
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GISELLE PESSANHA PESSOA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DNAs
SATÉLITES PRESENTES NO GENOMA DE *THOROPA*
(ANURA, CYCLORAMPHIDAE)**

GISELLE PESSANHA PESSOA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DNAs SATÉLITES
PRESENTES NO GENOMA DE *THOROPA* (ANURA,
CYCLORAMPHIDAE)

Orientador: Patrícia Pasquali Parise-Maltempi

Coorientador: Luiza Rieder Cholak

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

Rio Claro
2019

P475i Pessoa, Giselle Pessanha
Identificação e caracterização de DNAs satélites presentes no genoma de Thoropa (Anura, Cycloramphidae) / Giselle Pessanha Pessoa. -- Rio Claro, 2019
37 f. : tabs., fotos, mapas

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Patrícia Pasquali Parise-Maltempi
Coorientadora: Luiza Rieder Cholak

1. Citogenética. 2. Sapos. 3. Evolução animal. 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.

Resumo

As sequências repetitivas podem atuar em importantes processos e arranjos celulares, como na dinâmica evolutiva dos cromossomos sexuais e na estruturação da heterocromatina centromérica, além de fornecerem informações sobre a evolução genômica de espécies relacionadas. Uma das categorias mais representativas de DNA repetitivo em um genoma são os DNAs satélites, que podem ser empregados como marcadores em trabalhos citogenéticos sobre evolução genômica e complementar análises de diversidade biológica. Estudos citogenômicos em Anuros são escassos, especialmente considerando a grande diversidade do grupo. Em *Thoropa miliaris* (Anura: Cycloramphidae) esses dados são mínimos e nada se conhece sobre a organização de sequências repetitivas em seu genoma. Através da técnica de bandamento C foi observada uma superabundância de heterocromatina centromérica dos cromossomos de *T. miliaris* de uma população de Santa Teresa (ES) em comparação com outra população, de Paraty (RJ), possivelmente indicando um acúmulo de DNA satélite diferenciado. Neste trabalho, foi proposta a identificação e caracterização, pela primeira vez, de sequências de DNA satélite presentes no genoma de *T. miliaris* da população de Santa Teresa (ES), bem como localizá-las em suas metáfases por mapeamento cromossômico. Sua distribuição pelos cromossomos foi comparada com a de Paraty (RJ), em que, de forma geral, as sequências de DNA satélite demonstraram sinais de acúmulo menor. As extensas barreiras geográficas que separam as populações e as diferenças observadas quanto à abundância de DNA satélite centromérico entre elas podem indicar que estão submetidas à evolução independente do complexo centromérico e que o isolamento genético está em curso. Este trabalho permitiu adicionar dados que podem ajudar no entendimento da organização genômica e, talvez, em futuros estudos taxonômicos da espécie.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1. Materiais.....	10
3.2. Métodos.....	11
3.2.1. Sequenciamento Illumina e caracterização de DNAs satélites.....	11
3.2.2. Construção de <i>primers</i> e validação por PCR.....	12
3.2.3. Marcação de sondas e hibridação <i>in situ</i> fluorescente.....	12
4. RESULTADOS.....	13
4.1. Identificação de DNAs satélites no genoma.....	13
4.2. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente e comparação interpopulacional.....	20
4.2.1. TmiSat02-189.....	20
4.2.2. TmiSat04-44.....	20
4.2.3. TmiSat05-143.....	21
4.2.4. TmiSat08-68.....	22
4.2.5. TmiSat10-71.....	23
4.2.6. Inclusão de PboSat03-189 (<i>Proceratophrys boiei</i>) nas análises.....	23
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1. Introdução

Apesar de sua grande complexidade, um genoma eucarioto pode ser dividido fundamentalmente em dois tipos de sequências: aquelas singulares, que incluem a maioria dos genes funcionais, e as sequências de DNA repetitivo, que apresentam um número variado e elevado de cópias e que na maioria dos casos são não-codificantes (MARTINS, 2007; LÓPEZ-FLORES et al., 2012).

O DNA repetitivo é composto por sequências de bases repetidas de centenas a milhares de vezes, compreendendo uma grande fração do genoma eucarioto (CHARLESWORTH et al., 1994; MARTINS et al., 2007; GUY-FRANCK et al., 2008; KOPECNA et al., 2012; LOWER et al., 2018) e podendo superar 50% de sua extensão (PLOHL et al., 2012). Dentro desta classe há sequências codificantes, como o DNA codificador das histonas e o DNA ribossômico (rDNA) (MAXSON et al. 1983; HADJIOLOV, 1985) e aquelas que não originam produtos funcionais, como os fragmentos dispersos e móveis (representados por elementos transponíveis) e as sequências repetidas em tandem, como os microssatélites e os satélites (CHARLESWORTH et al., 1994; JURKA et al., 2005; MARTINS, 2007; GUY-FRANCK et al., 2008; LÓPEZ-FLORES et al., 2012; PLOHL et al., 2012).

Embora sua função tenha permanecido desconhecida por muitos anos, estudos recentes demonstram que seu papel mais efetivo é na estruturação de áreas do cromossomo sob forma de blocos de heterocromatina constitutiva, abundante nos telômeros e centrômeros, embora possa também ser encontrada distante dessas regiões (CARDONE et al., 1997; SHARMA & RAINA, 2005; PLOHL et al., 2012). O domínio central do DNA satélite é essencial para manter a coesão das cromátides irmãs durante a divisão mitótica, bem como dar assistência à formação e função do cinetocoro, garantindo a transmissão e conservação integral do material genético nesse processo (LICA et al., 1986 MURPHY & HARPEN, 1995). O DNA repetitivo tem sido explorado como um marcador citogenético relevante em diversos trabalhos científicos que se dedicam a estudar sua organização no genoma, evolução cromossômica, identificação de rearranjos cromossômicos e a atividade dos

cromossomos sexuais e supranumerários em muitos eucariotos, como plantas (KATO et al., 2004; SHARMA & RAINA, 2005), insetos (MANTOVANI et al., 1997; CABRAL-DE-MELLO et al., 2010), peixes (NANDA et al., 1992; MARTINS et al., 2007; PARISE-MALTEMPI, 2007; SILVA et al., 2013; TERCENIO et al., 2015), anfíbios (CARDONE et al., 1997; EDWARDS & MURRAY, 2005; FELICIELLO et al., 2006), répteis (CAPRIGLIONE et al., 1989; OLMO, 2008), aves (MADSEN et al., 1994; SOLOVEI et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2017) e mamíferos (GRADY et al., 1992; CAZAUX et al., 2013)

Uma das categorias mais representativas de DNA repetitivo em um genoma são os DNAs satélites, organizados em blocos de repetições em tandem. Essas sequências podem evoluir em concerto através de diversos mecanismos, como *crossing over* desigual, mutações e deslizamento da DNA polimerase, levando a uma alta homogeneidade entre as repetições de uma família de DNA satélite (DOVER, 1982; SHARMA & RAINA, 2005; PLOHL et al., 2012). A dinâmica evolutiva do DNA satélite pode afetar sua posição e sua distribuição no genoma e conseqüentemente no cromossomo, podendo influenciar a evolução cromossômica (HENIKOFF et al., 2001; VITTORAZZI et al., 2014).

Desde a segunda metade do século XX, vêm se incluindo cada vez mais o DNA satélite como marcador em estudos de evolução e diversidade biológica, por sua capacidade de fornecer informações sobre evolução genômica e dados que podem ser úteis em estudos da filogenia de espécies relacionadas (BRUTLAG, 1980; JOBSE et al., 1995; HENIKOFF et al., 2001; SHARMA & RAINA, 2005; FERREE & PRASAD, 2012; VITTORAZZI et al., 2014). Entre as espécies de eucariotos, a caracterização de DNAs satélites vem revelando variações na distribuição destas sequências nos genomas de indivíduos da mesma população, o que pode vir a auxiliar no esclarecimento sobre variabilidade genética intraespecífica e a dinâmica interna dessas sequências repetitivas (CARDONE et al., 1997; FELICIELLO et al., 2006).

Os anfíbios anuros são um grupo representado por 8.104 espécies até o momento (AmphibiaWeb, 2019). Estudos citogenéticos nesse grupo são escassos, especialmente considerando sua alta diversidade (PERKINS et al., 2019). A caracterização de sequências de DNA satélite em seus genomas pode indicar

variações genéticas populacionais assim como observado em outros vertebrados (HENIKOFF et al., 2001; FERREE & PRASAD, 2012; VITTORAZZI et al., 2014).

O gênero *Thoropa* (Cope 1865) (Anura: Cycloramphidae) compreende seis espécies válidas, divididas em dois grupos: *T.* grupo *petropolitana*, com as espécies *T. petropolitana* (Wandolleck 1907) e *T. lutzi* (Cochran 1938), que são dificilmente encontradas na natureza (IUCN, 2019); e *T.* grupo *miliaris*, contendo *T. saxatilis* (Cocroft & Heyer 1988), *T. megatympanum* (Caramaschi & Sazima 1984), *T. taophora* (Miranda-Ribeiro 1923) e *T. miliaris* (Spix 1824). Todas as espécies do gênero ocorrem principalmente na Mata Atlântica, mas também em ecótonos Cerrado-Mata Atlântica e em campos rupestres do Cerrado (FEIO, 2002; IUCN, 2019). A diversificação de *Thoropa* grupo *miliaris* pode ser explicada pelas três hipóteses mais aceitas para a diversificação genética dos anfíbios: esse processo pode ter sido (i) efetivado no Quaternário (início há 2,58 Ma) por atividades neotectônicas que edificaram barreiras ao fluxo gênico entre populações; (ii) gerado por refúgios isolados de estabilidade climática e/ou (iii) induzido pelo surgimento de barreiras geográficas (rios, montanhas) que isolaram as populações e causaram sua especiação (CARNAVAL et al., 2009; FITZPATRICK et al., 2009; SABBAG, 2013, 2018, 2019).

Thoropa miliaris (Spix 1824) (Figura 1), conhecida como rã-das-pedras, possui a mais ampla distribuição do gênero, ocorrendo em todos os estados do Sudeste, além do sul da Bahia (GARCIA et al., 2010). Essa espécie endêmica da Mata Atlântica é caracterizada pela biologia peculiar de adultos e girinos ocuparem, reproduzirem-se e desenvolverem-se em afloramentos rochosos úmidos próximos a ambientes costeiros (FEIO et al., 2006).



Figura 1: *Thoropa miliaris*, a rã-das-pedras (Fonte: Aline Salgado).

O conhecimento citogenético de *T. miliaris* é ainda muito escasso. Os dados se limitam à montagem do seu cariótipo ($2n=26$) (BRUM-ZORILLA & SAEZ, 1968), hibridação *in situ* fluorescente (FISH) de rDNA 18S e impregnação por nitrato de prata (Ag-RON) (Dados não publicados de Luiza Cholak, 2017). Nenhum estudo de caracterização e mapeamento cromossômico de sequências repetitivas em seu genoma foi realizado anteriormente para a espécie.

Os estudos de citogenética envolvendo o gênero *Thoropa* fazem parte de um projeto em andamento no laboratório de Citogenética Animal da UNESP de Rio Claro, cujo objetivo é comparar intraespecificamente e interespecificamente a organização de sequências repetitivas nos cromossomos das espécies de *Thoropa* grupo *miliaris*.

Como parte dos resultados obtidos nesse projeto, a técnica de bandamento C mostrou uma superabundância de heterocromatina centromérica dos cromossomos de *T. miliaris* na população de Santa Teresa (ES) comparada à população de Paraty (RJ) (Dados não publicados de Luiza Cholak, 2019) (figura 3). Essas populações vivem a um grande distanciamento geográfico entre si, reforçado pelas diferenças de altitude (655m de Santa Teresa, contra 5m da cidade litorânea de Paraty). Descrições prévias de evolução independente das sequências repetitivas em populações segregadas, especialmente do DNA satélite formador da heterocromatina centromérica (HENIKOFF et al., 2001; PLOHL et al., 2012; GARRIDO-RAMOS, 2017), associam-na ao processo de isolamento reprodutivo e à evolução das espécies. Dessa forma, o grande acúmulo de heterocromatina centromérica na população de Santa Teresa (ES) pode indicar que os genomas dos seus indivíduos estão submetidos à rápida evolução de suas sequências repetitivas, levando ao processo de isolamento genético entre as duas populações. Essa suposição é reforçada pelo trabalho de Sabbag et al. (2019), que, ao estudarem filogeneticamente *Thoropa* grupo *miliaris*, posicionaram *T. miliaris* em cinco clados distintos, dentre os quais as populações de Santa Teresa (ES) e Paraty (RJ) pertencem a linhagens evoluindo separadamente.



Figura 2: Distribuição de *Thoropa miliaris* na Mata Atlântica da Bahia e da região Sudeste, e indicações dos pontos amostrais em Paraty (RJ) e Santa Teresa (ES) (Fonte: IUCN modificado).

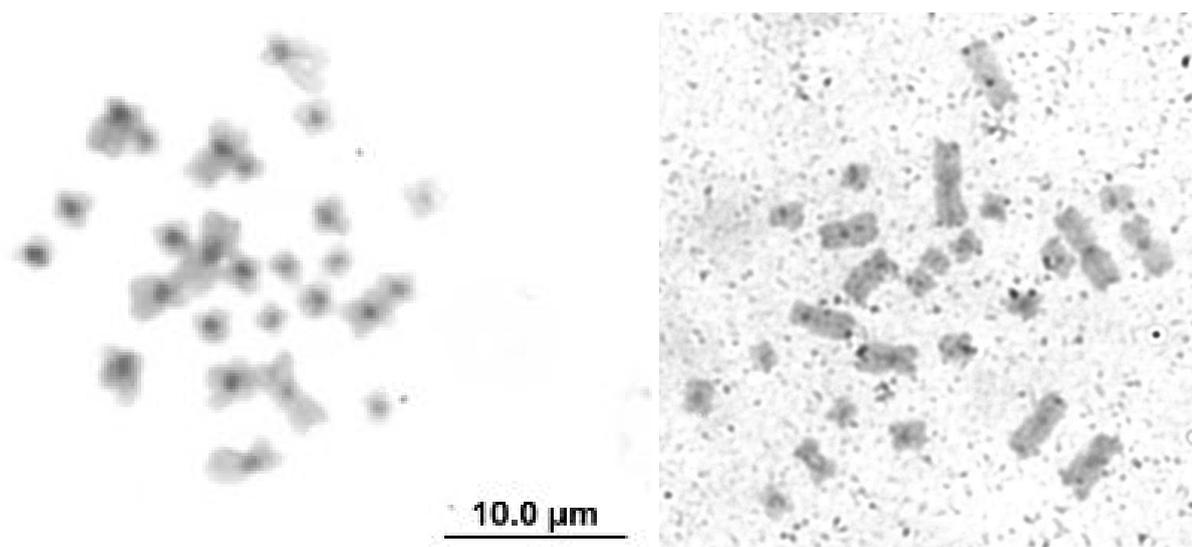


Figura 3: Bandamento C nos cromossomos de *Thoropa miliaris* das populações de Santa Teresa (ES) (à esquerda) e de Paraty (RJ) (à direita) (Fonte: Luiza Cholak).

2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram identificar sequências de DNA satélite no genoma de *Thoropa miliaris* da população de Santa Teresa (ES) e localizá-las nos cromossomos de duas populações (Paraty/RJ e Santa Teresa/ES), para comparar e compreender, pela primeira vez, a distribuição desses elementos na espécie e mais especificamente nessas populações, com o intuito de traçar um padrão de acúmulo diferenciado de heterocromatina centromérica entre elas.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

Foram utilizadas preparações cromossômicas oriundas de fígado, intestino e medula óssea de exemplares machos de *Thoropa miliaris* das populações de Santa Teresa (ES) e de Paraty (RJ). Os materiais estavam previamente armazenados em *freezer* no laboratório de citogenética animal da UNESP de Rio Claro e foram autorizados pelo Comitê de Ética (n° 1554, de 22/06/2016). Para esse trabalho não foram necessárias novas coletas de material biológico. Os indivíduos utilizados estão depositados na Coleção de Anfíbios Célio F. B. Haddad, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo (CFBH) com número de vouchers de Santa Teresa CFBH 43600 a CFBH 43610 e de Paraty CFBH 36377 a CFBH 36387. Foi incluído às análises o DNA satélite PboSat03-189, isolado de *Proceratophrys boiei* (Anura, Odontophrynidae) por Silva (2019), também abundante na arquitetura centromérica da espécie, para estudar a natureza molecular e a conservação estrutural do DNA satélite entre os anfíbios.

3.2. Métodos

3.2.1. Sequenciamento Illumina e caracterização de DNAs satélites

O sequenciamento genômico foi realizado pela empresa Macrogen, Korea, a partir de DNA de um exemplar macho de *T. miliaris* da população de Santa Teresa (ES). O sequenciamento de 1.5x de cobertura foi realizado através da plataforma Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). A tecnologia empregada foi Illumina® HiSeq™4000 (2x101bp paired-end), sendo utilizado o sequenciamento TruSeq 3000 4000 SBS Kit v3. Os reads obtidos do sequenciamento foram unidos utilizando o programa Fastq-join do FASTX-Toolkit com as opções básicas de entrada dos dados (GORDON & HANNON, 2010; CREPALDI, 2019).

Para identificação das sequências de DNA repetitivo, 500.000 *reads* aleatórios do total obtido do genoma sequenciado foram amostrados e processados pelas ferramentas da plataforma *online* RepeatExplorer (www.repeatexplorer.org). O resultado gerado pelo programa (*clusters*, agrupamentos de sequências altamente repetitivas) foi utilizado para a quantificação e anotação subsequente através dos grafos de cada agrupamento, selecionando aqueles de densidade característica de DNAs satélites (NOVÁK et al., 2010).

Em seguida, os arquivos selecionados como candidatos para repetições de satélites foram abertos no *software* Geneious v4.8.5 (<https://www.geneious.com>) e submetidos a análises de gráficos *dotplot* para cada uma das sequências, em busca da confirmação de sua organização em tandem. O gráfico *dotplot* é formado a partir de comparações e sobreposições entre as sequências dos próprios *contigs* (fragmentos repetitivos que formam os *clusters*), e a disposição característica de um DNA satélite é exibida através de linhas paralelas entre si e diagonais em relação aos eixos do plano, caracterizando a repetição em tandem dentro de cada fragmento analisado.

Confirmada a organização em tandem a partir dos gráficos *dotplot*, as sequências consenso de cada *cluster* de DNA satélite foram manualmente recuperadas a partir do alinhamento de monômeros (*contigs*) no programa MEGA v8.0, utilizando o algoritmo MUSCLE. Para a leitura e alinhamento no programa, os *contigs* foram previamente separados e nomeados no formato FASTA. Também no MEGA

v8.0, foram determinadas as porcentagens de conteúdo de A + T das sequências isoladas. As sequências consenso foram analisadas pelos bancos de dados *online* GIRI Repbase e BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), do *National Center for Biotechnology Information*, para a comparação com outros fragmentos já depositados.

Os satélites isolados foram alinhados para a busca por homologias e para classificá-los como os mesmos variantes, o mesmo DNA satélite ou que os reunisse em uma mesma família. As porcentagens de homologia entre as sequências consenso, que não ultrapassaram 60%, não foram suficientes para agrupá-los em nenhum caso (RUIZ-RUANO et al., 2016).

3.2.2. Construção de *primers* e validação por PCR

As sequências de DNA satélite isoladas do genoma de *Thoropa miliaris* de Santa Teresa (ES) foram utilizadas como matriz para o desenho manual de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) divergentes para as 10 sequências de DNAs satélites mais abundantes recuperadas do genoma. Os *primers* foram sintetizados pela empresa Exxtend (São Paulo, Brasil). As temperaturas de anelamento dos *primers forward* e *reverse* de cada DNA satélite isolado foram calculadas manualmente. A validação experimental foi testada por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) em um termociclador Applied Biosystems com um gradiente de temperatura entre 54°C e 64°C e utilizando o DNA genômico extraído do exemplar de *T. miliaris* proprietário do genoma sequenciado. A reação de PCR se deu sob condições gerais de iniciação a 95°C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento do *primer* a 50-60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 20 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. A confirmação dos produtos de amplificação foi atestada por eletroforese, utilizando gel de agarose 1%.

3.2.3. Marcação de sondas e hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Os produtos de PCR foram marcados pela técnica de *nick translation* em uma reação de 18µL contendo água ultrapura Milli-Q®, NTB Buffer 10x (Macherey-Nagel™),

biotina-14-dUTP (Roche) e DNA polimerase I/DNAse I (ThermoFisher®). As condições gerais da reação de *nick translation* foram de 16°C durante 60 minutos iniciais, seguidos de 10 minutos a 65°C e temperatura de manutenção a 10°C (PINKEL et al., 1986). As sondas marcadas foram utilizadas para o posterior mapeamento em preparações de lâminas com cromossomos das duas populações de *T. miliaris*, através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), baseada no protocolo descrito por Pinkel e colaboradores (1986), com modificações feitas por Cabral-de-Mello e colaboradores (2010).

Na técnica de FISH, preparações citológicas de *T. miliaris* contendo metáfases foram submetidas à desidratação por série alcoólica. A hibridação (anelamento) entre a sonda marcada e os cromossomos de *T. miliaris* foi feita em banho maria a 71°C durante 2 minutos e 30 segundos. A detecção da sonda foi realizada com anticorpo conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor 488 (Invitrogen).

As lâminas submetidas ao mapeamento cromossômico pela técnica de FISH foram observadas ao microscópio de fluorescência Olympus® BX51 com uma câmera digital (Olympus® DP71) acoplada. O número diplóide ($2n=26$) foi confirmado, e foram observadas, em média, 20 metáfases por lâmina. As metáfases com melhor qualidade de visualização foram fotografadas, e a captura de imagens foi feita a partir dos *softwares* DP Controller v3.2.1 e DP Manager v3.1 (Olympus®).

4. Resultados

4.1. Identificação de DNAs satélites no genoma

A plataforma *online* RepeatExplorer detectou 73,52% dos *reads* do genoma analisado como sequências únicas - *singlets* - e 26,48% como sequências repetitivas organizadas em *clusters* de sequências repetitivas, cujos tamanhos e proporções cumulativas são representados na figura 3.

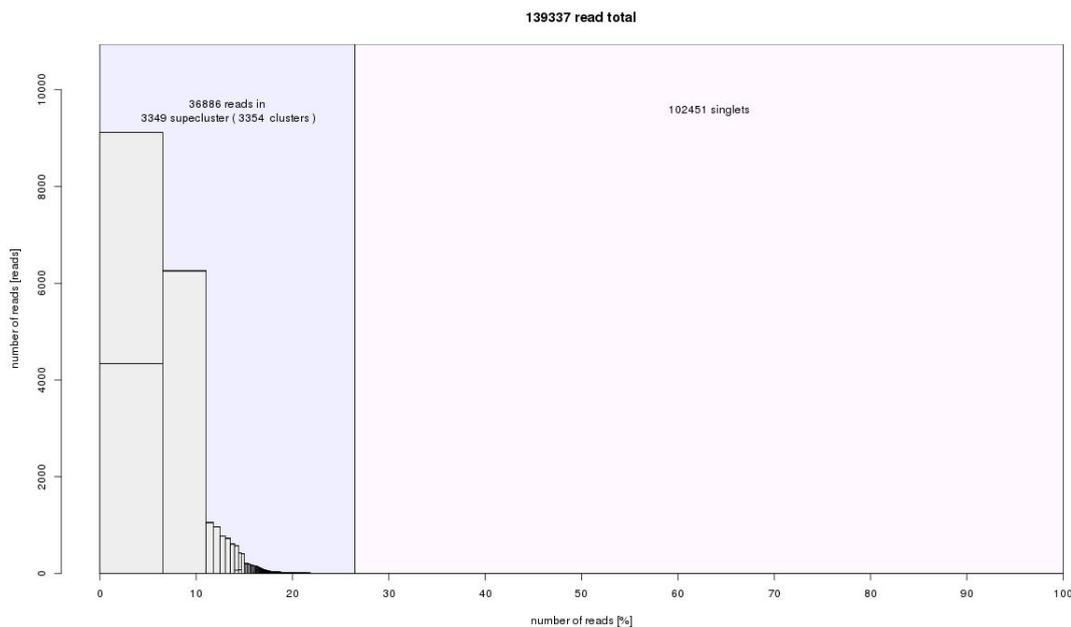


Figura 4: Histograma resultante da análise pelo RepeatExplorer, com as proporções cumulativas de sequências únicas e repetitivas.

O programa analisou com profundidade os 122 *clusters* repetitivos mais abundantes. Destes, 24 clusters (19,67% das sequências repetitivas mais abundantes) foram reconhecidos visualmente como DNAs satélites pela análise dos grafos resultantes, baseado na sua disposição densa e circular, típica de sequências repetidas em tandem (demonstrados na figura 4a).

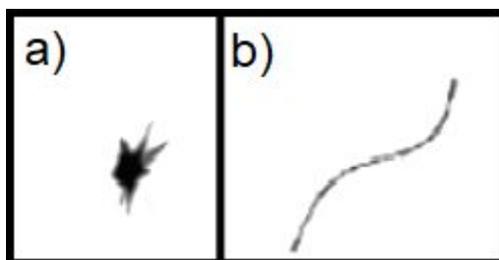


Figura 5: exemplos de grafos de clusters gerados por RepeatExplorer. O grafo a, de morfologia circular e densa, é característico de sequências altamente repetitivas, ao contrário do grafo b, de disposição aproximadamente senoidal, usualmente demonstrando uma sequência característica de elementos transponíveis.

Ao verificá-los quanto a sua distribuição em tandem no programa Geneious 4.8.5, 21 (17,21%) *clusters* se confirmaram DNAs satélites. O segundo e terceiro *clusters* mais representativos no genoma, apesar de se disporem em grafos densos, não se organizam em tandem. Dessa forma, não foram considerados DNAs satélites. Do conjunto identificado, os 10 DNAs satélites mais abundantes foram selecionados e tiveram suas sequências consenso recuperadas a partir do alinhamento de seus monômeros.

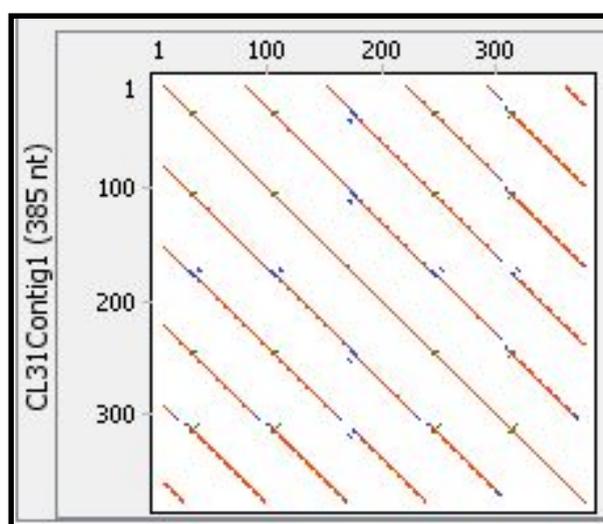


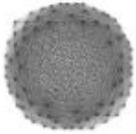
Figura 6: Gráfico *dotplot* referente ao *contig 1* do cluster 31, exibindo uma configuração típica de sequências em tandem.

Os 10 DNAs satélites selecionados possuem média percentual de A+T de 51,61% e suas representatividades genômicas, organizadas em ordem decrescente, variam de 4,5% a 0,057%. Somadas, as proporções dessas sequências correspondem a cerca de 6% do genoma (Quadro 1). Os *primers* desenhados e sintetizados a partir das sequências consenso são apresentados no quadro 2.

Quadro 1: informações gerais sobre os 10 *clusters* de DNA satélite mais abundantes no genoma.

Nº do cluster	Grafo de clusterização	Nome do satélite	Sequência consenso	A + T (%)	Proporção nos reads do genoma analisado (%)
CL1		TmiSat01-30	AGCAGTGTAT GCAGTGTTAAG CTGTTATA	63,33	4,5
CL8		TmiSat02-189	GGCCATTCTAA GCTGAGTGTGC CTGCCCTCGTC AGATCGCAGCA GATGAAAACAG CTTAAGGCCTG GCAAGTACCCG CATGGGAGACT GGCTGGAATC CCAGGTCCCAT TGACTCCTCGA TTTTACCTTGTA ACTCGGCTTTG TTCATTAATTAC AAAAAACGACC	51,32	0,44

			TGAAATCACC TTACCGTCAAT		
CL10		<u>TmiSat03-95</u>	TACATACATTAC ATTACTTATCCT GTA CTGATCCT GAGTTACATCC TGTATTATACTC CAGAGCTGCAC TCACTATTCTG CTGGTGGTCAC TGTG	58,94	0,29
CL12		<u>TmiSat04-44</u>	AGCCGGTATAA CCC GGGCATCT CCTGTATATAAT ATATATGTAC	59,09	0,15
CL13		<u>TmiSat5-143</u>	CGGTCCCCCG GCGT GACTGAG CGCGAGCCCC CGGTGATGAGC TCCGCCCGGG GGAAAGTCAGA TCCCTTGCCCG AGAAGGAGTTC CATGAGAGCGG ATAGAGGAAGG CGGCTGACGG AGGGGACGGT GGCCGAGGCC GTGGAG	30,76	0,15
CL19		Tmi-06-37	ACAGTACCACTT CTCCTGTCCTGT ATATATGGGGT GC	51,35	0,11
CL20		<u>TmiSat7-77</u>	CATAGTGATAT ATCCTGCAGAG TATTACACCCC TGACCTCTACA GATCTGCAGAA CATCGCTCTCC CCCTCCTGATA	49,35	0,11

CL27		<u>TmiSat08-68</u>	GGTGGTATGTA TGAGAAGTGTG AGGTATGTGTG ACACCCAAGGA CCCTCTATAGG GCCAAGCTTAA AG	51,47	0,063
CL28		<u>TmiSat09-49</u>	GCCACCACTAG AGGGAGCTCAG GAGCTGACTGT ATACTGACTGC CTGCA	42,8	0,063
CL31		<u>TmiSat10-71</u>	ACTACTACATTA TCTGTACTIONAG AGAGGTATCAC TGTGTTATCTGT GGTGTACATA GGACTGCAGGT GAC	57,74	0,057

Quadro 2: Primers forward e reverse desenhados a partir das sequências consenso dos 10 clusters selecionados e confeccionados.

DNA satélite	Forward	Reverse
TmiSat-01-30	TAAGCAGTGTTATGCAGTG	TAACAGCTTAACACTGCATA
TmiSat-02-189	GGCTGGGAATCCCAGGTCCC	AGAGTCTCCCATGCGGGTACTT
TmiSat-03-95	TACTTATCCTGTACTGATCC	TATGTAATGTATGTACACAGT
TmiSat-04-44	AACCCGGGCATCTCCTGTAT	GCATACCGGCTGTACATATATA
TmiSat-05-143	GAGGAAGGCGGCTGACGG	TATCCGCTCTCATGGAATC
TmiSat-06-37	ACCACTTCTCCTGTCCTGT	CTGTGCACCCCATATATACA
TmiSat-07-77	GATCTGCAGAACATCGCTCT	TGTAGAGGTCAGGGGTGTAA
TmiSat-08-68	AGCTTAAAGGGTGGTATGTACA	AGGCCCTATAGAGGGTCCTT
TmiSat-09-49	TGACTGCCTGCAGCCACC	ATACAGTCAGCTCCTGAGCT
TmiSat-10-71	TACTACATTATCTGTACTIONATAC	GTGTCACCTGCAGTCCTATG

Esses fragmentos foram analisados individualmente pelas ferramentas *online* BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e GIRI-Repbase, em busca de sequências semelhantes já depositadas nos bancos de dado. Semelhanças com um organismo filogeneticamente distante foram encontradas: o DNA satélite TmiSat02-189 se assemelha em 78,5% a um fragmento de DNA repetitivo homólogo ao RNA ribossomal 5S de *Ctenopharyngodon idella* (carpa do limo) a partir da análise pelo RepBase, sendo o único satélite que apresentou resultado relevante para esta busca. Pelo BLAST, TmiSat02-189 apresentou também homologia significativa (por emparelhamentos executados a partir de coberturas acima de 50% e *e-values* baixos, com alta confiabilidade) com uma família de DNA satélite denominada PcP190 (tabela), derivada do DNA ribossomal 5S e presente em outras famílias de anuros, bem como em vertebrados filogeneticamente distantes como peixes e répteis, sugerindo que essa sequência se conservou ao longo de centenas de milhões de anos (Vittorazzi et al., 2011).

Tabela: Semelhanças entre TmiSat02-189, isolado de *Thoropa miliaris*, com sequências PcP190.

DNA satélite	Sequência similar	Espécie	Cobertura (<i>Query Cover</i>) (%)	Emparelhamento (%)
TmiSat-02-189	PcP190EcoRI c12	<i>Physalaemus cuvieri</i>	62	73.6
TmiSat-02-189	PcP190EcoRI c10	<i>Physalaemus cuvieri</i>	62	73.3
TmiSat-02-189	PcP190EcoRI c6	<i>Physalaemus cuvieri</i>	62	73.7
TmiSat-02-189	PcP190EcoRI_c11	<i>Physalaemus cuvieri</i>	62	73.2
TmiSat-02-189	PcP190 C17	<i>Pseudis bolbodactyla</i>	60	65.8
TmiSat-02-189	PcP190EcoRI c4	<i>Physalaemus cuvieri</i>	62	72.1
TmiSat-02-189	PcP190EcoRI c13	<i>Physalaemus cuvieri</i>	62	73.1
TmiSat-02-189	PcP190 C7	<i>Pseudis minuta</i>	54	72.6
TmiSat-02-189	PcP190 C7	<i>Pseudis bolbodactyla</i>	59	63.2
TmiSat-02-189	PcP190 C8	<i>Pseudis limellum</i>	54	71.4
TmiSat-02-189	PcP190-2-Pfus-M1-C10	<i>Pseudis fusca</i>	60	39
TmiSat-02-189	PcP190 1.1	<i>Physalaemus albifrons</i>	62	72.9
TmiSat-02-189	PcP190 3.3	<i>Physalaemus nattereri</i>	52	62.8
TmiSat-02-189	PcP190 5.2	<i>Physalaemus marmoratus</i>	60	68.4
TmiSat-02-189	PcP190 C10.2	<i>Engystomops freibergeri</i>	60	81.9
TmiSat-02-189	Satélite SD1	<i>Acrossocheilus paradoxus</i>	55	63.4
TmiSat-02-189	RNA ribossomal 5S	<i>Carassius auratus</i>	55	72.2

Homologias com PcP190 de outras famílias de anuros (sobretudo *Engystomops freibergeri* e o gênero *Physalaemus*), e com fragmentos repetitivos de actinoptérgios (*Acrossocheilus paradoxus* e *Carassius auratus*).

4.2. Hibridação *in situ* fluorescente e comparação interpopulacional

A análise de mapeamento cromossômico por FISH mostrou que, de forma geral, todas as sequências de DNA satélite analisadas demonstraram sinais de acúmulo em todos os cromossomos na população de Santa Teresa (ES) e na população de Paraty (RJ), com exceção do TmiSat06-37. Em torno disso, cada DNA satélite apresentou outros sítios de marcações particulares nas duas populações.

4.2.1. Tmi02-189

O satélite TmiSat02-189, o segundo mais representativo do genoma de *Thoropa miliaris*, está presente na região centromérica e pericentromérica do par, com acúmulo maior na população de Santa Teresa em relação à de Paraty (Figura 7).

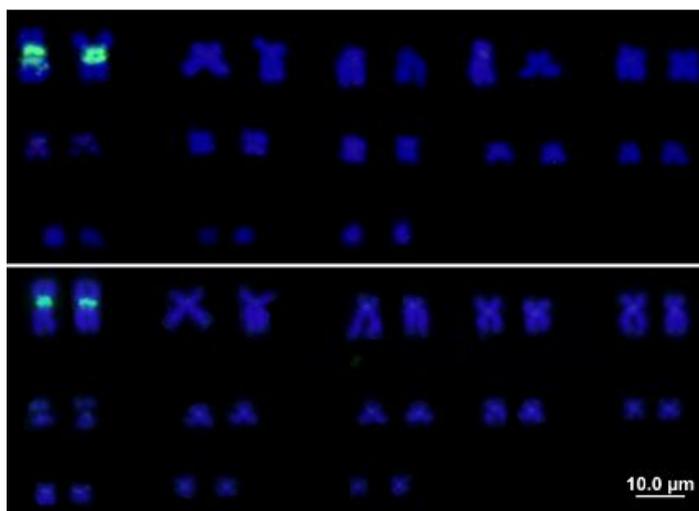


Figura 7: Distribuição de TmiSat-02-189 pelo cariótipo das populações de Santa Teresa (ES) (figura de cima) e Paraty (figura de baixo).

4.2.2. TmiSat05-143

O DNA satélite TmiSat05-143 está presente na região centromérica de todos os cromossomos na população de Santa Teresa (ES), mas não tão destacadas quanto

TmiSat02-189. Em alguns pares, apresenta marcações nas regiões pericentromérica e intersticial, com destaque para o par portador da NOR. Em contrapartida, nos cromossomos da população de Paraty (RJ), há uma marcação pontual na região subtelomérica em apenas uma cromátide do braço menor (p), nos pares 10 e 11 (Figura 8).

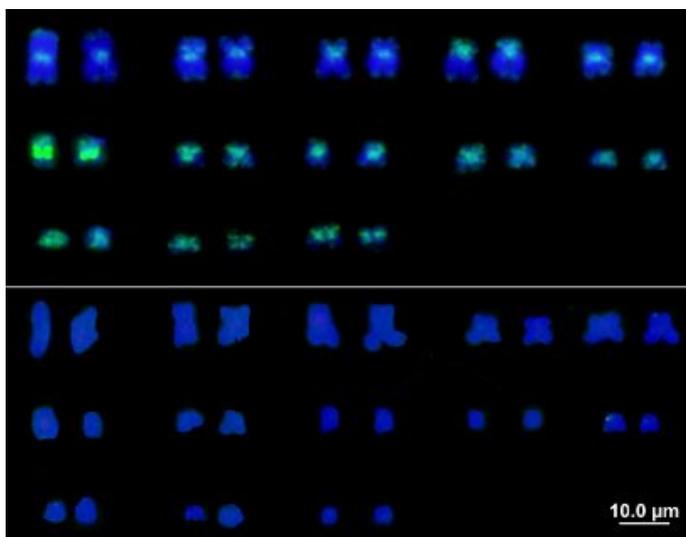


Figura 8: Distribuição do DNA satélite TmiSat05-143 nas populações de Santa Teresa (figura de cima) e Paraty (figura de baixo).

4.2.3. TmiSat08-68

Na população de Santa Teresa (ES), essa sequência de DNA satélite se concentra particularmente na região centromérica do par 9 e regiões pericentromérica e intersticial do braço p do par 11. Marcações fracas são observadas nos outros cromossomos, podendo algumas serem inespecíficas. Na população de Paraty (RJ), os telômeros e a zona intersticial foram marcados, mas a distribuição desse satélite é imperceptível nos 4 menores pares (Figura 9).

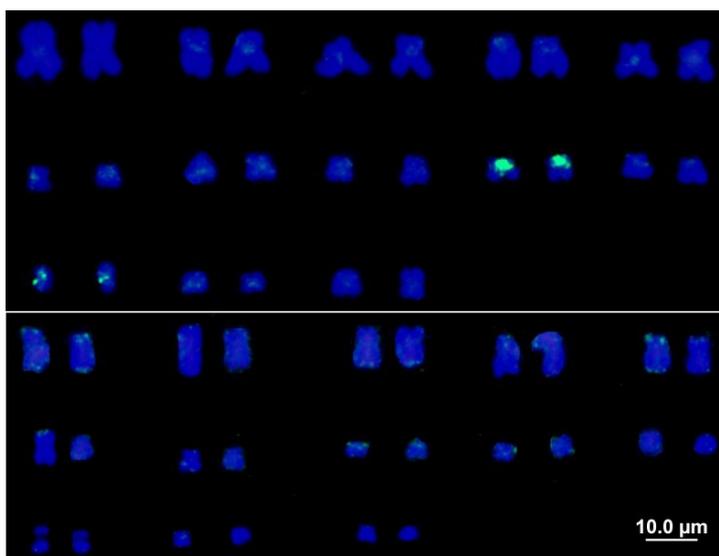


Figura 9: Marcação de TmiSat08-68 nas populações de Santa Teresa (ES) (figura de cima) e de Paraty (figura de baixo).

4.2.4. TmiSat10-71

Esse satélite se distribui igualmente pelo centrômero de todos os cromossomos da população de Santa Teresa (ES), se estendendo pelo braço p de alguns pares, e é visível na região telomérica de 4 pares no cariótipo de Paraty (RJ) (Figura 10).

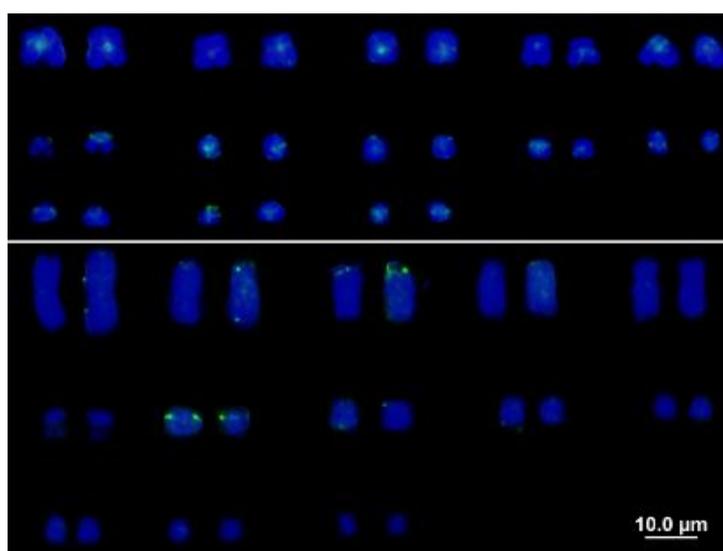


Figura 10: Distribuição de TmiSat10-71 nos cariótipos das populações de Santa Teresa (ES) (figura de cima) e de Paraty (figura de baixo).

4.2.5. TmiSat04-44

A hibridação do DNA satélite TmiSat04-44 foi bem sucedida apenas na população de Santa Teresa (ES), com bandas dispersas pelos centrômeros e telômeros em todo o cariótipo e apresentando um acúmulo diferenciado nos braços p do par da NOR (Figura 11). Embora essa forma de distribuição tenha se mostrado constante para TmiSat04-44, o padrão gera dúvidas sobre a possibilidade de serem sinais inespecíficos. Dessa forma, esse satélite merece ser melhor explorado na próxima etapa do trabalho.

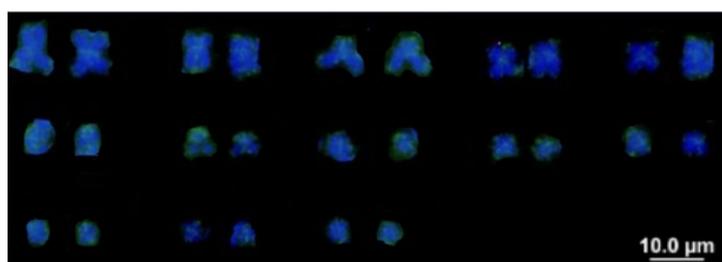


Figura 11: Distribuição de TmiSat04-44 em *Thoropa miliaris* na população de Santa Teresa (ES).

4.2.6. Inclusão de PboSat03-189 (*Proceratophrys boiei*) nas análises

A espécie *Proceratophrys boiei* (Anura, Odontophrynidae) pertence a uma família filogeneticamente próxima à de *Thoropa miliaris* (Anura, Cycloramphidae) (AmphibiaWeb, 2019). Foi isolado um DNA satélite (PboSat03-189) dessa espécie por Silva, 2019 em nosso laboratório, que foi descrito como um dos mais representativos na espécie. Esse satélite possui o mesmo tamanho de TmiSat02-189 (189 pares de bases) e ambos podem ser uns dos principais componentes da heterocromatina centromérica superabundante encontrada nas espécies. A hibridação de PboSat03-189 nos cromossomos de *T. miliaris* de Santa Teresa (ES) e Paraty (RJ) revelou que

ambos os DNAs satélites partilham uma conservação estrutural, visto que suas posições cromossômicas coincidem na região pericentromérica do par 1 em *Thoropa miliaris* (Figura 12) e, assim como TmiSat02-189, PboSat03-189 é superabundante na população de Santa Teresa (ES) em detrimento do mesmo par na população de Paraty (RJ).

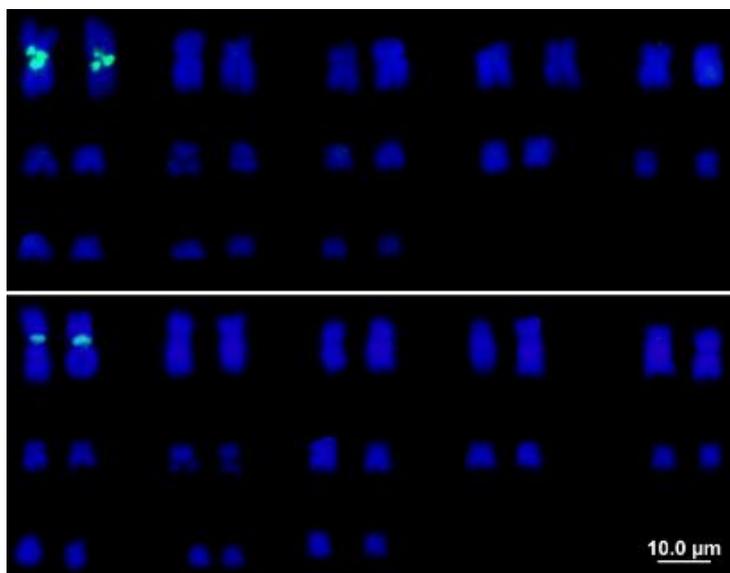


Figura 12: Sondas de PboSat03-189 submetidas à hibridação *in situ* nas populações de Santa Teresa (ES) e Paraty (RJ) (imagem de cima e de baixo, respectivamente).

5. Discussão

Thoropa miliaris possui hábito especialmente rupícola. Vive em afloramentos rochosos úmidos ou com fluxo baixo de água, distribuídos próximos ao mar em locais com altos níveis de salinidade e, muitas vezes, se desloca para a zona intertidal para forragear (ABE & BICUDO, 1991; FEIO et al., 2006). Por apresentarem essas adaptações, a espécie é tema de estudos fisiológicos (ABE & BICUDO, 1991), anatômicos (BARTH, 1956), ontogênicos (REBOUÇAS et al., 2018), taxonômicos (FEIO et al., 2006), além de ecológicos (ROCHA et al., 2002; GIARETTA & FACURE, 2004; SIQUEIRA et al., 2006) e filogeográficos (SABBAG, 2013, 2019).

Ainda assim, estudos envolvendo a organização e composição genômica como, por exemplo, a ocorrência e distribuição de sequências repetitivas são escassas. Os dados moleculares mais próximos são fornecidos por Duryea e colaboradores (2008, 2015) e envolvem uma espécie congênere, *Thoropa taophora*, da qual foram caracterizados nove microssatélites gerando marcadores úteis para estudar a estrutura genética e o fluxo gênico interpopulacional. Caracterizar e localizar estes elementos no genoma de *Thoropa miliaris* e comparar sua organização entre as populações isoladas de Paraty (RJ) e Santa Teresa (ES) podem fornecer informações importantes que podem auxiliar em todos os estudos envolvendo o organismo e, assim, ampliar o panorama de conhecimentos sobre a espécie.

As análises de alto rendimento em programas de bioinformática revelaram que, no indivíduo da população de Santa Teresa (ES) tratado, as sequências repetitivas representam um terço do genoma, e que aproximadamente 20% dos *reads* aleatórios analisados são DNAs satélites. Esse resultado corrobora a grande representatividade das sequências altamente repetitivas, esperada em muitos organismos eucariotos (SHARMA & RAINA, 2005; PHOHL et al., 2012), e que seus tamanhos são variáveis (FELICIELLO et al., 2006, SANTOS et al., 2006; MACGREGOR & SESSIONS, 1986).

Foram identificadas 21 famílias de DNA satélites, correspondendo a 6% dos *reads* analisados no genoma. A diminuição percentual considerável de DNA satélite em relação a do número de fragmentos repetitivos em geral provavelmente se deu graças à exclusão dos segundo e terceiro *clusters* mais abundantes computados pelo programa, que não apresentavam organização em tandem apesar de seus grafos caracterizarem disposição altamente repetitiva. Esses *clusters* são sequências repetitivas não caracterizadas. Segundo a classificação adotada por Guy-Franck et al. (2008), podem tratar-se de elementos transponíveis, que possuem sequências repetitivas diretas verificadas em suas extremidades e são amplamente documentados em anuros (MISKEY et al., 2003; SHEN et al., 2013; PHILIPSEN, 2016; ROGERS et al., 2018).

A homologia de 78,5% entre o satélite TmiSat02-189 e um fragmento de DNA repetitivo homólogo ao RNA ribossomal 5S em *Ctenopharyngodon idella* (carpa do limo) merece algumas considerações. Esse componente da maior subunidade do ribossomo é codificado pelo rDNA 5S, que é organizado em unidades repetidas em

tandem, compostas por uma região codificadora conservada entre taxa distantes, e uma sequência espaçadora não codificadora muito variável, denominada NTS (FEDOROFF, 1979; WILLIAMS, 2004; SANTOS et al., 2006). Martins e colaboradores (2006) observaram que uma família de DNA satélite centromérico isolada de *Hoplías malabaricus* surgiu da duplicação de rDNA 5S. Vitorazzi e colaboradores (2011) descrevem uma família de DNA satélite em *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae), denominada PcP190, semelhante ao DNA ribossomal 5S presente em outras famílias de anuros, bem como em vertebrados filogeneticamente distantes como peixes e répteis, sugerindo que essa sequência se conservou ao longo de centenas de milhões de anos e se originou do rDNA 5S. Foi observado que TmiSat02-189 apresenta homologia significativa com PcP190 isolado de várias espécies de anfíbios, demonstrando que TmiSat02-189 pertence à família de DNAs satélites PcP190.

Rodrigues e colaboradores (2012) estudaram a distribuição cariotípica de NTS em duas espécies do gênero *Engystomops*, encontrando hibridação particularmente centromérica dessa sonda. Nesse trabalho, sítios centroméricos de rDNA 5S codificante não foram detectados. Sua hipótese é que as sequências associadas ao centrômero são segmentos de DNA satélite derivados de rDNA 5S. TmiSat02-189 possui 57,1% de homologia com um tipo de NTS de *Engystomops petersi*, indicando uma semelhança sequencial relevante, além de existir uma semelhança posicional no cromossomo.

Foi encontrado um emparelhamento de 71% entre TmiSat02-189 e uma sequência de DNA satélite PcP190 isolado por Gatto e colaboradores (2018) em espécies dos gêneros irmãos *Pseudis* e *Lysapsus* (sugerindo que essas duas sequências têm origem em comum). Neste trabalho, os autores observaram que o satélite PcP190 é enriquecido entre o centrômero e o braço p do cromossomo portador da região organizadora do nucléolo (NOR) em *P. bolbodactyla*, indicando um estágio inicial de heteromorfismo entre o par morfologicamente idêntico. O acúmulo diferenciado de PcP190 poderia influenciar a diferenciação morfológica do par sexual da espécie. Vitorazzi et al. (2011) também apontaram a contribuição de PcP190 no processo de heteromorfismo entre os cromossomos sexuais de *Physalaemus ephippifer*. A dinâmica do DNA satélite durante a diferenciação cromossômica sexual é

uma característica comum dos eucariotos (SINGH et al., 1979; CHARLESWORTH et al., 2005; KEJNOVSKY et al., 2009).

Como antes mencionado, o DNA satélite é o principal componente do centrômero na maioria dos organismos eucariotos, com organização em longas matrizes ao longo dessa arquitetura (PARDUE & GALL, 1970; PLOHL et al., 2012). Sua função estrutural na maquinaria de segregação centromérica é altamente conservada (DOVER, 1982). Contudo, DNAs satélites são os elementos que mais rapidamente evoluem no genoma, podendo ser desde espécie-específicos até compartilhados entre várias taxa de um filo (HENIKOFF et al., 2001; VITTORAZZI et al., 2011; MEHROTRA & GOYAL, 2014).

Embora sejam externamente iguais, com o mesmo número diplóide ($2n=26$) e número fundamental ($NF=52$), os cariótipos das populações isoladas de *T. miliaris* apresentam variações na abundância e na posição cromossômica de todas as sequências de DNA satélite isoladas no presente trabalho. Destes, TmiSat02-189, TmiSat05-143, TmiSat08-68, TmiSat10-71 e PboSat03-189, incluído posteriormente, apresentaram superabundância centromérica na população de Santa Teresa (ES) em relação à de Paraty (RJ), seguindo um padrão coincidente com evidências de evolução interpopulacional do DNA satélite centromérico. Dentro de uma espécie em evolução alopátrica, a alta taxa de variabilidade do DNA satélite centromérico contribui para a divergência geral dessas sequências entre as populações isoladas (HENIKOFF et al., 2001; FELICIELLO et al., 2014; GARRIDO-RAMOS, 2015; HARTLEY & O'NEILL, 2019).

Henikoff et al. (2001) exploraram essa questão assumindo como modelo espécies irmãs do gênero *Drosophila*. Ao estudarem essas sequências associadas a CenH3, uma variante da histona H3, componente do nucleossomo centromérico e essencial para a formação do cinetocoro (observada a extinção da função centromérica em sua ausência), verificaram que as sequências de DNA satélite nessa região estão submetidas à rápida evolução, sincronizada com a evolução da histona CenH3 para neutralizar os efeitos deletérios desses acúmulos. A rápida evolução do complexo centromérico levaria a uma incompatibilidade entre CenH3 e o DNA satélite centromérico de outra população isolada, uma vez que esta última evolui independentemente. É criada, dessa forma, uma barreira reprodutiva pós-zigótica entre

as populações. As populações de Santa Teresa (ES) e Paraty (RJ) são separadas por extensas barreiras geográficas, e as diferenças observadas quanto à abundância de DNA satélite centromérico entre elas pode indicar que o isolamento genético está em curso.

Compreender os tempos de divergência do gênero *Thoropa* pode fornecer uma breve estimativa das consequências evolutivas do isolamento geográfico entre as populações de Santa Teresa (ES) e Paraty (RJ). Sabbag (2019) delineou a história evolutiva de *Thoropa* grupo *miliaris*, que inclui *T. miliaris* na floresta tropical Atlântica, utilizando marcadores moleculares de DNA mitocondrial nas estimativas. A divergência de *T. grupo miliaris* começou possivelmente no Mioceno (8,5 - 3,7 Ma). Nesse estudo, *Thoropa miliaris* apresentou cinco clados geneticamente distintos, e dois deles abrangem respectivamente as populações de Santa Teresa (ES) (mil-2) e Paraty (RJ) (mil-4) (SABBAG, 2019).

As diferenças significativas de abundância de TmiSat02-189 entre *Thoropa miliaris* de Santa Teresa (ES) e Paraty (RJ) são possivelmente os indicadores mais explícitos da evolução independente de DNAs satélites centroméricos à qual essas populações estão submetidas. O DNA satélite TmiSat04-44 é disperso por todos os cromossomos apenas na população de Santa Teresa (ES), não aparecendo nos cromossomos de Paraty (RJ). É possível que essa sequência, pouco expressiva no genoma de *Thoropa miliaris* de Santa Teresa (ES), o seja ainda menos na população de Paraty (RJ) ou praticamente inexistente (baixo número de cópias), tornando as marcações por hibridação imperceptíveis.

TmiSat05-143 é presente em todos os centrômeros do cariótipo de Santa Teresa (ES), inclusive na zona pericentromérica e intersticial de alguns pares, com destaque para o par da NOR. Essa distribuição contrasta com marcações pontuais invariáveis em apenas um braço (p) na região subtelomérica de uma cromátide dos pares 10 e 11, verificada em todas as metáfases. A presença de TmiSat05-143 na região centromérica do cariótipo de Santa Teresa (ES) em detrimento de Paraty (RJ) se encaixa nas mesmas considerações feitas a respeito de TmiSat02-189. A zona subtelomérica é conhecida como “sítio frágil” predisposta a rearranjos cromossômicos, formando gaps ou quebras em uma ou as duas cromátides irmãs (D'ANGELO, 2009), o

que pode ter causado a assimetria da marcação nos dois pares do cariótipo de Paraty (RJ).

Na população de Santa Teresa (ES), os pares 9 e 11 apresentaram abundância pericentromérica e intersticial de TmiSat08-68, o que não ocorreu na população de Paraty (ES) em nenhum cromossomo, reforçando a superabundância dessas sequências na zona centromérica da população de Santa Teresa. Na população de Paraty (RJ), TmiSat08-68 é evidente nos telômeros, evidenciando a riqueza desse DNA satélite na formação da heterocromatina telomérica, protetora do cromossomo (BRANDE et al., 1995; GARRIDO-RAMOS, 2017). Embora TmiSat10-71 seja o menos representativo no genoma de *Thoropa miliaris*, também possui um padrão de acumulação diferenciado entre as populações, por ser notado de forma geral na região centromérica da população de Santa Teresa (ES) comparado à população de Paraty (RJ), que abriga esse satélite na região telomérica de alguns pares.

O satélite PboSat03-189 apresenta uma abundância prevista na população de Santa Teresa (ES) em relação à de Paraty (RJ). PboSat03-189 e TmiSat02-189 não possuem homologia sequencial significativa (42,1%), mas sim a mesma distribuição cromossômica em *Thoropa miliaris*. Essa coincidência demonstra a conservação estrutural do DNA satélite na arquitetura centromérica, e acender a hipótese de que PboSat03-189, que apresenta 89% de semelhança com o altamente conservado PcP190 isolado por Vittorazzi e colaboradores (2011), seria uma sequência centromérica conservada pelo menos entre anuros filogeneticamente próximos. Contudo, mais estudos sobre a distribuição desse DNA satélite pelo genoma são necessários para descortinar seu contexto na evolução cromossômica dos anfíbios.

6. Conclusões

Foi identificado, caracterizado e localizado o conteúdo altamente repetitivo no genoma de *Thoropa miliaris*, com ênfase na comparação interpopulacional de DNAs

satélites entre Santa Teresa (ES) e Paraty (RJ). Algumas sequências de DNA satélite isoladas apresentaram homologia sequencial e/ou posicional com satélites altamente conservados até mesmo entre grupos filogeneticamente distantes, e também com rDNA 5S, que deriva variantes de DNAs satélites. O DNA satélite é o principal componente da heterocromatina centromérica dos eucariotos, e sua alta taxa de divergência entre populações geograficamente isoladas favorece a incompatibilidade entre os complexos centroméricos, causando o isolamento pós-zigótico. Com o emprego da FISH, o acúmulo diferenciado de cada DNA satélite isolado na população de Santa Teresa (ES) em detrimento da população de Paraty (RJ) foi melhor explorado. O padrão de acúmulo de DNA satélite centromérico coincidiu com as diferenças verificadas pelo bandamento C, contribuindo para a hipótese de que essas populações, segregadas por uma extensa barreira geográfica e submetidas à evolução independente do complexo centromérico, poderiam estar submetidas um processo de isolamento genético, sendo necessários mais estudos para corroborar essa tese.

7. Referências bibliográficas

ABE AS, BICUDO J. (1991). Adaptations to salinity and osmoregulation in the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia, Leptodactylidae). **Zoologischer Anzeiger**, 227, 313–318.

AmphibiaWeb. (2019). <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 11 Aug 2019.

BARTH, R. (1956). Observações anatômicas sobre a larva de *Thoropa miliaris* (Amphibia, Leptodactylidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** [online]. Vol.54, n.3.

BRANDES, A., RODER, M.S. & GANAL, M.W. (1995). Barley telomeres are associated with two different types of satellite DNA sequences. **Chromosome Res**, Vol.3, pp 315-320.

- BRUM-ZORILLA N. and SAEZ F. A. (1968). Chromosomes of Leptodactylidae (Amphibia, Anura). *Experientia*, 24: 969. Brutlag, D. L. 1980. Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. **Annu. Rev. Genet.** 14:121-144.
- CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. (2010). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, 104, 393–400.
- CAPRIGLIONE, T., OLMO, E., ODIERNA, G. et al. (1989). Genome composition and tandemly repetitive sequence at some centromeres in the lizard *Podarcis s. sicula* Raf. **Genetica** 79: 85.
- CARDONE, D.E., FELICIELLO, I., MAROTTA, M., ROSATI, C., CHINALI, G. (1997). A family of centromeric satellite DNAs from the European brown frog *Rana graeca italica*. **Genome** 40: 774–781.
- CARNAVAL, A.C.; HICKERSON, M.J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C. (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science*, v. 323, p. 785-789.
- CAZAUX B, CATALAN J, JUSTY F, ESCUDÉ C, DESMARAIS E, BRITTON-DAVIDIAN J (2013). Evolution of the structure and composition of house mouse satellite DNA sequences in the subgenus *Mus* (Rodentia: Muridea): a cytogenomic approach. **Chromosoma** 122:209–220.
- CHARLESWORTH B., SNIÉGOWSKI P, STEPHAN W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**. 371: 215-220.
- CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, Gabriel. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, n. 2, p. 118.
- CREPALDI, C. Estudo da origem e evolução dos cromossomos sexuais do gênero *Megaleporinus* a partir de sequências repetitivas. Rio Claro. Tese de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Biociências.
- D'ANGELO, C. S. (2009). Pesquisa dos mecanismos de rearranjos cromossômicos subteloméricos na monossomia 1p36, expansão do espectro da variabilidade fenotípica e comportamental, diagnósticos diferenciais e caracterização de uma região crítica para obesidade. Doctoral Thesis, Instituto de Biociências, University of São Paulo, São Paulo. Retrieved 2019-09-11, from www.teses.usp.br.

- DOVER GA. (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. **Nature** 299: 111–117.
- DURYEA MC, ZAMUDIO KR, BRASILEIRO CA. (2005). Characterization of microsatellite markers for *Thoropa taophora* (Anura, Cycloramphidae), a frog endemic to the Brazilian Atlantic Rain Forest. **Mol Ecol Res** 8:663–665.
- DURYEA MC, ZAMUDIOKR, BRASILEIRO CA.(2008). Vicariance and marine migration in continental island populations of a frog endemic to the Atlantic Coastal forest. **Heredity**. 115:225–34.
- EDWARDS, N.S., MURRAY A.W. (2005). Identification of *Xenopus* CENP-A and an Associated Centromeric DNA Repeat **Mol. Biol. Cell**, 16. pp. 1800-1810.
- FEDOROFF N.V. (1979). Deletion mutants of *Xenopus laevis* 5S ribosomal DNA. **Cell**. 16: 551-563.
- FEIO, R. N. (2002). Revisão taxonômica do gênero *Thoropa* Cope, 1865 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Tese apresentada ao Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 217 pp..
- FEIO, R.N.; NAPOLI M.F.; CARAMASCHI, U. Considerações taxonômicas sobre *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) com revalidação e redescrição de *Thoropa taophora* (Miranda-Ribeiro, 52 1923) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional**, v. 64, n. 1, p. 41- 60, 2006.
- FELICIELLO I, PICARELLO O, CHINALI G. (2006). Intra-specific variability and unusual organization of the repetitive units in a satellite DNA from *Rana dalmatina*: molecular evidence of a new mechanism of DNA repair acting on satellite DNA. **Gene** 383: 81–92.
- FELICIELLO, Isidoro et al. (2014). Satellite DNA as a driver of population divergence in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Genome biology and evolution**, v. 7, n. 1, p. 228-239.
- FERREE PM, PRASAD S. (2012). How can satellite DNA divergence cause reproductive isolation? Let us count the chromosomal ways. **Genet Res Int**.
- FITZPATRICK, S.W.; BRASILEIRO, C.A.; HADDAD, C.F.B.; ZAMUDIO, K.R. (2009). Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. **Molecular Ecology**, v.18, p.2877-2896.
- GARCIA, P., PEIXOTO, O. L., MOREIRA, G. (2010). *Thoropa miliaris*. The IUCN Red List for Threatened Species <<https://www.iucnredlist.org/species/57371/11628284>>

- GARRIDO-RAMOS, Manuel A. (2015). Satellite DNA in plants: more than just rubbish. **Cytogenetic and genome research**, v. 146, n. 2, p. 153-170.
- GARRIDO-RAMOS, Manuel. (2017). Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**. 8(9):230.
- GATTO, Kaleb Pretto et al. (2018). Sex chromosome differentiation in the frog genus *Pseudis* involves satellite DNA and chromosome rearrangements. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 301.
- GIARETTA, Ariovaldo Antonio; FACURE, Kátia Gomes. (2004). Reproductive ecology and behavior of *Thoropa miliaris* (Spix, 1824)(Anura, Leptodactylidae, Telmatobiinae). **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1-9.
- GRADY L., RATLIFF, D & L., ROBINSON, R & L., D & MCCANLIES, Erin & Meyne, J & K MOYZIS, R.(1992). Highly Conserved Repetitive DNA Sequences are Present at Human Centromeres. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 89. 1695-9.
- GUY-FRANCK, R., KERREST, A., DUJON, B. (2008). Comparative genomics and molecular dynamics of repeats in eukaryotes. **Microbiol . Mol. Biol. Rev.** (72)4: 686-727.
- HADJIOLOV, AA. (1985). The nucleolus and ribosome biogenesis. **Springer**, New York, p 263.
- HARTLEY, Gabrielle; O'NEILL, Rachel J. (2019). Centromere repeats: hidden gems of the genome. **Genes**, v. 10, n. 3, p. 223.
- HENIKOFF, S., AHMAD, K., & MALIK, H. S. (2001). The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. **Science**, 293(5532), 1098-1102.
- IUCN 2019. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-2.
<<http://www.iucnredlist.org>>
- JOBSE C, BUNTJER JB, HAAGSMA N, BREUKELMAN HJ, BEINTEMA JJ, LENSTRA JA (1995). Evolution and recombination of bovine DNA repeats. **J Mol Evol** 41:277–283.
- JURKA, J. et al. (2005). Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenet. Genome Res.** 110, 462–467.

KATO A, LAMB JC, BIRCHLER, JA. (2004). Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101: 13554–13559.

KEJNOVSKY, E. et al. (2009). The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. **Heredity**, v. 102, n. 6, p. 533.

KOPECNA O, KUBICKOVA S, CERNOHOSKA H, CABELOVA K, VAHALA J, RUBES J. (2012). Isolation and comparison of tribe-specific centromeric repeats within Bovidae. **J Appl Genet.** 53:193–202.

LICA, L. M., NARAYANSWAMI, S., HAMKALO, B. A. Mouse satellite DNA, centromere structure, and sister chromatid pairing. **Rockefeller University Press.** Vol. 103 no. 4 1145-1151

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M.A. (2012). The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In: GARRIDO-RAMOS, M.A. (ed): **Repetitive DNA. Genome Dynamics**, Karger, p. 1-28.

LOWER, S.S.; MCGURK, M.P.; CLARK, A.G.; BARBASH, D.A. (2018). Satellite DNA evolution: Old ideas, new approaches. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 49, 70–78.

MACGREGOR, H. C., and S. K. SESSIONS.(1986). “The Biological Significance of Variation in Satellite DNA and Heterochromatin in Newts of the Genus *Triturus*: An Evolutionary Perspective.” **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, vol. 312, no. 1154, pp. 243–259.

MADSEN, C. S., BROOKS, J. E., KLOET, E., KLOET, S. R. Sequence conservation of an avian centromeric repeated DNA component. **Genome** 37 (3) 351-355.

MANTOVANI, B, TINTI F, BACHMANN L, SCALI V. (1997). The Bag320 satellite DNA family in *Bacillus* stick insects (Phasmatodea): different rates of molecular evolution of highly repetitive DNA in bisexual and parthenogenic taxa. **Mol Biol Evol.**14(12):1197–1205.

MARTINS, C., FERREIRA, I. A., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. & GALETTI, P. M. Jr. (2006). A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* **Genetica** (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. 127, 133–141.

MARTINS C. (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome, in: PISANO E, OZOUF-COSTAZ C, FORESTI F, KAPOOR BG (eds): **Fish Cytogenetics**, pp 421–453. Science Publisher, Hauppauge.

MAXSON R, COHN R, KEDES L, Mohut T. (1983). Expression and organization of histone genes. **Ann Rev Gen** 17:239–277.

MEHROTRA, Shweta; GOYAL, Vinod. (2014). Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 164-171.

MISKEY, C., IZSVÁK, Z., PLASTERK, R. H., & IVICS, Z. (2003). The Frog Prince: a reconstructed transposon from *Rana pipiens* with high transpositional activity in vertebrate cells. **Nucleic acids research**, 31(23), 6873-6881.

MURPHY, T. D., & KARPEN, G. H. (1995). Localization of centromere function in a *Drosophila* minichromosome. **Cell**, 82(4), 599–609.

NANDA, I., SCHARTI, M., FEICHTINGER W. et al. (1992). Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. **Chromosoma**. 101: 301.

NOVÁK, P, NEUMANN P, MACAS J. (2010). Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics** 11:378.

OLIVEIRA TD, KRETSCHMER R, BERTOCCHI NA, DEGRANDI TM, de OLIVEIRA EHC, CIOFFI MB, GARNERO ADV and GUNSKI RJ. (2017). Genomic organization of repetitive DNA in woodpeckers (Aves, Piciformes): Implications for karyotype and ZW sex chromosome differentiation.

OLMO, E. (2008). Trends in the evolution of reptilian chromosomes. *Integrative and Comparative Biology*, Volume 48, Issue 4, 1. Pages 486–493.

PARDUE, Mary Lou; GALL, Joseph G. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. **Science**, v. 168, n. 3937, p. 1356-1358.

PARISE-MALTEMPI, PP, MARTINS C, OLIVEIRA C, FORESTI F. (2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenet Genome Res**. 116: 218-223.

PERKINS, R.i & GAMBOA, J., JONIKA, M., LO, J, SHUM, Amy, ADAMS, R., BLACKMON, H. (2019). A database of amphibian karyotypes. **Chromosome Research**. 27.

- PHILIPPSEN, Gisele S., et al. (2016). Distribution patterns and impact of transposable elements in genes of green algae. **Gene**. vol. 594, no 1, p. 151-159.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 2934-2938.
- PLOHL M, MESTROVIC N, MRAVINAC B (2012) Satellite DNA evolution. In: Garrido-Ramos MA (ed) Repetitive DNA, Genome dynamics, 7th edn. **Karger**, Basel, pp 126–152.
- REBOUÇAS, Raoni; DA SILVA, Hélio Ricardo; SANUY, Delfi. (2018). Froghood: Postmetamorphic development of the rock river frog *Thoropa miliaris* (Spix, 1824)(Anura, Cycloramphidae). **Acta Zoologica**, v. 99, n. 2, p. 151-157.
- ROCHA, Carlos Frederico D. et al. (2002). Microhabitat use and orientation to water flow direction by tadpoles of the leptodactylid frog *Thoropa miliaris* in southeastern Brazil. **Journal of herpetology**, p. 98-100.
- RODRIGUES, Débora Silva; RIVERA, Miryan; LOURENÇO, Luciana Bolsoni. (2012). Molecular organization and chromosomal localization of 5S rDNA in Amazonian *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). **BMC genetics**, v. 13, n. 1, p. 17.
- ROGERS, Rebekah L. et al. (2018). Genomic takeover by transposable elements in the strawberry poison frog. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 12, p. 2913-2927.
- RUIZ-RUANO F.J. , LÓPEZ-LEÓN, M.D., CABRERO J., CAMACHO J.P.M. (2013). High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Sci. Rep.** 6:28333.
- SABBAG, A.F. (2013). Filogeografia de *Thoropa* grupo *miliaris* (Anura: Cycloramphidae) São José do Rio Preto. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
- SABBAG, A.F., M.L. LYRA, K.R. ZAMUDIO, C.F.B. HADDAD, R.N. FEIO, F.S.F. LEITE, J.L. GASPARINI, e C.A. BRASILEIRO. (2018). Molecular phylogeny of Neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest. **Mol. Phylogenet. Evol.** 122:142–156.
- SABBAG, A.F. (2019). Variação genética e morfológica das espécies de *Thoropa* (Cope, 1865) (Anura, Cycloramphidae) Rio Claro. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Biociências.

- SANTOS, Sara et al. (2006). Amplification of the major satellite DNA family (FA-SAT) in a cat fibrosarcoma might be related to chromosomal instability. **Journal of heredity**, v. 97, n. 2, p. 114-118.
- SHARMA, S., and S. N. RAINA. (2005). Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 109:15–26.
- SHEN, Jiangshan J. et al. (2013). Genomic dynamics of transposable elements in the western clawed frog (*Silurana tropicalis*). **Genome biology and evolution**, v. 5, n. 5, p. 998-1009.
- SILVA, D. et al. (2013). Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): Dispersive location, association and co-localization in the genome. **Genetica**. 141.
- SINGH, Lalji; PURDOM, Ian F.; JONES, Kenneth W. (1979). Behaviour of sex chromosome associated satellite DNAs in somatic and germ cells in snakes. **Chromosoma**, v. 71, n. 2, p. 167-181.
- SIQUEIRA C. C.; SLUYS, M. V.; ARIANI, C. V. and ROCHA, C. F. D. (2006). "Feeding Ecology of *Thoropa miliaris* (Anura, Cycloramphidae) in Four Areas of Atlantic Rain Forest, Southeastern Brazil," **Journal of Herpetology** 40(4), 520-525.
- SOLOVEI, I.V., JOFFE, B.I., GAGINSKAYA, E.R. et al. (1996). Transcription on lampbrush chromosomes of a centromerically localized highly repeated DNA in pigeon (*Columba*) relates to sequence arrangement. **Chromosome Res** 588-603.
- TERENCIO ML, SCHNEIDER CH, GROSS MC, CARMO EJ, NOGAROTO V, ALMEIDA MC, ARTONI FR, VICARI MR, FELDBERG E (2015) Repetitive sequences: the hidden diversity of heterochromatin in prochilodontid fish. **Comp Cytogenet** 9:465–481.
- VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO,, L. B.; DEL-GRANDE, M. L.; RECCO-PIMENTEL, S. (2011). M. Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, p. 101–107.
- VITTORAZZI, S, Lourenço L, Recco-Pimentel S. (2014). Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hyloiid frogs. **BMC Genet** 15:111.
- WILLIAMS, C.R. (2004). Focus on Genome Research; **Nova Biomedical Books**: New York, NY, USA.