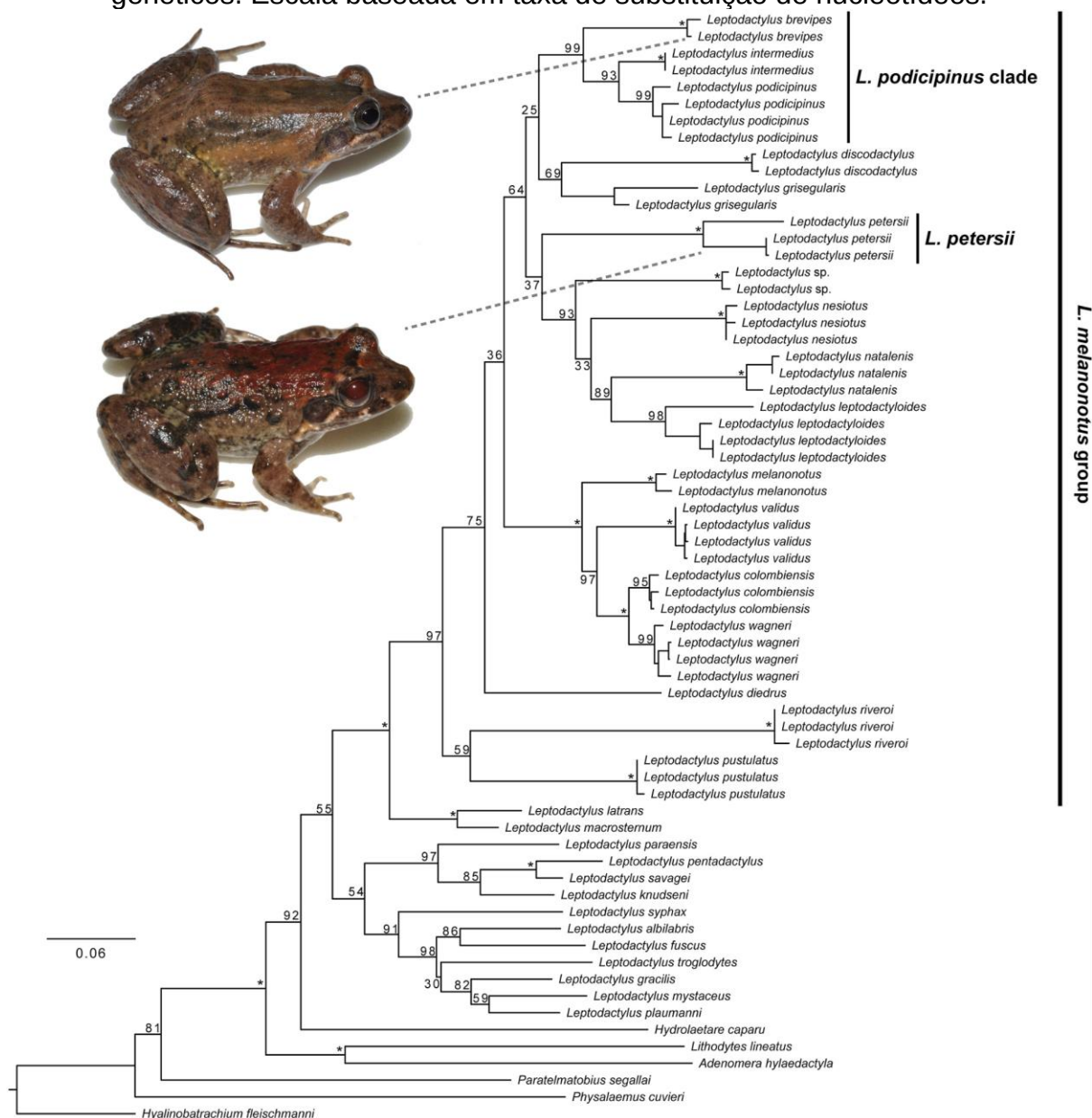
Por ser um clado abrangente, podem ser identificadas tanto espécies de forrageiros ativos, quanto predadores de espera em lagos e poças. Por esse motivo são associados a uma dieta de pequenos invertebrados, mas algumas espécies podem preda pequenos anuros e outros vertebrados. Apresentam vocalização bastante complexa, relacionada principalmente à reprodução, como por exemplo chamados de "avisos" para atrair fêmeas (no caso de *L. mystacinus*) e chamados de territorialidade e defesa (De Sá *et al.*, 2014). Ainda no tópico de reprodução, algumas espécies do gênero *Leptodactylus* costumam apresentar dimorfismo sexual, com membros anteriores hipertrofiados e, muitas vezes, a presença de espinhos nupciais, como acontece em *L. latrans* (De Sá *et al.*, 2014).

Figura 1 - Relações filogenéticas de grupos de Leptodactylidae.



Fonte: Provete *et al.* (2012).

Figura 2 - Relações filogenéticas do grupo *L. melanonotus* baseado em dados genéticos. Escala baseada em taxa de substituição de nucleotídeos.



Fonte: Gazoni *et al.* (2020) adaptado de De Sá *et al.* (2014).

O gênero *Leptodactylus* é distribuído geograficamente nas regiões da América do Sul, América Central e nas ilhas do Caribe (Frost, 2024) (Figura 3). O grupo tem grande distribuição latitudinal, mas é restrito em alcance de elevação, predominantemente encontrando-se em altitudes inferiores a 2.000 metros. Apesar disso, representantes de *Leptodactylus* são ecologicamente muito diversos, ocupando diferentes ambientes, de densas florestas úmidas amazônicas a habitats abertos como savana, cerrado e caatinga (De Sá *et al.*, 2014).

Figura 3 - Distribuição geográfica do gênero *Leptodactylus* (em cinza).



Fonte: De Sá *et al.* (2014).

Devido à sua ectotermia e hábito de vida transitório entre ambiente aquático e terrestre, anfíbios no geral são extremamente sensíveis à mudanças ambientais (Feder e Burggren, 1992). Mais especificamente, o gênero *Leptodactylus* pode ser considerado um bom exemplo de táxon utilizado para estudos de respostas de espécies acerca de impactos causados por mudanças ambientais, baseando-se na rede de relações filogenéticas que o grupo apresenta, levando em consideração modelos de reprodução variados e, principalmente, sua vasta distribuição geográfica.

O trabalho de Medina *et. al* (2020) utiliza desse gênero como objeto de estudo para analisar o efeito das mudanças climáticas em um contexto filogenético. A partir de seus resultados é possível prever um possível cenário de redistribuição das espécies de *Leptodactylus* frente à transformações de temperatura e clima, onde o autor projeta uma “diminuição da riqueza local de espécies (heterogeneidade biótica) e do potencial de distribuição, mas sem extinção de espécies”.

De modo geral, a consideração de *Leptodactylus* como grupo depende de análises de evidências, sejam elas baseadas em dados moleculares ou não. A documentação sistemática desse grupo, iniciando em 1826 com os trabalhos de Fitzinger, se baseou por muitos anos na descrição das espécies morfológicamente, bem como no entendimento de características ecológicas, até a inserção de estudos moleculares mais detalhados a partir do século 21. A união de estudos de métodos moleculares, como a amplificação de fragmentos de DNA ribossomal, e métodos não-moleculares, como a análise comparativa morfológica (por exemplo de amostra de esqueletos) e de uma série de comportamentos registrados, é uma importante ferramenta para o estudo da totalidade do grupo em questão (De Sá *et al.*, 2014).

1.2 As espécies *Leptodactylus pentadactylus* e *Leptodactylus brevipes*

Dentre as espécies de *Leptodactylus*, as estudadas no trabalho em questão são *Leptodactylus brevipes* (Figura 4) e *Leptodactylus pentadactylus* (Figura 5). A espécie *L. brevipes* (grupo *L. melanonotus*) é predominantemente encontrada no estado do Mato Grosso, mas também pode ser encontrada na região de divisa entre o Brasil e a Bolívia (Frost, 2024). A partir de estudos de morfologia, marcadores moleculares, vocalização e citogenética, *L. brevipes* foi considerada uma espécie diferente de *L. petersii* (Gazoni *et al.*, 2021), apesar de outros estudos já terem o considerado sinônimo à *L. podicipinus* (Rivero, 1961), *L. wagneri* (Heyer, 1970) e *L. petersii* (Heyer, 1994). Já a espécie *L. pentadactylus* tem sua distribuição localizada sob a Bacia do Rio Amazonas, do sul da Colômbia e sudeste da Venezuela, alcançando o sul do Peru, norte da Bolívia e, finalmente, a região norte Amazônica do Brasil (Frost, 2024). O grupo, inicialmente identificado por Heyer (1972 e 1979), apresenta alguns pontos distintivos da espécie observados por estudos como a caracterização de girinos (Duellman, 1978) e vocalização particular (Zimmerman, 1984).

Figura 4 - Exemplar de *Leptodactylus brevipes* em Alto Garças-MT.



Fonte: Thiago R. Carvalho, 2023

Figura 5 - Exemplar de *Leptodactylus pentadactylus* em Rio Branco-AC.



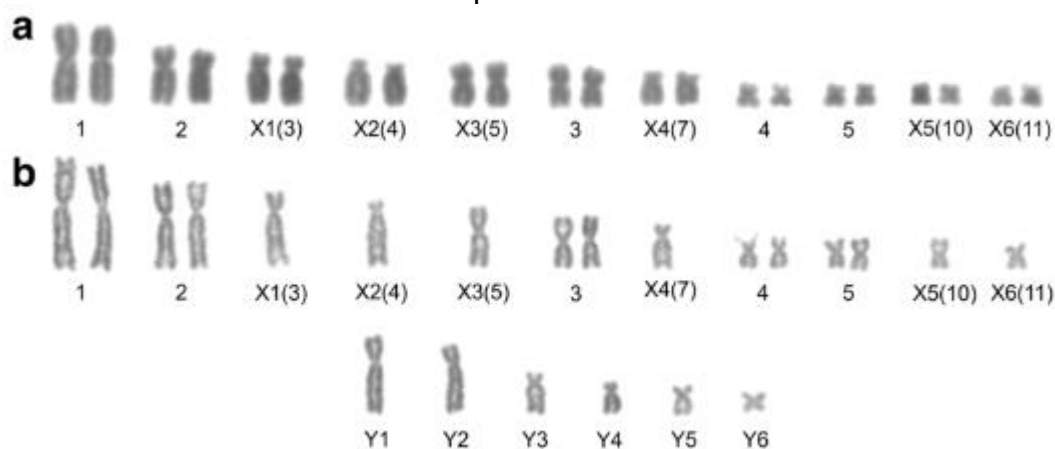
Fonte: Thiago R. Carvalho, 2023

O estudo acerca do cariótipo das espécies de anfíbios anuros é uma importante ferramenta para ajudar a entender a funcionalidade de seu genoma e sequências de DNA específicas, além de possibilitar a observação da organização dos cromossomos sexuais. Apesar da determinação sexual por cromossomos homomórficos ser uma característica majoritária entre anfíbios, há estudos recentes indicam novos e

complexos sistemas de cromossomos sexuais neste grupo (Gazoni *et al.*, 2018). Um exemplo disso é a particularidade morfológica de um anel meiótico composto por 12 cromossomos sexuais arranjados em cadeia, acompanhado de 5 outros cromossomos autossomos, identificado em análises citogenéticas de macho da espécie *L. pentadactylus*, sendo uma estrutura resultado de um processo evolutivo de translocação (Gazoni *et al.*, 2012).

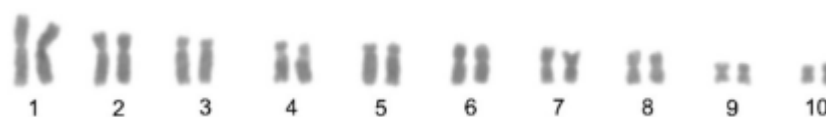
Anteriormente, Gazoni *et al.* (2011) apontaram que existe um cariótipo modelo ($2n=22$ e $NF=44$) do gênero *Leptodactylus*, compartilhado pela espécie *L. pentadactylus* (Figura 6). Este cariótipo foi considerado a partir de análise meiótica, hibridização *in situ* fluorescente e bandas de replicação, sendo que, pelo mesmo autor, foi identificado também o sistema cromossômico de determinação do sexo da mesma espécie ($X_1X_2X_3X_4X_5X_6:Y_1Y_2Y_3Y_4Y_5Y_6$), considerado o maior já relatado em vertebrados (Gazoni 2015). Nesse mesmo trabalho, ao avaliar indivíduos de *L. brevipes*, o autor considera o cariótipo da espécie, diferente do padrão do gênero, sendo este $2n=20$ (Figura 7). Essa diferença de cariótipo é considerada também em outro trabalho (Gazoni *et al.* 2021), onde há uma revalidação da espécie, em que *L. brevipes* deixa de ser considerada espécie sinônima de *L. petersii*, como apontado anteriormente.

Figura 6 - Cromossomos de *L. pentadactylus* com cariótipo montado de fêmea (a) e macho (b). A barra no canto inferior direito corresponde à escala de 5 μ m.



Fonte: Gazoni *et al.* (2018).

Figura 7 - Cariótipo de exemplar de *L. brevipes*.



Fonte: Gazoni *et al.* (2020).

1.3 Sequências repetitivas de DNAs satélites

Dentro das sequências de DNA dos eucariotos, podem ser encontradas cópias na totalidade do genoma ou em locais específicos, repetidas *in tandem*, ou seja, em sequência. Essas porções do DNA podem participar de diferentes processos no genoma, incluindo sua organização propriamente, participação na formação de telômeros e em processos de envelhecimento celular e possivelmente também na especiação (Garrido-Ramos, 2017).

A presença de sequências repetitivas no DNA, que chega a até 80% do genoma, aparece em sua maioria em regiões intergênicas, mas também em sequências modificáveis ou pseudogenes (Hommelsheim, 2014). Essas regiões do genoma podem se apresentar em longas repetições em certas posições, como os DNA satélites (DNAsat) ou dispersos pela totalidade do genoma, como é o exemplo de elementos transponíveis, mas em ambos os casos essas sequências têm sido mais facilmente encontradas em regiões centroméricas e subteloméricas dos cromossomos. Ambas as categorias de sequências repetitivas são grandes responsáveis pelas notáveis diferenças nos tamanhos dos genomas entre espécies, mesmo que estas não sejam tão relativamente distantes filogeneticamente (Biscotti *et al.*, 2015; Garrido-Ramos, 2017).

Os DNAsat são organizados em famílias, as quais se caracterizam pela relação de sequências curtas não codificantes arranjadas em tandem altamente repetidas. Podem estar presentes várias famílias em uma mesma espécie ou serem espécie-específicas. Portanto, utilizar os DNAsat e suas famílias pode auxiliar na identificação de filogenia aparentada, uma vez que espécies próximas evolutivamente podem compartilhar famílias de DNAsat em diferentes graus (Garrido-Ramos, 2017).

A catalogação dessas regiões repetitivas é uma ferramenta importante na abordagem genética no que se refere a identificar funções celulares e evolutivas dos DNAs satélites no genoma das espécies, como identificado na primeira extração de DNAsat para utilização em FISH em células sexuais de anfíbios do gênero *Xenopus*

(Thakur *et al.*, 2021; Gall e Pardue, 1969). Dentro de teorias que abordam processos evolutivos, famílias de DNAsat podem ser transmitidas verticalmente entre gerações, demonstrar conservação e relações intra e interespecíficas. É possível considerar a teoria de que há um caráter quantitativo desse DNA, ou seja, a aparição de um certo DNA satélite no genoma de uma espécie pode representar uma amplificação da expressão de uma sequência já existente. Estudos recentes também indicam que além do potencial de transmissão entre gerações dessas sequências, mutações e deleções são processos importantes a serem considerados no surgimento e desenvolvimento de DNAs satélites, levando à especiação (Belyayev *et al.*, 2020; Camacho *et al.*, 2022).

De modo geral, informações acerca de análises genômicas em anfíbios ainda são escassas pois são poucos os trabalhos que abordam estudos de DNAs satélites, apesar da importância desses resultados para estudos de diversas espécies. No entanto, recentemente, a partir de análises citogenéticas, genômicas e de bioinformática foi possível identificar para a espécie *Proceratophrys boiei* um grande número de DNAsat, sendo o maior número de famílias (226) já descrito para anfíbios anuros, além de possíveis relações evolutivas envolvendo essas sequências e cromossomos sexuais (João Da Silva *et al.*, 2023). Também pela utilização de DNAs satélites marcados por meio da FISH, foi possível detectar sua influência em estágios iniciais de heteromorfismo em cromossomos sexuais de outras espécies de anfíbios anuros, como *Pseudis bolbodactyla* e *P. tocantins* (Gatto *et al.*, 2018).

Como pontuado por diversos trabalhos, a caracterização cromossômica cada vez mais detalhada dos diferentes grupos de anuros estudados tem sido uma ferramenta muito importante na diferenciação e caracterização a níveis inclusive de espécie. O gênero *Leptodactylus* tem passado nos últimos anos por diversas modificações taxonômicas (Gazoni *et al.*, 2021) e neste sentido, análises citogenéticas de marcações moleculares de DNAs satélites podem ajudar a confirmar ou pelo menos traçar hipóteses evolutivas de relações filogenéticas entre espécies, além de acrescentar dados na literatura sobre essas sequências dinâmicas dos genomas eucariotos, sobretudo em anfíbios anuros.

2. OBJETIVOS

O trabalho em questão analisou os cromossomos das espécies *Leptodactylus pentadactylus* e *Leptodactylus brevipes* acerca da presença e localização cromossômica dos DNAs satélites LpeSat01-152 e LpeSat02-92, a partir de análises citogenéticas moleculares, a fim de aumentar o conhecimento do genoma e dessas sequências em específico, além de estudar o compartilhamento destas sequências, que podem estar desempenhando papéis estratégicos no genoma deste gênero de sapos.

3. METODOLOGIA

3.1 Material Citogenético

As análises citogenéticas foram realizadas com material de espécimes previamente coletados de *L. pentadactylus* e *L. brevipes* disponíveis no laboratório de Citogenética Animal, da UNESP Rio Claro. Os espécimes foram coletados no município de Paranaíta (MT) sob permissão concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio-SISBIO número de autorização 30202-2) e eutanasiados de acordo com a Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA – número de permissão 027/2011), coletas e permissões estas concedidas para trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do laboratório de Citogenética Animal. Foram analisados tecidos e preparações cromossômicas de medula óssea, fígado e testículos de exemplares machos e fêmeas armazenados e disponíveis no Laboratório provenientes de estudos anteriores (Gazoni *et al.*, 2012, 2018, 2021). As lâminas utilizadas foram preparadas com as amostras citadas, pingando de 2 a 3 gotas do material na lâmina em contato com o vapor de banho maria, e coradas inicialmente com solução de Giemsa diluída (Giemsa 1ml : H₂O destilada 30ml) o suficiente para cobrir as lâminas, para serem posteriormente armazenadas.

3.2 Extração de DNA total (gDNA)

A extração de DNA total das amostras de tecidos disponíveis seguiu o protocolo do kit comercial *Wizard® Genomic DNA purification kit* (Promega, WI, USA), com algumas modificações. Foram separadas amostras de fígado, medula e testículos, secas em papel toalha e trituradas manualmente com tesoura e pinça esterilizadas

em álcool 70% e chama. Os tecidos foram colocados em tubo de 1,5 ml e adicionado 600 µL de *chilled nuclei solution* (solução de lise de núcleo). O tubo foi brevemente agitado em vortex e incubado em banho-maria a 65°C por 30 minutos para nova agitação em vortex e incubado novamente por mais 30 minutos, totalizando 1 hora de incubação.

Foi adicionado 200 µL de *protein precipitation solution* (solução de precipitação de proteína) e colocado em freezer -20°C por 5 minutos. A solução foi então imediatamente centrifugada a 1400 rpm por 4 minutos. O sobrenadante da centrifugação foi transferido para um novo tubo para acrescentar 600µL de álcool isopropílico à temperatura ambiente, misturando a nova solução gentilmente com inversão. O tubo passou por centrifugação a 1400 rpm por 5 minutos e então foi descartado o sobrenadante resultante e acrescentado no precipitado restante 600µL de álcool 70% à temperatura ambiente, misturando gentilmente com inversão. O tubo passou por nova centrifugação a 1400 rpm por 5 minutos para então o sobrenadante ser descartado e o tubo com o precipitado resultante foi secado em estufa a 37°C por aproximadamente 15 minutos.

Após garantir que todo o álcool foi evaporado, o DNA precipitado foi reidratado com 150µL de H₂O MilliQ *overnight* em geladeira (4°C). Passado o período de reidratação, acrescentou-se 1,5µL de RNase (10mg/ml) para cada 150µL de DNA, deixando em estufa a 37°C por 30 minutos.

Após a extração, a qualidade das amostras extraídas foi analisada através de eletroforese em gel, com análise de bandas em transiluminador de luz ultravioleta. O gel de eletroforese foi preparado a partir de 0,5g de agarose e 50 ml de TAE 1x diluídos em 20 segundos em microondas. Foi adicionado 0,5µL de gel RED, despejando a solução em molde e aguardando o endurecimento do gel até a consistência ideal. O gel endurecido foi posicionado na cuba de eletroforese, preenchida com TAE 1x até o limite indicado. No primeiro poço do gel foi adicionado 1µL de *1 Kb Plus DNA ladder* (ThermoFisher®) como referência e nos demais, sempre 1µL de amostra de DNA juntamente com 1µL de *Blue Juice* (6x) para sinalização em luz ultravioleta. Os eletrodos foram posicionados em suas respectivas entradas e o equipamento foi configurado no padrão de 80V, 120 mA, 150W por 40 minutos.

3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para as reações de amplificação das sequências, foram utilizados os DNAs satélites LpeSat01-152 e LpeSat02-92, isolados de *L. pentadactylus* (Tabela 1) para a elaboração dos *primers* utilizados disponíveis em laboratório (Tabela 2). As amplificações foram realizadas seguindo protocolo já estabelecido: em um microtubo de PCR foram adicionados 33,5µL de H₂O MiliQ, 1µL da amostra de DNA, 5µL de solução tampão Taq Buffer, 4µL de Cloreto de Magnésio (50mM), 1µL de Primer F, 1µL de Primer R, 1µL de dNTPs mix e 0,5µL Taq Polimerase (adicionada por último para manter sua qualidade em baixas temperaturas), totalizando 47µL. O tubo foi levado ao Termociclador Modelo Veriti 96-Well, com programação pré-selecionada (Tabela 3). Para determinar a temperatura de anelamento, específica para cada *primer*, foi feito um teste de temperaturas em rampa, selecionando a mesma configuração do processo, porém nas temperaturas de 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C e 62°C. Houve aparição de banda esperada em gel de agarose entre as temperaturas de 56 a 60°C, sendo esta última a de maior clareza, considerada então a temperatura ideal neste experimento. Para garantir a presença e verificação da qualidade dos produtos de PCR amplificados, foi realizada análise de eletroforese em gel de agarose 1% + GelRed a cada amplificação. As amostras foram eluídas em Blue Juice (6x) para visualização da corrida em gel, utilizando marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (ThermoFisher®) como referência para determinar o tamanho das bandas formadas, e ao final, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

Tabela 1 - Informações dos DNA satélite LpeSat01-152 e LpeSat02-92.

Identificação do Satélite	Proporção A-T	Tamanho do Monômero	Consenso/ Monômero
LpeSat01-152	54,6 %	152 pb	CTTGCATGCCCCG AGATAATCGCTA GAGTAATGTCAT GTTCACTCAATG GAGAAAATCACAT TTCGCGTAGTTCA AGCTACCAACTTC TCCGACTAGGGT TTGATGGGGTGC CACGAGTTATACT TACTGGTGAAGTT

			TCCCTTTCATGGC AC
LpeSat02-92	42,3%	92 pb	TTAAACCAGGGG TGTGCGTTATTGC CACGTTAATGGC GCGCTCGCCTTC GCAAAGGCGATG GGGTCACCTGGG ACTAAACGTCGC CCTGCAT

Fonte: Crepaldi *et al.* - dados não publicados

Tabela 2 - Oligonucleotídeos (*primers*) utilizados em reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação de DNAs satélites LpeSat01-152 e LpeSat02-92

Satélite	Sentido de Reação	Sequência Alvo
LpeSat01-152	Iniciador 5' (forward)	CCCGAGATAATCGCTA GAGT
	Iniciador 3' (reverse)	CATGCAAGGTGCCATG AAAG
LpeSat02-92	Iniciador 5' (forward)	ACTAAACGTCGCCCTG CATTGG
	Iniciador 3' (reverse)	GCCCAGTGACCCCATC GCCT

Fonte: Tagliaferro *et al.* - dados não publicados

Tabela 3 - Configuração utilizada no termociclador para PCR. A temperatura de anelamento (*) pode variar a depender da necessidade da amostra.

Estágio		Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação Inicial		94	5'
Ciclo (30x)	Desnaturação	94	30''
	Anelamento	60*	30''
	Extensão	72	1'20''
Extensão Final		72	5'
Hold		4	-

Fonte: Autoria própria.

3.4 Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

A FISH foi realizada a partir dos produtos obtidos na PCR, de acordo com o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986) e modificado por Cabral-de-Mello e Marec (2021). A PCR de marcação “*Nick translation*” para confecção da sonda consiste em uma solução de 8,14 µL de água Milli Q + 2 µL de NT Buffer (10x) + 0,4 µL dCTP (0,2 mm) + 0,4 µL dGTP (0,2 mm) + 0,4 µL dATP (0,2 mm) + 0,4 µL dTTP (0,2 mm) + 0,52 µL digoxigenina + 3 µL DNase + 3 µL de produto de PCR de amplificação, totalizando solução suficiente para 4 tubos, onde cada tubo é utilizado para 2 lâminas analisadas. A solução passa por termociclador em programa padrão.

O primeiro dia do processo de FISH inicia-se com um pré-tratamento das lâminas utilizadas, primeiramente fixadas em solução Carnoy (metanol : ácido acético glacial - 3:1) por 20 minutos, seguida de uma desidratação alcoólica em série nas concentrações de 70%, 90% e 100%, por 5 minutos cada. As lâminas são então incubadas a 37°C até secarem completamente (o que leva em torno de 20 minutos) e lavadas 1 vez em solução de cloreto de sódio 2xSSC por 5 minutos. A solução de 2xSSC é obtida a partir da diluição de 50 ml de uma solução de 20xSSC em 450 ml de água destilada. Já a solução de 20xSSC é obtida a partir da diluição de 175,3 g de cloreto de sódio (NaCl) e 88,2 g de citrato de sódio em 800 ml de água destilada, sob agitação constante até a diluição aparente completa, para finalizar com mais 200 ml de água destilada. A FISH então segue para incubação em cubeta de Coplin com solução de formaldeído (8 ml de formaldeído + 8 ml de PBD [0,008 g de leite em pó desnatado + 1600 µL de 20xSSC + 80 µL de Triton]) por 10 minutos em temperatura ambiente.

Após o tratamento, as lâminas são lavadas 2 vezes em 2xSSC, por 5 minutos cada, em temperatura ambiente. Seguem então para desidratação alcoólica em série nas concentrações de 70%, 90% e 100%, por 5 minutos cada, e deixadas na estufa por 30 minutos. O próximo passo da FISH é a hibridização, onde a solução de sonda (3 µL de sonda + 3 µL de sulfato dextrano 50% + 1,5 µL de 20xSSC + 7,5 µL de formamida 100% - valores por cada lâmina) é desnaturada em termociclador a 95°C por 10 minutos e colocada imediatamente em contato com gelo por 5 minutos. Após o resfriamento, coloca-se cerca de 15 µL da sonda sobre a lâmina, cobrindo com lamínula. É então feita a transferência das lâminas para um placa de petri em banho maria a 75°C. O tempo de desnaturação é variável entre espécies, então foram feitos alguns testes de tempos diferentes (de 3, 3:30, 4, 4:30 e 4:40 minutos) para que o

tempo ideal fosse identificado como 3:30 minutos. As lâminas são então transferidas para câmara úmida com 2xSSC em estufa a 37°C em processo *overnight*.

O segundo dia da FISH inicia com uma sequência de banhos pós-hibridização, mergulhando as lâminas primeiramente em solução 2xSSC a temperatura ambiente por 5 minutos, retirando com cuidado as lamínulas. A lavagem das lâminas segue com incubação a 42°C: 2 vezes em 2xSSC por 5 minutos cada; 2 vezes em 0,1xSSC por 5 minutos cada; 1 vez em 2xSSC por 5 minutos; agitando levemente as cubetas entre as lavagens. As lâminas são então transferidas para cubeta com 2xSSC a temperatura ambiente por 10 minutos e, por fim, para cubeta com PBD a temperatura ambiente brevemente até o próximo passo, de detecção. Na detecção, é necessário aplicar em cada lâmina 100 µL de solução de detecção (100 µL de PBD + 0,5 µL de antidigoxigenina) e cobrir com lamínula, deixando-as incubadas em câmara úmida por 1 hora em estufa a 37°C.

A fotossensibilidade da antidigoxigenina faz necessária a aplicação da solução de detecção na ausência de luz. Passada a incubação, a lamínula pode ser removida e as lâminas, lavadas 3 vezes em PBD a 45°C por 5 minutos cada. A finalização da hibridização *in situ*, que também é feita na ausência de luz, consiste na montagem da lâmina com 10 µL de Vectashield/DAPI, cobrindo com lamínula, e armazenando as lâminas finalizadas cobertas da luz, em geladeira.

Os cromossomos submetidos à técnica de FISH foram examinados sob luz ultravioleta e com uso de filtros específicos, utilizando o microscópio BX51 da Olympus. A captura digital das imagens é por câmera DP71 acoplada a um computador, através do software DP controller. As imagens dos cromossomos corados com DAPI e a de marcação com a digoxigenina foram sobrepostas no próprio DP controller. Ajustes de brilho, contraste e a montagem de pranchas foram realizados pela plataforma Canva.

4. RESULTADOS

4.1 Extração de DNA.

Após a extração de DNA total das espécies estudadas para realização das PCRs citadas, foi possível obter dados de quantificação da amostra da espécie *L. pentadactylus* a partir de resultados do espectrofotômetro Nanodrop. A amostra correspondeu a uma concentração de 607,7 ng/µL, indicando alta concentração de

DNA total na extração. O gel de eletroforese com as amostras também indica alta concentração de DNA extraído devido à presença de bandas claras e de tamanho (bp) esperado de acordo com o medidor correspondente ao ladder utilizado (*1 Kb Plus DNA ladder* ThermoFisher®).

4.2 Reações de PCR de DNAs satélite

Foram realizados experimentos de amplificação por reação de polimerização em cadeia dos DNAs satélites (LpeSat01-152 e LpeSat02-92) utilizando os primers descritos previamente, de acordo com o protocolo descrito no item 3.3. As bandas obtidas foram comparadas em seu tamanho com o ladder correspondente (*1 Kb Plus DNA ladder* ThermoFisher®) para serem confirmadas. As amostras obtidas a partir da reação foram utilizadas como sondas na hibridização *in situ*.

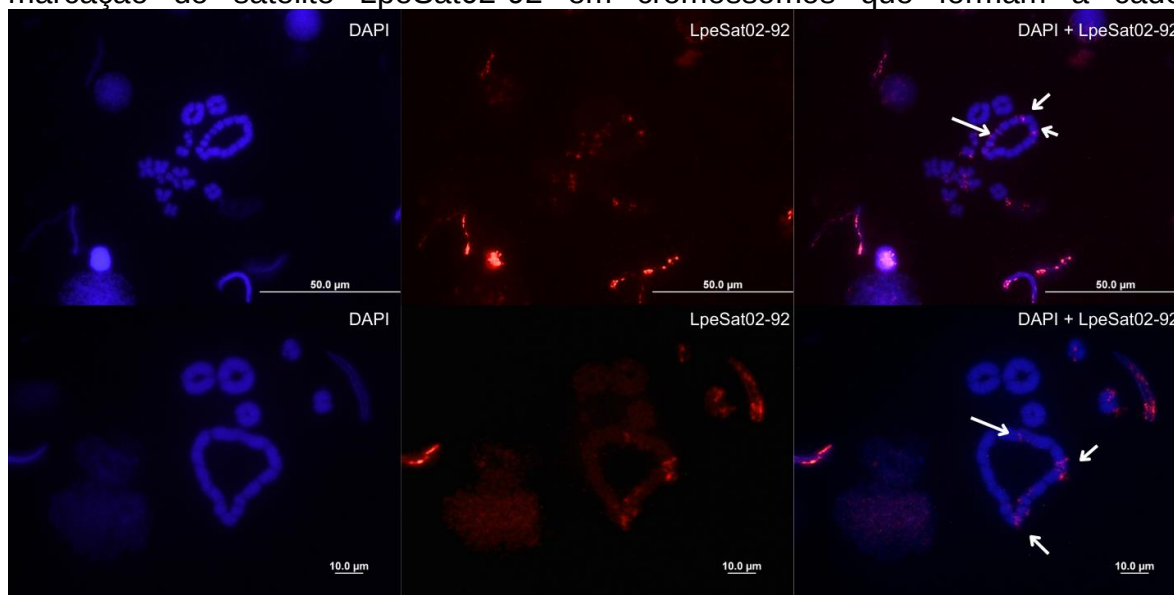
Para a PCR de amplificação com a sequência do primer LpeSat02-92 resultar em banda visível, foi necessário adaptar o protocolo original de configuração do equipamento termociclador para uma temperatura ideal à amostra. Para isso, a PCR foi replicada em 5 microtubos eppendorf de 0,2 mL, cada um sofrendo simultaneamente uma temperatura de anelamento diferente no ciclo: 52°C, 54°C, 56°C, 58°C e 60°C. O intervalo escolhido para este teste levou em conta temperaturas de anelamento conhecidas de experimentos anteriores. Analisando o resultado da reação em gel de eletroforese, baseado na presença e clareza de visualização da banda formada, a temperatura ótima de anelamento do primer LpeSat02-92 para as amostras utilizadas foi de 60°C, temperatura então padronizada para as duas espécies no decorrer do trabalho para este primer. O mesmo ocorreu com o primer LpeSat01-152, onde também foi necessário adaptar as configurações padrões de uso do termociclador com um teste de rampa de temperatura de anelamento, com 6 microtubos de réplicas técnicas para a mesma amostra em temperaturas de 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C e 62°C, considerando a mesma lógica utilizada anteriormente. A temperatura de anelamento identificada como ideal neste caso foi de 62°C para a espécie *L. brevipes*, e 54°C para a espécie *L. pentadactylus* para o primer em questão.

4.3 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e imagens de microscopia UV

Após o processo de marcação e hibridização realizados nas amostras, foi feita a observação em microscopia em luz UV e obtidas imagens. Apesar de terem sido realizados experimentos objetivando amplificação e marcação das amostras com o satélite LpeSat01-152, não existem registros visuais (imagens de gel de eletroforese ou de microscopia por fluorescência) devido à perda de material causado pelo incêndio do dia 31 de agosto de 2022, que afetou o laboratório de Citogenética Animal, localizado no Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro. Com o incidente, além das atividades do grupo terem levado tempo para serem retomadas, materiais de lâminas preparadas e amostras de estoque de DNA foram permanentemente perdidos, impossibilitando a continuidade do presente projeto.

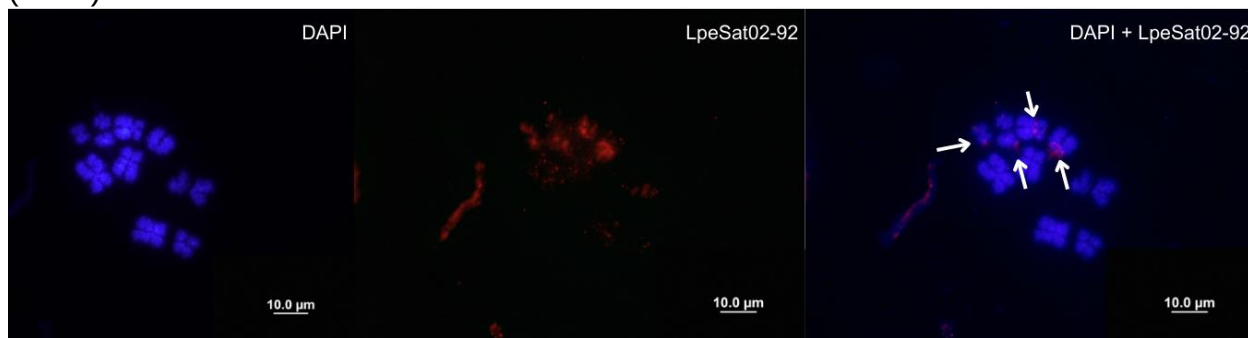
Porém, foi possível recuperar imagens de material de testículo (Figuras 8 e 9), objetivando marcar cromossomos sexuais, e fígado (Figura 10) da espécie *L. pentadactylus*, e material de medula da espécie *L. brevipes* (Figura 11), todos correspondentes a sequência LpeSat02-92. Nestes, observa-se sinais nos cromossomos indicando a presença da sequência LpeSat02-92 em todas as amostras correspondentes à espécie *L. pentadactylus*.

Figura 8 - Meiose de testículo de espécie *L. pentadactylus*. As setas indicam a marcação do satélite LpeSat02-92 em cromossomos que formam a cadeia.



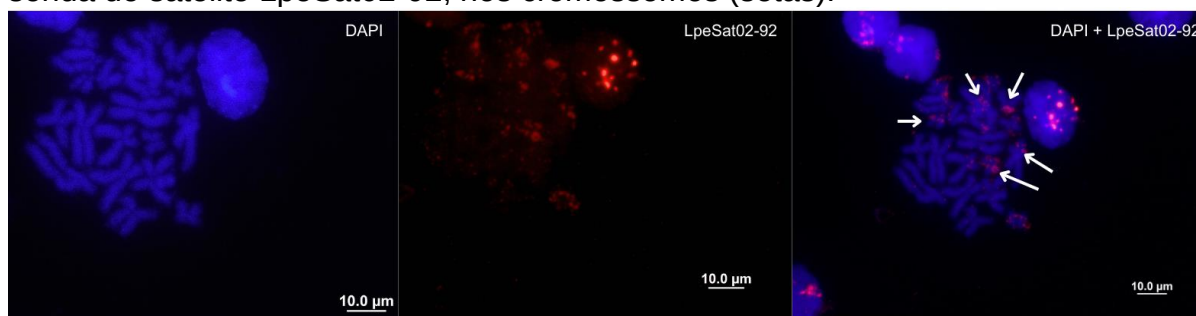
Fonte: Autoria própria.

Figura 9 - Meiose de testículo de espécie *L. pentadactylus*. As setas indicam a marcação do satélite LpeSat02-92 em cromossomos que formam a cadeia. Os cromossomos sexuais da espécie neste caso não organizam-se em formato anelar (n=11).



Fonte: Autoria própria.

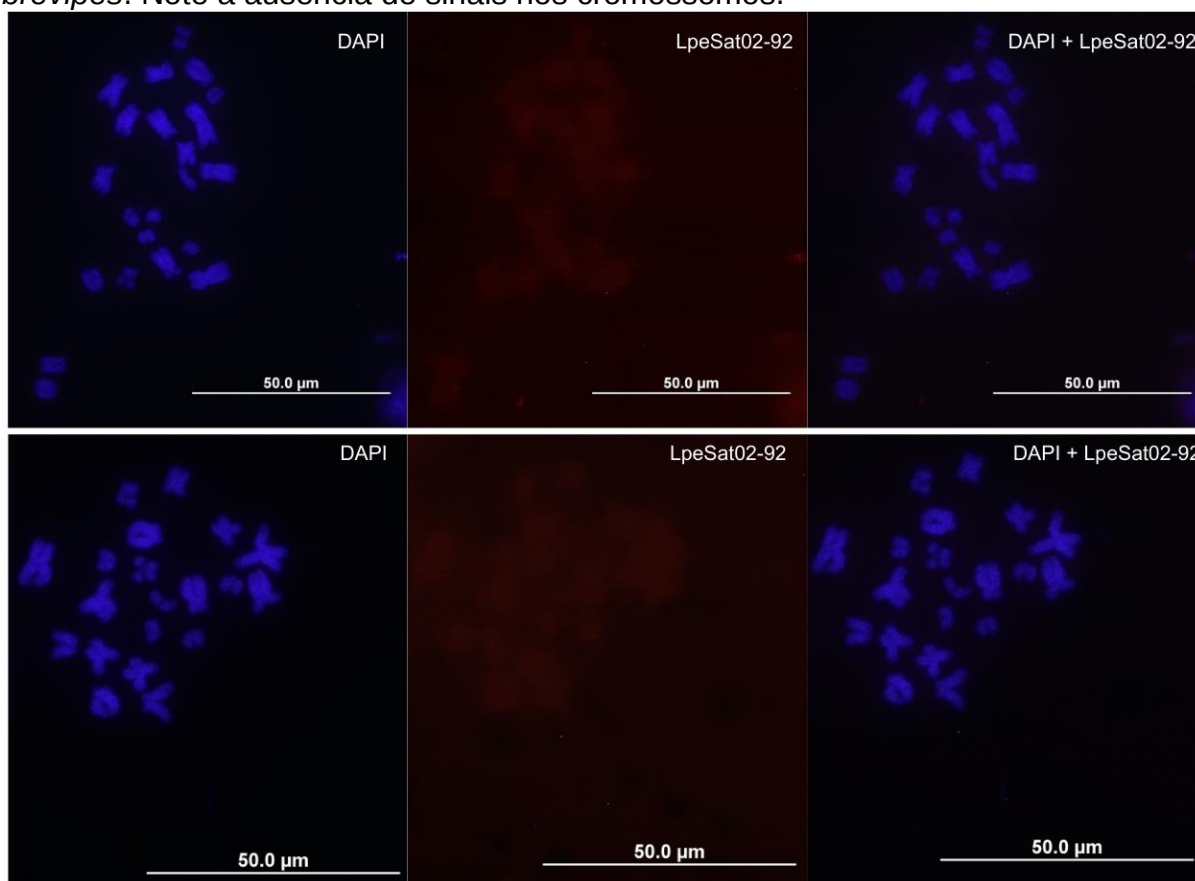
Figura 10 - Metáfases mitóticas da espécie *L. pentadactylus*. Note a marcação da sonda do satélite LpeSat02-92, nos cromossomos (setas).



Fonte: Autoria própria.

Apesar de serem submetidas ao mesmo protocolo de hibridização das amostras de *L. pentadactylus* e terem demonstrado amplificação positiva nos resultados de PCR, os cromossomos provenientes de medula da espécie *L. brevipes* não apresentaram marcação para a sequência LpeSat02-92 (Figura 11).

Figura 11 - Imagens de metáfases mitóticas de material de medula da espécie *L. brevipes*. Note a ausência de sinais nos cromossomos.



Fonte: Autoria própria.

5. DISCUSSÃO

O presente projeto objetivou realizar um trabalho de comparação de presença e posição de DNAs satélites no genoma de duas espécies de anuros do gênero *Leptodactylus* a partir de análises moleculares com as regiões descritas LpeSat01-152 e LpeSat02-92. Assim como já descrito na literatura, foi possível reconhecer uma organização em formato anelar dos cromossomos sexuais na espécie *L. pentadactylus*, possível resultado de diversas translocações raras no processo de segregação meiótica, para a formação de gametas (Gazoni *et al.*, 2012; Noronha *et al.*, 2020). Esse formato não necessariamente se mantém em todos os materiais extraídos de gônadas, como observado.

A cariotipagem desse grupo não é padrão e pode variar entre espécies, como de $2n=22$ (para *L. labyrinthicus* e *L. pentadactylus*), $2n=24$ (*L. silvanimbus*) e $2n=20$ (*L. brevipes*) (Gazoni *et al.*, 2020; Garrido-Ramos, 2017). Essa variação já foi

explorada por Amaro-Ghilardi (2006), sugerindo algumas hipóteses: a primeira em que o cariótipo ancestral seria $2n=22$ e que um evento de fissão cromossômica e subsequente inversão pericêntrica teria resultado em um novo par de cromossomos, sendo assim $2n=24$; ou que o cariótipo ancestral teria $2n=24$ e que teria derivado o cariótipo $2n=22$ a partir de uma inversão pericêntrica seguida de uma fusão entre cromossomos. Apesar do trabalho citado ter sido publicado anteriormente aos estudos que sugerem o cariótipo $2n=20$ para *L. brevipes* (Gazoni *et al.*, 2020), ainda levando em conta as diversas ploidias já conhecidas no grupo, seria considerado que $2n=24$ seria a ploidia ancestral para *Leptodactylus* (apesar de estar reconhecida apenas em uma espécie - *L. silvanimbus*), e os demais representantes seriam resultado de uma deriva.

Para os resultados de hibridização realizada com LpeSat02-92, foi identificada marcação apenas em amostras de *L. pentadactylus*, apesar da amplificação ter sido positiva em ambas as espécies. Outra característica já identificada para o comportamento e localização de DNAs satélites como um todo é sua presença na porção centromérica da heterocromatina (Garrido-Ramos, 2017), observado em alguns dos cromossomos marcados em *L. pentadactylus* deste trabalho, apesar de não integralmente. Como citado anteriormente, o incêndio ocorrido em agosto de 2022 no prédio do Instituto de Biociências da UNESP impossibilitou a recuperação dos resultados em imagem de experimentos de hibridização e marcação com o primer LpeSat01-152. Apesar disso, as anotações recuperadas contendo as informações dos experimentos realizados até então relatam que foi possível identificar presença de banda de DNA em gel de eletroforese contendo primer LpeSat01-152 em amostras das duas espécies. Antes das atividades práticas serem interrompidas pelo incidente citado, houve uma tentativa de realizar a marcação com LpeSat01-152 para a espécie *L. brevipes*, mas não foi possível identificar o anelamento. Seriam necessárias mais tentativas de marcação com adaptações de protocolo, principalmente no tempo de desnaturação durante a hibridização.

A presença de banda de DNA em gel de eletroforese na amplificação do primer LpeSat01-152 em *L. pentadactylus* e *L. brevipes* é um sinal de compartilhamento de sequência entre espécies diferentes, como sugerido pela hipótese da biblioteca de DNAs satélites. Esta consiste em explicar a evolução dos DNAs satélites no genoma a partir de uma “biblioteca” de sequências conservadas comuns. A amplificação dinâmica dessas sequências satélites em comum seria uma explicação para a

variação entre espécies: o processo de especiação surge de mudanças quantitativas de DNAs satélites advindos da biblioteca, construindo um perfil comparativo entre espécies a partir dessas sequências.

Além disso, é proposto que é essencial na evolução de uma sequência satélite que a mesma adquira função biológica para que seja mantida na biblioteca entre grandes períodos evolutivos e, portanto, ainda entre espécies (Fry e Salser, 1977; Mestrovic *et al.*, 1998). Ou seja, entende-se que o sucesso na amplificação do satélite no DNA das duas espécies neste trabalho advém do compartilhamento dessas sequências na biblioteca originalmente e que, provavelmente, essas porções do DNA seguem em cada espécie uma trajetória evolutiva diferente.

A técnica de FISH utilizada no presente trabalho para observar a posição das regiões de interesse nos cromossomos é utilizada em outros estudos de DNA satélite em anuros. Para Vittorazzi e colaboradores (2014), a FISH possibilitou a marcação do DNA satélite PcP190 em representantes das famílias Hylodidae e Leptodactylidae, esta última onde o gênero *Leptodactylus* se encontra. A detecção desse DNA satélite, derivado de DNA ribossomal 5s de espécies ancestrais, nos genomas de duas famílias indica a distribuição e, principalmente, conservação dessas sequências nos anfíbios estudados. Além disso, seu dinamismo diferencial nos cromossomos de uma das espécies em questão (*Physalaemus ephippifer*) contribui para a diferenciação nos processos de determinação de seus cromossomos sexuais, tópico de especial atenção em estudos de anuros. Também é possível encontrar trabalhos em que a FISH é empregada em diferentes componentes genômicos para *Leptodactylus*, como para a identificação de sequências teloméricas em estudos comparativos de espécies do gênero, incluindo *L. pentadactylus* (Amaro-Ghilardi, 2004 e 2006). Este caso - onde foi confirmada a presença da sequência de interesse em três espécies de *Leptodactylus* - é também um exemplo de como estudos moleculares de regiões repetitivas específicas do genoma (como DNAs satélites ou, nesse, sequências teloméricas intersticiais - TTAGGG) podem traçar uma hipótese evolutiva entre espécies de um mesmo gênero ao elucidar fenômenos moleculares de rearranjo cromossômico.

O aprofundamento acerca do genoma de anfíbios ainda carece de estudos de mapeamento cromossômico de sequências satélites. Em trabalhos para a espécie *Proceratophrys boiei* foi utilizada a mesma abordagem molecular de mapeamento de sequências, havendo marcação de DNAs satélites predominantemente em regiões

peri e centroméricas dos cromossomos. Apesar disso, é possível reconhecer que existe uma certa limitação em obter resultados claros pela marcação da FISH, mesmo em sequências de satélites abundantes no genoma (João Da Silva et al., 2023; Da Silva et al., 2024). Sugere-se que mais trabalhos sejam realizados nessa área a fim de adaptar os protocolos e especificar os experimentos para obter mais acurácia nas marcações desejadas.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos no trabalho em questão contribuem para o refinamento de técnicas de biologia molecular acerca de amostras de espécies do gênero de anuros *Leptodactylus*, bem como apresenta informações de genoma e cariótipo das espécies *Leptodactylus brevipes* e *Leptodactylus pentadactylus*, importantes para estudos de citogenética. A organização de cromossomos sexuais da espécie *L. pentadactylus* em formato anelar foi identificada, assim como descrito na literatura. Em ambas as espécies estudadas foi possível amplificar por PCR os dois DNAs satélites utilizados no projeto, podendo indicar similaridade em seu conteúdo genômico, assim respaldada pela hipótese da biblioteca de DNAs satélites. Apesar disso, a marcação com DNA satélite LpeSat02-92 pela técnica de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi obtida em amostras de tecido de fígado e testículo apenas da espécie *L. pentadactylus*. Não foi possível realizar FISH para o DNA satélite referente a LpeSat01-152 em nenhuma das espécies utilizadas no trabalho. Para aprofundar o conhecimento acerca de relações evolutivas entre as espécies citadas, ou outras do mesmo grupo, seria necessário adaptar ainda mais a técnica para que o mapeamento de regiões de interesse seja efetivo e os estudos de satelitoma, mais completos. A FISH se mostra uma técnica de grande importância quando é preciso discutir sobre a organização cromossômica de organismos, com grande utilidade na comparação entre espécies de anfíbios. Além disso, observa-se que os DNAs satélites funcionam como importantes ferramentas moleculares para obter dados a respeito de estudos evolutivos em anuros.

7. REFERÊNCIAS

- AMARO-GHILARDI, R. C.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal studies after differential staining and fluorescence *in situ* hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). **Caryologia; giornale di citologia, citosistemica, e citogenetica**, v. 57, n. 1, p. 53–65, 2004.
- AMARO-GHILARDI, R. C. et al. Karyotypes of eight species of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with a description of a new karyotype for the genus. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 5, n. 2, p. 119, 1 dez. 2006.
- BELYAYEV, A.; JANDOVÁ, M.; JOSEFIOVÁ, J.; KALENDAR, R.; MAHELKA, V.; MANDÁK, B. et al. The major satellite DNA families of the diploid *Chenopodium album* aggregate species: arguments for and against the “library hypothesis”. **PLOS ONE**, v. 15, p. 10, 2020.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 415-420, 2015.
- CAMACHO, J. P. M.; CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; MARTÍN-PECIÑA, M. PERFECTTI, F.; GARRIDO-RAMOS, M. A.; RUIZ-RUANO, F. J. Satellitome comparison of two oedipodine grasshoppers highlights the contingent nature of satellite DNA evolution. **BMC Biology**, v. 20, n. 1, p. 1-24, 2022.
- DA SILVA, M. J. et al. Interspecific cytogenomic comparison reveals a potential chromosomal centromeric marker in *Proceratophrys* frog species. **Chromosoma**, 2024.
- DE SÁ, RAFAEL; GRANT, TARAN; CAMARGO, ARLEY; HEYER, W; PONSÁ, MARIA; STANLEY, EDWARD. Systematics of the Neotropical Genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae): Phylogeny, the Relevance of Non-molecular Evidence, and Species Accounts. **South American Journal of Herpetology**. v. 8, p. 1–128, 2014.
- DUELLMAN, W. E. The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. Miscellaneous Publication. **Museum of Natural History**, v. 65, p. 1–352, 1978.
- FEDER, M. E.; BURGGREN, W. W. **Environmental physiology of the amphibians**. Disponível em: <<https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/E/bo3636401.html>>. Acesso em: Abril de 2024
- FITZINGER, Leopold Joseph; HOF-NATURALIEN-CABINET., V. (AUSTRIA) K. K. **Neue classification der reptilien nach ihren natürlichen verwandtschaften :**

nebst einer verwandtschafts-tafel und einem verzeichnisse der reptilien-sammlung des K. K. zoologischen museum's zu Wien. [s.l.] Wien, J. G. Heubner, 1826, 1826.

FROST, D. R. 2024. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1 (Abril, 2024). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001

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

GALL, JOSEPH; PARDUE, MARY LOU. Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations. **Genomics: Gall and Pardue**, v. 63, p. 378-383, 1969.

GARRIDO-RAMOS, M. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, v. 8, n. 9, p. 230, 18 set. 2017.

GATTO, K. P. et al. Sex chromosome differentiation in the frog genus *Pseudis* involves satellite DNA and chromosome rearrangements. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 371621, 2018.

GAZONI, THIAGO. **Marcadores citológicos no cariótipo de espécies de *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) analisados com técnicas de citogenética clássica e molecular.** 2011. 99 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2011.

GAZONI, THIAGO. **Diversidade cariotípica e molecular de *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) e obtenção de sondas cromossomo-específicas de anfíbio por citometria de fluxo.** 2015. 85 f. Tese - (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2015.

GAZONI, T.; Gruber, S. L.; Silva, A. P. Z.; Araújo OGS, Narimatsu H, Strüssmann C, Haddad CFB, Kasahara S. Cytogenetic analyses of eight species in the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1843 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), including a new diploid number and a karyotype with multiple translocations. **BMC Genet**, v. 13(1), p. 109, 2012.

GAZONI, T; HADDAD, CFB; NARIMATSU, H; CABRAL-DE-MELLO, DC; LYRA, ML; PARISE-MALTEMPI, PP. More sex chromosomes than autosomes in the Amazonian frog *Leptodactylus pentadactylus*. **Chromosoma**. v. 127, p. 269-278, 2018.

GAZONI, T; DORIGON, NS; DA SILVA, MJ; CHOLAK, LR; HADDAD, CFB; PARISE-MALTEMPI, PP. Chromosome Mapping of U2 snDNA in Species of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenet Genome Res.** v. 161(1-2), p. 63-69, 2021.

GAZONI, T; LYRA, ML; RON, SR; STRUSSMANN, C; BALDO, D; NARIMATSU, H; PANSONATO, A; SCHNEIDER, RG; GIARETTA, AA; HADDAD, CFB; PARISE-MALTEMPI, PP; CARVALHO, TR. Revisiting the systematics of the *Leptodactylus melanonotus* group (Anura: Leptodactylidae): Redescription of *L. petersii* and revalidation of its junior synonyms. **Zoologischer Anzeiger** v. 290, p. 117–134, 2020.

HEYER, W. R. The adaptive ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (amphibia, leptodactylidae). Evolution; **international journal of organic evolution**, v. 23, n. 3, p. 421, 1969.

HEYER, W.R. Studies on the frogs of the genus *Leptodactylus* (Amphibia: Leptodactylidae). VI. Biosystematics of the melanonotus group. **Contrib. Sci.** 191, 1e48. LA County Nat. Hist. Mus., 1970

HEYER, W. R. The status of *Leptodactylus pumilio* Boulenger (Amphibia, Leptodactylidae) and the description of a new species of *Leptodactylus* from Ecuador. **Contributions in Science. Natural History Museum of Los Angeles County** v. 231, p. 1–8, 1972.

HEYER, W. R. Systematics of the pentadactylus species group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Smithsonian contributions to zoology**, n. 301, p. 1–43, 1979.

HEYER, W. R. Variation within the *Leptodactylus podicipinus–wagneri* complex of frogs (Amphibia: Leptodactylidae). **Smithsonian Contributions to Zoology** v. 546, p. 1–124, 1994.

HOMMELSHEIM, C.M.; FRANTZESKAKIS, L.; HUANG, M.; ÜLKER, B. PCR amplification of repetitive DNA: a limitation to genome editing technologies and many other applications. **Scientific Reports Nature Research.** 2014

JOÃO DA SILVA, M. 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, 2023.

LISPECTOR, Clarice. A hora da estrela: h. Rio de Janeiro: **Rocco**, 1977, 87p.

MEDINA, R.G; LIRA-NORIEGA, A; ARÁOZ, E. et al. Potential effects of climate change on a Neotropical frog genus: changes in the spatial diversity patterns of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) and implications for their conservation. **Climatic Change** v. 161, p. 535–553, 2020.

MESTROVIC, N. et al. Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus*--experimental evidence for the “library” hypothesis. **Molecular biology and evolution**, v. 15, n. 8, p. 1062–1068, 1998.

NORONHA, R. C. R. et al. Meiotic analyses show adaptations to maintenance of fertility in X1Y1X2Y2X3Y3X4Y4X5Y5 system of amazon frog *Leptodactylus pentadactylus* (Laurenti, 1768). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 out. 2020.

PROVETE, DIOGO B. et al. Phylogenetic signal and variation of visceral pigmentation in eight anuran families. **Zoologica Scripta**. Hoboken: Wiley-blackwell, v. 41, n. 6, p. 547-556, 2012.

RIVERO, J. A. Salientia of Venezuela. Bulletin of the Museum of Comparative Zoology. **Cambridge, Massachusetts** v. 126, p. 1–207, 1961.

THAKUR, J.; PACKIARAJ, J.; HENIKOFF, S. Sequence, Chromatin and Evolution of Satellite DNA. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, p. 4309, 2021.

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. 1, 2014.

ZIMMERMAN, B. L.; BOGART, J. P. Vocalizations of primary forest frog species in the Central Amazon. **Acta Amazonica** v. 14, p. 473–520, 1984.