



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)

ESTUDO DA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DE ELEMENTOS REPETITIVOS ISOLADOS DO GENOMA DE ESPÉCIES DE *PROCERATOPHRYS* (AMPHIBIA, ANURA, ODONTOPHRYNIDAE)

Marcelo João da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Fevereiro - 2019

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)

**ESTUDO DA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
ELEMENTOS REPETITIVOS ISOLADOS DO
GENOMA DE ESPÉCIES DE *PROCERATOPHRYS*
(AMPHIBIA, ANURA, ODONTOPHRYNIDAE)**

Marcelo João da Silva

ORIENTADORA: Prof. Dra. Patricia Pasquali Parise-Maltempi
CO-ORIENTADOR: Dr. Thiago Gazoni

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Biologia Celular e
Molecular).

Rio Claro, São Paulo, Brasil

Fevereiro - 2019

S586e

Silva, Marcelo João da

Estudo da organização estrutural de elementos repetitivos isolados do genoma de espécies de Proceratophrys (Amphibia, Anura, Odontophrynidae) / Marcelo João da Silva. -- Rio Claro, 2019
88 p. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Prof. Dra. Patricia Pasquali Parise-Maltempo

Coorientador: Dr. Thiago Gazoni

1. Sequenciamento genômico. 2. Citogenética. 3. DNA satélite. 4. RepeatExplorer. 5. FISH. 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da organização estrutural de elementos repetitivos isolados do genoma de espécies de Proceratophrys (AMPHIBIA, ANURA, ODONTOPHRYNIDAE)

AUTOR: MARCELO JOÃO DA SILVA

ORIENTADORA: PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

COORIENTADOR: THIAGO GAZONI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Profa. Dra. VANESSA BELLINI BARDELLA
Pós Doutorado do Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Profa. Dra. CINTIA PELEGRINETI TARGUETA DE AZEVEDO BRITO
Departamento de Genética / Universidade Federal de Goiás

Rio Claro, 26 de fevereiro de 2019

Dedico esse trabalho aos meus pais, João e Inês, aos meus irmãos, Mara e Marlon, a toda minha família, pelo amor e apoio a mim dedicados e a Deus, por nunca me deixar desistir.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida, pela inspiração e por estar comigo em todos os momentos, não me deixando desistir.

Agradeço imensamente à minha amada família, meus pais João e Inês, meus exemplos de vida e de caráter, e aos meus irmãos Mara e Marlon, agradeço por todo o amor e apoio desde o começo da minha vida acadêmica e, mais ainda, nestes dois anos em que ficamos separados. Aos meus avós Cícero, Anunciada, Nazaré e Francisco (*in memoriam*) por todo o apoio e carinho e por estarem sempre prontos a me ajudar, bem como meus tios, tias e primos. Obrigado por acreditarem em mim. Tudo isso foi por vocês.

À professora Dra. Patrícia Pasquali Parise-Maltempo por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, tornando-se mais do que uma orientadora, e sim uma segunda mãe para mim. Obrigado pelo incentivo, pela orientação, pelos ensinamentos, pela amizade e por acreditar em mim desde o início.

Em especial, ao Dr. Thiago Gazoni "*Thiaguinho*", uma das melhores pessoas que conheci em Rio Claro, e que desde que fomos apresentados, se tornou mais do que um co-orientador, e sim um amigo que vou levar para toda minha vida. O seu "*aluninho*" agradece por toda orientação, pelos ensinamentos de coleta de sapos, de citogenética, de laboratório e de tudo. As nossas aventuras de campo foram uma experiência magnífica e muito importante para minha formação. Obrigado pelas conversas e por todas as saídas para beber aquela cervejinha que ficávamos até sermos expulsos do bar. Foram momentos bons que estarão sempre em minha memória.

À Dra. Vanessa Bellini Bardella, que desde a minha chegada à Unesp me acolheu e se dispôs a me ajudar. Obrigado por toda ajuda a desvendar o mundo dos DNAs satélites e da Bioinformática, pela ajuda nos experimentos, disciplinas e pela valiosa contribuição para o trabalho na banca de qualificação e no trabalho final, e ao professor Diogo Cavalcante Cabral-de-Melo pelo apoio, por todo o conhecimento repassado no laboratório e nas disciplinas e pela contribuição para realização deste trabalho.

Agradeço imensamente aos meus colegas de laboratório, a doutoranda Luiza Rieder Cholak, a mestranda Carolina Crepaldi e o Dr. Rafael Borba por terem acolhido um "*estranho*" em seu meio. Agradeço por todo o conhecimento de laboratório e técnicas de Biologia Molecular repassados no início do meu mestrado. A acolhida de

vocês foi muito importante e agradeço de coração a cada um pelo companheirismo, dedicação, conversas e apoio durante toda a realização desse trabalho.

Em especial à Dra. Sanae Kasahara (*in memoriam*) que tive o prazer de conhecer ainda em vida, porém por pouco tempo, mas que foram valiosos para minha formação. Agradeço pelas preparações citogenéticas doadas no início do mestrado, pelas poucas conversas que tivemos e pela alegria que sempre tinha quando me encontrava no laboratório e ao professor Dr. Célio Fernando Baptista Haddad pela parceria grandiosa nesse trabalho. Obrigado pela identificação dos sapos, pela ajuda em coletas, pelas fotos cedidas e por todo apoio dado para realização desse trabalho.

Agradeço imensamente ao professor Dr. Edson Lourenço da Silva e a professora Dra. Tamaris Gimenez Pinheiro que me introduziram no mundo da citogenética desde a minha graduação na UFPI e que foram extremamente importantes na minha formação, sendo espelhos para minha vida profissional.

Aos alunos de Iniciação Científica do “*Pati Team*”, Évelin Mariani, Murilo Durigon Santos, Raquel F. Destro, Luciana Latsch, Mateus Tagliaferro, Leonardo Henrique e Gisele Pessoa. Vocês foram muito importantes para a concretização desse trabalho, seja com uma conversa informal, seja fazendo ou me ajudando em algum experimento, cada um de vocês tiveram uma contribuição para eu ter chegado até aqui. Obrigado pela acolhida e apoio.

Ao doutorando Diogo Milani, à mestrandas Ana Beatriz Machado Ferretti e ao Dr. Octavio Manuel Palacios Gimenez pela amizade, apoio e suporte durante a realização deste trabalho, e em especial aos amigos mestrados, Jefferson Oliveira Lima e Luís Sodelli, vocês se tornaram grandes amigos que vou levar para toda a minha vida. Foram muitos momentos juntos, muitos almoços, muitos churrascos, muita cerveja. E isso foi muito importante, cada momento com vocês foi um grande aprendizado de amizade e companheirismo.

Aos amigos Hideki Narimatsu e Paulo Pereira, os quais conheci durante as expedições de coleta e que não mediram esforços para me ajudar a coletar os sapos da minha pesquisa.

À secretária do Departamento de Biologia, Cristiane M. Miléo, à doutoranda Letícia Rocha e ao professor de inglês Lucas Squillante por todos os momentos juntos, pela parceria e apoio a mim concedido, e em especial, a Gerson Melo, técnico do Departamento de Biologia, e a pessoa mais divertida que conheci aqui em Rio Claro e que se tornou esse amigo “*bárbaro*”. Agradeço por cada saída que fizemos, por cada

cerveja e *drinks* que tomamos juntos, por todos os momentos divertidíssimos que tivemos.

A todos os integrantes do nosso grupo de *Whatsapp* “*Clube da Pepa*”, pelos momentos de descontração, pelas “*bobagens*” postadas, pelos churrascos, enfim, por todos os momentos bons que passamos juntos. Obrigado a cada um de vocês.

À Dra Cintia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito por aceitar fazer parte da banca de avaliação final e pelas contribuições na revisão do trabalho. Ao Dr. Willian Pinheiro da Costa, pelas valiosas contribuições na banca de qualificação e ao Dr. Kaleb Pretto Gatto, pelo apoio e disponibilidade em ler o trabalho. Suas considerações foram de grande relevância para o fechamento desse trabalho; ao professor Dr. Daniel Pacheco Bruschi, pela gentil ajuda em coletar e processar sapos na UFPR e enviá-los para nós aqui em Rio Claro, e à professora Dra. Luciana Bolsoni Lourenço, pela gentileza em nos disponibilizar material citogenético de *Proceratophrys* da Unicamp para futuros experimentos com DNAs satélites.

À minha namorada Paula Sanches Paschoali, pelo amor, carinho, companheirismo e paciência durante a realização deste trabalho. Sua ajuda e compreensão em momentos mais difíceis foram de grande importância. Muito obrigado por tudo amorzinho.

Agradeço a vocês meus amigos do Piauí, que desde o início, mesmo distantes sempre me apoiaram e torceram para o sucesso desse trabalho, em especial a Ana Paula Araújo, Flávia Cipriano e Maria Rita Cândido, nosso “*quarteto da citogenética*”.

Agradeço de modo geral ao Instituto de Biociências, ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) da Unesp de Rio Claro, ao Departamento de Biologia, pela estrutura para realização deste trabalho, bem como todos os seus funcionários. Em especial, a todos os professores do Departamento pelo ensinamento repassado.

Agradeço ao ICMbio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) pela concessão das permissões para coleta e transporte de espécimes da fauna silvestre.

Agradeço ao financiamento da FAPESP, pelo vínculo ao processo 2017/00195-7.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”. (Los Hermanos)

RESUMO

Dados citogenéticos de *Proceratophrys* ainda são escassos na literatura quando comparados a alguns outros grupos de anuros, e são restritos atualmente às espécies *P. boiei*, *P. appendiculata* e *P. renalis*, que possuem um número diploide de $2n = 22$ cromossomos e Região Organizadora de Nucléolo (RON) localizada no par 8, além de um padrão incomum de distribuição da heterocromatina constitutiva nos cromossomos de *P. boiei*, que apresentam grandes blocos heterocromáticos, além de um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ:ZW. A maioria dos genomas eucarióticos são compostos por grandes porções de sequências de DNAs repetitivos que estão localizadas principalmente na heterocromatina altamente compactada, e em muitos casos, é um dos componentes mais abundantes dos cromossomos sexuais. Nesse sentido, o grupo dos *Proceratophrys* torna-se interessante alvo para análises citogenéticas juntamente com a aplicação de ferramentas moleculares e genômicas, as quais podem contribuir no entendimento da evolução e diversidade de DNAs repetitivos, e com isso explorar discussões em relação a diferenciação de cromossomos sexuais. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar citogeneticamente a espécie *P. boiei*, sob o ponto de vista clássico e genômico, em busca de sequências repetitivas, avaliar a presença dessas sequências e buscar entender a sua organização no genoma dessa espécie. Ainda, o trabalho teve como objetivo descrever citogeneticamente outras espécies de *Proceratophrys*, aumentando a amostra de cariótipos descritos na literatura. Para isso, foram utilizadas técnicas convencionais e diferenciais de citogenética, sequenciamento genômico de *P. boiei* para busca de elementos repetitivos, através de análises de alto rendimento no *software RepeatExplorer* e outros programas de bioinformática, seguido de análises moleculares por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH). Por meio do sequenciamento foi possível estimar o tamanho do genoma de *P. boiei* em 1,6 Gpb, e com as análises, foi visto que 41% do genoma corresponde a sequências repetitivas, incluindo satDNAs, rDNA, elementos transponíveis e outros elementos repetitivos não caracterizados. Para esse trabalho, foram escolhidos três elementos repetitivos para serem explorados e localizados cromossomicamente em *P. boiei*, e a seleção foi feita levando-se em conta a maior abundância genômica. Foi possível constatar que essas sequências se tratam de DNAs satélites (satDNA) que foram nomeadas de PboSat1-176, PboSat2-173 e PboSat3-189. Os satDNAs PboSat1-176 e PboSat2-189 mapeados em *P. boiei* possuem localização cromossômica centromérica e pericentromérica, sugerindo o possível envolvimento destas repetições para a função centromérica. Estão presentes também no cromossomo sexual W, ocupando toda a área heterocromática, revelando a contribuição desta classe de DNA repetitivo para a quantidade e complexidade da heterocromatina constitutiva em *P. boiei*, podendo estar relacionados a diferenciação dos cromossomos sexuais nesta espécie. Já o satélite PboSat3-189 também teve localização centromérica, porém com um número de cópias bem menor em alguns pares de cromossomos, sugerindo que eventos de amplificação/deleção de sequências altamente dinâmicos estão ocorrendo aleatoriamente no genoma de *P.*

boiei. No trabalho, também foi descrito pela primeira vez os cariótipos de *P. schirchi*, *P. laticeps* e *P. melanopogon*, que apresentam um número diploide de $2n = 22$, além de detectar a presença de RONS no par de cromossomos 8 e no par 4 em *P. melanopogon* e revelar regiões de heterocromatina constitutiva no centrômero da maioria dos cromossomos destas espécies.

Palavras-chaves: Sequenciamento genômico, Citogenética, DNA satélite, *RepeatExplorer* e FISH.

ABSTRACT

Cytogenetic data from *Proceratophrys* are still scarce in the literature when compared to some other groups of anurans, and are currently restricted to the species *P. boiei*, *P. appendiculata* and *P. renalis*, which have a diploid number of $2n = 22$ chromosomes and the Nuclear Organizing Region (NOR) located in pair 8, in addition to an unusual pattern of distribution of constitutive heterochromatin in the *P. boiei* chromosomes, which present large heterochromatic blocks, as well as a system of ZZ:ZW sex chromosomes. Most eukaryotic genomes are composed of large portions of repetitive DNA sequences that are located primarily in highly compacted heterochromatin, and in many cases, is one of the most abundant components of sex chromosomes. In this sense, the *Proceratophrys* group becomes an interesting target for cytogenetic analysis along with the application of molecular and genomic tools, which may contribute to the understanding of the evolution and diversity of repetitive DNAs, and thereby explore discussions regarding the differentiation of sex chromosomes. Therefore, the objective of this study was to analyze the *P. boiei* species, from a classical and genomic point of view, in a search for repetitive sequences, evaluating the presence of these sequences and seeking to understand their organization in the genome of this species. In addition, the objective of this work was to describe cytogenetically other species of *Proceratophrys*, increasing the karyotype sample described in the literature. For this, we used conventional and differential cytogenetic techniques, genomic sequencing of *P. boiei* to search for repetitive elements, through high-throughput analyzes in the software *RepeatExplorer* and other bioinformatics programs, followed by molecular analyzes through Polymerase Chain Reaction (PCR) and Fluorescence in situ Hybridization (FISH). Through sequencing it was possible to estimate the size of the genome of *P. boiei* at 1.6Gpb, and with the analyzes, it was seen that 41% of the genome corresponds to repetitive sequences, including satDNAs, rDNA, transposable elements and other uncharacterized repeating elements. For this work, three repetitive elements were chosen to be explored and located chromosomally in *P. boiei*. This selection was made considering the greater genomic abundance, among other characteristics of similarity between them. After detailed analysis, it was possible to confirm that these sequences were satellite DNAs (satDNA) that were named PboSat1-176, PboSat2-173 and PboSat3-189. The PboSat1-176 and PboSat2-189 satDNAs mapped in *P. boiei* have centromeric and pericentromeric chromosomal location, suggesting the possible involvement of these replicates for the centromeric function. They are also present on the sexual chromosome W, occupying the entire heterochromatic area, revealing the contribution of this class of repetitive DNA to the quantity and complexity of the constitutive heterochromatin in *P. boiei*, which may be related to the sex chromosome differentiation in this species. The PboSat3-189 satellite was also centromeric in location but with a much smaller number of copies in some pairs of chromosomes, suggesting that highly dynamic sequence amplification / deletion events may be happening randomly in the *P. boiei* genome. In the work, the karyotypes of *P. schirchi*, *P. laticeps* and *P. melanopogon*, which present a diploid number of $2n = 22$, were also described for the first time, as well as to detect

the presence of RONS in chromosome pair 8 and in pair 4 in *P. melanopogon* and reveal regions of constitutive heterochromatin in the centromere of most of the chromosomes of these species.

Key words: Genomic sequencing, Cytogenetics, Satellite DNA, RepeatExplorer and FISH.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. O gênero <i>Proceratophrys</i>	13
1.2. Aspectos filogenéticos e citogenéticos de <i>Proceratophrys</i>	15
1.3. DNAs repetitivos	20
1.4. Cromossomos sexuais em anfíbios	26
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Material	30
3.2. Preparações citogenéticas.....	31
3.3. Extração de DNA genômico de tecidos sólidos	31
3.4. Sequenciamento Genômico e análises bioinformáticas.....	32
3.5. Construção de <i>primers</i> específicos e amplificação em cadeia	33
3.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	33
3.7. Hibridação Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	34
3.7.1. Tratamento das lâminas.....	34
3.7.2. Desnaturação dos cromossomos e das sondas.....	34
3.7.3. Lavagens e Detecção.....	35
3.7.4. Montagem das lâminas	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Capítulo 1: DNAs satélites centroméricos em <i>Proceratophrys boiei</i> (Anura, Odontophrynidae): uma abordagem molecular, genômica e comparativa.....	37
4.2. Capítulo 2: Estudo citogenético de quatro espécies de <i>Proceratophrys</i> (Anura, Odontophrynidae): análises convencionais e moleculares.	61
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	77
REFERÊNCIAS GERAIS	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Proceratophrys*

Considerando os dados compilados por Frost (2019), o levantamento atual do número estimado de representantes para a ordem Anura é de 7.036 espécies, as quais estão distribuídas por todos os continentes (exceto Antártida e latitudes extremas ao norte, bem como na maioria das ilhas oceânicas), e no Brasil há a ocorrência de 1.080 destas espécies (SEGALLA et al., 2016).

O gênero *Proceratophrys* pertence à família Odontophrynidae, que juntamente com *Macrogenioglottus* e *Odontophrynus* totalizam 54 espécies (PYRON & WIENS, 2011; FROST, 2018). Foi proposto por Miranda-Ribeiro em 1920 e tem como espécie tipo *P. biggibosa*, proveniente do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. É o mais representativo dos gêneros da família e compreende 41 espécies distribuídas no leste e Sul do Brasil, nordeste da Argentina e Paraguai, possivelmente estendendo-se para a Bolívia adjacente à fronteira brasileira, sendo encontradas em ambientes florestados e áreas abertas (PRADO & POMBAL, 2008; FROST, 2018).

A riqueza de espécies do gênero *Proceratophrys* provavelmente é subestimada, em relação ao número de espécies, conforme indicado pela constante descoberta e descrição de novas espécies, sendo que somente nos últimos sete anos, doze novas espécies foram descritas (PRADO & POMBAL, 2008; ÁVILA et al., 2011; MARTINS & GIARETTA, 2011; NAPOLI et al., 2011; CRUZ et al., 2012; BRANDÃO et al., 2012; DIAS et al., 2013; GODINHO et al., 2013; MARTINS & GIARETTA, 2013; MÂNGIA et al., 2014; MÂNGIA et al., 2018).

A classificação taxonômica para *Proceratophrys* tem sido realizada com base em similaridade morfológica externa, e suas espécies são comumente classificadas em grupos fenéticos ou complexos de espécies (GIARETTA et al., 2000; KWET & FAIVOVICH, 2001; PRADO & POMBAL, 2008), mesmo com evidências moleculares apontando para o não monofiletismo destes grupos (PRADO & POMBAL, 2008; AMARO et al., 2009; PYRON & WIENS 2011, TEIXEIRA et al., 2012).

O complexo *P. boiei* possui representantes caracterizados por apresentar um único e longo apêndice palpebral e sem apêndice rostral triangular. Inclui as espécies

P. boiei (Wied-Neuwied, 1824), *P. pavotii* Cruz, Prado & Izecksohn, 2005 e *P. renalis* (Miranda-Ribeiro, 1920).

As espécies do complexo *P. appendiculata* também possuem apêndices palpebrais únicos e longos, porém, diferente do grupo *P. boiei*, possuem o apêndice rostral triangular. Fazem parte deste complexo as espécies *P. appendiculata* (Günther, 1873), *P. laticeps* Izecksohn & Peixoto, 1981, *P. melanopogon* (Miranda-Ribeiro, 1926), *P. moehringi* Weygoldt & Peixoto, 1985, *P. phyllostomus* Izecksohn, Cruz & Peixoto, 1998, *P. sanctaritae* Cruz & Napoli, 2010, *P. subguttata* Izecksohn, Cruz & Peixoto, 1998, *P. tupinamba* Prado & Pombal, 2008, *P. vielliardi* Martins & Giaretta, 2011, *P. belzebul* Dias, Amaro, Carvahlo-e-Silva, e Rodrigues, 2013, *P. gladius* Mângia, Santana, Cruz, e Feio, 2014, *P. itamari* Mângia, Santana, Cruz, e Feio, 2014 e *P. izecksohni* Dias, Amaro, Carvahlo-e-Silva, e Rodrigues, 2013.

Os representantes do complexo *P. bigibbosa* são caracterizados pela falta de apêndices palpebrais e a presença de protuberâncias pós oculares. Fazem parte desse grupo as espécies *P. avelinoi* Mercadal de Barrio & Barrio, 1993, *P. bigibbosa* (Peters, 1872), *P. brauni* Kwet & Faivovich, 2001, *P. palustris* Giaretta & Sazima, 1993 e *P. rondonae* Prado & Pombal 2008.

Por fim, o complexo *P. cristiceps* agrupa espécies que não possuem os apêndices palpebrais e os apêndices rostrais proeminentes ou elevações postoculares, com *P. cristiceps* (Muller 1883), *P. cururu* Eterovick e Sazima 1998, *P. goyana* (Miranda-Ribeiro 1937), *P. concavitympanum* Giaretta, Bernarde & Kokubum, 2000, *P. moratoi* (Jim e Caramaschi 1980), *P. strussmannae* Avila, Kawashita-Ribeiro e Moraes 2011, *P. huntingtoni* Avila, Pansonato e Strussmann 2012, *P. carranca* Godinho, Moura, Lacerda e Feio 2013, *P. rotundipalpebra* Martins e Giaretta 2013, *P. bagnoi* Brandão, Caramaschi, Vaz-Silva e Campos 2013, *P. branti* Brandão, Caramaschi, Vaz-Silva e Campos 2013, *P. dibernardoii* Brandão, Caramaschi, Vaz-Silva e Campos 2013, *P. caramaschii* Cruz, Nunes e Juncá 2012, *P. aridus* Cruz, Nunes e Juncá 2012 e *P. ararype* Mângia, Koroiva, Nunes, Roberto, Ávila, Sant'Anna, Santana, e Garda, 2018. A espécie *P. schirchi* (Miranda-Ribeiro, 1937) encontra-se isolada, não fazendo parte de qualquer agrupamento do gênero.

A espécie *Proceratophrys boiei* (Wied-Neuwied, 1825) (Fig. 1) é representada por sapos neotropicais, endêmicos da Mata Atlântica, sendo encontrada em áreas de até 1.200 metros de altitude. Está distribuída ao longo do leste do Brasil, associada à Mata Atlântica e áreas de transição com Cerrado, do sul do estado do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná ao sul de Santa Catarina. A espécie é comumente encontrada na serapilheira dentro de florestas, próximo a córregos pequenos, estreitos e de fluxo lento permanente (HADDAD & SAZIMA, 1992; CONTE & MACHADO, 2005; ANANIAS et al., 2007; ZINA et al., 2007; PRADO & POMBAL, 2008; SERAFIM et al., 2008).

Os indivíduos apresentam um comportamento semi-fossorial e dimorfismo sexual, marcado por fêmeas maiores que os machos (CARNAVAL, 2002). O período reprodutivo varia entre os meses de setembro a janeiro, com um pico de abundância de machos vocalizando no final da estação chuvosa, e a maior parte da atividade de vocalização ocorrendo no início da noite (POMBAL, 1997; BERTOLUCI, 1998).



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

1.2. Aspectos filogenéticos e citogenéticos de *Proceratophrys*

Dados genéticos e citogenéticos de *Proceratophrys* ainda são escassos na literatura quando comparado a alguns outros grupos de anuros, e até o momento são limitados apenas à descrição do número e a morfologia cromossômica, baseados em

coloração convencional em Giemsa e diferencial por meio de Bandamento C e impregnação com nitrato de prata, ainda sem análises citogenômicas e moleculares para o gênero.

Os dados cariotípicos são restritos às espécies *P. boiei*, *P. appendiculata* e *P. renalis*, que possuem um número diploide de $2n = 22$ cromossomos e Região Organizadora de Nucléolo (RON) localizada no par 8, além de um padrão incomum de distribuição da heterocromatina constitutiva nos cromossomos de *P. boiei*, que apresentam grandes blocos heterocromáticos (ANANIAS et al., 2007; AMARO et al., 2012), diferente de outros anuros, que normalmente apresentam pequena quantidade de heterocromatina detectada pelo bandamento C.

O cariótipo e o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva de *P. boiei* de diferentes localidades foi descrito por Ananias e colaboradores (2007) (Figs. 2 e 3). Esses autores encontraram diferenças cromossômicas entre as amostras dos estados de São Paulo e da Bahia, suficientes para considerar a existência de um complexo de espécies sob o nome de *P. boiei*. Logo depois, Prado & Pombal (2008) realizaram uma ampla revisão taxonômica das espécies de *Proceratophrys* com apêndices palpebrais e, encontraram diferenças craniais entre as populações de *P. boiei* do nordeste e sudeste do Brasil, suficientes para considerá-las espécies distintas. Com isso, o nome *P. renalis* foi revalidado para as espécies do Nordeste do Brasil (PRADO & POMBAL, 2008).

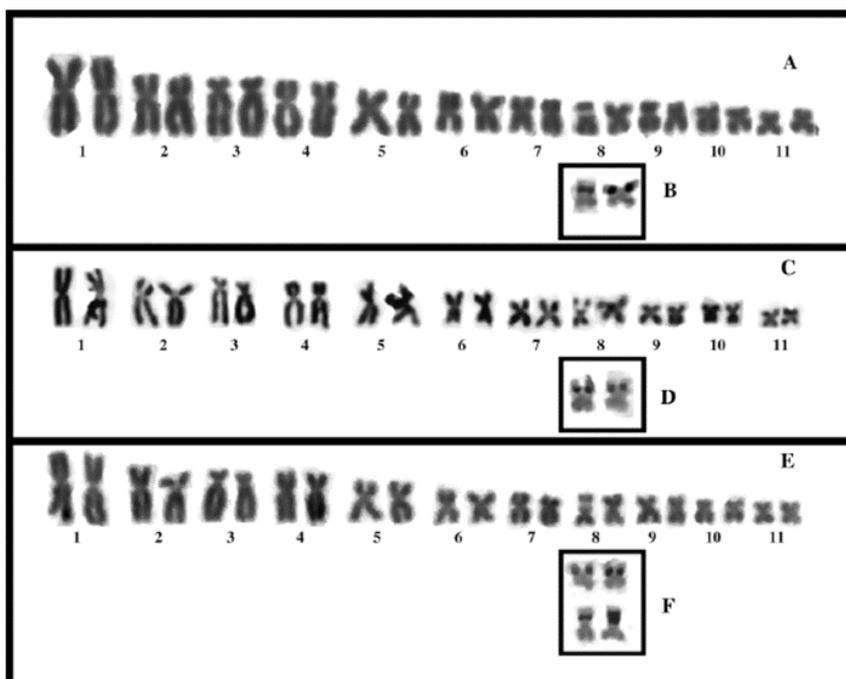


Figura 2. A e C: cromossomos de *Proceratophrys boiei* corados com Giemsa e Box B, D e F: cromossomos portadores da RON. A, macho (Mogi das Cruzes), C, fêmea (São Paulo), E, fêmea (Bahia). Observe a constrição secundária do par 8, que coincide com o sítio Ag-RON no estado homomórfico (B e D) e homomórfico / heteromórfico (F). Fonte: Ananias et al. (2007).

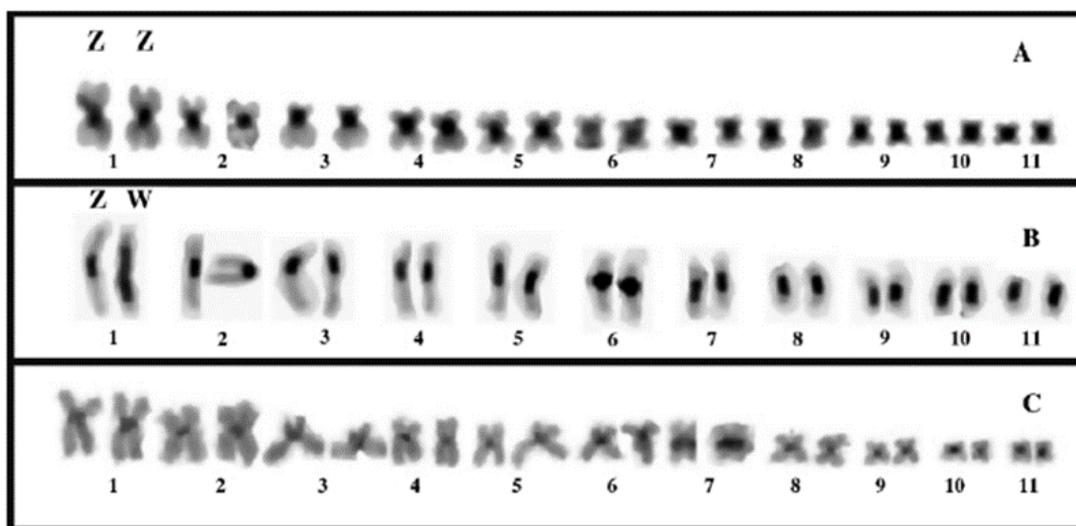


Figura 3. Cariótipos com bandas C positivas de *Proceratophrys boiei*. A, macho de Mogi das Cruzes; B, fêmea de São Paulo; C, fêmea da Bahia. O par cromossômico 1 de fêmeas de amostras de São Paulo corresponde a cromossomos sexuais. Observar a grande quantidade de heterocromatina nos cariótipos das amostras populacionais do sudeste do Brasil (Mogi das Cruzes e Santa Branca, SP) e um padrão incomum de bandas C positiva no cariótipo da amostra populacional do Nordeste do Brasil (Mata de São João, Bahia). Fonte: Ananias et al. (2007).

Análises moleculares realizadas por Amaro e colaboradores (2012) utilizando sequências mitocondriais e nucleares, mostraram resultados interessantes. No trabalho, os autores sugeriram independentes trajetórias evolutivas para *P. boiei* na região sul e sudeste do Brasil, além de descreverem a extensão geográfica de sua ocorrência e confirmarem o número diploide de $2n = 22$ cromossomos para a espécie. Além disso, os autores realizaram análises citogenéticas, nas quais foi possível verificar um padrão incomum na quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva e diferenças com relação à posição da RON em *P. boiei* das populações do Sul e Sudeste do Brasil.

A princípio, havia dois filogrupos de espécies para *P. boiei*: um grupo Sul e um grupo Norte. Por meio de dados moleculares, Amaro e colaboradores (2012) recuperaram dois subgrupos dentro do filogrupo Norte, passando a ser dividido em Norte 1 e Norte 2 (Fig. 4), resultado este que concorda com os dados cromossômicos obtidos no mesmo estudo (Fig. 5).

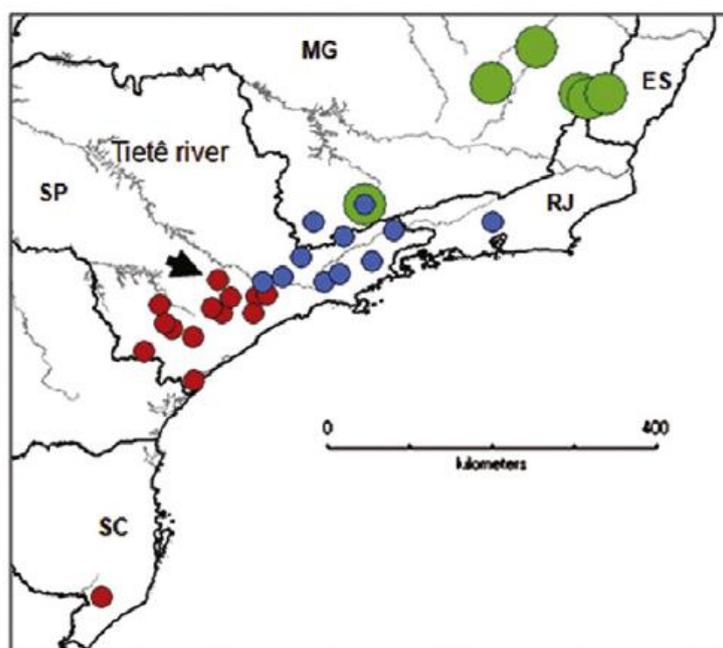


Figura 4. Mapa retratando localidades amostradas no trabalho de Amaro et al. (2012), que foram codificadas por cores para mostrar os representantes dos filogrupos Sul (vermelho), Norte 1 (verde) e Norte 2 (azul). A seta aponta para Iperó (SP), onde os dados cariotípicos mostram a hibridização entre os filogrupos do Sul e do Norte. Fonte: Amaro et al. (2012).

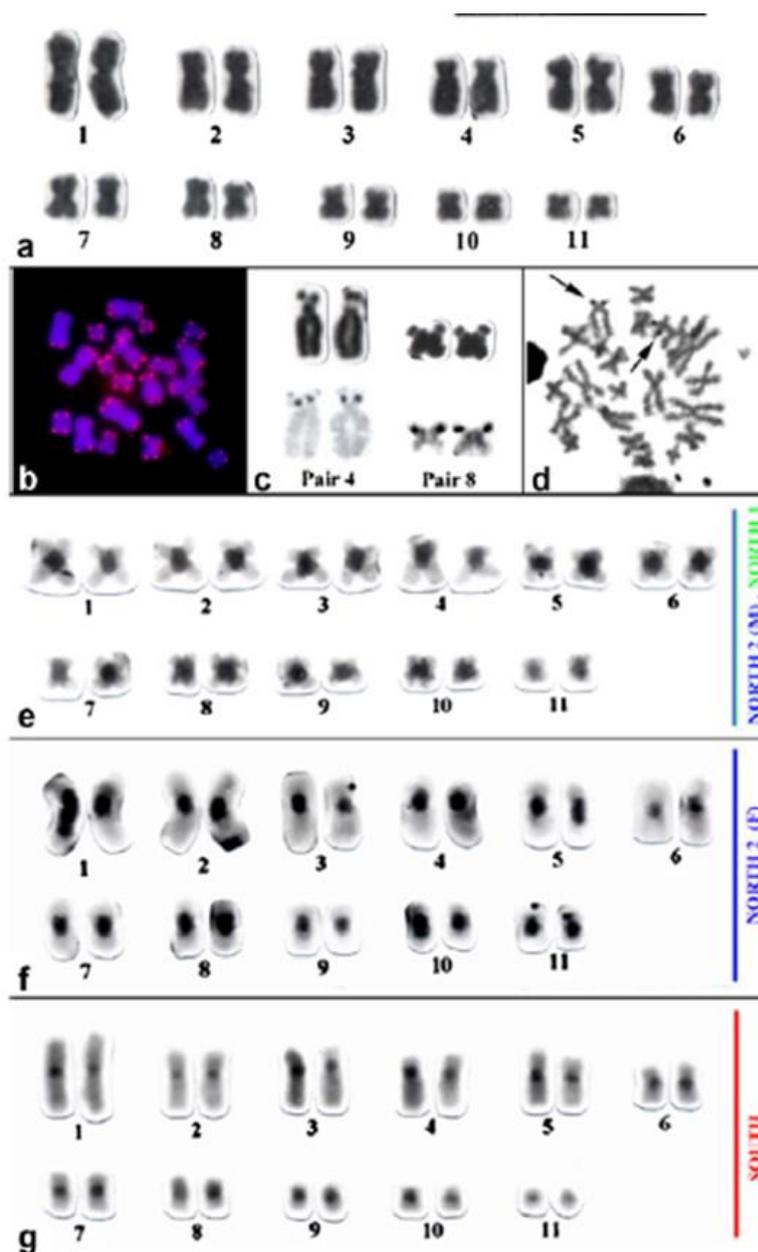


Figura 5. (a) Cariótipos e metáfases convencionais de coloração em Giemsa de *P. boiei*; (b) distribuição cromossômica da sequência telomérica (TTAGGG) $_n$ após FISH, mostrando exclusivamente o padrão telomérico; (c) pares 4 e 8 mostrando constrições secundárias em coloração convencional e localização Ag-RON; (d) metáfase do indivíduo híbrido de Iperó (SP). (e) cariótipo de macho (M) do filogruppo Norte 2: Cariótipos de machos (M) e fêmeas (F) do filogruppo Norte 1; (f) cariótipo de fêmea do filogruppo Norte 2; (g) cariótipo de fêmea do filogruppo sul. Fonte: Amaro et al. (2012).

Os indivíduos da espécie *P. boiei* foram então alocados conforme a região geográfica onde são encontrados, sendo divididos em: Clado Sul, correspondendo à região sul do Brasil e sul do estado de São Paulo, Clado Norte 1, correspondendo ao centro e norte de São Paulo e sul de Minas Gerais e Clado Norte 2, envolvendo o centro e norte de Minas Gerais, Rio de Janeiro e sul do Espírito Santo; todos correspondentes a áreas de Mata Atlântica e remanescentes (AMARO et al., 2012).

Os dados citogenéticos obtidos por Amaro e colaboradores (2012) para *P. boiei* são bastante interessantes, e abriram caminho para estudos envolvendo os cromossomos desta espécie, principalmente devido à grande quantidade de heterocromatina constitutiva e presença de um heteromorfismo cromossômico de banda C, relacionado à diferenciação de cromossomos sexuais.

Outro fato interessante presente nesta espécie está relacionado à localização da RON, cujos resultados de Amaro e colaboradores (2012) indicaram uma área de hibridização no sul de São Paulo. Nos indivíduos do Clado Norte 1 e 2 a RON foi localizada no par 8, já no Clado Sul, a RON foi localizada no par 4 e em uma análise de um macho na zona híbrida, o indivíduo estudado apresentou dois pares de cromossomos com a RON, uma no par 4 e outra no par 8 (AMARO et al., 2012).

Diante de todo o exposto, o grupo dos *Proceratophrys* torna-se interessante alvo para análises citogenéticas juntamente com a aplicação de ferramentas moleculares e genômicas, as quais poderão contribuir no entendimento da evolução e diversidade de DNAs repetitivos, e com isso explorar discussões em relação a diferenciação de cromossomos sexuais. Além disso, os dados resultantes poderão contribuir com discussões acerca das relações citogenéticas e filogenéticas entre diferentes populações de espécies de *Proceratophrys*.

1.3. DNAs repetitivos

A maioria dos genomas eucarióticos é composta por grandes porções de sequências de DNAs repetitivos. Em grande parte dos organismos, essas sequências compreendem uma fração considerável do genoma, podendo representar até 80% do genoma de plantas e anfíbios (LEWIN, 2014) e 50% ou mais do genoma humano (THE GENOME INTERNATIONAL SEQUENCING CONSORTIUM, 2001).

Essas sequências são classificadas de acordo com suas principais características, em sequências codificantes e não-codificantes, sendo as sequências codificantes representadas pelas famílias multigênicas, que estão envolvidas na codificação de importantes proteínas, como por exemplo as proteínas histônicas, assim como DNAs ribossomais (DNAr) e RNAs; e as não-codificantes, tais como DNAs satélite (satDNA), representados por sequências que apresentam repetições em tandem, além de transposons e retrotransposons, que são sequências que apresentam repetições dispersas ao longo do genoma (CHARLESWORTH et al., 1994; LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012).

Os DNAs satélites são sequências repetitivas que estão arranjadas em tandem nos genomas dos eucariotos. Constituem uma das frações mais abundantes dos genomas, consistindo em longas matrizes de sequências repetidas, localizadas preferencialmente na heterocromatina constitutiva das regiões cromossômicas centroméricas, pericentroméricas e subteloméricas, embora sua presença em regiões eucromáticas também já tenha sido relatada. Além disso, é comum estarem presentes em cromossomos sexuais e em cromossomos supranumerários (LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012; PLOHL et al., 2012; GARRIDO-RAMOS, 2015; RUIZ-RUANO et al., 2016; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2017; MILANI et al., 2017, 2018; UTSONOMIA et al., 2017; GATTO et al., 2018; RUIZ-RUANO et al., 2018).

DNAs repetitivos geralmente são envolvidos em processos de replicação e expansão de sequências através de múltiplos mecanismos, tais como *crossing over* desigual, conversão gênica, duplicação de genoma inteiro, duplicações segmentares e transposição (RICHARD et al., 2008; MATSUNAGA, 2009; KEJNOVSKY et al., 2009). Dessa forma, o tamanho e a abundância das repetições dos DNAs repetitivos variam muito dentro e entre as espécies, e por esse motivo, essas sequências são consideradas como sendo a principal causa de variação do tamanho dos genomas eucariotes, contribuindo assim com a evolução dos genomas (CHARLESWORTH et al., 1994; GREGORY, 2005).

Muitos são os estudos envolvendo DNAs repetitivos, genomas e cromossomos, e que vêm mostrando que grande parte dessas sequências pode ser utilizada como marcador citogenético em estudos de evolução cariotípica, estudos da organização do genoma e na identificação de rearranjos cromossômicos em diversos grupos de

organismos, como por exemplo, peixes (PISCOR et al., 2013, 2017; PONZIO et al., 2018), grilos (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2015, 2017), gafanhotos (MILANI et al., 2017, 2018) e também em anfíbios (GAZONI et al., 2012, 2018).

Apesar de décadas de pesquisa intensiva, o conhecimento sobre o significado funcional dos DNAs satélites é limitado, e um debate avaliando a funcionalidade dessas sequências ainda continua (PLOHL et al., 2012). Após a sua descoberta, no início da década de 1970, essa classe de DNA repetitivo foi considerada como “DNA lixo” por não conter regiões codificadoras (PLOHL et al., 2012). Entretanto, diversos estudos têm mostrado que os DNAs satélites exercem importantes papéis biológicos, dentre eles a participação na organização dos centrômeros e a modulação da expressão gênica (FELICIELLO, et al., 2005; PEZER et al., 2011; PLOHL et al., 2012; PLOHL et al., 2014; FUKAGAWA & EARNSHAW, 2014).

Nos últimos anos houve um crescente número de trabalhos que abordam a estrutura, localização e variabilidade dos satDNAs e é possível observar que as famílias de satDNAs encontradas podem distinguir entre si de acordo com a composição nucleotídica, tamanho da unidade de repetição, complexidade da sequência e localização cromossômica (PLOHL et al., 2008; PLOHL et al., 2012; LARRACUENTE, 2014; VITTORAZZI et al., 2014; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2017, 2018; MILANI et al., 2017, 2018; UTSONOMIA et al., 2017; GATTO et al., 2018; RUIZ-RUANO et al., 2018).

Por se tratar de elementos altamente dinâmicos, DNAs satélites apresentam uma alta identidade intraespecífica e baixa identidade interespecífica, significando que as repetições não estão evoluindo de forma independente uma da outra entre os genomas. A homogeneidade intraespecífica das sequências de DNA satélite se dá pela evolução não-independente dos monômeros, denominada “*Concerted evolution*”, em que as mutações se acumulam não só em uma unidade monomérica, mas são espalhadas entre unidades repetitivas de um DNA satélite ou são eliminadas (GARRIDO-RAMOS, 2017).

Concomitantemente, as mutações são fixadas dentro de um grupo de organismos ligados reprodutivamente, por meio de um processo chamado de *molecular drive*, que consiste em homogeneização e fixação de sequências (DOVER,

1982, 2002, UGARKOVIĆ & PLOHL, 2002; PLOHL et al., 2012; GARRIDO-RAMOS, 2017), dependendo de uma variedade de mecanismos de trocas não recíprocas de sequências de satDNAs, como por exemplo, *crossing-over* desigual, conversão gênica e replicação e reinserção de DNAs extracromossômicos entre os sítios portadores dessas sequências repetitivas (DOVER, 1982; PLOHL et al., 2012).

Por causa da diferença na taxa de homogeneização, monômeros adjacentes apresentam um maior grau de similaridade de sequência do que aqueles que se encontram em matrizes cromossômicas (WILLARD & WAYE, 1987; SCHINDELHAUER & SCHWARZ, 2002; HALL et al., 2005; ROIZES, 2006). Sendo assim, de acordo com o modelo de evolução em concerto para sequências repetitivas, as mutações se acumulam e se espalham dentro dos DNAs satélites gradualmente, e neste caso os DNAs satélites podem ser usados como marcadores filogeneticamente informativos (PLOHL et al., 2012; PLOHL et al., 2014; GARRIDO-RAMOS, 2017) (Fig. 6).

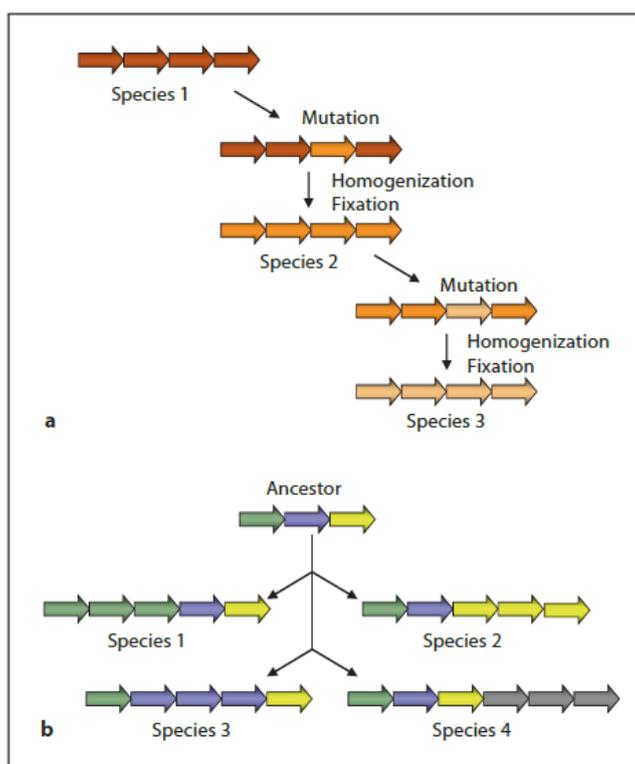


Figura 6. Representação esquemática de conceitos evolutivos de DNA satélite. a. “*Concerted Evolution*”: DNA satélite é alterado devido ao acúmulo gradual de divergência de sequência. b Conceito de biblioteca de DNA satélite. A variação nos perfis do satélite é obtida por alterações no número de cópias. Fonte: Garrido-Ramos, 2017.

A variação de abundância de famílias de DNAs satélites entre espécies proximamente relacionadas filogeneticamente pode ser explicada pelo modelo de bibliotecas de DNAs satélites. Tal modelo explica que espécies relacionadas compartilham uma coleção de sequências de DNAs satélites que era presente no ancestral comum, entretanto a abundância das diferentes famílias nos genomas de cada espécie pode ter um perfil espécie-específico, que é consequência das flutuações no número de cópias das sequências nessa biblioteca (UGARKOVIĆ & PLOHL, 2002). Como consequência dessas flutuações, em muitos casos há famílias de DNAs satélites que são espécie-específicas, ou seja, que só ocorrem em uma espécie de um grupo (KUHN et al., 2007; ACOSTA et al., 2010; TSOUMANI et al., 2013).

Estudos envolvendo isolamento, caracterização e mapeamento de satDNAs em anuros ainda são poucos. Há trabalhos, por exemplo, envolvendo o gênero *Rana*, em que dois DNAs satélites foram isolados e localizados nos cromossomos de *Rana italica* e *Rana graeca*, no qual os autores puderam propor que se tratam de espécies distintas, após conhecerem a localização cromossômica dessas sequências, além de testar padrões de homogeneização intraespecífica de sequências (CARDONE et al., 1997; PICARIELLO et al., 2002; FELICIELLO et al., 2005, 2006).

Em outro trabalho, uma família de DNA satélite denominada PcP190 foi caracterizada no gênero *Physalaemus* (*Physalaemus cuvieri*) por Vittorazzi e colaboradores (2011). Esse satélite teve sua origem atribuída a uma derivação do DNAr 5S devido à similaridade de 60% apresentada entre a região do gene dessa família multigênica e a sequência do DNA satélite. Logo depois, foi investigada a presença do DNA satélite PcP190 em outras espécies de *Physalaemus*, além de outras populações de *P. cuvieri* (VITTORAZZI et al., 2014) e também em *Leptodactylus latrans* (Leptodactylidae), *Crossodactylus gaudichaudii* (Hylodidae) e *Pseudis tocantins* (Hylidae) (VITTORAZZI et al., 2014; GATTO et al., 2016), no qual foi possível detectar a presença desse DNA satélite, mostrando que pode se tratar de um DNA satélite antigo, surgido há pelo menos 80 milhões de anos (GATTO et al., 2016). Além disso, foi demonstrado um acúmulo diferencial do DNA satélite PcP190 no cromossomo sexual W de *Physalaemus ephippifer*, podendo estar contribuindo para o processo de diferenciação dos cromossomos sexuais Z e W na espécie (VITTORAZZI et al., 2014).

Entre as espécies da família Hylidae, a rã *Pseudis tocantins* é a única que apresenta cromossomos sexuais Z e W heteromórficos conhecidos, e ainda com relação ao mapeamento do DNA satélite PcP190, Gatto e colaboradores (2016, 2018) demonstraram que o cromossomo sexual W dessa espécie é também enriquecido com a família de DNA satélite PcP190. Diante disso, os autores sugeriram que esta família de DNA satélite descrita para anfíbios, é ainda mais antiga do que anteriormente considerado, devido à presença em famílias de anuros relativamente distintas (GATTO et al., 2016).

Atualmente, Análises de Alto Rendimento (*High-Throughput Analysis*), junto com avanços na Bioinformática, tem sido extensivamente usadas para várias aplicações, sobretudo para a identificação e caracterização de sequências repetitivas, especialmente de satDNA, por leitura de *clustering* baseado em similaridade utilizando o *software online RepeatExplorer* (RUIZ-RUANO et al., 2016; NOVAK et al., 2010; NOVAK et al., 2013; CAMACHO et al., 2015; GARCÍA et al., 2015; RUIZ-RUANO et al., 2016; UTSUNOMIA et al., 2017; RUIZ-RUANO et al., 2018; PALACIOS-GIMENEZ, et al., 2018).

Vários trabalhos recentes com o uso do *software RepeatExplorer* para análises de alto rendimento e identificação de DNAs repetitivos vêm mostrando interessantes resultados nos mais diversos organismos. Ainda não há dados na literatura relatando esse tipo de estudos para espécies de anfíbios, mas podemos citar como exemplo as análises realizadas por Utsonomia e colaboradores (2017), que isolaram uma família de satDNAs em espécies de peixes pertencentes a gêneros diferentes dentro da família Characidae, proporcionando a oportunidade de testar os padrões evolutivos no grupo, tanto em relação à hipótese de evolução em concerto como em relação a hipótese de biblioteca de DNAs satélites.

Outro exemplo, é o trabalho de Palacios-Gimenez e colaboradores (2017) que examinaram o satelitoma do grilo *Eneoptera surinamensis* para caracterizar a evolução molecular de seus cromossomos neo-sexuais e encontraram um número anormalmente alto de 45 famílias de satDNAs, representando cerca de 14% do genoma e mostrando diferentes estruturas modulares e alta diversidade de matrizes. Ainda, Ruiz-Ruano et al. (2018) analisaram o satelitoma no gafanhoto *Pyrgomorpha*

conica e revelaram 87 variantes de satDNAs agrupados em 76 famílias diferentes, representando 9,4% do genoma da espécie.

1.4. Cromossomos sexuais em anfíbios

Cromossomos sexuais são motivos de estudos e investigações desde muito tempo, e apesar disso, o conhecimento sobre a origem e evolução desses cromossomos é limitado, principalmente no que se refere a cromossomos de determinados grupos de anfíbios, já que a maioria das espécies têm cromossomos sexuais homomórficos. Na grande maioria deles, o sexo é determinado genotipicamente através de heterogametia masculina ou feminina, porém, os genes ligados a essa determinação ainda não foram identificados.

Acredita-se que os cromossomos sexuais tenham origem autossômica e que, após a aquisição de um *locus* de determinação sexual, a supressão da recombinação meiótica entre X e Y ou entre os cromossomos Z e W, seja um dos primeiros eventos na evolução e diferenciação desse tipo especial de cromossomos (MULLER, 1964; OHNO, 1967; ELLEGREN, 2011; SCHARTL et al., 2016).

Na diferenciação dos cromossomos Y e W e do X e Z, eventos como por exemplo, inversões, acúmulo de heterocromatina, deleção da heterocromatina, supressão da recombinação meiótica, fusões entre cromossomos sexuais e autossômicos, entre outros, acontecem. Todos esses mecanismos atuam de uma maneira muito dinâmica diminuindo a recombinação homóloga, sem uma regra evolutiva geral (SCHARTL et al., 2016). Dessa forma, progressivamente, os cromossomos do sexo heterogamético (Y e W) perdem genes e ficam expostos a forças seletivas, constituindo assim a região mais variável dos genomas dos animais (BULL, 1983; CHARLESWORTH et al., 2005; GRAVES, 2008).

A presença de cromossomos sexuais heteromórficos é uma característica considerada rara em anuros, e o heteromorfismo muitas vezes só é reconhecido após a utilização de técnicas de coloração diferencial, como bandamento C, para evidenciar regiões heterocromáticas. De todas as espécies de anuros já cariotipadas, apenas aproximadamente 5% delas possuem cromossomos sexuais com algum grau de heteromorfismo (SCHMID et al., 2010). Apesar disso, tanto espécies com sistemas sexuais do tipo XX/XY quanto com sistemas ZZ/ZW e até com sistemas múltiplos de

cromossomos sexuais já foram encontradas, e esse número considerável de espécies que apresentam essa característica exibe um cromossomo Y ou W com acúmulo de heterocromatina (SCHMID et al., 2003, 2012; SCHARTL et al., 2016; GATTO et al., 2016; GAZONI et al., 2018).

A heterogametia feminina é sugerida como o estado ancestral da determinação do sexo em anfíbios, e que a heterogametia masculina tenha evoluído subsequente e independentemente várias vezes em diferentes linhagens (SCHARTL et al., 2016). Foi proposto então que os sistemas de cromossomos sexuais de anfíbios podem passar por transições não apenas nas interespecies, mas também no nível de intraespécies. Essa hipótese é baseada em estudos muito detalhados na espécie de rã *Glandirana rugosa* (anteriormente *Rana rugosa*), conhecida como a rã japonesa enrugada, que exibe cromossomos sexuais dos tipos ZW e XY, bem como cromossomos sexuais indiferenciados em diferentes populações (MIURA, 2007). Dados de mapeamento genético sugerem que esses cromossomos sexuais existentes em diferentes populações são homeólogos, indicando uma origem comum entre eles (SCHARTL et al., 2016).

A espécie *Pseudis tocantins*, por exemplo, possui um sistema de cromossomos sexuais ZZ / ZW, sendo o cromossomo W submetacêntrico e maior que o Z metacêntrico, principalmente por causa da amplificação da heterocromatina no braço longo do cromossomo (Wq) (BUSIN et al., 2008). Em um trabalho de mapeamento de DNA satélite nesse cromossomo sexual, descobriu-se que essa grande banda heterocromática no cromossomo W é enriquecida com o DNA satélite PcP190 citado acima, enquanto o cromossomo Z possui uma banda C positiva menor adjacente ao centrômero no braço longo que não é detectado pelas sondas PcP190 (GATTO et al., 2016, 2018).

Além disso, como exemplo de cromossomos sexuais múltiplos, em *Pristimantis riveroi* (anteriormente *Eleutherodactylus riveroi*) um sistema de cromossomo sexual X1X1X2X2: X1X2Y evoluiu através de fusão centralizada envolvendo o Y original e um grande autossomo (SCHMID et al., 2003). No entanto, é interessante notar que em alguns casos, o cromossomo W pode ser total ou parcialmente heterocromático, como acontece em *P. boiei*, onde é evidente o grande acúmulo de heterocromatina nesse cromossomo (ANANIAS et al., 2007). Além disso, há um padrão totalmente

reverso visto em *Physalaemus ephippifer*, com o cromossomo W maior que o Z, mas que não é heterocromático (NASCIMENTO et al., 2010).

Ainda, recentemente, Gazoni e colaboradores (2018) a partir de análises citogenéticas clássicas e moleculares, encontraram 12 cromossomos sexuais na rã amazônica denominada *Leptodactylus pentadactylus* (Leptodactylinae) de Paranaíta, Mato Grosso, Brasil. No trabalho, foi possível ver que esses cromossomos sexuais se organizam em uma surpreendente cadeia meiótica em forma de anel estável composta por seis cromossomos X e seis Y, nas células de todos os machos analisados. Dessa forma, os autores puderam constatar que o número de cromossomos sexuais é maior do que o número de autossomos encontrados, e esses dados representam o maior número de cromossomos sexuais múltiplos organizados em cadeias já encontrado entre as espécies de vertebrados (GAZONI et al., 2018).

O conhecimento e a caracterização dos cromossomos sexuais heteromórficos em anuros ainda são raros, porém, nos casos onde foi possível descrevê-los, é evidente que há uma grande diversidade de sistemas de determinação sexual entre as espécies, além de graus de diferenciação de cromossomos sexuais diferentes, em que eventos de amplificação de heterocromatina e rearranjos cromossômicos parecem ter importantes papéis na diferenciação dos cromossomos sexuais de anuros. Com isso, como a heterocromatina é geralmente composta por sequências de DNA repetitivos na maioria dos organismos, podendo haver uma forte relação com a diferenciação de cromossomos sexuais em anfíbios, com um estudo mais aprofundado do conteúdo repetitivo dessas regiões poderá ser possível contribuir para o entendimento da evolução cromossômica, principalmente no que se refere aos cromossomos sexuais em anfíbios.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi analisar citogeneticamente representantes de *Proceratophrys* sob o ponto de vista clássico e genômico, em busca de sequências repetitivas, avaliar a presença dessas sequências e buscar entender a sua organização no genoma da espécie.

Além disso, tendo em vista as diferenças citogenéticas encontradas entre populações de *P. boiei*, o trabalho teve como foco também a busca de dados que pudessem esclarecer algo sobre estas diferenças do ponto de vista taxonômico e do ponto de vista evolutivo, por meio da diferenciação de cromossomos sexuais na espécie. Dessa maneira, a identificação e o mapeamento de DNAs repetitivos poderia representar uma interessante estratégia para a obtenção de marcadores citogenéticos para o entendimento da evolução desses cromossomos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Os espécimes de *Proceratophrys boiei* foram coletados na natureza, através de busca ativa noturna nas cidades brasileiras de Mogi das Cruzes – SP ($23^{\circ}29'31.8''\text{S}$ $46^{\circ}14'51.1''\text{W}$), Tijucas do Sul – PR ($25^{\circ}49'24.8''\text{S}$ $49^{\circ}04'33.8''\text{W}$), em Camanducaia – MG ($22^{\circ}45'28.3''\text{S}$ $46^{\circ}07'56.1''\text{W}$) e em Morretes – PR ($25^{\circ}33'00.9''\text{S}$ $48^{\circ}56'01.7''\text{W}$). (Fig. 7).



Figura 7. Locais aproximados de coleta dos indivíduos. Fonte: *Google Maps*.

Tabela 1. Locais de coleta dos indivíduos com a quantidade de espécimes coletados em cada região.

LOCALIDADE	LOCALIZAÇÃO	MACHO	FÊMEA
Camanducaia – MG	22°45'28.3"S 46°07'56.1"O	01	05
Mogi das Cruzes – SP	23°29'31.8"S 46°14'51.1"O	09	01
Tijucas do Sul - PR	25°49'24.8"S 49°04'33.8"O	-	01
Morretes - PR	25°33'00.9"S 48°56'01.7"O	05	02

Fonte: O autor (2019)

Os animais foram levados vivos para o Laboratório de Citogenética Animal, localizado no Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de Rio Claro, onde foram feitas as preparações citogenéticas e a retirada de amostras de tecido para extração de DNA. Os indivíduos coletados foram identificados pelo Prof. Dr. Célio F. B. Haddad, do Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, catalogados e depositados na Coleção CFBH do referido Departamento. A eutanásia dos espécimes foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA – IB – UNESP – CRC), sob o protocolo 004752, e as autorizações para coleta de espécimes da fauna silvestre foram concedidas pelo ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, sob os números 59449 e 60972.

3.2. Preparações citogenéticas

As preparações cromossômicas foram obtidas diretamente de medula óssea, fígado, intestino e testículo, para animais machos, com tratamento prévio dos animais com colchicina a 1%, injetada intraperitonealmente na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso, cerca de quatro horas antes do sacrifício, seguindo-se os procedimentos rotineiros adotados no laboratório de citogenética de acordo com Baldissera et al. (1993).

3.3. Extração de DNA genômico de tecidos sólidos

O DNA total foi obtido a partir de amostras de fígado ou músculo, utilizando o Kit comercial “*Wizard® Genomic DNA Purification Kit*” – Promega, seguindo as

determinações do fabricante. As amostras obtidas foram aplicadas em gel de agarose 1% juntamente com 1 μ L de *Blue Juice* (6X) (Invitrogen®). A avaliação da qualidade das amostras foram realizadas através da visualização das bandas em um transiluminador de luz ultravioleta.

3.4. Sequenciamento Genômico e análises bioinformáticas

O sequenciamento genômico foi realizado pela empresa MacroGen (Seoul, Korea). Foram enviados aproximadamente 0,05g de tecido (fígado) fixado em etanol absoluto de uma fêmea de *P. boiei* proveniente de Tijucas do Sul, PR e uma fêmea e um macho provenientes de Mogi das Cruzes, SP.

O material foi sequenciado através da plataforma Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). O sequenciamento empregado foi Illumina® HiSeq™ 4000 (2 x 101 bp *paired-end*), sendo sequenciado utilizando TruSeq 3000 4000 SBS Kit v3. Os *reads* obtidos do sequenciamento foram unidos utilizando o programa Fastq-join do FASTX-toolkit (GORDON & HANNON, 2010) com as opções básicas de entrada dos dados.

Os dados do genoma sequenciado foram utilizados para a busca de sequências repetitivas e localização de DNAs satélites por meio da clusterização das sequências, utilizando o *software RepeatExplorer* (NOVÁK et al., 2013), para subsequente análise de densidade dos gráficos resultantes e identificação de possíveis DNAs satélites no genoma. Cada cluster gerado pelo *RepeatExplorer* foi individualmente analisado a partir dos gráficos apresentados no *output* do programa. Após essa primeira triagem, foi realizada através do *software Geneious v4.8*, a visualização de gráficos de *Dotplot* (JUNIER, T. & PAGNI, 2000) para estes *clusters* e seus respectivos *contigs*, em busca da confirmação de sua organização em tandem e para revisão manual de seus monômeros.

Os monômeros de DNAs satélites isolados foram alinhados independentemente, utilizando a ferramenta *Muscle* (EDGAR, 2004) no programa MEGA v6.06 (TAMURA et al., 2011) para a geração da sequência consenso de cada um. A sequência consenso para cada *cluster* analisado foi gerada a partir da inserção do alinhamento dos *contigs* no *software Geneious v4.8*. No MEGA v6.06 também foram analisadas as quantidades em porcentagem de A + T para cada consenso. A identificação dos tipos de repetitivos isolados foi complementada por buscas de

possíveis sequências similares publicadas em bancos de dados como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/Blast/>) e Repbase (<http://www.girinst.org/rebase/>).

3.5. Construção de *primers* específicos e amplificação em cadeia

As sequências consenso dos DNAs satélites isolados do genoma foram utilizados para o desenho manual de *primers* divergentes. Os *primers* obtidos foram utilizados em uma amplificação por PCR para avaliação da confiabilidade dos mesmos. Para isso foi utilizado DNA genômico total e os produtos de amplificação que mostraram um padrão de escada foram utilizados para a geração de sondas, marcadas especificamente por moléculas fluorescentes, para o posterior mapeamento cromossômico destes satélites por FISH.

3.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a reação de PCR acima citada foram utilizados os seguintes volumes: para um volume final de 10 µl cada, foi utilizado 0,5 µl do DNA extraído (50-100 ng/µl), 0,5 µl de dNTPs 5 mM, 0,1 µl de Platinum® Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (ThermoFisher®) e 0,5 µl de *primer forward* e 0,5 µl de *primer reverse* de cada satélite.

A amplificação ocorreu em um termociclador com o programa utilizado de 5 minutos a 94°C e 30 ciclos: 30 segundos a 94°C; 30 segundos em um gradiente de temperatura entre 48°C e 62°C, para a escolha da temperatura ótima de amplificação de cada um dos oligonucleotídeos; 1 minuto e 20 segundos a 72°C; e extensão final de 5 minutos também a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese com géis de agarose 1%, corados com GelRed®. As amostras foram eluídas em 1 µl de tampão de corrida Blue Juice (6x) e com 1 µl de marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA *ladder* (ThermoFisher®). Os géis foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta.

Os satélites amplificados tiveram suas bandas no gel de agarose purificados através do tratamento com a enzima ExoSAP-IT (GE Healthcare) utilizando-se 10 µL de produto de PCR, 1 µL ExoSAP e 3 µL H₂O milli-Q autoclavada. A reação foi levada ao termociclador em um ciclo de 1 hora a 37°C seguido por um ciclo de 15 minutos a 80°C. Os produtos purificados foram enviados para o sequenciamento na empresa Macrogen (Korea). As sequências resultantes foram comparadas com as sequências

consenso encontradas da triagem dos satélites a título de confirmação da composição de pares de base dos mesmos.

3.7. Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH)

A técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* foi conduzida utilizando sondas produzidas a partir de produtos de PCR. As sondas foram marcadas em uma reação de 20 µl contendo *DNA polymerase I/DNase I* (ThermoFisher®) e *digoxigenina-11-dUTP* (Roche), seguindo protocolo padrão de marcação por *nick-translation* com as condições gerais de 16°C durante 60 minutos, seguidos de 10 minutos a 65°C e temperatura de manutenção a 10°C, seguindo o protocolo de Pinkel e colaboradores (1986). Os ensaios de FISH também foram realizados de acordo com a técnica descrita por Pinkel e colaboradores (1986) com modificações de Silva e colaboradores (2012).

3.7.1. Tratamento das lâminas

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

3.7.2. Desnaturação dos cromossomos e das sondas

O DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70% em 2xSSC, a 70°C. Em geral, o tempo de desnaturação foi de 50 segundos. As lâminas foram desidratadas em série alcoólica (-20°C) 70, 90 e 100% por 5 minutos. As sondas foram desnaturadas com uma solução de hibridação preparada com 3 µl da sonda marcada e 27 µl do tampão de hibridação (*Hybuffer*) por lâmina em um microtubo de 100 µl. A solução de hibridação foi desnaturada em termociclador a 95°C por 10 minutos e cada lâmina foi montada com 30 µl de solução de hibridação contendo a sonda, cobertas com lamínula, ficando *overnight* a 37°C em câmara úmida.

3.7.3. Lavagens e Detecção

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

3.7.4. Montagem das lâminas

Para montagem das lâminas foram colocados aproximadamente 10 µl de solução de DAPI + *antifading* (Vectashield) sobre cada lâmina. As lâminas foram cobertas com lamínula, e armazenadas em geladeira no escuro. A observação das lâminas foi realizada em um microscópio Olympus BX51 acoplado a um modelo de câmera digital Olympus D71 e as imagens foram capturadas pelo *software DP controller*.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos durante a realização do mestrado foram organizados em dois capítulos, que ainda estão em processo de escrita e aperfeiçoamento, que em seguida serão enviados para publicação em revistas científicas da área. Foram também anexados gráficos, tabelas e imagens resultantes das análises realizadas durante todo o mestrado, que podem não fazer parte dos artigos, mas são importantes para o entendimento do leitor desta dissertação.

4.1. Capítulo 1: DNAs satélites centroméricos em *Proceratophrys boiei* (Anura, Odontophrynidae): uma abordagem molecular, genômica e comparativa.

M. J. Silva¹, T. Gazoni¹, H. Narimatsu¹, P. Pereira¹, C. F. B. Haddad² e P. P. Parise-Maltempì¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil

²Departamento de Zoologia e Centro de Aquicultura (CAUNESP), Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

O gênero de sapos *Proceratophrys* pertence à família Odontophrynidae e compreende atualmente 41 espécies (FROST, 2018). Pertencente a esse grupo, a espécie *Proceratophrys boiei* (Wied-Neuwied, 1825) é representada por sapos neotropicais, endêmicos da Mata Atlântica brasileira e está distribuída ao longo do leste do Brasil, do sul dos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná ao sul de Santa Catarina (HADDAD & SAZIMA, 1992; CONTE & MACHADO, 2005; ZINA et al., 2007; PRADO & POMBAL, 2008; SERAFIM et al., 2008).

Os dados citogenéticos para *P. boiei* ($2n = 22$) são bastante interessantes, sobretudo para estudos genéticos e citogenéticos comparativos. Isto se deve principalmente à presença do heteromorfismo cromossômico relacionado à heterocromatina constitutiva observado em um par de cromossomos homólogos em fêmeas de populações da região sudeste do Brasil e que está ausente em populações do Sul do País (AMARO et al., 2012). Esse heteromorfismo está relacionado a um processo de diferenciação de cromossomos sexuais, no qual os cromossomos têm o mesmo tamanho e morfologia sob coloração convencional, mas podem ser facilmente distinguidos um do outro após a técnica de Bandamento C, sendo o cromossomo Z com bandas C apenas na região pericentromérica e o cromossomo W quase completamente heterocromático (ANANIAS et al., 2007; AMARO et al., 2012).

Estes dados apresentados sobre os cromossomos de diferentes populações de *P. boiei* se mostram bastante interessantes, principalmente em se tratando do grupo dos anfíbios, já que seus representantes normalmente possuem pouca heterocromatina constitutiva em seus cariótipos e que dentre as espécies já cariotipadas, poucas delas apresentam cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados. A grande quantidade de heterocromatina presente em um dos homólogos do par sexual pode ser utilizada como um ponto de partida para o aumento do conhecimento a respeito da origem e evolução dos cromossomos sexuais em anfíbios, por exemplo, estudando com mais precisão os componentes desta heterocromatina que é na maior parte constituída por DNA repetitivo.

A maioria dos genomas eucarióticos é composta por grandes porções de heterocromatina que geralmente é constituída por sequências de DNAs repetitivos. Essas sequências são classificadas em codificantes e não-codificantes, sendo as sequências codificantes representadas pelas famílias multigênicas, que estão envolvidas na codificação de importantes proteínas, DNAs ribossomais (DNAr) e RNAs; e as não-codificantes, tais como DNAs satélite (satDNA), representados por sequências que apresentam repetições em tandem, além de transposons e retrotransposons, que são sequências que apresentam repetições dispersas ao longo do genoma (CHARLESWORTH et al., 1994; JURKA et al., 2005; LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012).

DNA satélite (satDNA) consiste em uma classe de sequências repetitivas altamente abundantes nos genomas eucarióticos. Por se tratar de sequências repetidas em tandem, satDNAs compreendem longas matrizes localizadas junto a uma heterocromatina altamente compactada geralmente nos centrômeros e telômeros dos cromossomos, embora também tenham sido relatadas em regiões eucromáticas (CHARLESWORTH, 1994; LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012; GARRIDO-RAMOS, 2017). Além disso, há satDNAs que são específicos de determinados cromossomos, como por exemplo cromossomos sexuais ou cromossomos B (MESTRINER et al., 2000; ZIEGLER et al., 2003; RUIZ-RUANO et al., 2016; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2017; VITTORAZZI et al., 2014; GATTO et al., 2018).

Sequências de DNA repetitivo, como os DNAs satélites, evoluem em concerto (*concerted evolution*), de forma não independente, ou seja, *clusters* das unidades

repetitivas não se diferenciam isoladamente. De acordo com o modelo de *concerted Evolution*, mudanças nas unidades repetitivas de uma dada sequência podem se espalhar para todos os *clusters* que contém sequências da mesma família podendo essas mudanças serem fixadas em uma dada população por meio de um processo chamado de *molecular drive* (DOVER 1982, 2002; UGARKOVIĆ & PLOHL 2002; PLOHL et al. 2012; GARRIDO-RAMOS, 2017). O processo de *molecular drive* depende de uma variedade de mecanismos de trocas não recíprocas, como *crossing-over* desigual e conversão gênica, entre os sítios portadores dessas sequências repetitivas (DOVER, 1982; PLOHL et al. 2012, GARRIDO-RAMOS, 2017).

Apesar de décadas de pesquisa intensiva, o conhecimento sobre o significado funcional dos DNAs satélites é limitado, e um debate de décadas avaliando a funcionalidade dessas sequências ainda continua. Após a sua descoberta, no início da década de 1970, essa classe de DNA repetitivo foi considerada como “DNA lixo” por não conter regiões codificadoras. Entretanto, diversos estudos têm mostrado que os DNAs satélites exercem importantes papéis biológicos, dentre eles a participação na organização dos centrômeros e a modulação da expressão gênica (PEZER et al., 2011; PLOHL et al., 2012; PLOHL et al., 2014; FUKAGAWA & EARNSHAW, 2014; FELICIELLO, et al., 2015).

No presente estudo, foram realizadas pela primeira vez, análises de alto rendimento do conteúdo de satDNA no genoma de *Proceratophrys boiei* através de dados de Sequenciamento genômico Illumina, a fim de obter informações abrangentes sobre o conteúdo de sequências repetitivas, por meio da integração de dados genômicos e cromossômicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem Animal, Preparações cromossômicas e Sequenciamento de DNA Genômico

Um total de 11 animais adultos de *P. boiei* foram coletados em 23°29'31.8"S 46°14'51.1"O Mogi das Cruzes, São Paulo (Brasil) e 25°49'24.8"S 49°04'33.8"O Tijucas do Sul, Paraná (Brasil). A eutanásia dos espécimes foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA – IB – UNESP – CRC), sob o protocolo 004752, e as autorizações para coleta de espécimes da fauna silvestre foram concedidas pelo

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, sob os números 59449 e 60972.

As preparações cromossômicas foram obtidas de células da medula óssea, fígado e testículo, quando do sexo masculino, de animais injetados intraperitonealmente com solução de colchicina 1%, (na proporção de 0,01mL/g de massa corpórea), tendo os tratamentos duração de cerca de quatro horas, como descrito em Baldissera Jr. et al. (1993). O DNA total foi obtido a partir de amostras de fígado ou músculo, utilizando o Kit comercial “*Wizard Genomic DNA Purification Kit*” – Promega, seguindo as determinações do fabricante.

O sequenciamento genômico foi realizado através da plataforma Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) pela empresa MacroGen Inc. (Seoul, Republic of Korea) para um indivíduo fêmea de Tijuca do Sul, PR, utilizando o método Illumina® HiSeq™ 4000 (2 x 101 bp paired-end) e TruSeq 3000 4000 SBS Kit v3. Os reads obtidos do sequenciamento foram unidos utilizando o programa Fastq-join do FASTX-toolkit (GORDON & HANNON, 2010) com as opções básicas de entrada dos dados.

Procura de SatDNAs pelo Método de *Clustering* Baseado em Gráfico

Antes da análise de *clustering* baseada em gráficos do *RepeatExplorer*, foi processada e verificada a qualidade “*paired-ends reads*” usando FastQC (FastQC, Version 0.10.1, 2012). O pré-processamento das leituras foi realizado seguindo os parâmetros padrão usando a plataforma pública: <https://repeatexplorerelixir.cerit-sc.cz/galaxy/>. As leituras foram processadas com uma “*quality trimming tool*”, “*FASTQ interlacer*” em *paired end reads*, conversor “*FASTQ to FASTA*” e “*RepeatExplorer clustering*”, todos com opções recomendadas padrão (NOVÁK et al., 2013). Além disso, foi realizado uma análise extra na ferramenta TAREAN “*Tandem Repeat Analyzer*” do *RepeatExplorer*, para uma busca mais refinada de sequências repetitivas.

Por meio de observação visual, os *clusters* que apresentaram alta densidade gráfica, com formato circular, indicando proximidade com as famílias de satDNAs (NOVÁK et al., 2010) foram selecionados em uma primeira triagem. Dentro de cada *cluster* foram selecionados os *contigs* com sequências em tandem por meio da

ferramenta *dotplot*, usando o software *Geneious* (*Geneious, Version 4.8.5* (JUNIER, T. & PAGNI, 2000)).

O monômero de consenso de cada família de satDNA foi utilizado para a consulta em dois bancos de dados, o BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/Blast/>) e o Repbase ([http://www.girinst.org/repbase /](http://www.girinst.org/repbase/)), para verificar a similaridade com outras sequências repetitivas descritas e depositadas.

As superfamílias (SF) foram consideradas comparando o consenso do monômero de cada satDNA independentemente, usando a ferramenta *Geneious* v4.8.5, de acordo com os parâmetros estabelecidos por Ruiz-Ruano e colaboradores (2016).

Amplificação de SatDNAs através de PCR, Sondas e Hibridização *In Situ* por Fluorescência

Foram usadas as sequências consensos de cada família de satDNA para projetar *primers* divergentes manualmente. Os produtos de PCR para cada família de satDNA foram marcados por *Nick translation* utilizando digoxigenina-11-dUTP (Roche, Mannheim, Alemanha). A FISH foi realizada de acordo com Pinkel et al. (1986) com modificações de Silva et al. (2012), utilizando preparações cromossômicas mitóticas. As sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP foram detectadas utilizando anti-digoxigenina-rodamina (Roche).

As bandas monoméricas foram isoladas e purificadas utilizando o kit de purificação de DNA *Zymoclean Gel* (*Zymo Research Corp., The Epigenetics Company, CA, EUA*) de acordo com as recomendações do fabricante e depois utilizadas como molde para a reamplificação utilizando as mesmas condições de PCR anteriormente testadas. Os monômeros foram sequenciados utilizando o serviço da MacroGen Inc. para confirmar a amplificação da sequência desejada.

Os resultados da FISH foram observados usando um microscópio *Olympus BX51* equipado com uma lâmpada fluorescente e os filtros adequados. As imagens foram obtidas usando uma câmera digital com refrigeração DP71 em escala de cinza e, em seguida, pseudo-coloridas em azul para cromossomos e vermelho para sinais de hibridização, mescladas e otimizadas para brilho e contraste usando o *Adobe*

Photoshop CS6. Para a montagem dos cariótipos e análises cromossômicas foram analisadas metáfases de machos e fêmeas de *P. boiei* com um número variável entre 5 a 10 metáfases analisadas por lâmina.

RESULTADOS

O sequenciamento Illumina para a amostra de *P. boiei* de Tijucas do Sul, PR produziu 16,342,588 *paired-end reads*, com um total de 1,650,601,388 nucleotídeos (nt), dado o tamanho estimado genômico de 1,6 Gbp. O conteúdo de GC é de 42,84% e de AT é de 57,16%, o Q20 é de 94,13% e o Q30 é de 87,63%.

Para esse trabalho foram selecionados três satélites para serem explorados, e foram nomeados de PboSat1-176, PboSat2-173 e PboSat3-189, de acordo com decréscimo de abundância genômica. A seleção e o agrupamento dessas três sequências nesse trabalho foram realizados levando-se em conta a localização cromossômica semelhante das três.

A hibridação *in situ* revelou marcações dos satélites PboSat1-176 e PboSat2-173 nos centrômeros de todos os cromossomos das populações de *P. boiei* de Mogi das Cruzes, SP e Tijucas do Sul, PR. Destaca-se aqui o fato de que na população de Mogi das Cruzes, onde o heteromorfismo do par sexual está presente, além das marcações centroméricas em todos os cromossomos, os satDNAs estão presentes em quase todo o cromossomo W, correspondendo a área de banda C positiva (Fig.1).

Já o satélite PboSat3-189 se mostrou presente nos centrômeros de todos os pares cromossômicos de maneira muito semelhante aos satélites PboSat1-176 e PboSat2-173, porém, nos pares cromossômicos 3, 5, 8 e 10 de machos, e nos pares 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 de fêmeas, os sinais de hibridação foram mais fracos do que nos outros pares, não correspondendo a toda a área de heterocromática apresentada pelo bandamento C, e além disso, no cromossomo sexual W o satélite não correspondeu a toda a área heterocromática como aconteceu com os outros satélites (Fig. 2).

A análise de similaridade de sequências revelou que dois desses satDNAs, PboSat1-176 e PboSat3-189, estão organizadas em duas famílias semelhantes de satDNAs, que foram agrupadas formando uma superfamília (Superfamília SF1), com

53,1% de similaridade. Entre os satélites PboSat1-176 e PboSat2-173, 48,8% de similaridade e entre PboSat2-173 e PboSat3-189, 44,3% de similaridade (Fig. 3).

Para a procura por satDNAs, foi utilizado uma análise detalhada dos agrupamentos que representam elementos repetitivos na saída de resumo do *RepeatExplorer*, que produziu 218 *clusters*, apresentando uma abundância no genoma variando de 0,010% a 4,5% em questão de representatividade, correspondendo no total a 41% do genoma, incluindo satDNAs, rDNA, elementos transponíveis e outros elementos repetitivos não caracterizados (Fig. 4). Além disso, foi realizada também uma rodada do genoma na ferramenta TAREAN “*Tandem Repeat Analyzer*” do *RepeatExplorer* da qual foram obtidos 195 *clusters*, com abundância genômica variando de 0,0099 a 8%, sendo oito deles considerados como altamente confiáveis de serem DNAs satélites, de acordo com a análise realizada.

Foi desenhado *primers* para amplificação por PCR para 28 elementos repetitivos, que foram considerados como possíveis satDNAs. Juntos, os 28 satDNAs encontrados para *P. boiei* compreenderam aproximadamente 15% do genoma da fêmea desta espécie proveniente de Tijucas do Sul, PR, com sequências mostrando um conteúdo de A+T variando de 47,8% a 72,7% e unidades monoméricas repetitivas variando de 31 a 304 pb (Tab. 1). Dos 28 satDNAs encontrados, 15 tiveram sucesso na amplificação usando o DNA genômico de *P. boiei*.

A busca por similaridade com outras sequências repetitivas mostrou que o PboSat3-189 possui similaridade com 42 outras sequências do satDNA PcP190 depositadas no BLAST. As similaridades são com sequências isoladas de espécies dos gêneros *Physalaemus*, *Pseudis* e *Pleurodema*, com identidade de sequência variando entre 84% e 90% (Fig. 5, Tab. 4). Os satDNAs PboSat1-176 e PboSat2-173 não revelaram semelhança com quaisquer outras sequências repetitivas depositadas.

DISCUSSÃO

A aplicação de ferramentas de bioinformática e abordagens citogenéticas moleculares para determinar o conteúdo de satDNA em genomas permite um rápido e mais acurado isolamento de sequências repetitivas dos genomas do que os métodos utilizados até recentemente, como por exemplo aqueles envolvendo digestão com enzimas de restrição. Neste trabalho, foi apresentado pela primeira vez a organização

dos DNAs satélites presentes no genoma da espécie de sapo *Proceratophrys boiei* e fornecido o primeiro mapeamento físico desses elementos repetitivos no genoma da espécie. Isto representa um enorme salto no conhecimento sobre a organização genômica de anfíbios em geral e mais especificamente sobre o conteúdo de satDNAs presentes em *Proceratophrys*, um gênero de anuros ainda sub-explorado citogeneticamente, sobretudo em relação ao seu conteúdo genômico.

Espécies de anuros têm sido usadas como modelo em uma variedade de tipos de estudos, principalmente taxonomia e ecologia, genética e citogenética. No entanto, informações sobre a organização genômica associada a aspectos cromossômicos ainda são pouco conhecidas. Assim, a compreensão e caracterização de um quadro mais completo sobre a organização cromossômica e a genômica de classes distintas de DNA, sobretudo de elementos repetitivos, são questões importantes que poderiam ajudar em futuros estudos com diferentes abordagens. Em nossas análises, ficou bem evidente que *P. boiei* possui um genoma com uma grande quantidade de elementos repetitivos (41% de 1.6 Gpb de tamanho genômico estimado), representando, portanto, grande parte do genoma. Dessa forma, fica claro a importância da necessidade de se ter um conhecimento da composição, localização e distribuição cromossômica dessas sequências que incluem os satDNAs.

Pouco ainda se sabe sobre a organização e localização cromossômica dessas matrizes de sequências, que preferencialmente estão localizadas na heterocromatina constitutiva das regiões cromossômicas centroméricas, pericentroméricas e subteloméricas (LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012; PLOHL et al., 2012; GARRIDO-RAMOS, 2015). Há casos de isolamento de DNAs satélites por restrição enzimática, nos quais essas sequências foram localizadas tanto na região centromérica e pericentromérica (VITORRAZZI et al., 2011, 2014), como em cromossomos sexuais heteromórficos (GATTO et al., 2016, 2018).

A hibridação *in situ* mostrou no presente trabalho que os satélites PboSat1-176 e PboSat2-173, com proporção genômica de 8% e 4,5% respectivamente, são coincidentes com a heterocromatina C positiva revelada por Bandamento C revelados por Ananias et al. (2007) e Amaro et al. (2012) em todos os cromossomos de *P. boiei*, tanto machos quanto fêmeas, revelando a contribuição desta classe de DNA repetitivo para a quantidade e complexidade da heterocromatina constitutiva em *P. boiei*. A

localização desses DNAs satélites em todos os centrômeros de *P. boiei* sugere o possível envolvimento destas repetições com a função dos centrômeros em *P. boiei*. Esses dados estão de acordo com o que já foi descrito por Plohl et al. (2014), que sugere que os monômeros de satDNA formam arranjos homogêneos, geralmente enriquecidos em regiões de heterocromatina constitutiva, como centrômeros e telômeros, e foram hipoteticamente relacionados à manutenção da função centromérica (PLOHL et al., 2014).

Diferentemente, os resultados apresentados para o satélite PboSat3-189 com proporção genômica de 0,7%, que também está localizado em regiões centromérica e pericentromérica, porém, com um número menor de repetições em alguns cromossomos, sugerindo que eventos de amplificação/deleção de sequências altamente dinâmicos estão acontecendo aleatoriamente no genoma de *P. boiei*. Casos parecidos em que as repetições de determinados satDNAs estão presentes em uma menor quantidade, ou mesmo ausentes em alguns pares cromossômicos já foram descritos para diferentes animais e plantas (PIRAS et al., 2010; SHANG et al., 2010; LOCKE et al., 2011; VITTORAZZI et al., 2011; GONG et al., 2012), sugerindo que o baixo número de cópias dessas repetições nesses cromossomos, pode não estar sendo evidenciada pela hibridação *in situ*.

Em um caso interessante de isolamento e caracterização de DNA satélite, utilizando a metodologia de restrição enzimática de DNA genômico, Vittorazzi e colaboradores (2011) conseguiram isolar uma sequência de 190pb do genoma da espécie de sapo *Physalaemus cuvieri*, nomeando-a de PcP190, que foi localizada nos centrômeros de alguns cromossomos da espécie, além de estar presente em outras espécies distantemente relacionadas. Com a investigação da presença do DNA satélite PcP190 em outras espécies de *Physalaemus* e também em *Leptodactylus latrans* (Leptodactylidae), *Crossodactylus gaudichaudii* (Hylodidae), *Pseudis tocantins* (Hylidae) (VITTORAZZI et al., 2014; GATTO et al., 2016), que são relativamente distantes filogeneticamente, foi possível mostrar que pode se tratar de um DNA satélite antigo, surgido há pelo menos 80 milhões de anos (GATTO et al., 2016).

Por meio da consulta a bancos de dados de depósito de sequências, o monômero do satélite PboSat3-189 mostrou similaridade de aproximadamente 89% com as sequências do satélite PcP190 depositadas no GenBank do NCBI em três

diferentes famílias de anuros. Diante disso, é possível sugerir que esta família de DNA satélite descrita para anfíbios, é muito mais antiga do que se parece, devido à presença em famílias de anuros relativamente distintas. Dessa forma, considerando a comparação entre as sequências do DNA satélite PcP190 isolados de espécies dos gêneros *Physalaemus*, *Pseudis* e *Pleurodema*, a sequência consenso do satélite PboSat3-189 isolada de *Proceratophrys* no presente trabalho, algumas características desses satDNAs nestes gêneros são dignas de destaque: (i) a predominância de famílias de satDNAs ricos em A+T; (ii) as tendências dessas matrizes para ocupar uma localização cromossômica mais restrita (heterocromatina constitutiva), e (iii) também a possibilidade de que a predominância de satDNAs ricos em A+T possa ser uma característica comum nos genomas de anuros.

DNAs satélites diferem em sequência de nucleotídeo, complexidade de sequência, comprimento de unidade de repetição e abundância, com apenas duas características compartilhadas: capacidade de construir longas matrizes de repetições dispostas frente a frente em tandem e capacidade de formar regiões heterocromáticas (PLOHL et al., 2012). Em Odontophrynidae, esta é a primeira vez em que DNAs satélites são revelados no genoma de um de seus gêneros, e os satDNAs centroméricos mapeados em *P. boiei* são relativamente conservados em tamanho, que foi de 173 a 189 pb nas sequências consensos obtidos. Este parece ser um tamanho comum para sequências de DNA satélite centroméricas, uma vez que já foram descritos também para diferentes organismos, por exemplo, o DNA satélite α de primatas (CHOO et al., 1991), o satélite ATOC180 de *Drosophila* (BACHMANN et al., 1993), o satélite ATCON de *Arabidopsis* (HESLOP-HARRISON et al., 1999) e o satélite PcP190 de *Physalaemus* (VITTORAZI et al., 2011, 2014).

SatDNAs não codificam proteínas, mas sua transcrição tem sido relatada em muitos organismos, incluindo vertebrados, invertebrados e plantas, onde eles participaram da formação da heterocromatina (VOLPE et al., 2002), centrômeros (ROSIC et al., 2014) e na regulação gênica (FELICIELLO et al., 2015). Além disso, recentemente, Palacios-Gimenez et al. (2018) usaram sequências de DNA e RNA de *Gryllus assimilis* para abordar o conteúdo e os padrões transcricionais dos satDNAs encontrados nesta espécie de grilo. No trabalho os autores discutiram hipóteses para a conservação e transcrição de satDNAs em *Gryllus*, o que pode resultar de seu papel na diferenciação sexual no nível da cromatina, na formação da heterocromatina e na

função centromérica. Da mesma forma, devido à grande quantidade de satDNAs encontrados no genoma de *P. boiei*, e grande quantidade de repetições centroméricas nos cromossomos, é provável que estes satDNAs estejam desempenhando papéis fundamentais para a manutenção genômica, mas que estudos mais profundos são necessários para confirmar essa organização e funcionalidade.

Embora ainda sejam dados iniciais, com este trabalho é possível avançar um pouco no conhecimento sobre a composição da heterocromatina centromérica em anfíbios. É possível destacar que na heterocromatina centromérica estão presentes várias sequências de DNAs repetitivos, ou variantes de sequências. As sequências nucleotídicas dos satDNAs aqui estudados apresentaram algum grau de similaridade entre si, conforme alinhamento realizado, porém mesmo mostrando alguma homologia, podem ser consideradas, no caso das sequências aqui analisadas, como sequências distintas, de acordo com a classificação de DNA satélite proposta por Ruiz-Ruano et al. (2018).

Esta diversidade de satDNAs associadas a região dos centrômeros pode ser visualizada também nos cromossomos que mostraram sinais, após a técnica de FISH, com diferentes distribuições. A localização dos satélites PboSat1-176 e PboSat2-173 coincidiram à região cromossômica associados a heterocromatina centromérica e pericentromérica. Porém, diferentemente, o satélite PboSat3-189, que foi classificado fazendo parte de uma superfamília com o PboSat1-176, teve uma localização cromossômica um pouco diferente, não aparecendo em mesma quantidade nos cromossomos. Este resultado pode surgir do fato de que diferentes taxas evolutivas podem ter afetado essas famílias de DNAs satélites. No presente trabalho ainda não foram analisadas todas as sequências de satDNAs isoladas. Assim, há a possibilidade de haver outras sequências associadas aos centrômeros e que após analisadas poderá nos dar uma representação mais completa da diversidade total de sequências de satDNAs associadas ao centrômero presentes no genoma de *P. boiei*.

Nossas perspectivas de descoberta levantam que o alto número de sequências repetitivas, sobretudo de satDNAs no genoma de *P. boiei* devem ter relevância na organização e na regulação do genoma, o que preparará o cenário para análises funcionais mais profundas do genoma de *Proceratophrys*. Embora mais pesquisas nessa área sejam necessárias, nosso estudo fornece um passo importante para

entender a biologia dos satDNAs em Odontophrynidae, destacando também a importância dos sapos como organismos modelo clássicos para estudos citogenéticos evolutivos. Levando em conta a grande variedade de satDNAs encontrados no genoma de *P. boiei*, é possível haver até mesmo satDNAs exclusivos em elementos cromossômicos específicos, como no cromossomo sexual W, o que conferiria diferentes localizações cromossômicas de satDNAs, podendo-se sugerir uma dinâmica diferencial para expansão e dispersão de *clusters* de repetições distintas.

Vários outros satDNAs foram isolados do genoma de *P. boiei* que serão explorados em projetos posteriores. O futuro mapeamento completo do satelitoma desta espécie poderá fornecer dados suficientes para propor hipóteses evolutivas sobre a organização do genoma desta espécie, mas que podem ser ampliadas para anfíbios como um todo, bem como hipóteses sobre a diferenciação de cromossomos sexuais neste grupo de vertebrados.

REFERÊNCIAS

- AMARO, R. C.; CARNAVAL, A. C. Q.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Demographic process in montane Atlantic rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, p. 880–888, 2012.
- ANANIAS, F.; MODESTO, A. D. S.; MENDES, S. C.; NAPOLI, M. F. Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphism. **Hereditas**, v. 144, p. 206-212, 2007.
- BACHMANN, L.; SPERLICH, D. Gradual Evolution of a Specific Satellite DNA Family in *Drosophila ambigua*, *D. tristis*, and *D. obscura*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 647-659, 1993.
- BALDISSERA, F. A. JR.; OLIVEIRA, P. S. L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 335–345, 1993.
- CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215–220, 1994.
- CHOO, K. H.; VISSEL, B.; NAGY, A.; EARLE, E.; KALITSIS, P. A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 1179-1182, 1991.

- CONTE, C. E.; MACHADO, R. A. Riqueza de espécies e distribuição espacial e temporal em comunidade de anuros (Amphibia, Anura) em uma localidade de Tijucas do Sul, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, p. 940-948, 2005.
- DOVER, G. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. **Nature**, v. 299, p. 111–7, 1982.
- DOVER, G. Molecular drive. **Trends in Genetics**, v. 18, p. 587–9, 2002.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792–1797, 2004.
- FELICIELLO, I.; AKRAP, I.; BRAJKOVI, J.; ZLATAR, I.; UGARKOVI, U. 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, 2015.
- FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6 (9 January 2013). American Museum of Natural History, New York, USA, 2017. Electronic Database. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>> Acesso em: 21 jan. 2019.
- FUKAGAWA, T.; EARNSHAW, W.C. The Centromere: Chromatin Foundation for the Kinetochore Machinery. **Developmental Cell**, v. 30, p. 496–508, 2014.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in Plants: More than Just Rubbish. **Cytogenetic Genome Research**, v. 146, p. 153–170, 2015.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, v. 8, p. 230, 2017. doi:10.3390/genes8090230
- GATTO, K. P.; BUSIN, C. S.; LOURENÇO, L. B. Unraveling the sex chromosome heteromorphism of the paradoxical frog *Pseudis tocantins*. **PLoS One**, 11(5):e0156176, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0156176
- GATTO, K. P.; MATTOS, J. V.; SEGER, K. R.; LOURENÇO, L. B. Sex Chromosome Differentiation in the Frog Genus *Pseudis* Involves Satellite DNA and Chromosome Rearrangements. **Frontiers in Genetics**, 9:301, 2018. doi: 10.3389/fgene.2018.00301
- GONG, Z.; WU, Y.; KOBLÍZKOVÁ, A.; TORRES, G. A.; WANG, K.; IOVENE, M.; NEUMANN, P.; ZHANG, W.; NOVÁK, P.; BUELL, C. R.; MACAS, J.; JIANG, J. Repeatless and repeat-based centromeres in potato: implications for centromere evolution. **Plant Cell**, v. 24, p. 3559-3574, 2012.
- GORDON, A. AND HANNON, G. J. (2010) Fastx-toolkit, FASTQ/A short-reads pre processing tools. Unpublished http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit
- HADDAD, C. F. B. & SAZIMA, I. Anfíbios anuros da Serra do Japi. *História Natural da Serra do Japi: Ecologia e Preservação de uma Área Florestal no Sudeste do Brasil*. P. C. Morellato, eds., Unicamp, Campinas, 1992.

- HESLOP-HARRISON, J. S.; MURATA, M.; OGURA, Y.; SCHWARZACHER, T.; MOTOYOSHI, F. Polymorphisms and Genomic Organization of Repetitive DNA from Centromeric Regions of *Arabidopsis* Chromosomes. **The Plant Cell**, v. 11, p. 31-42, 1999.
- JUNIER, T. & PAGNI, M. Dotlet: diagonal plots in a web browser. **Bioinformatics**, v. 16, p. 178–9, 2000.
- JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; PAVLICEK, A.; KLONOWSKI, P.; KOHANY, O.; WALICHIEWICZ, J. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic Genome Research**, v. 110, p. 462–7, 2005.
- LOCKE, D. P.; HILLIER, L. W.; WARREN, W. C.; WORLEY, K. C.; NAZARETH, L. V.; MUZNY, D. M.; YANG, S. P.; WANG, Z.; CHINWALLA, A. T.; MINX, P.; MITREVA, M.; COOK, L.; DELEHAUNTY, K. D; FRONICK, C.; et al. Comparative and demographic analysis of orang-utan genomes. **Nature**, v. 469, p. 529-533, 2011.
- LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes. In: Garrido-Ramos MA (ed) *Genome Dynamics. Repetitive DNA*. Karger, Basel, pp 1–28, 2012.
- MESTRINER, C. A. et al. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p. 1–9 2000.
- NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, 11, 378, 2010.
- NOVAK, P.; NEUMANN, P.; PECH, P.; STEINHAISSL, J.; MACAS, J. RepeatExplorer: a galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 29, p. 792–3, 2013.
- PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; DIAS, G. B.; GOMES DE LIMA, L.; KUHN, G. C. E. S.; RAMOS, É.; MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*. **Scientific Reports**, 7, 6422, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-06822-8.
- PEZER, Z.; BRAJKOVIC, J.; FELICIELLO, I.; UGARKOVIC, D. Transcription of satellite DNAs in insects. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v. 51, p. 161–78, 2011.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.
- PIRAS, F. M; NERGADZE, S. G.; MAGNANI, E.; BERTONI, L.; ATTOLINI, C.; et al. Uncoupling of Satellite DNA and Centromeric Function in the Genus *Equus*. **PLoS Genetic**, 6(2): e1000845, 2010. doi:10.1371/journal.pgen.1000845

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

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. **Satellite DNA evolution**. In: Garrido-Ramos MA (ed) Repetitive DNA, vol 7. Karger, Basel, pp 126–152, 2012
<https://doi.org/10.1159/000337122>

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

ROSIC, S.; KOHLER, F.; ERHARDT, S. Repetitive centromeric satellite RNA is essential for kinetochore formation and cell division. **The Journal of Cell Biology**, 2014; 207:335-49; PMID:25365994; <https://doi.org/10.1083/jcb.201404097>

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

RUIZ-RUANO, F. J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. High-throughput analysis of the satellitoma illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, 6, 28333, 2016.

SERAFIM, H.; IENNE, S.; CICCHI, P. J. P.; JIM, J. Anurofauna de remanescentes de floresta Atlântica do município de São José do Barreiro, estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, p. 69, 2008.

SHANG, W. H.; HORI, T.; TOYODA, A.; KATO, J.; POPENDORF, K.; SAKAKIBARA, Y.; FUJIYAMA, A.; FUKAGAWA, T. Chickens possess centromeres with both extended tandem repeats and short non-tandem-repetitive sequences. **Genome Research**, v. 20, p. 1219-1228, 2010.

SILVA, E. L.; BUSSO, A. F.; PARISE-MALTEMPI. Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolar organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 139(1), 2012. DOI: 10.1159/000342957.

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

UGARKOVIC, D. & PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. **The EMBO Journal**, v. 21, p. 5955–9, 2002.

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

VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hylodid frogs. **BMC Genetics** 15, 111, 2014. <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0111-x>.

VOLPE, T. A.; KIDNER, C.; HALL, I. M.; TENG, G.; GREWAL, S. I. S.; MARTIENSSEN, R. A. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. **Science**, v. 297, p. 1833–7, 2002.

ZIEGLER, C. G.; LAMATSCH, D. K.; STEINLEIN, C.; ENGEL, W.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. **Chromosome Research**, v. 11, n. 1, p. 23–35, 2003.

ZINA, J.; ENNSER, J.; PINHEIRO, S. C. P.; HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F. Taxocenose de anuros de uma mata semidecídua do interior do Estado de São Paulo e comparações com outras taxocenoses do Estado, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 1-9, 2007.

ANEXOS (Capítulo 1)

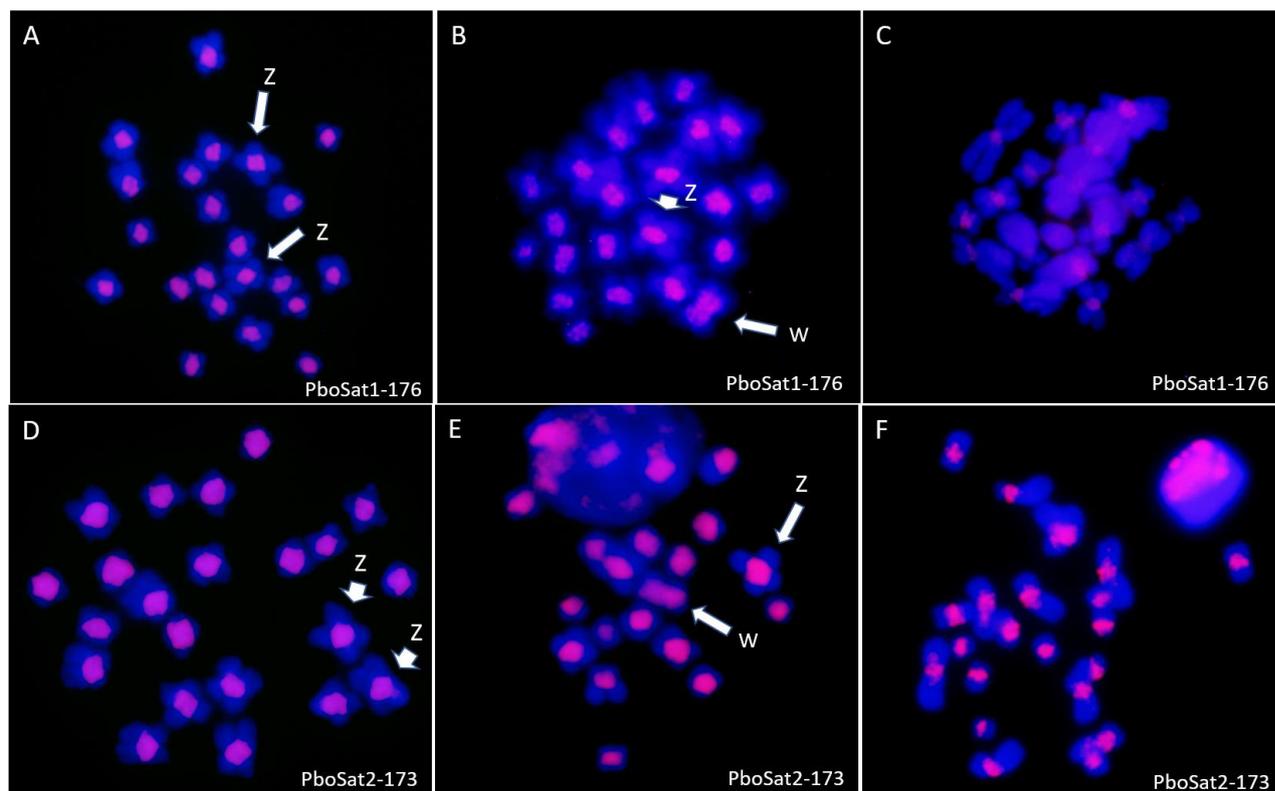


Figura 1. Mapeamento cromossômico dos satDNAs em *P. boiei*. Em A, B e C, PboSat1-176 em indivíduo macho (São Paulo), fêmea (São Paulo) e fêmea (Paraná), respectivamente. Em D, E e F, PboSat2-173 em indivíduo macho (São Paulo), fêmea (São Paulo) e fêmea (Paraná), respectivamente.

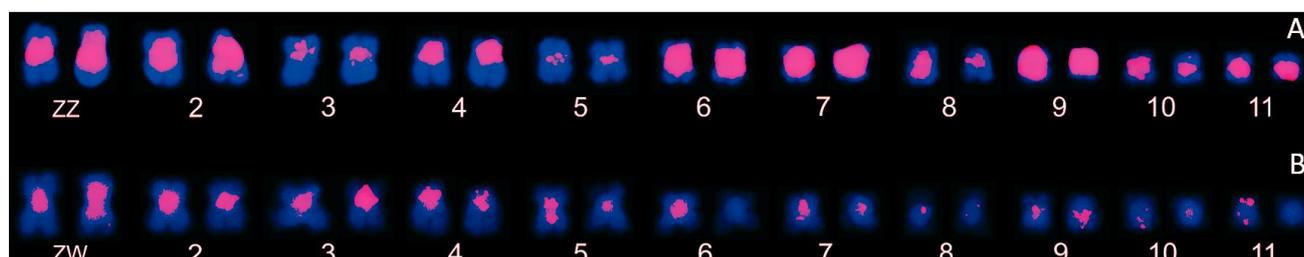


Figura 2. Mapeamento cromossômico do satDNA PboSat3A-189 em *P. boiei*. Em A, indivíduo macho e em B, fêmea.

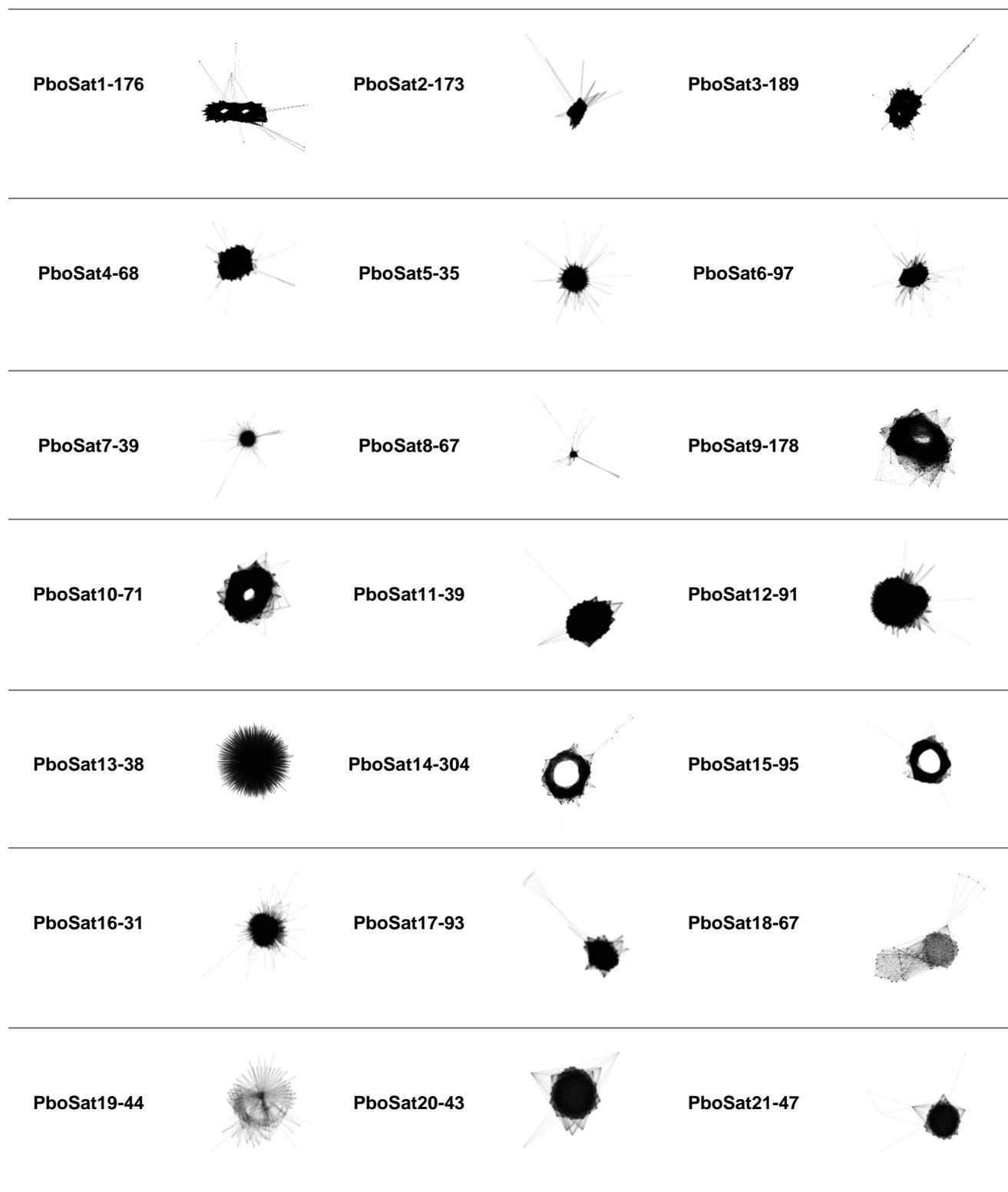
Tabela 1. DNAs satélites encontrados no genoma de *P. boiei* de Tijucas do Sul, PR com suas principais características.

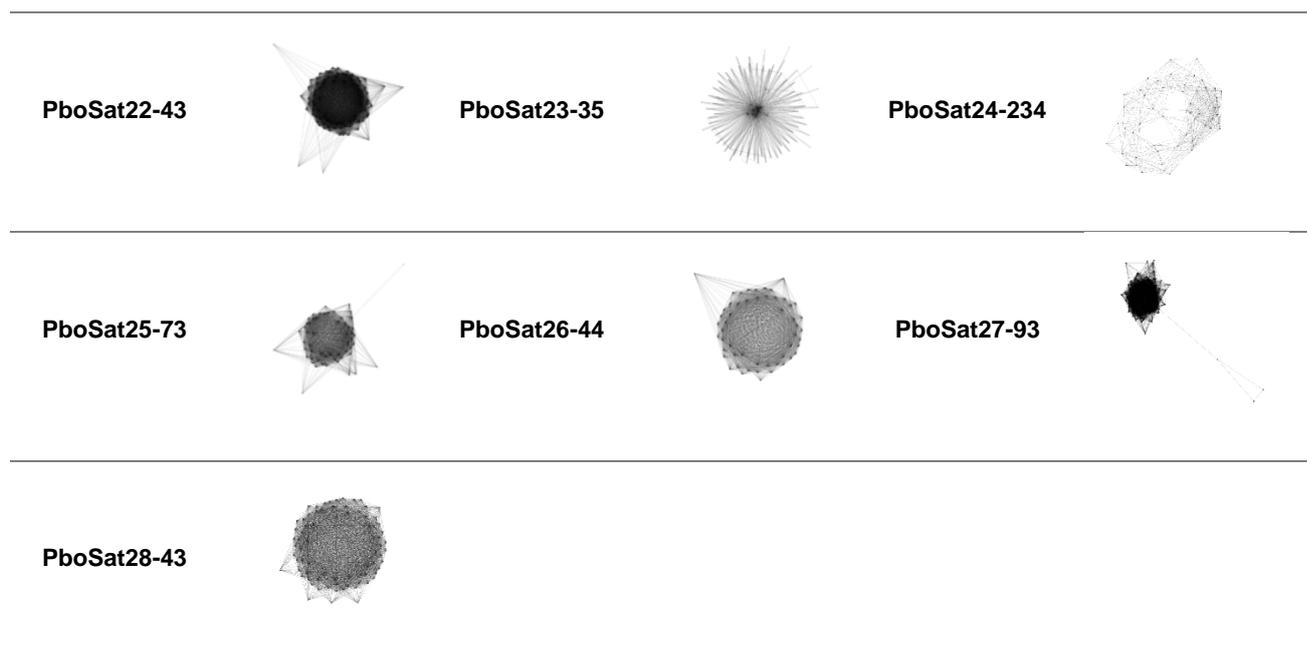
SatDNA Família	Tamanho de monômero (pb)	Abundância (%)	Consenso	A+T %
PboSat1-176 TAREAN Cluster1	176	8,000	GAAAAACAGTCACCTTGCTACCCATTCAT TCCTATGGAAGAAGCAACTTGAGATATGG ATGTCAATTTCTCTGTGCAGGAATGTCAG GCGAATGAAAACCTCAATGCTGCCAGGCTT GTTTCCATGACCCTTTAGCCACACCAAGT CGGAGGAGTTGGTCACTCTTCAGGTTTGG GA	54
PboSat2-173 RepeatExplorer Cluster 1	173	4,500	CCACAACCTGGATGCTTCTTCATAGGAA TGAATGGGCAGGCAAGTACTGGATTTT TCTCCCAAACCTGAAGAGTGACAAACTC CTCCGACTTGGTGTGGCTAAAGGGTCAT GGAAACAAGCCTGGCAGCATTGAGTTTT CATTTTCATCACATTCTGCACAGAGATT TTCA	54,4
PboSat3-189 TAREAN Cluster 12	189	0,710	CTAGATTTTCAGTGGTCTTTATAAAAAGAG ATTACACGAGAAAAGCTACCTTTGAGAAGA AAAGGATCAACAGAACAAGGGATTCCCAG CCAGTCTCCCATGCTGGTACTTGCCTTGC CTCAAGCTGCGTAGCGGCTGCGATCTGAC GAGTGCAGGGACCTTCAGCTTAGAATGGC CGTTGACGAGTTCCAG	51,3
PboSat4-68 RepeatExplorer Cluster 14	68	0,705	ATTAACCTATAGGAATCTGAACCA AGGATTTCCAGCCCCATGCTGGT ACTTGCCTTGCAAGGTACGCG	50
PboSat5-35 RepeatExplorer Cluster 23	35	0,525	TACATAGGGGGCAGTATTATAGTA GTTATATTCTTG	68,6
PboSat6-97 RepeatExplorer Cluster 39	97	0,249	TGACTGCACCAGCAGAATAGTGA GTGCAGCTCTGGAGTATAATACA GGATGTAACCTCAGGATCAGTACA GGATAAGTAATGTAATGTATGTAC ACAG	58,3
PboSat7-39 RepeatExplorer Cluster 58	39	0,128	AGTATCACACATGATAGGATTAG ATACGCAGCTGCAGAC	56,4
PboSat8-67 RepeatExplorer Cluster 66	67	0,102	AACATCCTCCCTGCCTGCAGCCA CCACTAGAGGGAGCTCAGGAGC TGAAGTATAGAGTTACATGAT	47,8
PboSat9-178 TAREAN Cluster 55	178	0,100	GCCACTCCCGGGTGGTGTGTTTTTC CTTGACCCCGGGTAGGCATTAATT TTTAAACCCCAATAAAATGTGCTTTT TTCGCCACCTCCGGGTGGTGTGTTT ATCCTTGACCCCGATCGGGTGTGTT AATTTTCCACTCCCGAAAATTTTCAT TTTTTCACCACCCCGGGGTGGCG TTTTTTTT	52,2
PboSat10-71 RepeatExplorer Cluster 67	71	0,095	CCCATCGGGGGTCAAGGAAAAAC ACCAACCCGGGGGTGGCGAAAAA AGCATTATTTTCGGGATAAAAATAA	52,1
PboSat11-39 RepeatExplorer Cluster 70	39	0,091	AATCTGTATGTAGTGAGCTCCCC CTAGTGGTGGCTGTAT	51,2
PboSat12-91 RepeatExplorer Cluster 69	91	0,091	ATGCTGGTATAACCTGGGTATAT ACTGTATATAATTATATATGTACA GCTGGTATAAGTTATACATCTTC TTGTATATAGTGATATGGAGC	69,3
PboSat13-38 RepeatExplorer Cluster 71	38	0,089	TATTATATAAGTGGACCAAGTAG AAATGTACAGTACCG	65,8
PboSat14-304 TAREAN	304	0,089	GAATTCTAACTACACCATCACCA CCCTACTATTCTCAGGCTCTACC	56,6

Cluster 62			CCTTTTTACTCCAACCTCTGTGTGT CTGATCGTGTATATTACACAACAG CTTCACATCATATTATCAGTACGT AAGGCACTGCTCCACCTTGTGGG CAATTTCTGCTACTACACCTTCT ATCTATATAAATACTCATCTTACTGG TTACATATGCATACCTTAGCACAAG TGGGAAACTTCCCATGAGCTCTATA TGCAAATAAGGGCATTGCAAAGCC CTTGCCCTTGTCTCTCTGTGTTGGA ATCCCTCTCTGACT	
PboSat15-95 RepeatExplorer Cluster 78	95	0,077	GCATATGTAACCAGTAAGATGAG TATTATATAGATAGGAAGGTGTAG TAGCAGAAATTGCCACAAGGTG GAGCAGTGCCTTACGTAAGTATAAT	60
PboSat16-31 RepeatExplorer Cluster 79	31	0,075	GTACAGGGATAATAAACACAGTGA TGTGACA	61,3
PboSat17-93 RepeatExplorer Cluster 109	93	0,039	TGTGTTCCACTATAAGCTACA GATATATCCTGTTCCATCTGTCT AGGATGCACAGGGAATTCAGTATA CACCTGTATATGTGGAATA	62,3
PboSat18-67 TAREAN Cluster 123	67	0,021	GCTATATACACCATAAACACATACAT GTGTACAGTGTAAATTTATATAGTAT ATGCGTACATTTAT	72,7
PboSat19-44 RepeatExplorer Cluster 145	44	0,020	AGCTGAGCTCTGTGATATATAGGG TTATATGATAGAGGGAGAGA	59,1
PboSat20-43 RepeatExplorer Cluster 147	43	0,020	TTCTCAGTGATGCTACTGCTCTCTA GTGAATGGATAGGCTGCA	53,5
PboSat21-47 RepeatExplorer Cluster 157	47	0,018	GAGCTCAGGAGATTACTGCATACT GTATATACAGCCACCACTAGAGG	53,2
PboSat22-43 RepeatExplorer Cluster 158	43	0,017	ACAGATAATGTAGTAGATGTCACCT GCAGTCCTATGTAACACC	58,2
PboSat23-35 RepeatExplorer Cluster 167	35	0,016	ACACAGGAGAGCTGACAGATCCT CTATACTACACC	51,4
PboSat24-234 TAREAN Cluster 151	234	0,015	TTTAGTGATTTTCGTCATTTTTCAAGT CGTCAAGTGGATGTTTCTCATTTTTCC ATGATTTTTAGTTTTCTTGCCATATTC CACGTCCTACAGTGGACATTTCTAAA TTTTCCACCTTTTTTCAGTTTTCTCGC CATATTTACGTCCTAAAGTGTGATTT CTCATTTTTCCGTGATTTTTAGTTTTCTC GCCATATTCAGGTCCTTCAGTGTGCA TTTTCTATTTTTACGTTT	63,2
PboSat25-73 RepeatExplorer Cluster 198	73	0,011	GAGCTCAGGAGATTACTGCATACT GTATATACAGCCACCACTAGAGG	53,2
PboSat26-44 RepeatExplorer Cluster 208	44	0,011	CATTACCTGGTAGTGTCTCTATAAG AAGCCTCTACTCTGCACT	51,5
PboSat27-93 TAREAN Cluster 96	93	0,0370	CTGTTCCATCCATGTCTAGGATGCACA GGGAATTCAGTATACACCTGTATATGT GTAATATGTGTTCCACTATAAG CTACAGATATATC	63,4
PboSat28-43 TAREAN Cluster 125	43	0,0210	CTCTAGTGAATGGATAGGCTGCATTCTC AGTGATGCTACTGCT	53,5

Fonte: O autor (2019)

Tabela 2. Gráficos de agrupamentos de sequências gerados pelo *RepeatExplorer* para os DNAs satélites encontrados no genoma de *P. boiei*.





Fonte: O autor (2019)

Tabela 3. Lista de *primers* desenhados para os DNAs satélites

Nome do Primer	Sequência (5' - 3')
PboSat1-176F	GTCAGGCGAATGAAAACCTC
PboSat1-176R	ATTCCTGCACAGAGAAATTG
PboSat2-173F	CCTCCGACTTGGTGTGGC
PboSat2-173R	AGTTTGTCACTCTTCAGGTTTG
PboSat3-189F	CATGCTGGTACTTGCCTTGCC
PboSat3-189R	GAGACTGGCTGGGAATCCC
PboSat4-68F	GAATCTGAACCAAGGATTCC
PboSat4-68R	CTATAGGTTAATCGCGTACC
PboSat5-35F	TTATAGTAGTTATATTCTTGT
PboSat5-35R	TACTGCCCTATGTACAA
PboSat6-97F	ATGTACACAGTACTGCA
PboSat6-97R	ACATTACATTACTTATCCTGTA
PboSat7-39F	GATAGGATTAGATACGCAGC
PboSat7-39R	ATGTGTGATACTGTCTGCAG
PboSat8-67F	GCAGCCACCACTAGAGGG
PboSat8-67R	AGGCAGGGAGGATGTTATCA
PboSat9-178F	ACTCCCGAAAATTTCATTTTTTC
PboSat9-178R	GGAAAATTAACACCCGATCG
PboSat10-71F	AATTAACCCATCGGGGGT
PboSat10-71R	TTATCCCGAAAAATGTGCTTT
PboSat11-39F	TGTAGTGAGCTCCCCCTAGT
PboSat11-39R	TACAGATTATACAGCCACCACT
PboSat12-91F	TATGGAGCATGCTGGTATAA
PboSat12-91R	TCACTATATAACAAGAAGATGTA
PboSat13-38F	ATAAGTGGACCAAGTAGAAA
PboSat13-38R	ATAATACGGTACTGTACATTT
PboSat14-68F	CCTTGTGGGCAATTTCTGCTA
PboSat14-68R	TGGAGCAGTGCCTTACGTAC
PboSat15-95F	ATAATGCATATGTAACCAAGTAA
PboSat15-95R	CAGTACGTAAGGCACTGC
PboSat16-31F	CACAGTGATGTCACAGTAC
PboSat16-31R	TTTATTATCCCTGTACTGTGA
PboSat17-93F	GTTCAATCCATGTCTAGGAT

PboSat17-93R	TGGATATATCTGTAGCTTATAG
PboSat18-67F	TAAACACATACATGTGTACA
PboSat18-67R	TGGTGTATATAGCCATAAAT
PboSat19-44F	AAGCTGAGCTCTGTGATATA
PboSat19-44R	CTCTCCCTCTATCATATAAC
PboSat20-43F	TGATGTCAGTCTCTCTAGT
PboSat20-43R	CTGAGAATGCAGCCTATCC
PboSat21-47F	CACCACTAGAGGGAGCTCA
PboSat21-47R	GCTGTATATACAGTATGCAGTA
PboSat22-43F	TAATGTAGTAGATGTCACCT
PboSat22-43R	TCTGTGGTGTTACATAGGA
PboSat23-35F	CCTCTATACTACACCACACA
PboSat23-35R	ATCTGTCAGCTCTCCTGTG
PboSat24-234F	TCACGTCCTAAAGTGTGTAT
PboSat24-234R	AATATGGCGAGGAAAAGTGA
PboSat25-73F	TGATGTAATGTCTCTGGAGG
PboSat25-73R	TATATGTGACTGATATCAGCC
PboSat26-44F	CTGGTAGTGTCTCTATAAGA
PboSat26-44R	GTATGAGTGCAGAGTAGG
PboSat27-93F	ACAGATATATCCTGTTTCATTC
PboSat27-93R	AGCTTATAGTGAATGAAC
PboSat28-43F	CTCTAGTGAATGGATAGGCT
PboSat28-43R	AGCAGTGACATCACTGAGAA

Fonte: O autor (2019)

ALINHAMENTOS

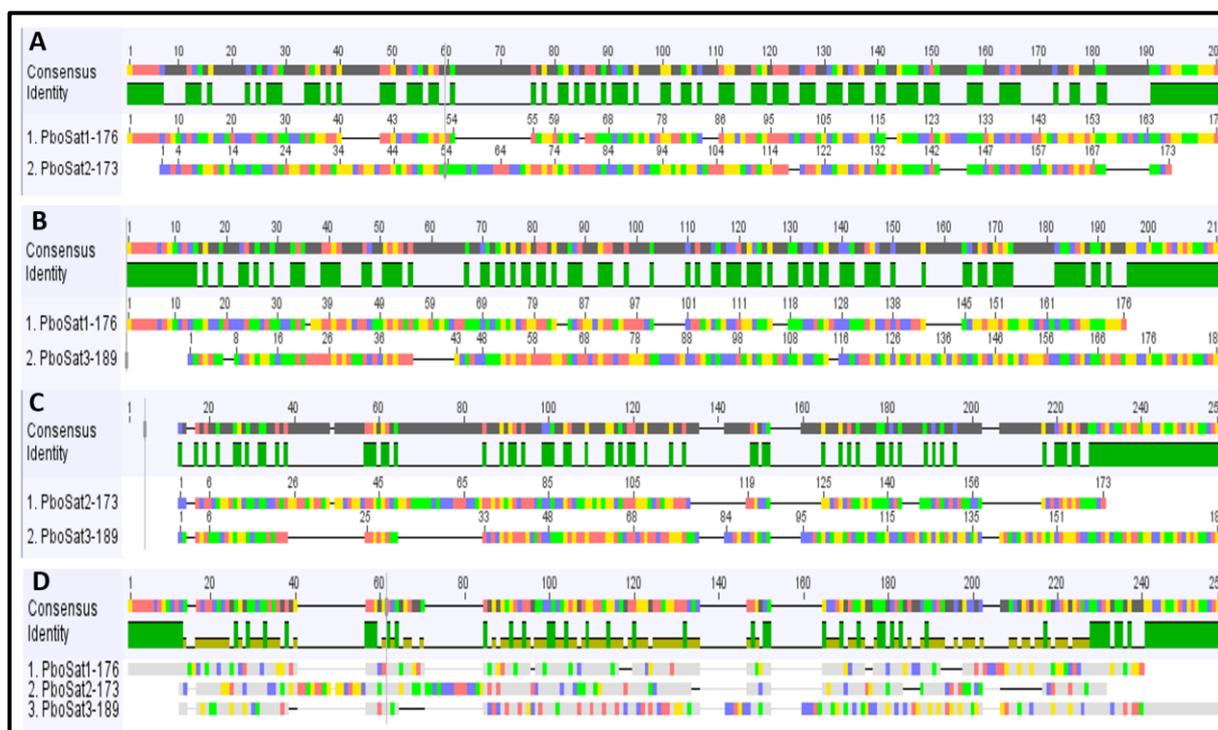


Figura 3. Alinhamentos dos satélites. A: PboSat1-176 e PboSat2-173 (48,8% de similaridade); B: PboSat1-176 e PboSat3-189 (53,1%); C: PboSat2-173 e PboSat3-189 (44,3%); D: Os três consensos juntos (32,6%).

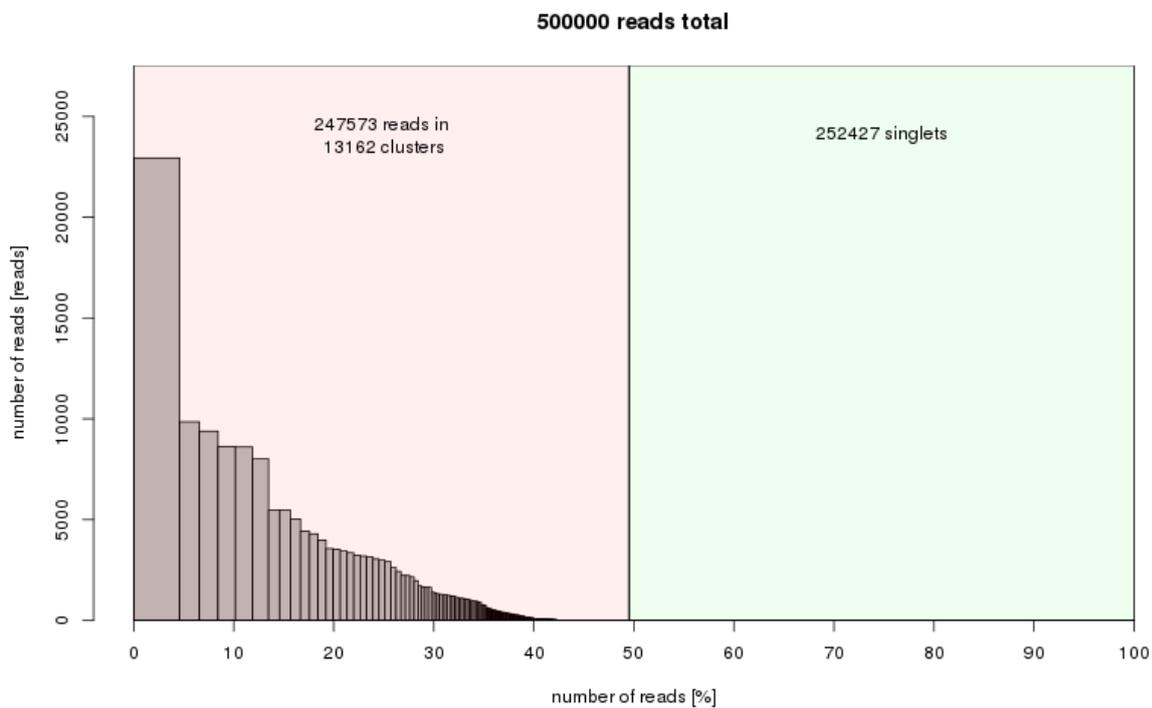


Figura 4. Histograma com os *clusters* repetitivos encontrados pelo *RepeatExplorer* no genoma de *P. boiei*.

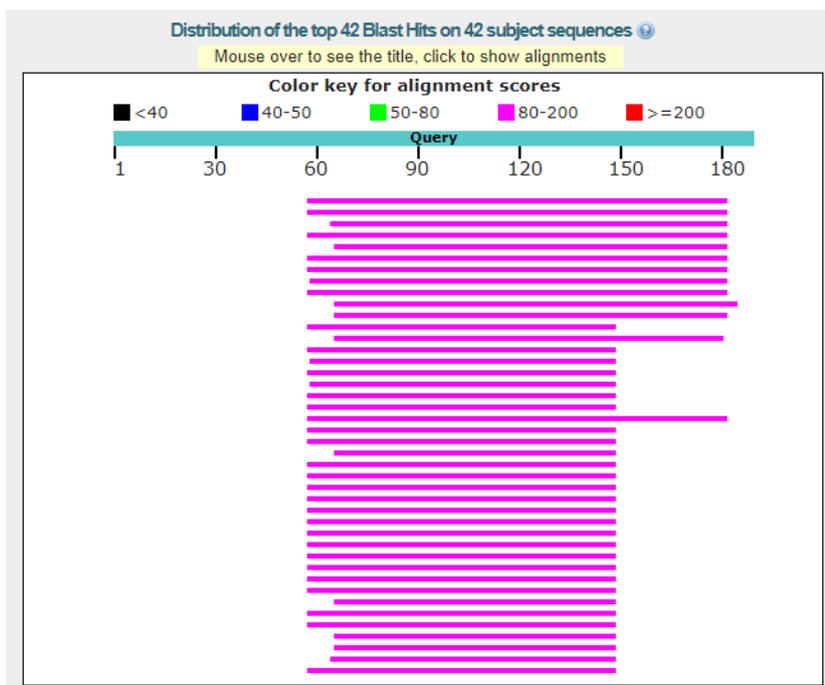


Figura 5. Resultado da busca por seqüências similares no *BLAST* para o satélite PboSat3A-189.

Tabela 4. Relação das 42 sequências similares para o satélite PboSat3A-189 no *BLAST* do NCBI.

Espécie	Identidade	Acesso
Physalaemus cuvieri clone PcP190EcoRI_c12 satellite sequence	89%	JF281115.1
Physalaemus cuvieri clone PcP190EcoRI_c6 satellite sequence	89%	JF281109.1
Physalaemus cuvieri clone PcP190EcoRI_c10 satellite sequence	90%	JF281113.1
Physalaemus cuvieri clone PcP190EcoRI_c11 satellite sequence	88%	JF281114.1
Pseudis tocantins clone C1-4 satellite PcP190 sequence	89%	KX170887.1
Physalaemus cuvieri clone PcP190EcoRI_c13 satellite sequence	87%	JF281116.1
Physalaemus cuvieri clone PcP190EcoRI_c17 satellite sequence	86%	JF281120.1
Physalaemus cuvieri clone PcP190EcoRI_c16 satellite sequence	86%	JF281119.1
Physalaemus cuvieri clone PcP190EcoRI_c4 satellite sequence	86%	JF281117.1
Pseudis minuta voucher ZUEC:11583 clone C7 satellite PcP190 sequence	87%	MH370440.1
Pseudis limellum voucher MNRJ:34072 clone C8 satellite PcP190 sequence	87%	MH370453.1
Physalaemus marmoratus clone 5.1 satellite PcP190 sequence	89%	KM361701.1
Pseudis tocantins clone C11-3/1a satellite PcP190 sequence	84%	KX170931.1
Pleurodema diplolister clone 10.2 satellite PcP190 sequence	88%	KM361713.1
Pleurodema diplolister clone 6.1 satellite PcP190 sequence	88%	KM361711.1
Pleurodema diplolister clone 4.2 satellite PcP190 sequence	88%	KM361709.1
Pleurodema diplolister clone 2.1 satellite PcP190 sequence	88%	KM361707.1
Physalaemus albifrons clone c9 satellite PcP190 sequence	88%	KM361698.1
Physalaemus albifrons clone 4.1 satellite PcP190 sequence	88%	KM361696.1
Physalaemus cuvieri clone PcP190EcoRI_c14 satellite sequence	82%	JF281124.1
Physalaemus marmoratus clone 8.2 satellite PcP190 sequence	88%	KM361705.1
Physalaemus marmoratus clone 8.1 satellite PcP190 sequence	88%	KM361704.1
Physalaemus cuvieri clone MG3.2 satellite PcP190 sequence	89%	KM361674.1
Pleurodema diplolister clone 10.1 satellite PcP190 sequence	87%	KM361712.1
Pleurodema diplolister clone 4.1 satellite PcP190 sequence	87%	KM361708.1
Physalaemus ephippifer clone 10.1 satellite PcP190 sequence	87%	KM361700.1
Physalaemus albifrons clone 1.1 satellite PcP190 sequence	87%	KM361694.1
Physalaemus albonotatus clone 3.2 satellite PcP190 sequence	87%	KM361692.1
Physalaemus centralis clone 5.1 satellite PcP190 sequence	87%	KM361688.1
Physalaemus centralis clone 2.1 satellite PcP190 sequence	87%	KM361686.1
Physalaemus centralis clone 1.2 satellite PcP190 sequence	87%	KM361684.1
Physalaemus cuvieri clone PB6.2 satellite PcP190 sequence	87%	KM361683.1
Physalaemus cuvieri clone PB1.1 satellite PcP190 sequence	87%	KM361681.1
Physalaemus cuvieri clone RS1.1 satellite PcP190 sequence	87%	KM361675.1
Physalaemus marmoratus clone 5.2 satellite PcP190 sequence	87%	KM361702.1
Physalaemus cuvieri clone TO6.1 satellite PcP190 sequence	88%	KM361679.1
Physalaemus cuvieri clone TO6.2 satellite PcP190 sequence	86%	KM361680.1
Physalaemus cuvieri clone TO5.2 satellite PcP190 sequence	86%	KM361678.1
Pleurodema diplolister clone 4.3 satellite PcP190 sequence	87%	KM361710.1
Physalaemus cuvieri clone MG3.1 satellite PcP190 sequence	87%	KM361673.1
Physalaemus albonotatus clone 9.1 satellite PcP190 sequence	86%	KM361689.1
Physalaemus albonotatus clone 2 satellite PcP190 sequence	84%	KM361690.1

Fonte: O autor (2019)

4.2. Capítulo 2: Estudo citogenético de quatro espécies de *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae): análises convencionais e moleculares.

M. J. Silva¹, T. Gazoni¹, H. Narimatsu¹, P. Pereira¹, C. F. B. Haddad², M. D. Santos¹, L. R. Cholak¹ e P. P. Parise-Maltempi¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil

²Departamento de Zoologia e Centro de Aquicultura (CAUNESP), Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

O gênero *Proceratophrys* pertence à família Odontophrynidae, que juntamente com *Macrogenioglottus* e *Odontophrynus* totalizam 54 espécies (PYRON & WIENS, 2011; FROST, 2018). Foi proposto por Miranda-Ribeiro em 1920 e tem como espécie tipo *P. biggibosa*, proveniente do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. É o mais representativo dos gêneros da família em quantidade de representantes, compreendendo atualmente 41 espécies, distribuídas no leste e Sul do Brasil, nordeste da Argentina e Paraguai, sendo encontradas em ambientes florestados e áreas abertas (PRADO & POMBAL, 2008; FROST, 2018).

A riqueza de espécies do gênero *Proceratophrys* no entanto provavelmente é subestimada, em relação ao número de espécies, conforme indicado pela constante descoberta e descrição de novas espécies, sendo que somente nos últimos sete anos, doze novas espécies foram descritas (PRADO & POMBAL, 2008; ÁVILA et al., 2011; MARTINS & GIARETTA 2011; NAPOLI et al., 2011; CRUZ et al., 2012; BRANDÃO et al., 2013; DIAS et al., 2013; GODINHO et al., 2013; MARTINS & GIARETTA, 2013; MÂNGIA et al., 2014; MÂNGIA et al., 2018).

A classificação taxonômica para *Proceratophrys* tem sido realizada com base em similaridade morfológica externa, e suas espécies são comumente agrupadas em grupos ou complexos de espécies (IZECKSOHN et al., 1999; GIARETTA et al., 2000; KWET & FAIVOVICH, 2001; PRADO & POMBAL, 2008), mesmo com evidências

moleculares apontando para o não monofiletismo deste grupo (PRADO & POMBAL, 2008; AMARO et al., 2009; PYRON & WIENS 2011, TEIXEIRA et al., 2012).

O complexo *P. boiei* possui representantes caracterizados por apresentar um único e longo apêndice palpebral e sem apêndice rostral triangular. Inclui as espécies *P. boiei* (Wied-Neuwied, 1824), *P. pavotii* Cruz, Prado & Izecksohn, 2005 e *P. renalis* (Miranda-Ribeiro, 1920).

As espécies do complexo *P. appendiculata* também possuem apêndices palpebrais únicos e longos, porém, diferente do grupo *P. boiei*, possuem o apêndice rostral triangular. Fazem parte deste complexo as espécies *P. appendiculata* (Günther, 1873), *P. laticeps* Izecksohn & Peixoto, 1981, *P. melanopogon* (Miranda-Ribeiro, 1926), *P. moehringi* Weygoldt & Peixoto, 1985, *P. phyllostomus* Izecksohn, Cruz & Peixoto, 1998, *P. sanctaritae* Cruz & Napoli, 2010, *P. subguttata* Izecksohn, Cruz & Peixoto, 1998, *P. tupinamba* Prado & Pombal, 2008, *P. vielliardi* Martins & Giaretta, 2011, *P. belzebul* Dias, Amaro, Carvahlo-e-Silva, e Rodrigues, 2013, *P. gladius* Mângia, Santana, Cruz, e Feio, 2014, *P. itamari* Mângia, Santana, Cruz, e Feio, 2014 e *P. izecksohni* Dias, Amaro, Carvahlo-e-Silva, e Rodrigues, 2013.

Os representantes do complexo *P. bigibbosa* são caracterizados pela falta de apêndices palpebrais e a presença de protuberâncias pós oculares. Fazem parte desse grupo as espécies *P. avelinoi* Mercadal de Barrio & Barrio, 1993, *P. bigibbosa* (Peters, 1872), *P. brauni* Kwet & Faivovich, 2001, *P. palustris* Giaretta & Sazima, 1993 e *P. rondonae* Prado & Pombal 2008.

Por fim, o complexo *P. cristiceps* agrupa espécies que não possuem os apêndices palpebrais e os apêndices rostrais proeminentes ou elevações postoculares, com *P. cristiceps* (Muller 1883), *P. cururu* Eterovick e Sazima 1998, *P. goyana* (Miranda-Ribeiro 1937), *P. concavitympanum* Giaretta, Bernarde & Kokubum, 2000, *P. moratoi* (Jim e Caramaschi 1980), *P. strussmannae* Avila, Kawashita-Ribeiro e Morais 2011, *P. huntingtoni* Avila, Pansonato e Strussmann 2012, *P. carranca* Godinho, Moura, Lacerda e Feio 2013, *P. rotundipalpebra* Martins e Giaretta 2013, *P. bagnoi* Brandão, Caramaschi, Vaz-Silva e Campos 2013, *P. branti* Brandão, Caramaschi, Vaz-Silva e Campos 2013, *P. dibernardoii* Brandão, Caramaschi, Vaz-Silva e Campos 2013, *P. caramaschii* Cruz, Nunes e Juncá 2012, *P. aridus* Cruz,

Nunes e Juncá 2012 e *P. ararype* Mângia, Koroiva, Nunes, Roberto, Ávila, Sant'Anna, Santana, e Garda, 2018. A espécie *P. schirchi* (Miranda-Ribeiro, 1937) encontra-se isolada, não fazendo parte de qualquer agrupamento do gênero.

A espécie *Proceratophrys boiei* (Wied-Neuwied, 1825) é representada por sapos neotropicais, endêmicos da Mata Atlântica, sendo encontrada em áreas de até 1.200 m de altitude. Está distribuída ao longo do leste do Brasil, associada à Mata Atlântica e áreas de transição com Cerrado, do sul do estado do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná ao sul de Santa Catarina. A espécie é comumente encontrada na serapilheira dentro de florestas, próximo a córregos pequenos, estreitos e de fluxo lento permanente (HADDAD & SAZIMA, 1992; CONTE & MACHADO, 2005; ANANIAS et al., 2007; ZINA et al., 2007; PRADO & POMBAL, 2008; SERAFIM et al., 2008).

A espécie *P. melanopogon* (Miranda-Ribeiro, 1926), ocorre na Serra do Mar e na Serra da Mantiqueira nos estados de São Paulo, no Rio de Janeiro, e no extremo sudeste de Minas Gerais, no sudeste do Brasil. Já *Proceratophrys schirchi* (Miranda-Ribeiro, 1937), é nativa do Brasil e ocorre do leste ao sul do país, nos estados da Bahia, Espírito Santo, extremo nordeste de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Já *Proceratophrys laticeps* Izecksohn e Peixoto, 1981, tem uma distribuição no leste do Brasil, variando da parte central do estado da Bahia e sul do estado do Espírito Santo.

Dados genéticos e citogenéticos de *Proceratophrys* ainda são escassos na literatura quando comparado a alguns outros grupos de anuros, e até o momento são limitados apenas à descrição do número e a morfologia cromossômica, baseados em coloração convencional com Giemsa, Bandamento C e impregnação com nitrato de prata (ANANIAS et al., 2007; AMARO et al., 2012), ainda sem análises citogenômicas e moleculares para o gênero.

Os dados cariotípicos são restritos às espécies *P. boiei*, *P. appendiculata* e *P. renalis*, que possuem um número diploide de $2n = 22$ cromossomos e Região Organizadora de Nucléolo (RON) localizada no par 8, além de um padrão incomum de distribuição da heterocromatina constitutiva nos cromossomos de *P. boiei*, que apresentam grandes blocos heterocromáticos, ao contrário de outros anuros (ANANIAS et al., 2007; AMARO et al., 2012).

Dessa forma, levando-se em consideração a falta de estudos citogenéticos convencionais e moleculares em anuros, sobretudo no gênero *Proceratophrys*, e as constantes e recentes descrições de novas espécies para o gênero, no presente estudo foram comparados os cromossomos de *P. schirchi*, *P. boiei*, *P. melanopogon* e *P. laticeps*, a fim de obter um melhor conhecimento sobre as características cromossômicas e contribuir para a compreensão da evolução cromossômica deste gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Neste estudo, foram analisadas amostras de *Proceratophrys schirchi*, *P. boiei*, *P. melanopogon* e *P. laticeps*. Os espécimes de *P. schirchi* e *P. laticeps* foram coletados em área florestada do município de Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil (19°55'54.5"S 40°35'22.8"O). Já *P. boiei* e *P. melanopogon* foram coletados no município de Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil (23°29'31.8"S 46°14'51.1"O). Todos os indivíduos foram coletados na natureza sob licenças de coletas emitidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob os números 59449/2017 e 60972/2017.

Preparações citogenéticas

A eutanásia dos espécimes foi realizada por anestesia profunda sob consentimento e aprovação do comitê de ética em uso animal - CEUA (permissão 004752/2017), Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. Todos os animais foram depositados na coleção de anfíbios Célio F. B. Haddad (CFBH) alojado no Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

Os cromossomos metafásicos foram obtidos a partir de células do epitélio intestinal como descrito por Schmid (1978), medula óssea e fígado, como descrito em Baldissera JR et al. (1993) e corados com solução de *Giemsa* a 10%. As melhores metáfases foram selecionadas e fotografadas para cariotipagem. As regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) foram localizadas por impregnação pelo nitrato de prata (HOWELL & BLACK, 1980) e a heterocromatina constitutiva foi detectada pela técnica de Bandamento C de acordo com Sumner (1972).

Extração de DNA genômico e obtenção de sondas

O DNA total de *P. boiei* foi obtido a partir de amostras de fígado, utilizando o Kit comercial “*Wizard Genomic DNA Purification Kit*” – *Promega*, seguindo as determinações do fabricante. As amostras obtidas, coradas com 1 µL de *Blue Juice* (6X) (*Invitrogen*®), foram aplicadas em gel de agarose 1% e a avaliação da qualidade das amostras foram realizadas através da visualização das bandas em um transiluminador de luz ultravioleta.

A sonda de 18S rDNA foi obtida por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) amplificada do DNA genômico de *P. boiei*, utilizando os seguintes *primers*: Pboi_C18S_F: AATTCCAGCTCCAATAGCGT e Pboi_C18S_R: CCGCGGGCCTGATTTGAA. A amplificação ocorreu em um termociclador com o programa utilizado de 5 minutos a 94°C e 30 ciclos: 45 segundos a 94°C; 45 segundos a 60°C; 1 minuto e 30 segundos a 68°C; e extensão final de 5 minutos também a 68°C.

Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH)

Para a técnica de FISH foi utilizada a sonda de 18S rDNA marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche), de acordo com o método de Pinkel et al. (1986) com modificações descritas em Silva et al. (2012).

Lâminas preparadas com cromossomos metafásicos foram incubadas com RNase (20 ng / µL) por 1 hora a 37°C e desidratadas usando uma série de álcool (70%, 90% e 100%). O DNA cromossômico foi desnaturado durante 50 segundos em formamida a 70% em 2xSSC a 70°C e desidratado imediatamente utilizando uma série de álcool gelada (70%, 90% e 100%). A solução de hibridação (24 microlitros de *hybuffer* e 6 microlitros de sonda de rDNA) foi incubada durante 10 min a 95°C em um termociclador e aplicada a cada lâmina com o material cromossômico.

Após a hibridação durante a noite a 37°C, as lâminas foram lavadas por 10 minutos em 2xSSC a 72°C. Sinais de hibridação foram detectados usando antidigoxigenina-rodamina (Roche) e lavadas uma vez com PBD (1 g de leite em pó + 20 mL de 20xSSC + 500 µl de Triton + 100 mL de água destilada) a 45°C por 5 minutos. Cada lâmina foi incubada com 0,5 µl de Antidigoxigenina rodamina + 100 µl

PBD por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Foram feitas três lavagens por 5 minutos com PBD a 45°C.

Os cromossomos foram contrastados usando *Vectashield Mounting Medium* e DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole), antes da visualização com um microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmera digital (modelo Olympus D71). As imagens foram capturadas usando o programa *DP Controller*.

RESULTADOS

O número diploide encontrado para as espécies *Proceratophrys schirchi*, *P. laticeps*, *P. melanopogon* e *P. boiei* foi de $2n = 22$, sem cromossomos sexuais identificados, exceto em *P. boiei*, onde como era esperado, o heteromorfismo cromossômico de heterocromatina foi observado no par 1 de indivíduos fêmeas (Fig. 1B e 3B). O cariótipo dos espécimes analisados de *P. schirchi* e *P. laticeps*, consistiram em 10 pares de cromossomos metacêntricos (1, 6, 7, 8, 9, 10 e 11), submetacêntricos (2, 3 e 5) e um par subteloentrico (4), e em ambas as espécies, uma constrição secundária foi encontrada no braço curto do par 8, proximais, adjacentes ao centrômero, coincidente com a RON (Fig. 2A e D). Blocos de heterocromatina foram detectados na região centromérica e pericentromérica dos cromossomos de *P. schirchi* e *P. laticeps*, sem evidências de heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo (Fig. 3C e E).

O cariótipo de *P. melanopogon*, assim como as outras espécies aqui estudadas, consistiu em 10 pares de cromossomos metacêntricos (1, 6, 7, 8, 9, 10 e 11), submetacêntricos (2, 3 e 5) e um par subteloentrico (4) (Fig. 1). Diferente das outras duas espécies, em *P. melanopogon*, uma constrição secundária foi encontrada no braço curto do par 4 (Fig. 1C), onde também está localizada a RON (Fig. 2C). Os blocos de heterocromatina foram limitados à região centromérica dos cromossomos (Fig. 3D).

O cariótipo de *P. boiei* da população estudada aqui, também consistiu em 10 pares de cromossomos metacêntricos (1, 6, 7, 8, 9, 10 e 11), submetacêntricos (2, 3 e 5) e um par subteloentrico (4) (Fig. 1B). A NOR foi localizada no braço curto do par 8 em posição intersticial (Fig. 2B) e foi possível observar uma grande quantidade de heterocromatina constitutiva na região centromérica e pericentromérica de todos os

cromossomos, além da presença de um bloco de heterocromatina em apenas um dos homólogos do par 1 em fêmeas, descrito como sendo um heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo (Fig. 3A e B).

A técnica de hibridação fluorescente *in situ* com sonda de rDNA 18S revelou hibridação nos sítios correspondentes aos das Ag-RON em *P. schirchi* e *P. boiei*. Em *P. melanopogon* e *P. laticeps* foram realizadas diferentes variações de FISH, mas ainda sem resultados positivos para esta sonda (Fig. 2).

DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram fornecidos os primeiros dados cariotípicos de *P. schirchi*, *P. laticeps* e *P. melanopogon* e ainda foi confirmado o cariótipo de *P. boiei*, corroborando com dados já descritos na literatura para amostras de outras localidades. Considerando os dados avaliados, todas as espécies do estudo apresentaram 22 cromossomos, como esperado para as espécies de *Proceratophrys* já descritas, bem como a maioria das espécies em Odontophrynidae, além de outras famílias de anuros (AMARO-GHILARDI & YONENAGA-YASSUDA, 2002; SILVA et al., 2003; ANANIAS et al., 2007; GAZONI et al., 2012). Diferenças no número cromossômico podem ser evidentes em anfíbios, como por exemplo no gênero *Leptodactylus*, em que algumas espécies apresentam um número diploide de $2n = 22$, outras de $2n = 20$ e até de $2n = 24$ (GAZONI et al., 2012).

Os dados cariotípicos para o gênero *Proceratophrys* são restritos apenas para as espécies *P. boiei*, *P. appendiculata* e *P. renalis*, em que um número diploide de $2n = 22$ e RON localizada no par 8 foram descritas para estas espécies, além de um padrão incomum de distribuição da heterocromatina constitutiva em *P. boiei*, em que grandes blocos heterocromáticos foram encontrados. Os dados apresentados no presente trabalho para *P. schirchi*, *P. melanopogon* e *P. laticeps* são similares, destacando um certo grau de conservadorismo do número diploide no grupo (BEÇAK et al., 1970; SILVA et al., 2003; ANANIAS et al., 2007).

Como exemplo de variação cariotípica em anuros, *P. boiei* apresenta uma característica interessante, em que análises interpopulacionais com espécimes do sudeste e nordeste do Brasil revelaram um padrão heterocromático incomum no genoma (ANANIAS et al., 2007). Nas amostras populacionais mais ao sul (Estado de

São Paulo), os autores relataram a presença de grandes blocos de heterocromatina nas regiões centroméricas de todos os cromossomos, enquanto as amostras mais setentrionais (Estado da Bahia) apresentaram uma pequena quantidade de heterocromatina constitutiva.

Além disso, as fêmeas de São Paulo apresentaram, no par cromossômico 1, um cromossomo homólogo com um grande bloco heterocromático, enquanto que os machos apresentavam heterocromatina restrita à região centromérica. Este arranjo heterocromático incomum levou Ananias e colaboradores (2007) a supor que *P. boiei* possui um sistema de determinação sexual tipo ZZ / ZW, sendo o primeiro registro de cromossomos sexuais ZZ / ZW dentro de Odontophrynidae (ANANIAS et al., 2007). O mesmo heteromorfismo cromossômico foi detectado em outras duas localidades dentro da faixa geográfica do estado de São Paulo, em que o sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ: ZW parece estar generalizado em *P. boiei* (AMARO et al., 2012). Essa composição cariotípica para *P. boiei* foi corroborada no presente trabalho, em que o conjunto cromossômico de amostras da localidade de Mogi das Cruzes apresentou o heteromorfismo relacionado ao sexo em fêmeas de *P. boiei*.

Dessa forma, questões envolvendo diferenças citogenéticas em populações, como encontrados para *P. boiei*, fortalecem a possível existência de complexos de espécies sob um nome específico, refletindo a necessidade de estudos mais aprofundados que ajudariam a resolver essas questões taxonômicas. Os cariótipos encontrados para as espécies de *Proceratophrys* no presente trabalho, indicam uma estreita relação entre as três espécies do grupo já descritas na literatura, estando de acordo com Prado & Pombal (2008), ao juntá-los a grupos de espécies naturais.

Como há uma grande similaridade na constituição cariotípica entre as espécies de *Proceratophrys* analisadas neste trabalho, a Ag-RON pode ser um importante marcador espécie-específico. Em nossa amostra, as espécies *P. boiei*, *P. schirchi* e *P. laticeps* apresentaram uma RON localizada no braço curto do par 8, como relatado em algumas populações de espécies no gênero (ANANIAS et al., 2007; AMARO et al., 2012). A posição da RON no par 8 em anfíbios é frequente, porém, a posição desse marcador nem sempre é coincidente, podendo aparecer seja nos braços curtos, seja nos braços longos, em posição terminal, distal, intersticial ou proximal, além de outros pares cromossômicos, como ocorreu em *P. melanopogon* no presente trabalho,

onde a RON apareceu no par 4, e nesse caso é possível sugerir que rearranjos cromossômicos ocorreram nesta espécie.

Nas espécies amostradas, foram observadas RONs em apenas um par cromossômico, o que é usual em anfíbios anuros (SCHMID et al., 1990; GREEN & SESSIONS, 2007; SCHMID et al., 2010). O uso combinado de impregnação por nitrato de prata e FISH usando sonda de rDNA 18S confirmou que as constrições secundárias encontradas em *P. boiei* e em *P. schirchi* eram RONs ativas, por meio da hibridação da sonda exatamente no local da RON. A ocorrência de RONs múltiplas, no entanto, é relativamente comum em alguns grupos de anuros, como por exemplo em *P. boiei* de uma população de Iperó, São Paulo, em que RONs foram identificadas nos cromossomos dos pares 4 e 8 (AMARO et al., 2012). E em outros gêneros como é o caso de *Leptodactylus mystacinus*, em que marcações nos cromossomos dos pares 4 e 8 foram encontrados (SILVA et al., 2006).

Apesar do número diploide conservado em *Proceratophrys*, uma diferença nas fórmulas cromossômicas foi observada em *P. melanopogon*. Foi observada uma constrição secundária atípica localizada em posição intersticial no braço curto do par 4, o que difere de *P. schirchi* e *P. laticeps*, nos quais a localização da constrição secundária se deu no par 8. Coincidentemente, a NOR foi localizada junto a constrição secundária encontrada nessas espécies analisadas. Do mesmo modo, Ananias et al. (2007) encontraram NORs heteromórficas em dois exemplares de *P. boiei* de Mata de São João – BA, estando localizadas no par cromossômico 8, fato este que reforça essa localização e posição de NORs em *P. schirchi* e *P. laticeps*, porém diferente em *P. melanopogon* como encontrado no presente trabalho, mesmo sendo espécie proximamente relacionadas. Essa informação é muito interessante uma vez que a identificação da morfologia, número e posição da região organizadora do nucléolo pode contribuir significativamente para estudos de relacionamentos filogenéticos e evolução dos cromossomos, sendo um importante marcador em estudos citotaxonômicos.

As espécies de *Proceratophrys* da presente amostra exibem bandas C, predominantemente na região centromérica dos cromossomos. Essas bandas são de difícil caracterização, sendo sua identificação dependente, algumas vezes, do grau de distensão dos cromossomos e a existência de bandas pode ser decorrente, também,

dos tratamentos técnicos, de modo que são evidentes em algumas metáfases ou sutis em outras. Desta forma, esta é a primeira descrição de Banda C em *P. schirchi*, *P. laticeps* e em *P. melanopogon* e um padrão distinguível e comum foi identificado em regiões centroméricas e pericentroméricas nas três espécies em questão. Portanto, padrões de bandas C podem ser potencialmente usados para identificar espécies neste gênero, e mais estudos baseados nesta técnica devem ser realizados dentro de *Proceratophrys*.

Com os dados obtidos neste trabalho, foi possível aumentar o número de espécies com cariótipos conhecidos em *Proceratophrys*, visto que são poucas espécies descritas citogeneticamente dentro do gênero dentre a grande quantidade de espécies descritas, contribuindo para elucidar os aspectos taxonômicos e filogenéticos nesse grupo de organismos.

REFERÊNCIAS

AMARO, R. C.; CARNAVAL, A. C. Q.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Demographic process in montane Atlantic rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, p. 880–888, 2012.

AMARO, R. C.; PAVAN, D.; RODRIGUES, M. T. On the generic identity of *Odontophrynus moratoi* Jim & Caramaschi, 1980 (Anura, Cycloramphidae). **Zootaxa**, v. 2071, p. 61-68, 2009.

AMARO-GHILARDI, R. C.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Y. Chromosomal studies after differential staining and fluorescence *in situ* hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). **Caryologia**, v. 57, p. 53-65, 2004.

AMARO-GHILARDI, R. C.; SKUK, G.; DE SÁ, R. O.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Karyotypes of eight species of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with a description of a new karyotype for the genus. **Phyllomedusa**, v. 5, p. 119-133, 2006.

AMARO-GHILARDI, R. C.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Polymorphism of C-bands heterochromatin and of the nucleolar organizer regions (NORs) in the leptodactylid frog *Proceratophrys boiei* (Amphibia, Anura). **Chromosome Research**, v. 10, p. 24, 2002.

ANANIAS, F.; MODESTO, A. D. S.; MENDES, S. C.; NAPOLI, M. F. Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphism. **Hereditas**, v. 144, p. 206-212, 2007.

ÁVILA, R. W.; KAWASHITA-RIBEIRO, R. A.; MORAIS, D. H. A new species of *Proceratophrys* (Anura: Cycloramphidae) from western Brazil. **Zootaxa**, v. 2890, p. 20–28, 2011.

BALDISSERA, F. A. JR.; OLIVEIRA, P. S. L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 335–345, 1993.

BUSIN, C. S.; PIMENTEL, A.; PRADO, C. P. DE A.; STRÜSSMANN, C.; SIQUEIRA-JÚNIOR, S.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal differentiation of populations of *Lysapsus limellus limellus*, *L. l. bolivianus*, and of *Lysapsus caraya* (Hylinae, Hylidae). **Micron - Journal - Elsevier**, v. 37, p. 355–362, 2006.

BRANDÃO, R. A.; VAZ-SILVA, W.; CARAMASCHI, U.; FRANÇOZO, R. D. New distribution records of *Proceratophrys vielliardi* Martins & Giaretta 2011 (Amphibia, Anura, Cycloramphidae). **Herpetology Notes**, v. 5, p. 223–225, 2012.

CONTE, C. E. & MACHADO, R. A. Riqueza de espécies e distribuição espacial e temporal em comunidade de anuros (Amphibia, Anura) em uma localidade de Tijucas do Sul, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22(3), p. 940-948, 2005.

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

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

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6 (9 January 2013). American Museum of Natural History, New York, USA, 2017.

Electronic Database. Disponível em:

<<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>> Acesso em: 06 nov. 2018.

GAZONI, T.; GRUBER, S. L.; SILVA, A. P. Z.; ARAÚJO, O. G. S.; NARIMATSU, H.; STRÜSSMANN, C.; HADDAD, C. F. B.; 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):109, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-109>.

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

- GODINHO, L. B.; MOURA, M. R. D.; DE LACERDA, J. V. A.; FEIO, R. N. A new species of *Proceratophrys* (Anura: Odontophrynidae) from the middle São Francisco River, southeastern Brazil. **Salamandra**, v. 49, p. 63–73, 2013.
- GREEN, D. M.; SESSIONS, S.K. Karyology and Cytogenetics. In: HEATWOLE, H., TYLER, M. (Ed.) **Amphibian Biology, vol. 7. Systematics**. Chipping Norton: Surrey Beatty and Sons, p. 2756-2841, 2007.
- GRUBER, S. L.; ZINA, J.; NARIMATSU, H.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hylinae, Hylidae). **BMC Genetics**, 13:28, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-28>.
- HADDAD, C. F. B. & SAZIMA, I. Anfíbios anuros da Serra do Japi. *História Natural da Serra do Japi: Ecologia e Preservação de uma Área Florestal no Sudeste do Brasil*. P. C. Morellato, eds., Unicamp, Campinas, 1992.
- IZECKSOHN, E.; CRUZ, C. A. G.; PEIXOTO, O. Sobre *Proceratophrys appendiculata* algumas espécies afins (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). **Revista da Universidade Rural, Serie Ciência da Vida**, v. 20, p. 37–54, 1999.
- HOWELL, W. M., BLACK, D. A. Controlled silver staining of the nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.
- KASAHARA, S.; SILVA, A.P.Z.; GRUBER, S. L.; HADDAD, C.F.B. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 103, p. 155-162, 2003.
- KWET, A.; FAIVOVICH, J. *Proceratophrys bigibbosa* species group (Anura: Leptodactylidae), with description of a new species. **Copeia**, 203–215, 2001. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2001\)001\[0203:PBSGAL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2001)001[0203:PBSGAL]2.0.CO;2)
- MÂNGIA, S.; KOROIVA, R.; NUNES, P. M. S.; ROBERTO, I. J.; ÁVILA, R. W.; SANT'ANNA, A. C.; SANTANA, D. J.; GARDA, A. A. A new species of *Proceratophrys* (Amphibia: Anura: Odontophrynidae) from the Araripe Plateau, Ceará State, northeastern Brazil. **Herpetologica**, v. 74, p. 255–268, 2018.
- MÂNGIA, S.; SANTANA, D. J.; CRUZ, C. A. G.; FEIO, R. N. Taxonomic review of *Proceratophrys melanopogon* (Miranda Ribeiro, 1926) with description of four new species (Amphibia, Anura, Odontophrynidae). **Boletim do Museu Nacional. Nova Serie, Zoologia. Rio de Janeiro**, v. 531, p. 1–33, 2014.
- MARTINS, L. B.; GIARETTA, A. A. A new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) from central Brazil. **Zootaxa**, v. 2880, p. 41–50, 2011.
- MARTINS, L. B.; GIARETTA, A. A. Morphological and acoustic characterization of *Proceratophrys goyana* (Lissamphibia: Anura: Odontophrynidae), with the description of a sympatric and related new species. **Zootaxa**, v. 3750, p. 301–320, 2013.

- NAPOLI, M. F.; CRUZ, C. A. G.; ABREU, R. O.; DEL-GRANDE, M. L. A new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) from the Chapada Diamantina, State of Bahia, northeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 3133, p. 37–49, 2011.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.
- PYRON, R. A.; WIENS, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 61, p. 543-583, 2011.
- PRADO, G. M.; POMBAL, J. P. Espécies de *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 com apêndices palpebrais (Anura; Cycloramphidae). **Arquivos de Zoologia**, v. 39 p. 1-85, 2008.
- TEIXEIRA, M.; AMARO, R. C.; RECODER, R. S.; DAL VECHIO, F.; RODRIGUES, M. T. A new dwarf species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura, Cycloramphidae) from highlands of Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3551, p. 25–42, 2012.
- SCHMID, M.; BOGART, J. P.; HEDGES, S. B. (Ed.). The chromosomes of Terraranan frogs: Insights into vertebrate cytogenetics. **Cytogenetic and Genome Research**, 31:1-568, 2010.
- SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; NANDA, I.; EPPLEN, J. T. Chromosome banding in Amphibia. In: OLMO, E. (Ed.) **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**. Basel: Birkhauser Verlag, p. 21-45, 1990.
- SERAFIM, H.; IENNE, S.; CICCHI, P. J. P.; JIM, J. Anurofauna de remanescentes de floresta Atlântica do município de São José do Barreiro, estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, p. 69, 2008.
- SILVA, E. L.; BUSSO, A. F.; PARISE-MALTEMPI. Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolar organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 139(1), 2012. DOI: 10.1159/000342957.
- SILVA, A. P. Z.; GARCIA, P. C. A.; MARTINS, V. G.; BACCI, M. Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. gracilis delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. **Amphibia-Reptilia** 25:185-196, 2004.
- SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C. F. B.; GALASSI, G. G.; KASAHARA, S. Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. **Genetica**, v. 127, p. 35-44, 2006.
- SILVA, A. P. Z.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using

differential staining. **Cytobios**, v. 103, p. 25-38, 2000.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

ZINA, J.; ENNSER, J.; PINHEIRO, S. C. P.; HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F. Taxocenose de anuros de uma mata semidecídua do interior do Estado de São Paulo e comparações com outras taxocenoses do Estado, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 1-9, 2007.

ANEXOS (Capítulo 2)

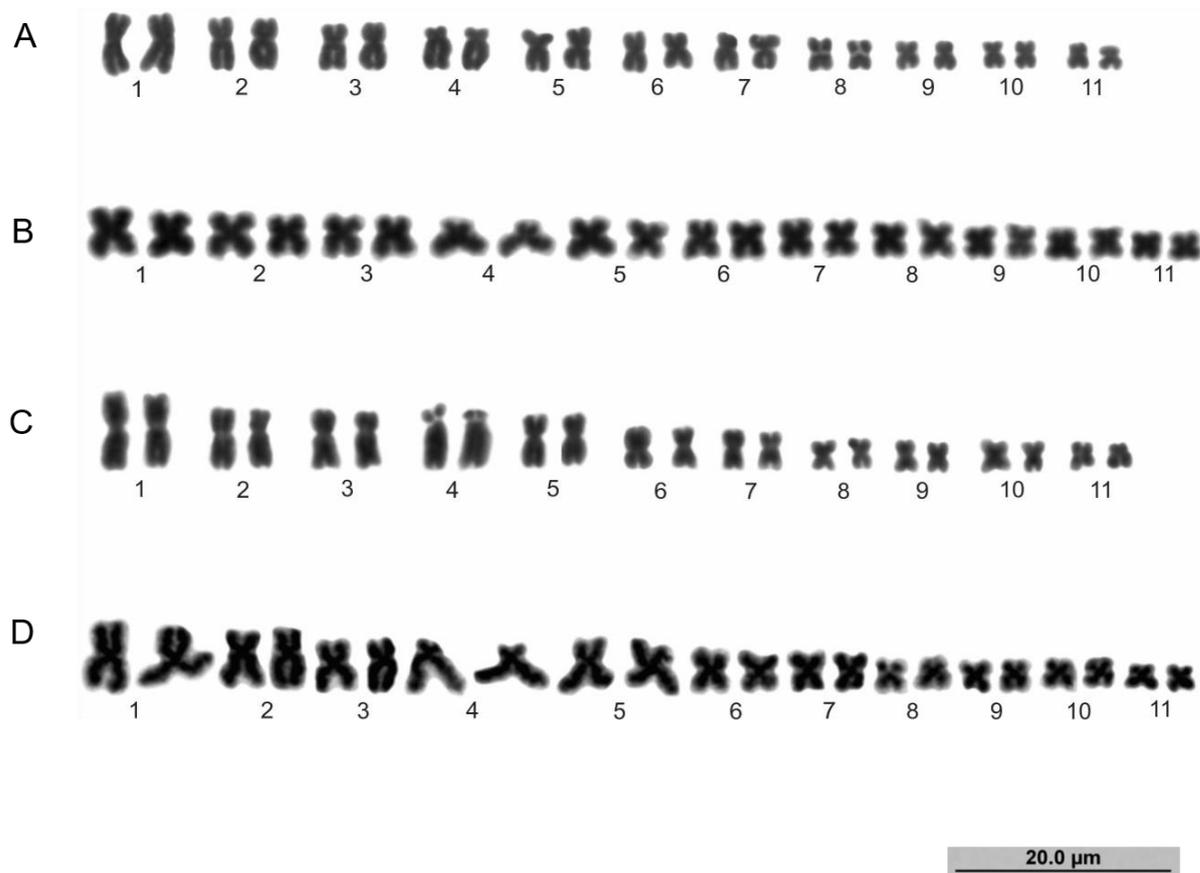


Figura 1. Cariótipos em coloração convencional em Giemsa. A: *P. schirchi*, B: *P. boiei*; C: *P. melanopogon*; D: *P. laticeps*.

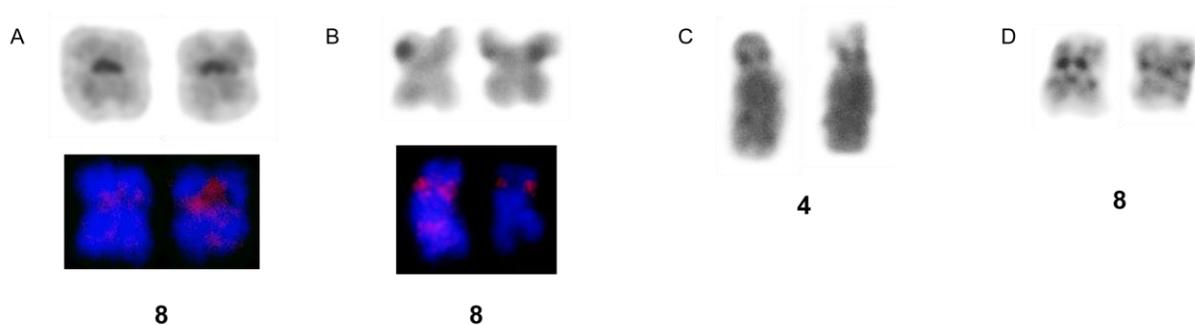


Figura 2. Pares cromossômicos evidenciando RONS e rDNA 18S de *P. schirchi* (A); *P. boiei* (B); RON de *P. melanopogon* (C) e RON de *P. laticeps* (D).

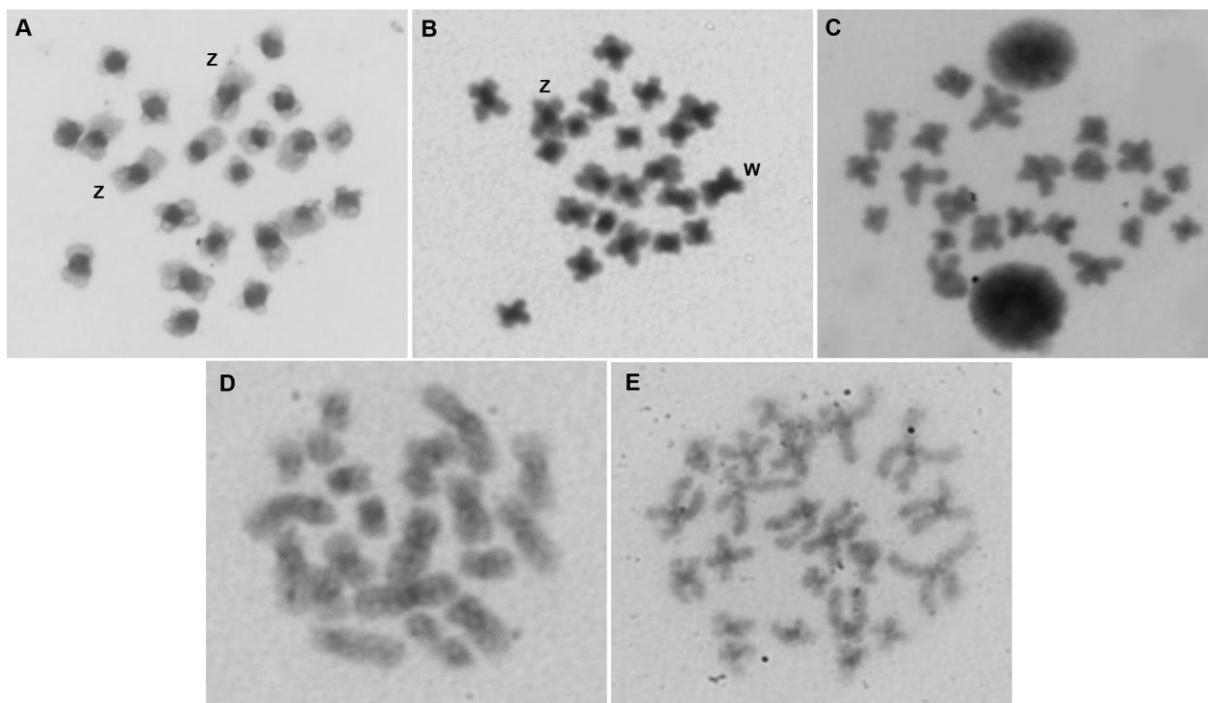


Figura 3. Bandamento C: A: Metáfase de *P. boiei* macho e B, fêmea (SP). Em destaque, par sexual ZW; C: Metáfase de *P. schirchi* (macho) D: Metáfase de *P. melanopogon* (macho) E: Metáfase de *P. laticeps* (macho).



Figura 4. Indivíduos de *Proceratophrys*. A: *P. schirchi* (Foto: Célio F. B. Haddad); B: *P. boiei* (Foto: Célio F. B. Haddad); D: *P. laticeps* (Foto: João L. Gasparini) e E: *P. melanopogon* (Foto: Célio F. B. Haddad).

5. CONCLUSÕES GERAIS

- O Sequenciamento Genômico Illumina e as Análises de Alto Rendimento com o *software RepeatExplorer* revelaram uma grande quantidade de elementos repetitivos no genoma de *P. boiei* de Tijucas do Sul, Paraná, que com 1.6 Gpb de tamanho genômico, 41% deste correspondem a sequências repetitivas, o que contribuiu para a primeira caracterização da presença de DNAs satélites no genoma da espécie, além do primeiro mapeamento físico desses elementos repetitivos, representando um enorme salto no conhecimento da biblioteca de satDNAs em *Proceratophrys*;
- Como era esperado, por meio da análise do genoma de *P. boiei* pelo *RepeatExplorer*, foi obtido uma grande quantidade de elementos repetitivos, totalizando 218 *clusters*. Com as análises aprofundadas neste trabalho, foi possível concluir que 28 destes correspondem a satDNAs, representando aproximadamente 15% do genoma de *P. boiei*, de acordo com a representatividade genômica de cada um;
- Os três satDNAs (PboSat1-176, PboSat2-173 e PboSat3-189) escolhidos para mapeamento neste trabalho tiveram características cromossômicas semelhantes, estando localizados principalmente na região centromérica e pericentromérica dos cromossomos desta espécie, indicando uma possível contribuição dessas sequências para a manutenção dessas regiões cromossômicas heterocromáticas;
- Nossas perspectivas de descoberta levantam que o alto número de sequências repetitivas, sobretudo de satDNAs no genoma de *P. boiei* podem ter relevância na organização e na regulação do genoma, o que preparou um cenário para mais análises funcionais do genoma em *Proceratophrys*. Embora mais pesquisas nessa área sejam necessárias, nosso estudo fornece um passo importante para entender a biologia dos satDNAs em *Odontophrynidae*, em especial no que se refere a composição dos centrômeros, destacando também a importância do grupo como organismo modelo para estudos citogenéticos evolutivos;
- Como foi visto, há diferenças cromossômicas bem evidentes entre diferentes populações de *P. boiei*, e a diferença mais significativa é a presença de um

heteromorfismo de banda C em fêmeas de Mogi das Cruzes, São Paulo. Esse cromossomo diferenciado é quase totalmente heterocromático e dessa forma, um passo importante será estudar em trabalhos futuros a composição molecular dessa heterocromatina, que geralmente é constituída de elementos repetitivos, tentando esclarecer a diferenciação desse cromossomo sexual em *P. boiei*.

- As análises citogenéticas convencionais e diferenciais para *P. boiei*, *P. schirchi*, *P. laticeps* e *P. melanopogon*, embora ainda iniciais, forneceram informações importantes, como a característica de que o gênero *Proceratophrys* exhibe constituição cromossômica relativamente conservada, mantendo o cariótipo de $2n = 22$ para as espécies até então cariotipadas;

- As análises de Bandamento C para *P. boiei*, como esperado, corroborou com análises de outros autores. Com a descrição do padrão heterocromático de *P. schirchi*, *P. laticeps* e *P. melanopogon*, foi possível ampliar o conhecimento acerca desse marcador tão importante para caracterização de espécies de anuros, que mesmo sendo um passo inicial, necessitando de mais análises, sobretudo em indivíduos fêmeas, além de indivíduos de outras populações, abrem caminho para futuras abordagens no gênero;

- Com o uso de nitrato de prata para evidenciar Regiões Organizadoras de Nucléolo, foi possível concluir que há um certo grau de conservadorismo quanto à posição e quantidade de RONS ativas em *Proceratophrys*. No entanto, há evidências de discrepância quanto a esse marcador, como aconteceu em *P. melanopogon*, no qual a RON está localizada em um par diferente das outras espécies analisadas. Neste trabalho, foi possível confirmar como RONS verdadeiras por meio de FISH apenas as presentes em *P. boiei* e *P. schirchi*, sendo necessários mais experimentos com esta sonda para confirmar as RONS presentes em *P. laticeps* e mais ainda em *P. melanopogon*;

- Estudos mais aprofundados são ainda necessários para revelar as relações citogenéticas e moleculares em *Proceratophrys*, com ampliação das amostras, coletas de novas espécies, variação nos procedimentos de FISH, verificação do compartilhamento de satDNAs levantando questões evolutivas, bem como relacionar

os dados citogenéticos com informações produzidas em outras pesquisas, que permitam um melhor entendimento da evolução cromossômica.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ACOSTA, M. J.; MARCHAL, J. A.; FERNÁNDEZ-ESPARTERO, C.; ROMERO-FERNÁNDEZ, I.; ROVATSOS, M. T.; GIAGIA-ATHANASOPOULOU, E. B.; GORNUNG, E.; CASTIGLIA, R.; SÁNCHEZ, A. Characterization of the satellite DNA Msat-160 from species of *Terricola* (*Microtus*) and *Arvicola* (*Rodentia*, *Arvicolinae*). **Genetica**, v. 138, p. 1085–1098, 2010.
- AMARO, R. C.; CARNAVAL, A. C. Q.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M.T. Demographic process in montane Atlantic rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, p. 880–888, 2012.
- AMARO, R. C.; PAVAN, D.; RODRIGUES, M. T. On the generic identity of *Odontophrynus moratoi* Jim & Caramaschi, 1980 (Anura, Cycloramphidae). **Zootaxa**, v. 2071, p. 61-68, 2009.
- ANANIAS, F.; MODESTO, A. D. S.; MENDES, S. C.; NAPOLI, M. F. Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphism. **Hereditas**, v. 144, p. 206-212, 2007.
- ÁVILA, R. W.; KAWASHITA-RIBEIRO, R. A.; MORAIS, D. H. A new species of *Proceratophrys* (Anura: Cycloramphidae) from western Brazil. **Zootaxa**, v. 2890, p. 20–28, 2011.
- BACHMANN, L.; SPERLICH, D. Gradual evolution of a specific satellite DNA family in *Drosophila ambigua*, *D. tristis*, and *D. obscura*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 647–659, 1993.
- BERTOLUCI, J. A. Annual patterns of breeding activity in Atlantic rainforest anurans. **Journal of Herpetology**, v. 32(3), p. 607-11, 1998.
- BRANDÃO, R. A.; VAZ-SILVA, W.; CARAMASCHI, U.; FRANÇOSO, R. D. New distribution records of *Proceratophrys vielliardi* Martins & Giaretta 2011 (Amphibia, Anura, Cycloramphidae). **Herpetology Notes**, v. 5, p. 223–225, 2012.
- BULL, J. J. Evolution of Sex Determining Mechanisms. Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, 1983.
- BUSIN, C. S.; ANDRADE, G. V.; BERTOLDO, J.; DEL GRANDE, M. L.; UETANABARO, M.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. **Genetica**, v. 133, p. 119–127, 2008.

- BUSIN, C. S.; PIMENTEL, A.; PRADO, C. P. DE A.; STRÜSSMANN, C.; SIQUEIRA-JÚNIOR, S.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal differentiation of populations of *Lysapsus limellus limellus*, *L. l. bolivianus*, and of *Lysapsus caraya* (Hylinae, Hylidae). **Micron - Journal - Elsevier**, v. 37, p. 355–362, 2006.
- CAMACHO, J. P. M.; RUIZ-RUANO, F. J.; MARTINBLAZQUEZ, R.; et al. A step to the gigantic genome of the desert locust: chromosome sizes and repeated DNAs, **Chromosoma**, v. 124, p. 263–75, 2015.
- CARDONE, D. E.; FELICIELLO, I.; MAROTTA, M.; ROSATI, C.; CHINALI, G. A family of centromeric satellite DNAs from the European brown frog *Rana graeca italica*. **Genome**, v. 40, p. 774–781, 1997.
- CARNAVAL, A. C. O. Q. Phylogeography of four frog species in forest fragments of Northeastern Brazil - A preliminar study. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 913–921, 2002.
- CHARLESWORTH, B.; SNIÉGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215–220, 1994.
- CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, p. 118–128, 2005.
- CONTE, C. E. & MACHADO, R. A. Riqueza de espécies e distribuição espacial e temporal em comunidade de anuros (Amphibia, Anura) em uma localidade de Tijucas do Sul, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22(3), p. 940-948, 2005.
- CRUZ, C. A. G.; NUNES, I.; JUNCÁ, F. Redescription of *Proceratophrys cristiceps* (Müller, 1883) (Amphibia, Anura, Odontophrynidae), with description of two new species without eyelid appendages from Northeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 7, p. 110–122, 2012.
- DIAS, P. H.; DOS, S.; AMARO, R. C.; DE CARVALHO-E-SILVA, A. M. P. T.; RODRIGUES, M. T. Two new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura; Odontophrynidae) from the Atlantic forest, with taxonomic remarks on the genus. **Zootaxa**, v. 3682, p. 277–304, 2013.
- DOVER, G. Molecular drive. **Trends Genet.**, v. 18, p. 587–9, 2002.
- DOVER, G. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution, **Nature**, v. 299, p. 111–7, 1982.
- ELLEGREN, H. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 157–166, 2011.
- FELICIELLO, I.; PICARIELLO, O.; CHINALI, G. 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**, v. 383, p. 81–92, 2006.

FELICIELLO, I.; PICARIELLO, O.; CHINALI, G. The first characterisation of the overall variability of repetitive units in a species reveals unexpected features of satellite DNA. **Gene**, v. 349, p. 153–164, 2005.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6 (9 January 2013). American Museum of Natural History, New York, USA, 2017. Electronic Database. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>> Acesso em: 21 jan. 2019.

FUKAGAWA, T.; EARNSHAW, W.C. The Centromere: Chromatin Foundation for the Kinetochore Machinery. **Developmental Cell**, v. 30, p. 496–508, 2014.

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

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

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, v. 8, p. 230, 2017. doi:10.3390/genes8090230

GATTO, K. P.; BUSIN, C. S.; LOURENÇO, L. B. Unraveling the sex chromosome heteromorphism of the paradoxical frog *Pseudis tocantins*. **PLoS One**, 11:e0156176, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0156176

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

GAZONI, T.; HADDAD, C. F. B.; NARIMATSU, H.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; LYRA, M. L.; PARISE-MALTEMPI, P. P. More sex than autosomes in the Amazonian frog *Leptodactylus pentadactylus*. **Chromosoma**, v. 127(2), p. 269-278, 2018.

GAZONI, T.; GRUBER, S. L.; SILVA, A. P. Z.; ARAÚJO, O. G. S.; NARIMATSU, H.; STRÜSSMANN, C.; HADDAD, C. F. B.; 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 Genetics**, v. 13(1):109, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-109>

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

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

GORDON, A.; HANNON, G. J. Fastx-toolkit. FASTQ/A short-reads pre-processing tools http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit (2010).

GRAVES, J. A. M. Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 565–586, 2008.

GREGORY, T. R. Synergy between sequence and size in Large-scale genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 9, p. 699–708, 2005.

HADDAD, C. F. B. & SAZIMA, I. Anfíbios anuros da Serra do Japi. *História Natural da Serra do Japi: Ecologia e Preservação de uma Área Florestal no Sudeste do Brasil*. P. C. Morellato, eds., Unicamp, Campinas, 1992.

HALL, S. E.; LUO, S.; HALL, A. E.; PREUSS, D. Differential rates of local and global homogenization in centromere satellites from *Arabidopsis relatives*. **Genetics**, v. 170, p. 1913–1927, 2005.

HILLIS, D. M.; GREEN, D. M. Evolutionary phylogenetic changes of heterogametic history of amphibians. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 3, p. 49–64, 1990.

KEJNOVSKY, E.; HOBZA, R.; CERMAK, T.; KUBAT, Z.; VYSKOT, B. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. **Heredity**, v. 102, p. 533–541, 2009.

KUHN, G. C. S.; FRANCO, F. F.; MANFRIN, M. H.; MOREIRA-FILHO, O.; SENE, F. M. Low rates of homogenization of the DBC-150 satellite DNA family restricted to a single pair of microchromosomes in species from the *Drosophila buzzatii* cluster. **Chromosome Research**, v. 15, p. 457–470, 2007.

KWET, A.; FAIVOVICH, J. *Proceratophrys bigibbosa* species group (Anura: Leptodactylidae), with description of a new species. **Copeia**, 203–215, 2001. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2001\)001\[0203:PBSGAL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2001)001[0203:PBSGAL]2.0.CO;2)

LARRACUENTE, A. M. The organization and evolution of the Responder satellite in species of the *Drosophila melanogaster* group: dynamic evolution of a target of meiotic drive. **BMC Evolutionary Biology**, 14, 233, 2014. doi: 10.1186/s12862-014-0233-9.

LEWIN, B. The Content of the Genome. In: **Gene XI**. p. 100–119, 2014.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes. In: Garrido-Ramos MA (ed) *Genome Dynamics. Repetitive DNA*. Karger, Basel, pp 1–28, 2012.

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

MÂNGIA, S.; SANTANA, D. J.; CRUZ, C. A. G.; FEIO, R. N. Taxonomic review of *Proceratophrys melanopogon* (Miranda Ribeiro, 1926) with description of four new

species (Amphibia, Anura, Odontophrynidae). **Boletim do Museu Nacional. Nova Serie, Zoologia. Rio de Janeiro**, v. 531, p. 1–33, 2014.

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

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

MATSUNAGA, S. Junk DNA promotes sex chromosome evolution. **Heredity**, v. 102, p. 525–526, 2009.

MILANI, D.; BARDELLA, V. B.; FERRETTI, A. B. S. M.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; MELO, A. S.; MOURA, R. C.; LORETO, V.; SONG, H.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Satellite DNAs Unveil Clues about the Ancestry and Composition of B Chromosomes in Three Grasshopper Species. **Genes**, v. 9, 523, 2018.
doi:10.3390/genes9110523

MILANI, D.; RAMOS, E.; LORETO, V.; MARTÍ, D. A.; CARDOSO, A. L.; MORAES, K. C. M.; MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. The satellite DNA AflaSAT-1 in the A and B chromosomes of the grasshopper *Abracris flavolineata*. **BMC Genetics**, v. 18, p. 81, 2017.

MIURA, I. An evolutionary witness: the frog *Rana rugosa*, underwent change of heterogametic sex from XY male to ZW female. **Sexual Development**, v. 1(6), p. 323–331, 2007.

MULLER, H. J. The relation of recombination to mutational advance. **Mutation Research**, v. 1, p. 2–9, 1964.

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

NASCIMENTO, J; QUINDERÉ, Y. R. S. D; RECCO-PIMENTEL, S. M; LIMA, J. R. F; LOURENÇO, L. B. Heteromorphic Z and W sex chromosomes in *Physalaemus ephippifer* (Steindachner, 1864) (Anura, Leiuperidae). **Genetica**, v. 138, p. 1127–1132, 2010.

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

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; PECH, J.; STEINHAISSL, J.; MACAS, J. RepeatExplorer: A Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 29, p. 792–793, 2013.

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

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CARVALHO, C. R., FERRARI SOARES, F. A., CABRAL-DE-MELLO, D. C.; SHARAKHOV, I. V. Contrasting the chromosomal organization of repetitive DNAs in two Gryllidae crickets with highly divergent karyotypes. **PLoS One**, 10, e0143540, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143540>

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

PEZER, Z.; BRAJKOVIC, J.; FELICIELLO, I.; UGARKOVIC, D. Transcription of satellite DNAs in insects. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v. 51, p. 161–78, 2011.

PICARIELLO, O.; FELICIELLO, I.; BELLINELLO, R.; CHINALI, G. S1 satellite DNA as a taxonomic marker in brown frogs: molecular evidence that *Rana graeca graeca* and *Rana graeca italica* are different species. **Genome**, v. 45, p. 63–70, 2002.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PISCOR, D.; FERNANDES, C. A.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Nucleolar organizer regions, 18S and 5S rDNA clusters in the chromosomes of *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae). **Biologia**, v. 72, p. 12-29, 2017.

PISCOR, D.; RIBACINKO-PISCOR, D. B.; FERNANDES, C. A.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Cytogenetic analysis in three *Bryconamericus* species (Characiformes, Characidae): first description of the 5S rDNA-bearing chromosome pairs in the genus. **Molecular Cytogenetic**, 6: 13, 2013. DOI: 10.1186/1755-8166-6-13

PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MEŠTROVIĆ, N.; MANTOVANI, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. **Gene**, v. 409, p. 72–82, 2008.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA evolution. In: Garrido-Ramos MA (ed) *Repetitive DNA, Genome dynamics*, 7th edn. Karger, Basel, pp 126–152, 2012.

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

POMBAL, J. P. Distribuição espacial e temporal de anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, Sudeste do Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 57, p. 583-594, 1997.

PONZIO, J. C.; PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosomal locations of U2 snDNA clusters in *Megaleporinus*, *Leporinus* and *Schizodon* (Characiformes: Anostomidae). **Biologia**, v. 73, p. 295-298, 2018.

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

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

RICHARD, G. F.; KERREST, A.; DUJON, B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, p. 686–727, 2008.

RODRÍGUEZ, F. R.; HERRÁN, R. L.; NAVAJAS-PÉREZ, R.; CANO-ROLDÁN, B.; SOLA-CAMPOY, P. J.; GARCÍA-ZEA, J. A.; RUIZ REJÓN, C. Centromeric Satellite DNA in Flatfish (Order Pleuronectiformes) and Its Relation to Speciation Processes. **Journal of Heredity**, 217–222, 2017. doi:10.1093/jhered/esw076

ROIZES, G. Human centromeric alphoid domains are periodically homogenized so that they vary substantially between homologues. Mechanism and implications for centromere functioning. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 1912–1924, 2006.

RUIZ-RUANO, F. J.; CASTILLO-MARTÍNEZ, J.; CABRERO, J.; GÓMEZ, R.; CAMACHO, J. P. M.; LÓPEZ-LEÓN, M. D. High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats. **Chromosoma**, v. 127, p. 323-340, 2018.

RUIZ-RUANO, F. J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. High-throughput analysis of the satellitoma illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, 6, 28333, 2016. doi: 10.1038/srep28333.

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

SCHINDELHAUER, D.; SCHWARZ, T. Evidence for a fast, intrachromosomal conversion mechanism from mapping of nucleotide variants within a homogeneous alpha-satellite DNA array. **Genome Research**, v. 12, p. 1815–1826, 2002.

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

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

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

SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; LANGONE, J.; GARCIA, P. C. A. Brazilian Amphibians – List of Species. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, n. 2, p.37-48, 2016.

SERAFIM, H.; IENNE, S.; CICCHI, P. J. P.; JIM, J. Anurofauna de remanescentes de floresta Atlântica do município de São José do Barreiro, estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, p. 69, 2008.

SILVA, E. L.; BUSSO, A. F.; PARISE-MALTEMPI. Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolar organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 139(1), 2012. DOI: 10.1159/000342957.

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

THE GENOME INTERNATIONAL SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, p. 860–921, 2001.

TSOUMANI, K. T.; DROSOPOULOU, E.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P.; MATHIOPOULOS, K. D. Molecular characterization and chromosomal distribution of a species-specific transcribed centromeric satellite repeat from the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. **PLoS One** 8:e79393, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0079393

UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. **The EMBO Journal**, v. 21, p. 5955–9, 2002.

UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F. J.; SILVA, D. M. Z. A.; SERRANO, É. A.; ROSA, I. F.; SCUDELER, P. E. S.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J. P. M.; FORESTI, F. A Glimpse into the Satellite DNA Library in Characidae Fish (Teleostei, Characiformes). **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 103, 2017. doi: 10.3389/fgene.2017.00103

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

VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hylodid frogs. **BMC Genetics**, 15:111, 2014. <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0111-x>

WILLARD, H. F.; WAYE, J. S. Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. **Trends Genetics**, v. 3, p. 192–198, 1987.

ZHANG, T.; TALBERT, P. B.; ZHANG, W.; WU, Y.; YANG, Z.; HENIKOFF, J. G.; HENIKOFF, S.; JIANG, J. The CentO satellite confers translational and rotational

phasing on cenH3 nucleosomes in rice centromeres. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 4875-4883, 2013.

ZINA, J.; ENNSER, J.; PINHEIRO, S. C. P.; HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F. Taxocenose de anuros de uma mata semidecídua do interior do Estado de São Paulo e comparações com outras taxocenoses do Estado, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 1-9, 2007.

