
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NATHÁLIA SEPULVEDA DORIGON

**AVALIAÇÃO DO USO DE SEQUÊNCIAS DE
snDNA U2 COMO MARCADOR CITOGENÉTICO
NOS ESTUDOS DE EVOLUÇÃO
CROMOSSÔMICA DE *Leptodactylus* (AMPHIBIA,
ANURA, LEPTODACTYLIDAE)**



Rio Claro
2016

NATHÁLIA SEPULVEDA DORIGON

AVALIAÇÃO DO USO DE SEQUÊNCIAS DE *snDNA* U2 COMO
MARCADOR CITOGENÉTICO NOS ESTUDOS DE EVOLUÇÃO
CROMOSSÔMICA DE *Leptodactylus* (AMPHIBIA, ANURA,
LEPTODACTYLIDAE)

Orientadora: PROFA. DRA. PATRICIA PASQUALI PARISE-MALTEMPI

Co-orientador: DR. THIAGO GAZONI

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

Rio Claro
2016

591.15 Dorigon, Nathália Sepulveda
D697a Avaliação do uso de sequências de snDNA U2 como marcador
citogenético nos estudos de evolução cromossômica de *Leptodactylus*
(Amphibia, Anura, Leptodactylidae) / Nathália Sepulveda Dorigon. - Rio
Claro, 2016
39 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Patricia Pasquali Parise Maltempi
Coorientador: Thiago Gazoni

1. Genética animal. 2. Citogenética animal. 3. Citogenética molecular.
4. Hibridação in situ por fluorescência. 5. Cromossomo. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico a meu avô, Luiz Durigon, que sempre esteve comigo em todos os momentos, no meu coração. Vou estar de braços abertos te esperando no novo mundo, pra poder te contar pessoalmente como foram esses cinco anos e sei que vai ficar orgulhoso, vai poder dizer “truco” com toda sua alegria. Posso não ter lembranças, mas tenho um amor muito grande e a esperança de logo te reencontrar. See you soon, grandpa!

AGRADECIMENTOS

É simplesmente impossível citar o nome de todas as pessoas que merecem agradecimentos ao final desse caminho que trilhei, mas espero contemplar algumas pessoas que tiveram uma grande importância em todo o processo da minha graduação.

Agradeço imensamente aos meus pais, Ademir e Silvia (os indivíduos parentais, rsrs), que desde sempre deram o melhor para que eu pudesse chegar a este momento, a entrega do meu trabalho de conclusão de curso, e ser a primeira da família a ter um curso superior. Todas as vezes em que eu quis vir morar em Rio Claro eles me aconselharam e ajudaram a por em prática a minha decisão. É.. Agora acabou de vez, sem mais mudanças, sem mais fazer compra da semana no armário de casa, trazer comida pronta, sumir com os “tapuér” e panelas em meio às muitas mudanças, entre tantas outras coisas mais. Sei que eu não demonstro o suficiente, mas eu amo muito vocês e dou muito valor a tudo o que sempre fizeram por mim em todos os momentos da minha vida. Obrigada!

À caçula da família, minha irmã Gabrielli, por sempre ajudar quando eu precisei. Sempre vivemos em pé de guerra, e até hoje ainda é assim, mas fazer o que né? Sei que você vai ser uma ótima neurologista, se é que vai persistir nessa ideia pro futuro, ou seja lá o que escolher fazer da vida. Love U sis!

Ao meu amado companheiro, Marcelo, que ficou ao meu lado e, também, sempre me ajudou quando precisei. Fiz você perder várias horas de sono, dinheiro e paciência, né Má? Mas você nunca me deixou na mão, sempre cuidou muito bem de mim e a bobona aqui demorou a perceber que não sabia mais fazer qualquer coisa sem você junto, seja apoiando, criticando, falando que não entende de cromossomos nas vezes em que eu pedi opinião rsrs.. Antes tarde do que nunca. Você faz parte da minha vida e agora também desse TCC muito mais do que imagina (aliás, sem você nem na UNESP eu estaria). Obrigada por tudo. Eu te amo muito!

À Professora Patricia Parise que ao longo de cinco anos foi uma grande docente, orientadora, amiga e mãe na ciência pra mim. Obrigada por sempre me aconselhar e me ajudar em tudo o que precisei. Muito obrigada Pati!

Ao Dr. Thiago Gazoni que, desde julho de 2014, me ensinou e compartilhou todo o seu conhecimento sobre a citogenética de anfíbios, me ajudando a chegar ao final do curso com este trabalho em mãos. Juntamente com a Profa. Patricia, você me mostrou que eu tive a melhor orientação que alguém poderia desejar. Sei que seu caminho na ciência ainda vai longe e sempre vou ter muito orgulho em dizer que trabalhei com você. Muito obrigada!

Aos meus avós, vô Dori e vô Tonha, que sempre me ajudaram em tudo e acompanharam minhas várias mudanças Pira-RC ao longo dos cinco anos da graduação, sempre dispostos a ajudar quando eu precisei. Sempre me falando dos sapinhos que apareciam na chácara depois que comecei a iniciação científica, foram importantes incentivadores. Eu amo muito vocês!

À vô Lena, que também acompanhou e ajudou muito com as mudanças. Eu amo você!

Aos queridos Gustavo e Marilei Paiva que me acolheram maravilhosamente quando passei na UNESP e me ajudaram com a adaptação a essa nova vida, muito obrigada! Obrigada por todo o apoio e ensinamentos naquele terceiro ano do CAP em 2011, ano em que a minha escolha pela biologia finalmente aconteceu por causa do exemplo e incentivo que eu tive de vocês.

Às minhas grandes amigas em Rio Claro, minhas amadas *Xolots* Andréa Rösel, Emilia Arthur, Fernanda Martins, Giuliana Garcia e Juliana Jurgilas. Obrigada por todos os rolês, conversas, brigadeiros, batatas áureas recheadas, pizzas, lasanhas, gorós e por tornar a vida em Rio Claro menos difícil para mim.

Aos colegas de laboratório que sempre estiveram dispostos a me ajudar: muito obrigada! Eu sei que não sou uma pessoa muito sociável, mas sempre tive o auxílio de vocês quando precisei.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”

Aristóteles

RESUMO

O Brasil é um dos países com maior diversidade de anfíbios anuros, com o número de espécies aumentando cada vez mais com a descoberta de novas espécies e a realização de estudos envolvendo caracteres de morfologia externa, osteologia, bioacústica, biologia reprodutiva, ecologia, distribuição geográfica e, progressivamente, dados de sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear. Apesar disso, a citogenética ainda tem sido pouco considerada como importante complemento aos dados de marcadores moleculares, o que poderia auxiliar na elucidação de problemas de taxonomia e sistemática de muitas espécies de anuros. O gênero Neotropical *Leptodactylus*, por exemplo, tem passado por inúmeras revisões e alterações no número e composição de famílias e apresenta indicativos de modificações cromossômicas que podem ter contribuído para a variação intra e interespecífica, mostrando que os marcadores citogenéticos poderão ajudar no esclarecimento de muitas dessas alterações. No presente trabalho foi realizado mapeamento por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) de sequências repetitivas de snDNA U2 no cariótipo de 6 espécies de *Leptodactylus* ($2n = 22$, exceto por *Leptodactylus* sp. 2, com $2n = 20$) coletados no Brasil, com o objetivo de revelar seus padrões de distribuição, dados que permanecem desconhecidos em anfíbios. A sonda de DNA usada, hibridou na região distal do braço curto do par metacêntrico 6 em *L. fuscus* (grupo *Leptodactylus fuscus*), *L. latrans* (grupo *Leptodactylus latrans*), *L. petersii*, *Leptodactylus* sp. e *Leptodactylus* sp. 2 (grupo *Leptodactylus melanonotus*). Uma mudança nesse padrão foi observada em *L. labyrinthicus* (grupo *Leptodactylus pentadactylus*) de duas localidades no estado de São Paulo. Um espécime de Lençóis Paulista mostrou sinais de hibridação na região proximal do braço curto do par 10 e, adicionalmente, na região distal do braço curto do par 6, enquanto *L. labyrinthicus* de Rio Claro exibiu sinais de hibridação apenas nos cromossomos 10. A mesma localização das sequências do gene U2 para a maioria das espécies analisadas no trabalho sugere um padrão relativamente conservado, bem como já observado para outros animais estudados, e uma homeologia entre o cromossomo 6 dessas espécies de *Leptodactylus*, incluindo *Leptodactylus* sp. 2, na qual é considerado que pelo menos um evento de fusão ocorreu durante a evolução do cariótipo. Os resultados mostram que o gene snDNA U2 representa um bom marcador citogenético para o gênero *Leptodactylus*.

Palavras-chave: Citogenética molecular. Hibridação *in situ* por fluorescência. Cromossomo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVO	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Material	14
3.2. Métodos	15
3.2.1. Obtenção de suspensões celulares.....	15
3.2.2. Preparação de lâminas.....	17
3.2.3. Extração de DNA genômico	17
3.2.4. Amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	17
3.2.5. Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (FISH), segundo Martins e Galetti (1999) com modificações	18
3.2.6. Análise cromossômica	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Amplificação de DNA e marcação da sonda por PCR.....	22
4.2. Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	23
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A Classe Amphibia está presente no mundo todo, exceto na Antártida (DUELLMAN; TRUEB, 1994), e é composta por 7545 espécies, pertencentes às ordens Gymnophyona, Caudata, e, majoritariamente, Anura, com 6639 representantes (FROST, 2016). O Brasil é um dos países com maior diversidade de anfíbios anuros, com 1039 espécies reconhecidas até o momento, segundo a Lista de Anfíbios Brasileiros (SEGALLA et al., 2016). A partir de 2005, foram realizadas extensas revisões baseadas principalmente em dados moleculares como as de Faivovich et al. (2005), Frost et al. (2006), Grant et al. (2006), Hedges et al. (2008) e Pyron e Wiens (2011), resultando em grandes modificações na taxonomia e sistemática de toda a classe Amphibia, porém sem considerar dados cromossômicos na maior parte desses trabalhos. É importante enfatizar que análises de dados de sequenciamento de DNA associados com informações cariotípicas têm produzido relevantes trabalhos sobre a filogenia de certos grupos de anuros da fauna brasileira (AGUIAR et al., 2007; LOURENÇO, L., et al., 2008; TARGUETA et al., 2010), mostrando que a citogenética pode também contribuir no esclarecimento de questões de taxonomia e sistemática (LOURENÇO, A., et al., 2016).

Atualmente, são reconhecidas 74 espécies para o gênero *Leptodactylus* (FROST, 2016), que mostram ampla distribuição geográfica, com ocorrência na região Neotropical, desde o sul dos Estados Unidos, na América do Norte, América Central, Antilhas, até a Argentina na América do Sul (DUELLMAN; TRUEB, 1994; FROST, 2016). No Brasil, o número de espécies registradas é de 57 (SEGALLA et al., 2016), com tendência a aumentar, já que novos representantes têm sido descritos recentemente (FROST, 2016). As espécies de *Leptodactylus* reconhecidas atualmente são subdivididas em quatro grupos (DE SÁ et al., 2014), sendo eles o grupo *Leptodactylus fuscus*, grupo *Leptodactylus latrans*, grupo *Leptodactylus melanonotus* e grupo *Leptodactylus pentadactylus*. Grande parte dos estudos relacionados à taxonomia e sistemática dos *Leptodactylus* foi, tradicionalmente, baseada em caracteres morfológicos e comportamentais, como utilizado de início por Heyer (1969) para a subdivisão das espécies em grupos fenéticos. O gênero tem passado por diversas mudanças nos últimos anos, o que aumentou consideravelmente a necessidade de estudos envolvendo técnicas diversas, como as de citogenética, envolvendo o maior número possível de marcadores cromossômicos que possam corroborar ou esclarecer as relações filogenéticas entre as espécies.

• Citogenética de *Leptodactylus*

Os cariótipos de cerca de 40 espécies de *Leptodactylus* (sensu DE SÁ et al., 2014) são conhecidos até o momento (revisões em GREEN; SESSIONS, 2007; KING, 1990; KURAMOTO, 1990, complementadas com os trabalhos de GAZONI et al., 2012 e COELHO et al., 2015) e apresentam, de modo geral, $2n = 22$ cromossomos, com exceção de *L. cf. podicipinus* e *L. silvanimbus*, com $2n = 20$ (GAZONI et al., 2012) e $2n = 24$ (AMARO-GHILARDI et al., 2006), respectivamente. Quando analisados apenas com coloração convencional, como na maioria dos casos de descrição cariotípica no gênero, são, geralmente, bastante similares entre si, pois a técnica resulta apenas na descrição do número e da morfologia dos cromossomos. No entanto, as técnicas de coloração diferencial e de citogenética molecular, obtidas a partir de 1990, têm produzido alguns resultados indicativos de que variações cromossômicas podem modificar, em certa extensão, a constituição cariotípica inter e intraespecífica de espécies de *Leptodactylus* (AMARO-GHILARDI et al., 2004; AMARO-GHILARDI et al., 2006; ARRUDA; MORIELLE-VERSUTE, 2008; GAZONI et al., 2012; GAZONI, 2015; SILVA et al., 1999; SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2006; SUÁREZ, 2010; WILEY et al., 1992).

A citogenética molecular, caracterizada pela manipulação propriamente dita de material genético, baseia-se, principalmente, na hibridação *in situ* por fluorescência – FISH. A técnica de FISH permite a identificação de sondas de DNA marcadas, geralmente pela inclusão de um nucleotídeo contendo biotina ou digoxigenina associada, que após hibridação com o DNA cromossômico complementar, podem ser detectadas por moléculas contendo fluoróforos (de forma geral avidina para sondas marcadas com biotina e anticorpo anti-digoxigenina para sondas marcadas com digoxigenina) e visualizadas sob microscopia de fluorescência (GUERRA, 2004).

• Os snRNA U

As sequências de DNA repetitivo compõem substancialmente o material genético dos eucariotos, podendo estar organizadas de forma dispersa pelo genoma ou como repetições em tandem, como, por exemplo, os microssatélites, minissatélites e famílias multigênicas (CHARLESWORTH; SNIÉGOWSKI; STEPHAN, 1994; MAXSON et al., 1983). De acordo com Nei e Rooney (2005), famílias multigênicas são grupos de genes que apresentam similaridade estrutural e funcional e descendem de um gene ancestral comum. Exemplos de

famílias multigênicas bem conhecidas e estudadas do ponto de vista molecular e cromossômico são os genes codificadores de proteínas histônicas, genes de RNAs ribossomais (rRNAs) e genes de pequenos RNAs nucleares (snRNAs). Os snRNAs estão sempre associados a um conjunto de proteínas específicas, sendo o complexo conhecido como pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs), e os componentes mais comuns desses complexos são os RNAs spliceossomais U.

Os snRNA U são sequências transcritas por cinco diferentes DNAs repetitivos altamente conservados (BARZOTTI et al., 2003), chamados de snRNAs U devido ao seu alto teor de ácido uridílico (HODNETT; BUSCH, 1968; MURAMATSU; HODNETT; BUSCH, 1966; NAKAMURA; PRESTAYKO; BUSCH, 1968), que desempenham importante função no processo de *splicing*, onde, juntamente com uma série de proteínas, constituem partes do spliceossomo (VALADKHAN, 2005), maquinaria utilizada para realizar o processamento do pré-mRNA no núcleo, possibilitando a retirada dos íntrons e ativando o RNA para a tradução da informação genética em proteínas. Essas sequências participam, também, de diferentes processos de regulação celular como, por exemplo, na manutenção dos telômeros. Os snDNAs U são considerados bons marcadores repetitivos identificáveis pela técnica de FISH, tendo sido estudados em diversos organismos na tentativa de entender as relações evolutivas entre espécies próximas, bem como na inferência de homeologia entre determinados cromossomos presentes em linhagens distintas e no rastreamento da origem e evolução de cromossomos específicos (UTSUNOMIA et al., 2014). Até o momento, no entanto, não há relato de mapeamento destas sequências em anfíbios. Os mais abundantes snDNAs são os genes que codificam U1 e U2 (ARES et al., 1985). Os genes snRNA U2 em galinha (*Gallus gallus*) e no anfíbio *Xenopus laevis*, por exemplo, são repetidos em tandem, assim como em seres humanos, mas os mesmos genes em ratos e camundongos são encontrados dispersos ou organizados como pares invertidos no genoma de tais organismos (DAHLBERG; LUND, 1988). Dessa forma, o surgimento da organização em tandem de sequências do gene U2 pode ter acontecido independentemente nas linhagens de anfíbios e aves ou a linhagem dos roedores pode ter perdido tal característica (MATERA; WEINER; SCHMID, 1990).

Devido a sua grande importância para o metabolismo celular, os genes snRNA U constituem uma distinta classe de genes conservados evolutivamente que já foram mapeados citogeneticamente em diversos organismos, incluindo humanos (LUND et al., 1983), camundongos (LUND; NESBITT, 1988), crustáceos (BARZOTTI et al., 2003), peixes (CABRAL-DE-MELLO et al., 2012; MANCHADO et al., 2006; ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010) e algumas espécies de gafanhotos (BUENO et al., 2013; PALÁCIOS-GIMENEZ et

al., 2013), indicando a conservação do número e da posição de agrupamentos com a localização restrita, em geral, a apenas um ou poucos pares cromossômicos (ANJOS, 2014). Essa conservação das sequências de snRNA U é uma característica muito importante, tomada como base para a realização de diversos estudos. A análise da sequência de nucleotídeos de snRNA U2 de rato, galinha e faisão, por exemplo, mostraram que a sequência primária desses tipos de RNA tem sido altamente conservada ao longo da evolução (BRANLANT et al., 1982; REDDY et al., 1981; VAN ARSDELL; WEINER, 1984), assim como Mattaj e Zeller (1983) apresentaram também, pois identificaram 94% de homologia entre o gene snRNA U2 em ratos e no anfíbio *Xenopus*. Por ser uma sequência altamente conservada e encontrada nas mais diversas espécies animais, o gene snRNA U2 é promissor em estudos de evolução cromossômica.

Para o anuro *Xenopus* sp., sabe-se que o gene U2 é organizado em pequenas sequências repetitivas organizadas em tandem com aproximadamente 830 pb (MATTAJ; ZELLER, 1983), repetido de 500 a 1000 vezes no genoma, porém não há relato de mapeamento destas sequências nos cromossomos de anfíbios. Enquanto que estudos de distribuição genômica envolvendo FISH com outras sequências gênicas repetitivas, como as de histonas e de snRNAs envolvidos em processos de *splicing* alternativo tem sido utilizadas em outros organismos, como citado anteriormente, apenas o mapeamento de sequências de genes ribossomais, como de 18S, 28S e 5S, além de sequências teloméricas (TTAGGG)_n e DNA satélite tem sido relatados nos trabalhos sobre citogenética de anfíbios anuros (AMARO-GHILARDI et al., 2004; AMARO-GHILARDI et al., 2006; ARRUDA; MORIELLE-VERSUTE, 2008; GAZONI et al., 2012; SILVA et al., 1999; SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2006; WILEY et al., 1992).

• *Splicing* e o spliceossomo

O spliceossomo é um grande complexo RNA-proteína utilizado para realizar o processamento do pré-mRNA (ZAVANELLI; ARES, 1991), um processo pós-transcricional que possibilita a retirada dos íntrons e torna o RNA ativo para a tradução da informação genética em proteínas, processo conhecido como *splicing*. Tal maquinaria molecular, a maior conhecida atualmente, requer os snRNPs U1, U2, U4, U5 e U6 para funcionar perfeitamente (ROESSER, 2004). Defeitos em quaisquer componentes do spliceossomo levam a uma expressão proteica inapropriada que pode ser altamente prejudicial ou, comumente, letal para a célula (BURKE, 2012). Os genes snRNA U do spliceossomo são transcritos pela RNA

polimerase II, exceto pelo snRNA U6, que é transcrito pela enzima RNA polimerase III (SCHUL; VAN DRIEL; DE JONG, 1998). A demanda pela transcrição dos snRNAs é grande, de forma que um único snRNA U2 é transcrito a cada 2 a 4 segundos, assim como acontece, também, com os genes U1 (DAHLBERG; LUND, 1988).

O importante papel do *splicing* alternativo na expressão gênica eucariótica é a remoção dos íntrons do pré-mRNA, que posteriormente é convertido em mRNA, permitindo que a partir de um único gene sejam produzidas diferentes proteínas com diferentes funções (ROESSER, 2004). Isso se deve ao fato de que alguns exons são encontrados em todos os mRNAs produzidos a partir de um determinado pré-mRNA, que passa pelo processo de *splicing* alternativo, gerando as formas variáveis de mRNA e, conseqüentemente, proteínas. Tal processo acontece em larga escala em eucariotos superiores, aumentando a complexidade de cada indivíduo por ampliar o número de proteínas específicas expressas a partir de um único gene, aumentando a diversidade proteica dos organismos (NILSEN; GRAVELEY, 2010; WILL; LÜHRMANN, 2011; RITCHIE; SCHELLENBERG; MACMILLAN, 2009). O mRNA resultante do processo de *splicing* contém uma sequência codificante pronta para ser exportada do núcleo para o citoplasma e traduzida em proteína pelos ribossomos (BURKE, 2012).

O *splicing* é um processo essencial para os eucariotos, sendo que pelo menos 90% dos genes que codificam proteínas em humanos, por exemplo, passam por tal processo (DJEBALI, 2012), que é praticamente inexistente em procariotos (BURKE, 2012). Em organismos eucariotos inferiores, assim como nos fungos, os íntrons são relativamente curtos, mas em eucariotos superiores existem íntrons com tamanhos variáveis, normalmente grandes. Em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, somente por volta de 5% dos genes passam por *splicing* e seus íntrons contêm por volta de 100 a 400 nucleotídeos e em humanos, por exemplo, os genes contêm uma média de 8 íntrons com diferentes tamanhos entre 100 e 10 mil nucleotídeos. Em geral, os íntrons são mais longos quando comparados aos exons, o que normalmente resulta em um mRNA maduro que pode ter um tamanho muito menor do que o gene codificante (BURKE, 2012).

Apenas no final da década de 1970 os íntrons foram descobertos e, desde então, o entendimento dos processos envolvendo o *splicing* avançou e ainda avança cada dia mais com as novas pesquisas realizadas.

2 OBJETIVO

Considerando que o gênero *Leptodactylus* é abundante, com muitos representantes no Brasil e que novas espécies têm sido descritas nos últimos anos; que apenas uma pequena parcela destas foi, até o momento, cariotipada, sendo as análises restritas, na maioria das vezes, ao uso de coloração convencional; que grandes modificações na família Leptodactylidae e no gênero *Leptodactylus* ocorreram, a partir de 2006, baseadas, principalmente, em sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear, porém, com pouca ênfase dada às informações citogenéticas, e que existem questões de taxonomia e sistemática ainda não resolvidas, como aquelas relativas à dificuldade de alocar algumas das espécies no grupo, o presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de buscar nova ferramenta para obtenção de informações sobre a organização e localização do gene snRNA U2 em anfíbios, através do mapeamento das sequências por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) no genoma de 6 diferentes espécies de *Leptodactylus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os espécimes de *Leptodactylus* utilizados no trabalho foram coletados em 4 estados do Brasil, como mostrado na Tabela 1. As coletas foram realizadas por alunos e colaboradores da Profa. Dra. Patrícia P. P. Maltempo, sob licença concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio - SISBIO autorização 30202-2) e identificados pelo Dr. Célio F.B. Haddad, do Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP. Os experimentos e o manejo dos animais foram realizados em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Câmpus de Rio Claro (CEUA - permissão 027/2011). Após a coleta do material citológico, os animais da amostra foram fixados com formol e armazenados em álcool 70% no laboratório. Posteriormente, foram depositados na Coleção CFBH do Departamento de Zoologia do câmpus.

Tabela 1: *Leptodactylus* coletados em estados brasileiros, localidades de coleta dos espécimes e identificação dos espécimes da Coleção de Anfíbios “Célio Fernando Baptista Haddad” (CFBH), Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro.

Espécie	Sexo	Localidade	Identificação
<i>Leptodactylus fuscus</i>	J	Porto Nacional, TO	CFBH39542
<i>Leptodactylus latrans</i>	M	Ubatuba, SP	CFBH39555
<i>Leptodactylus</i> sp.	J	Urucará, AM	CFBH39693
<i>Leptodactylus petersii</i>	M (J)	São Gabriel da Cachoeira, AM	CFBH39703
<i>Leptodactylus</i> sp. 2	F	Sinop, MT	CFBH36745
<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	M	Rio Claro, SP	CFBH23257
<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	F	Lençóis Paulista, SP	CFBH39768

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção de suspensões celulares

As preparações cromossômicas de medula óssea, fígado e testículos foram obtidas durante os últimos 5 anos, combinando-se os procedimentos descritos por Schmid (1978) e Baldissera Jr et al. (1993) com modificações. Para todos os procedimentos, o tratamento prévio dos animais foi realizado da mesma forma, que consistiu basicamente em uma injeção de colchicina na concentração de 1% injetada intraperitonealmente, na proporção aproximada de 0,1 mL para cada 10 g de peso do espécime, quatro horas antes da eutanásia, sem tratamento prévio com fitohemaglutinina. Os espécimes foram sacrificados com a aplicação de pomada de xilocaína (lidocaína), que foi espalhada por todo o corpo do animal, principalmente na região ventral (BERNARDE, 2008 apud DINIZ, 2015). Cada animal teve parte da musculatura e fígado armazenados em tubos criogênicos contendo álcool 95-100% para extração de DNA.

a. Obtenção das preparações cromossômicas a partir de medula óssea

Os fêmures e as tíbias dos animais foram retirados e as epífises foram cortadas. Com uma seringa, foram feitas lavagens sucessivas do canal ósseo com solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075M até a medula óssea ter sido totalmente retirada. Os ossos foram descartados e a solução hipotônica contendo células foi transferida para tubos de centrífuga, que foram incubados a 37°C durante 45 minutos. A pré-fixação foi feita adicionando à suspensão aproximadamente 6 gotas de fixador Carnoy (metanol 3:1 ácido acético) gelado, preparado no momento do uso, e agitando levemente o tubo. 5 minutos depois, foram adicionadas mais 6 gotas de fixador, o material foi ressuspendido e o tubo foi deixado no suporte novamente por 5 minutos. Para a fixação das células, foi realizada centrifugação a 1000 rpm por 9 minutos. O sobrenadante foi então descartado e adicionou-se aproximadamente 5 mL de fixador Carnoy (3 partes de metanol : 1 parte de ácido acético) preparado na hora e gelado. Foram realizadas pelo menos mais duas centrifugações com para substituição de fixador. Após a última centrifugação e descarte do sobrenadante, o material citológico foi transferido para microtubos de 1,5 mL e armazenado em freezer a -20°C por pelo menos 24 horas antes de ser usado para confecção das lâminas.

b. Obtenção das preparações cromossômicas a partir de fígado

Com uma seringa, foram feitas injeções sucessivas com solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075M, e dissociação com auxílio de pinça até a liberação de grande quantidade de células do fígado extraído de cada animal. O líquido resultante contendo as células hepáticas foi transferido para um tubo de centrifuga, que foi incubado a 37°C durante 45 minutos. A pré-fixação foi feita adicionando à suspensão aproximadamente 6 gotas de fixador Carnoy (metanol 3:1 ácido acético) gelado, preparado no momento do uso, e agitando levemente o tubo. 5 minutos depois, foram adicionadas mais 6 gotas de fixador, o material foi ressuspendido e o tubo foi deixado no suporte novamente por 5 minutos. Para a fixação das células, foi realizada centrifugação a 1000 rpm por 9 minutos. O sobrenadante foi então descartado e adicionou-se aproximadamente 5 mL de fixador Carnoy (3 partes de metanol : 1 parte de ácido acético) preparado na hora e gelado. Foram realizadas pelo menos mais duas centrifugações com para substituição de fixador. Após a última centrifugação e descarte do sobrenadante, o material citológico foi transferido para microtubos de 1,5 mL e armazenado em freezer a -20°C por pelo menos 24 horas antes de ser usado para confecção das lâminas.

c. Obtenção de preparações cromossômicas a partir de testículos

Dos espécimes machos, foram retirados e esmagados os testículos em placa contendo solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075M para evitar que o material fique seco enquanto exposto. O conteúdo resultante foi transferido para um tubo de centrifuga, que foi incubado a 37°C durante 45 minutos. A pré-fixação foi feita adicionando à suspensão aproximadamente 6 gotas de fixador Carnoy (metanol 3:1 ácido acético) gelado, preparado no momento do uso, e agitando levemente o tubo. Após 5 minutos, foram adicionadas mais 6 gotas de fixador, o material foi ressuspendido e o tubo foi deixado no suporte novamente por 5 minutos. Para a fixação das células, foi realizada centrifugação a 1000 rpm por 9 minutos. O sobrenadante foi então descartado e adicionou-se aproximadamente 5 mL de fixador Carnoy (3 partes de metanol : 1 parte de ácido acético) preparado na hora e gelado. Foram realizadas pelo menos mais duas centrifugações com para substituição de fixador. Após a última centrifugação e descarte do sobrenadante, o material citológico foi transferido para microtubos de 1,5 mL e armazenado em freezer a -20°C por pelo menos 24 horas antes de ser usado para confecção das lâminas.

3.2.2 Preparação de lâminas

Sobre uma lâmina limpa e seca, mantida horizontalmente sobre um suporte em banho-maria a 60°C, uma ou duas gotas da suspensão celular armazenada em freezer foram gotejadas após o fixador ter sido renovado. As lâminas secaram a temperatura ambiente e foram envelhecidas por, pelo menos, 24 horas antes da aplicação da técnica de FISH ou armazenadas no freezer, quando necessário guardá-las.

3.2.3 Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA genômico de *L. latrans* utilizou-se o protocolo padrão para a extração de DNA a partir de tecido animal do kit comercial NucleoSpin[®] Tissue, que consiste, basicamente, em lise das membranas celulares, limpeza dos contaminantes (proteínas e outras macromoléculas) e a precipitação do DNA, seguida por eluição em tampão (5 mM Tris/HCl, pH 8,5) fornecido pelo kit.

3.2.4 Amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os primers utilizados na amplificação do gene U2 foram desenhados por Bueno e colaboradores (2013), sendo eles U2 Forward (5'-ATC GCT TCT CGG CCT TAT G-3') e U2 Reverse (5'-TCC CGG CGG TAC TGC AAT A-3'). A amplificação foi realizada conforme os reagentes e proporções destes, informação detalhada na Tabela 2.

Tabela 2: Reagentes e proporções utilizados na PCR.

Soluções	Volume/amostra
Mix (dNTP's, TaqPol., Mg ²⁺ , tampão)	6.25 µL
H ₂ O MiliQ autoclavada	5.25 µL
Primer Forward	0.5 µL
Primer Reverse	0.5 µL
DNA genômico extraído	1.0 µL
Volume final	13.5 µL

A reação de PCR seguiu as seguintes condições programadas no aparelho termociclador:

- Desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos;
- 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos;
- Anelamento a 55°C por 30 segundos;
- Elongação a 72°C por 5 minutos;
- Extensão final a 72°C durante 5 minutos, com temperatura de manutenção a 4°C.

Para verificar o resultado da amplificação do DNA foi utilizada a técnica de eletroforese, aplicando-se a mistura de 1 µL de produto de PCR e 1 µL de tampão de corrida Blue Juice em gel de agarose 1% corado com Gel Red. Ao final da técnica, aproximadamente 30 minutos depois de iniciar o procedimento, o gel foi visualizado sob incidência de luz ultravioleta para verificar a quantidade e o tamanho dos fragmentos amplificados, comparando os resultados de cada amostra com o marcador “ladder” de peso molecular de 1Kb.

3.2.5 Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), segundo Martins e Galetti (1999) com modificações

Os procedimentos de FISH foram realizados nas seguintes etapas:

a. Marcação não-isotópica da sonda com digoxigenina-11-dUTP através da técnica de PCR seguindo o protocolo apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Reagentes e proporções utilizados na PCR de marcação da sonda.

Soluções	Volume
H ₂ O MiliQ autoclavada	16 µL
Tampão (PCR Buffer - <i>Invitrogen</i>)	2.5 µL
MgCl ₂ (50 mM - <i>Invitrogen</i>)	0.25 µL
dATP (2 mM)	0.5 µL
dCTP (2 mM)	0.5 µL

dGTP (2 mM)	0.5 μ L
dTTP (2 mM)	0.35 μ L
Digoxigenina-11-dUTP (1 mM - <i>Roche</i>)	0.3 μ L
Primer Forward	1 μ L
Primer Reverse	1 μ L
Produto de PCR	2 μ L
Taq Polimerase (<i>Invitrogen</i>)	0.1 μ L
Volume final	25 μL

A reação de PCR seguiu as seguintes condições gerais:

- Desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos;
- 30 ciclos de:
 - desnaturação a 94°C por 30 segundos;
 - Anelamento a 55°C por 30 segundos;
 - Elongação a 72°C por 5 minutos;
 - Extensão final a 72°C durante 5 minutos, com temperatura de manutenção a 4°C.

Depois de finalizada a reação de marcação da sonda, foi feita a verificação em gel de agarose 1%, da mesma maneira descrita anteriormente no item “4.2.3. Amplificação de DNA via Polymerase Chain Reaction (PCR)”.

b. Reação de hibridação, empregando-se a solução de hibridação que contém formamida e procedimentos de desnaturação e renaturação no termociclador:

A desnaturação dos cromossomos foi feita imergindo-se as lâminas em solução de formamida 70%/2xSSC a 70°C por 1 minuto e 20 segundos até, no máximo, 1 minuto e 40 segundos. Logo após, as lâminas foram desidratadas em série alcóolica gelada (-20°C) a 70%, 90% e 100%, sucessivamente, por cinco minutos em cada uma destas concentrações, e deixadas para secar em estufa a 37°C. A solução de hibridação foi preparada com os reagentes descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Reagentes e proporções utilizados na montagem da solução de hibridação.

Soluções	Volume/lâmina
Sonda previamente marcada	6 μ L
Formamida	15 μ L
20xSSC	3 μ L
Sulfato de dextran (a 50%)	6 μ L
Volume final	30 μL

A solução de hibridação foi colocada no termociclador para desnaturação a 95°C por 10 minutos e, ao final, a solução foi retirada do aparelho e imediatamente colocada em gelo no freezer por pelo menos 5 minutos para impedir que a sonda renaturasse, o que diminuiria a disponibilidade de sonda a ser hibridada com o DNA dos cromossomos presentes na lâmina. As lâminas foram montadas com 30 μ L dessa solução, cobertas com lamínulas limpas, e mantidas a 37°C overnight (aproximadamente 17 horas) em câmara úmida com 2xSSC. No dia seguinte, as lamínulas foram retiradas e as lâminas lavadas duas vezes em 2xSSC a temperatura ambiente por 5 minutos e uma vez em 1xSSC, também em temperatura ambiente, por 5 minutos. Após as lavagens em 2xSSC e 1xSSC, as lâminas foram colocadas em uma cubeta com tampão PBD a temperatura ambiente por 5 minutos e o volume restante foi colocado em banho-maria a 45°C para ser utilizado posteriormente. A preparação do tampão PBD é descrita na Tabela 5.

Tabela 5: Reagentes e proporções utilizados na preparação do PBD.

Soluções	Volume
Leite em pó desnatado	2,0 g
Água destilada	200 mL
Triton	1000 μ L
20xSSC	40 mL

c. Detecção e amplificação do sinal de hibridação por meio de anti-digoxigenina rodamina (Roche):

Em sala escura, foi preparada uma solução com 100 μL de PBD para cada lâmina + 0,5 μL de anti-digoxigenina rodamina também para cada lâmina. Pipetou-se 100 μL dessa solução em cada lâmina, que foram cobertas com Parafilm[®] e deixadas a 37°C em câmara úmida por pelo menos 1 hora. Depois, as lâminas foram passadas em série de 3 vezes em PBD a 45°C sem deixá-las secar entre uma lavagem e outra.

d. Coloração dos cromossomos com 15 μL da solução DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) + antifading da VECTASHIELD Mounting Medium (Vector, Burlingame, CA):

Em sala escura, sem deixar as lâminas secar, foram colocados 15 μL de antifading + DAPI sobre a região contendo o DNA em cada lâmina e cobriu-se com lamínulas limpas. O material ficou em câmara úmida na geladeira por pelo menos 15 minutos antes de iniciar as análises.

3.2.6 Análise cromossômica

As preparações cromossômicas foram analisadas sob luz ultravioleta com o uso de filtros específicos e documentadas em microscópio de fluorescência BX51 da Olympus, com câmera refrigerada DP71 acoplada a um microcomputador, através do software DP Controller. Para a montagem dos kariogramas foi usado o Corel PHOTO-PAINT X8, através do emparelhamento dos cromossomos de acordo com a morfologia, em ordem decrescente de tamanho, através de inspeção visual. A classificação morfológica foi baseada no trabalho de Green e Sessions (2007), no qual os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos ou subtelo-cêntricos possuem dois braços e os telocêntricos, apenas um.

4 RESULTADOS

4.1 Amplificação de DNA e marcação da sonda por PCR

A amplificação do gene U2 de *Leptodactylus latrans* para posterior produção da sonda resultou em fragmentos de aproximadamente 200-300 pb do gene U2 (Figura 1).

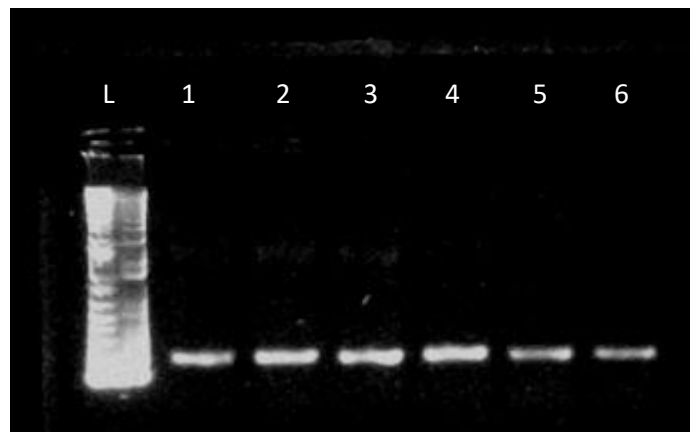


Figura 1: Gel de agarose com os produtos de amplificação do gene snRNA U2 de *L. latrans*. L: Ladder de 1Kb.

Após a reação de marcação da sonda de snDNA U2, o produto final obtido foi visualizado em gel de agarose 1%, que mostrou a eficiência da reação (Figura 2).



Figura 2: Gel de agarose com os produtos da reação de marcação da sonda de snRNA U2 de *L. latrans*; L: Ladder de 1Kb. Fragmentos amplificados com aproximadamente 200-300 pb.

4.2 Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)

A hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) mostrou sinais na região distal do braço curto do par metacêntrico 6 (6bp) em *L. fuscus* (do grupo *Leptodactylus fuscus*), *L. latrans* (do grupo *Leptodactylus latrans*), *L. petersii*, *Leptodactylus* sp. e *Leptodactylus* sp. 2 (do grupo *Leptodactylus melanonotus*) (Figura 3).

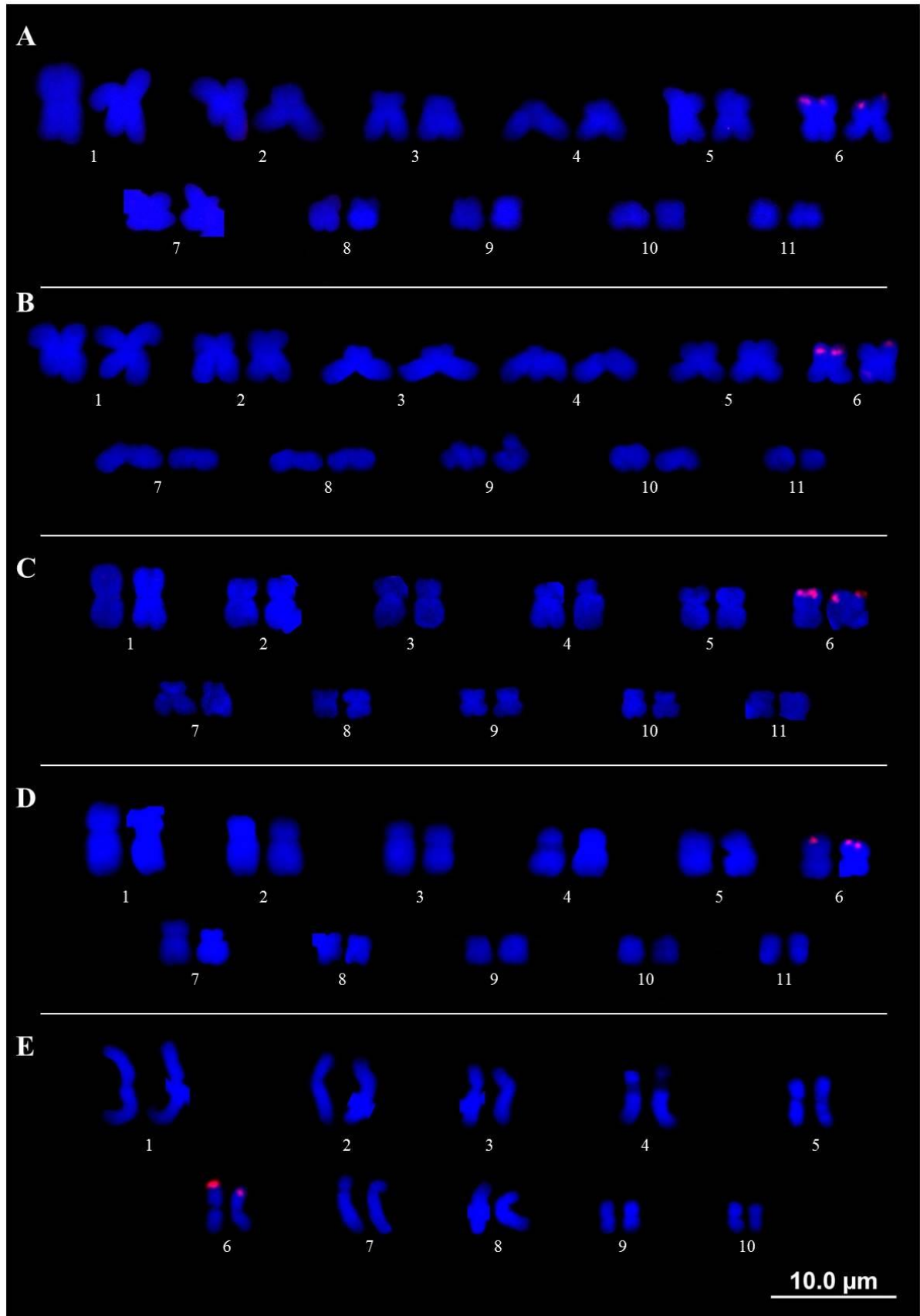


Figura 3: Gene snDNA U2 mapeado em cromossomos mitóticos de **A.** *Leptodactylus fuscus*; **B.** *Leptodactylus* sp. (aff. *podicipinus*); **C.** *Leptodactylus latrans*; **D.** *Leptodactylus petersii*; **E.** *Leptodactylus* sp. 2 (aff. *podicipinus*).

No cariótipo do espécime de *L. labyrinthicus* (do grupo *Leptodactylus pentadactylus*) coletado em Lençóis Paulista, foram observados sinais de hibridação na região proximal do braço curto do par 10 (10bp) e, adicionalmente, na região 6bp distal, enquanto o espécime de *L. labyrinthicus* coletado em Rio Claro apresentou sinais de hibridação na região proximal em ambos os cromossomos do par 10 (10bp) e, adicionalmente, na região distal em apenas um cromossomo do par 6 (6bp) (Figura 4).

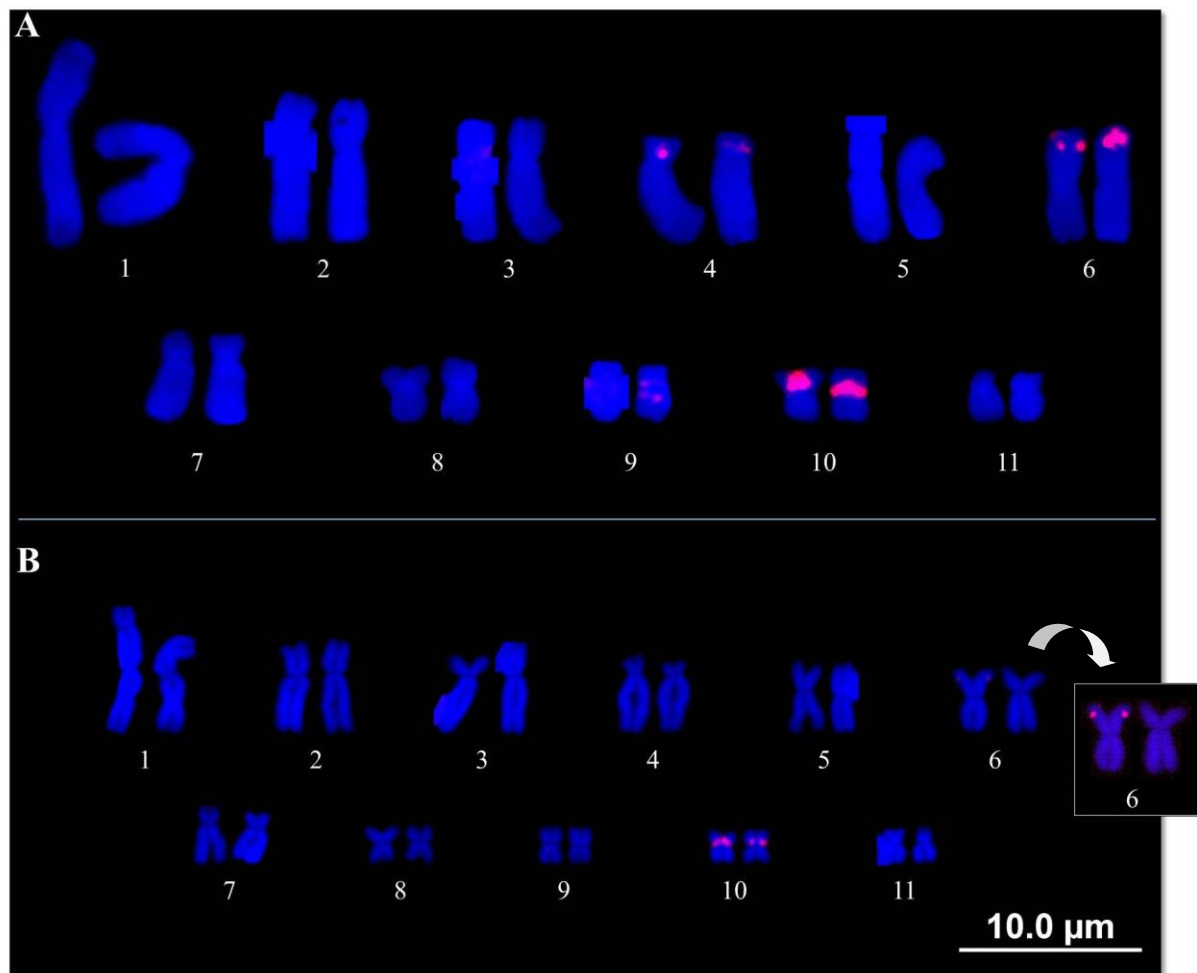


Figura 4: Gene snDNA U2 mapeado em cromossomos mitóticos de **A.** *L. labyrinthicus* de Lençóis Paulista, SP; **B.** *L. labyrinthicus* de Rio Claro, SP. **Inset:** No detalhe nota-se intensificação proposital para realçar a marcação em apenas um cromossomo do par 6 de *L. labyrinthicus* de Rio Claro, SP. Sinais fluorescentes em outros cromossomos em **A** são inespecíficos, não tendo sido encontrados em outras metáfases analisadas.

5 DISCUSSÃO

A análise comparativa dos resultados das 6 espécies indicou a presença de um único agrupamento do gene snRNA U2 em um par cromossômico em *L. fuscus*, *L. latrans*, *L. petersii*, *Leptodactylus* sp. e *Leptodactylus* sp. 2, sugerindo que a distribuição do gene snRNA U2 unicamente na região 6bp distal pode ser o padrão para o gênero *Leptodactylus*, uma vez que foi encontrado na grande maioria das espécies analisadas aqui. Uma vez que a distribuição dessa sequência é relativamente conservada entre a maioria das espécies aqui estudadas, mesmo entre grupos de espécies distintos, espera-se que variações encontradas futuramente em outras espécies do grupo possam estar associadas a alterações cromossômicas que possam auxiliar na identificação de espécies crípticas. A mesma localização das sequências do gene U2 na maioria das espécies analisadas sugere uma provável homeologia entre o cromossomo 6 dessas espécies de *Leptodactylus*, incluindo *Leptodactylus* sp. 2, na qual é considerada a ocorrência de pelo menos um evento de fusão durante a evolução de seu cariótipo (GAZONI et al., 2012), bem como padrão de distribuição relativamente conservado desses pequenos DNAs repetitivos nucleares, como já observado em outros animais estudados (BARZOTTI et al., 2003; BUENO et al., 2013; CABRAL-DE-MELLO et al., 2012; LUND et al., 1983; LUND; NESBITT 1988; MANCHADO et al., 2006; PALÁCIOS-GIMENEZ et al., 2013; ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010).

Uma mudança no padrão de localização do gene U2 para as espécies do gênero *Leptodactylus* analisadas foi observada em *L. labyrinthicus* (no grupo *Leptodactylus pentadactylus*) de duas localidades do Estado de São Paulo. O espécime da população de Lençóis Paulista mostrou sinais de hibridação na região proximal do braço curto do par 10 (10bp) e, adicionalmente, na região 6bp distal, enquanto o espécime de *L. labyrinthicus* da população de Rio Claro apresentou sinais de hibridação na região proximal em ambos os cromossomos do par 10 (10bp) e, adicionalmente, na região distal em apenas um cromossomo do par 6 (6bp). Para ambos os espécimes de *L. labyrinthicus* analisados, portanto, a principal marcação para o gene U2 foi encontrada na região 10bp proximal. A presença de tais sequências no par 10 representa um caractere sinapomórfico nas populações de *L. labyrinthicus* analisadas. A ampliação do mapeamento do gene snRNA U2 também em outros espécimes de *L. labyrinthicus* e outras espécies no grupo *L. pentadactylus* é fortemente recomendada para verificação da distribuição deste marcador em outros espécimes e populações. A partir da filogenia apresentada por de Sá et al. (2014), adaptada e mostrada na Figura 5, é possível indicar que a presença do gene snRNA U2 no par 6 pode representar uma

característica menos derivada dentro do gênero *Leptodactylus*, compartilhada pelos grupos *L. fuscus*, *L. latrans* e *L. melanonotus*.

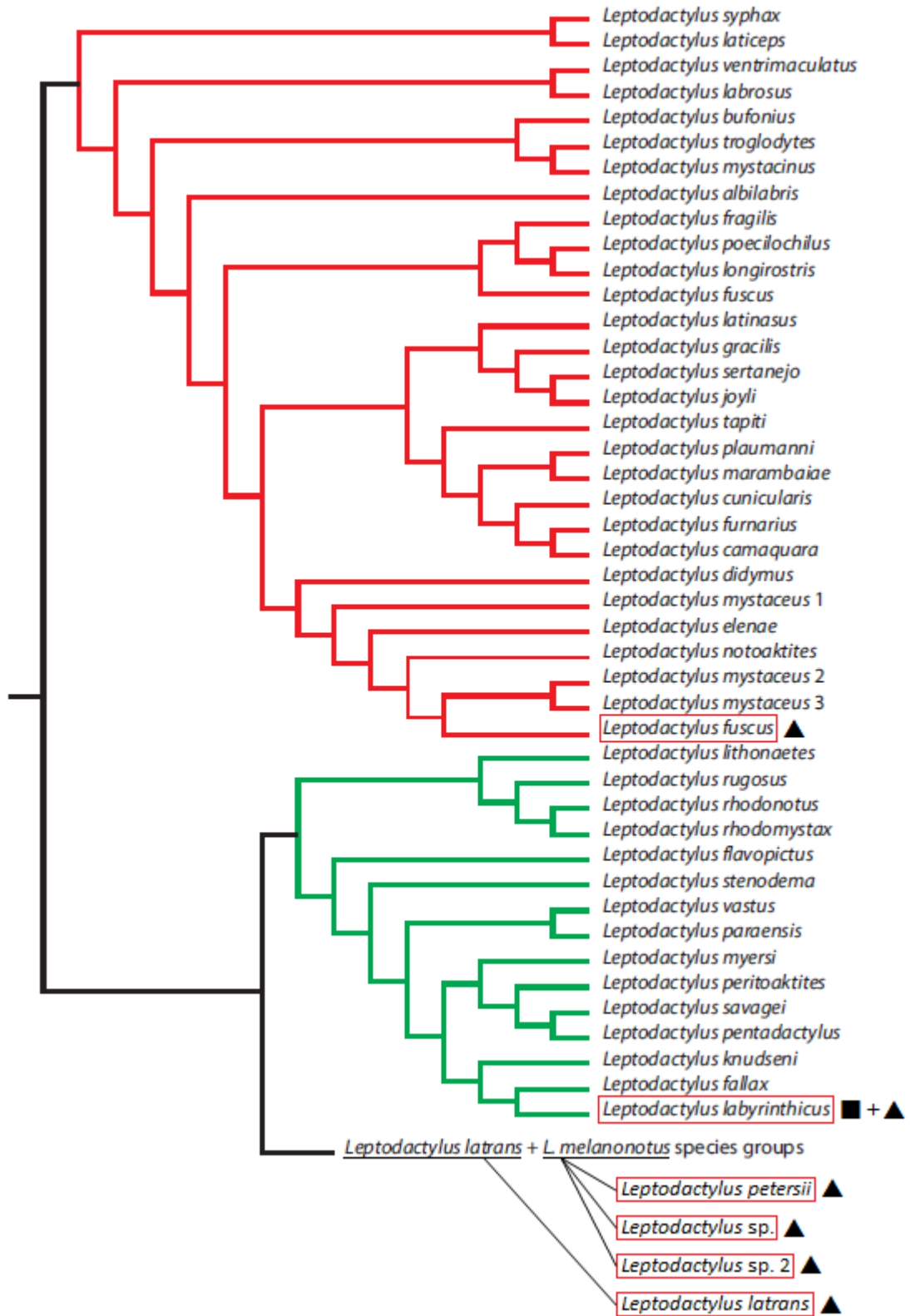


Figura 5: Árvore filogenética adaptada de de Sá et al. (2014) indicando as espécies do gênero *Leptodactylus* em que o gene snRNA U2 está presente na região 6bp distal (▲) ou 10bp proximal (■).

Embora rearranjos cromossômicos Robertsonianos (tais como fusão/fissão) não possam ser descartados como responsáveis pelo distinto padrão de localização do gene snRNA U2 em *L. labyrinthicus*, a aparente manutenção da homeologia entre os pares cromossômicos 6 e 10 das demais espécies do gênero *Leptodactylus* sugere que tenha ocorrido translocação recíproca ou, alternativamente, transposição por elementos móveis (transposons) de regiões contendo sequências do gene U2 do par 6 para os cromossomos 10 de *L. labyrinthicus*, sem alteração significativa à morfologia cromossômica, sendo que tais mecanismos já foram sugeridos também por outros autores para diferentes organismos (ANJOS; LORETO; SOUZA, 2013; BERNSTEIN; MANSER; WEINER, 1985; FINNEGAN, 1989; GAZONI et al., 2012; MATERA; WEINER; SCHMID, 1990; POLETTTO et al., 2010).

Os dois padrões de marcação observados para *L. labyrinthicus* permitem a sugestão de algumas hipóteses. A primeira é de que em *L. labyrinthicus*, o gene snRNA U2 estava, inicialmente, presente apenas na região distal do braço curto do par 6 e, devido a eventos de transposição por elementos móveis ou translocação recíproca e posterior amplificação do gene, duas populações passaram a apresentar um padrões diferentes. Uma população teve parte da sequência repetitiva dos cromossomos 6 transferida para a região proximal do braço curto dos cromossomos 10, de forma que ambos os cromossomos dos dois pares apresentam marcação para o gene U2 (Figura 6A), como observado para o indivíduo coletado em Lençóis Paulista, SP.

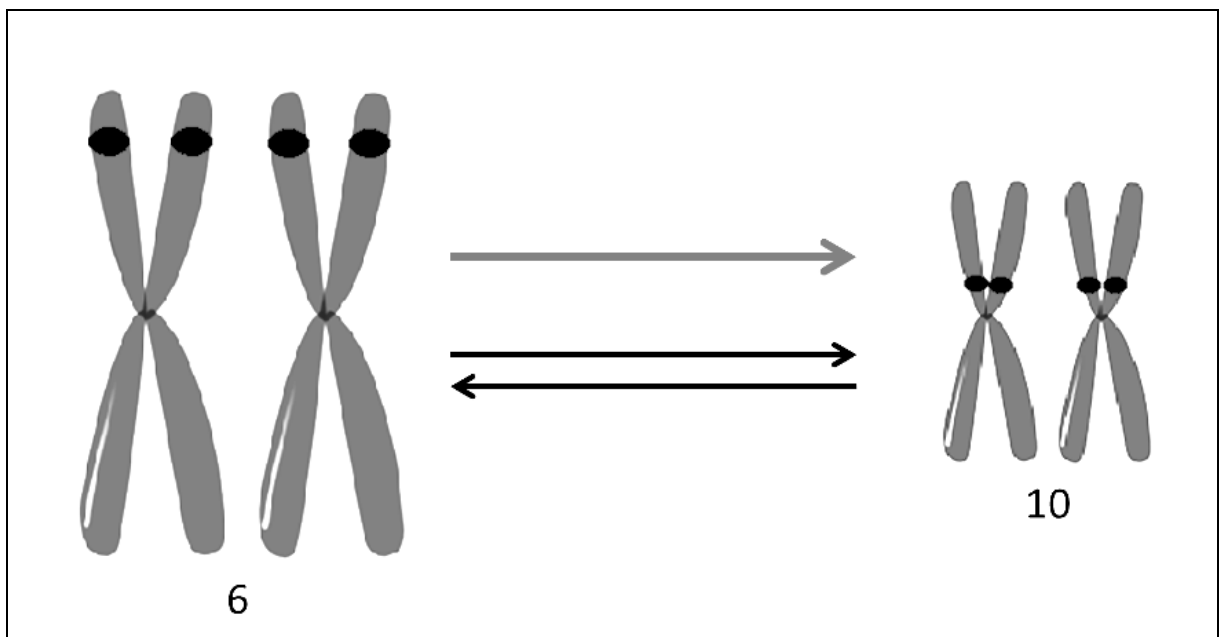


Figura 6: Eventos de transposição por elementos móveis (\rightarrow) ou translocação recíproca (\rightleftharpoons) e posterior amplificação do gene que resultaram na transferência de apenas parte da sequência repetitiva dos cromossomos 6 à região 10bp proximal, portanto ambos os pares cromossômicos apresentam marcação para o gene U2.

A segunda hipótese é que parte dos indivíduos de uma população que apresenta o gene snRNA U2 apenas nos cromossomos 10 entraram em contato com indivíduos de uma população em que o gene U2 encontrava-se apenas no par 6 e obtiveram sucesso reprodutivo (Figura 7A), produzindo ao longo das gerações, indivíduos com o gene U2 em ambos os pares cromossômicos (Figura 7C). O inter cruzamento entre indivíduos que apresentam marcações como apresentadas na Figura 7 B e C possibilita o aparecimento de indivíduos com marcação para o gene U2 em apenas um cromossomo do par 6 e ambos os cromossomos do par 10, como ilustrado na Figura 7D, além de outras constituições cariotípicas que não são relevantes para a situação aqui apresentada.

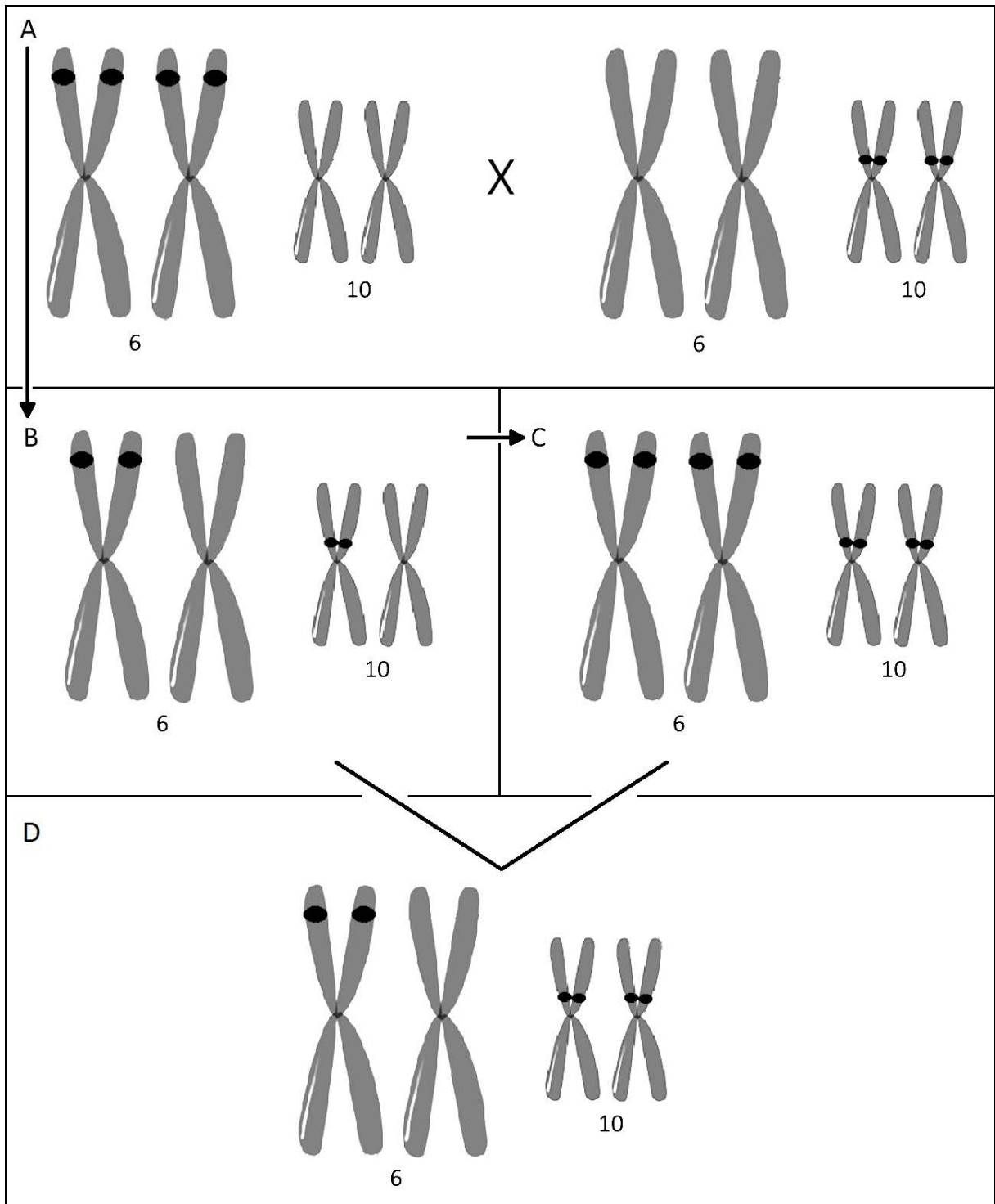


Figura 7: **A.** Intercruzamento de indivíduos de uma população com o gene U2 apenas na região 10bp proximal com indivíduos de uma população com o gene U2 apenas na região 6bp distal; **B.** População apresentando marcação em apenas um cromossomo de cada par; **C.** População apresentando marcação em ambos os cromossomos dos pares 6 e 10; **D.** População com marcação para o gene U2 em apenas um cromossomo do par 6 e ambos os cromossomos do par 10.

A terceira hipótese é que a ausência de sequências detectáveis por FISH em um dos cromossomos do par 6 em *L. labyrinthicus* de Rio Claro pode ser explicada por posterior deleção do gene snRNA U2 (Figura 8), sem alteração significativa na morfologia cromossômica, em indivíduos nos quais o gene U2, anteriormente, era encontrado em ambos os cromossomos nos pares 6 e 10 por ação de transposição por elementos móveis ou translocação recíproca parcial da sequência repetitiva.

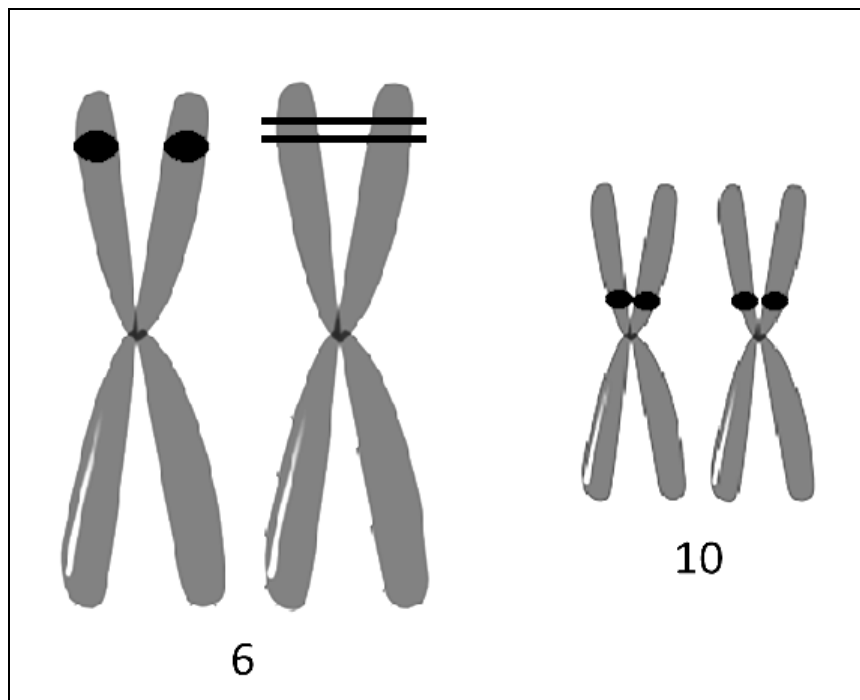


Figura 8: Deleção (=) do gene U2 na região 6bp distal em um dos cromossomos, sem alteração significativa na morfologia cromossômica em indivíduos que, anteriormente, apresentavam marcação do gene U2 nos pares 6 e 10.

Nossos resultados mostraram que o gene snRNA U2 é aplicável em análises de espécies do gênero *Leptodactylus* e indicam a possibilidade de aplicação do gene U2 como marcador também para estudos envolvendo outros gêneros de anfíbios anuros, bem como das demais Ordens da Classe Amphibia.

6 CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados demonstram a viabilidade de mapeamento do gene U2, revelando-o como um bom marcador citogenético para espécies do gênero *Leptodactylus* e, provavelmente, para outros grupos de anfíbios anuros. A aplicação da técnica poderá auxiliar nos estudos que visem à melhor compreensão sobre organização genômica e evolução cariotípica de anfíbios, representando um subsídio valioso no aprimoramento do conhecimento acerca das relações evolutivas das espécies no referido gênero, incluindo os atuais grupamentos de espécies. Na medida em que futuros dados citogenéticos poderão indicar espécies crípticas ou reconhecer entidades específicas em complexos de espécies, o conhecimento da diversidade da anurofauna brasileira poderá ser ampliado e, oportunamente, útil ao direcionamento de futuros planejamentos de conservação da biodiversidade.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, O.; BACCI, M.; LIMA, A.P.; ROSSA-FERES, D.C.; HADDAD, C.F.B.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Cladistics**, v. 23, n. 5, p. 455-463, 2007.

AMARO-GHILARDI, R.C.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal studies after differential staining and fluorescence in situ hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). **Caryologia**, v. 57, n. 1, 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: Journal of Herpetology**, v. 5, n. 2, p. 119-133, 2006.

ANJOS, A.; LORETO, V.; SOUZA, M.J. Chromosome mapping of ribosomal genes and histone H4 in the genus *Radacridium* (Romaleidae). **Genetics and molecular biology**, v. 36, n. 3, p. 336-340, 2013.

ANJOS, A. **Dinâmica evolutiva dos clusters de pequenos RNAs nucleares (RNAsn) nos cariótipos de espécies de gafanhotos com ênfase em Acrididae**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2014.

ARES, M.; MANGIN, M.; WEINER, A.M. Orientation-dependent transcriptional activator upstream of a human U2 snRNA gene. **Molecular and cellular biology**, v. 5, n. 7, p. 1560-1570, 1985.

ARRUDA, M.P.; MORIELLE-VERSUTE, E. Cytogenetic and random amplified polymorphic DNA analysis of *Leptodactylus* species from rural and urban environments (Anura, Amphibia). **Genetics and Molecular Research**, p. 161-176, 2008.

BALDISSERA JR, F.A.; OLIVEIRA P.S.L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Rev Bras Genet**, 16:335-345, 1993.

BARZOTTI, R.; PELLICCIA, F.; ROCCHI, A. Identification and characterization of U1 small nuclear RNA genes from two crustacean isopod species. **Chromosome Research**, v. 11, n. 4, p. 365-373, 2003.

BERNARDE, P.S.; SILVA, S.; GOMES-SILVA, D.A.P.; MELO, J.; NASCIMENTO, V. Ecologia e métodos de amostragem de répteis squamata. In: **Coletânea de textos: Manejo e monitoramento da fauna silvestre em florestas tropicais. Rio Branco, VIII Congresso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre na Amazônia e América Latina** p. 189-201, 2008.

BERNSTEIN, L.B.; MANSER, T.; WEINER, A.M. Human U1 small nuclear RNA genes: extensive conservation of flanking sequences suggests cycles of gene amplification and transposition. **Molecular and cellular biology**, v. 5, n. 9, p. 2159-2171, 1985.

BRANLANT, C.; KROL, A.; EBEL, J.P.; LAZAR, E.; HAENDLER, B.; JACOB, M. U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs. **EMBO J.** 1:1259-1265, 1982.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O.M.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66532, 2013.

BURKE, J.E. **The central role of the U2/U6 snRNA interaction in spliceosome structure and recycling**. 2012. 214 f. Dissertação (Doutorado em Bioquímica) - University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, EUA, 2012.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; VALENTE, G.T.; NAKAJIMA, R.T.; MARTINS, C. Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. **Chromosome research**, v. 20, n. 2, p. 279-292, 2012.

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

COELHO, A.C.; DE MATTOS, T.L.; VIANA, P.; TERCENIO, M.L.; SCHNEIDER, C.H.; MENIN, M.; GROSS, M.C. Intra-generic and interspecific karyotype patterns of *Leptodactylus* and *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae) with inclusion of five species from Central Amazonia. **Genetica**, v. 144, n. 1, p. 37-46, 2016.

COLGAN, D.J.; MCLAUCHLAN, A.; WILSON, G.D.F.; LIVINGSTON, S.P.; EDGEcombe, G.D.; MACARANAS, J.; CASSIS, G.; GRAY, M.R. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Australian Journal of Zoology**, v. 46, n. 5, p. 419-437, 1998.

DAHLBERG, J.E.; LUND, E. The genes and transcription of the major small nuclear RNAs. In: *Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles*. Springer Berlin Heidelberg, p. 38-70, 1988.

DE SÁ, R.O.; GRANT, T.; CAMARGO, A.; HEYER, W.R.; PONSSA, M.L.; STANLEY, E. Systematics of the neotropical genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae): phylogeny, the relevance of non-molecular evidence, and species accounts. **South American Journal of Herpetology**, v. 9, p. S1-S128, 2014.

DINIZ, P.C. Métodos de amostragem da herpetofauna: algumas dicas e orientações para estudantes e profissionais com pouca ou nenhuma experiência de campo. **Acervo da Iniciação Científica**, n. 1, 2015.

DJEBALI, S.; DAVIS, C.A.; MERKEL, A.; DOBIN, A.; LASSMANN, T.; MORTAZAVI, A.; ...; GINGERAS, T.R. Landscape of transcription in human cells. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 101-108, 2012.

DUELLMAN W.E.; TRUEB, L. Biology of amphibians. **Johns Hopkins University Press**, Baltimore, 789 p., 1994.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, C.F.B.; GARCIA, P.C.A.; FROST, D.R.; CAMPBELL, J.A.; WHEELER, W.C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of natural History**, p. 1-240, 2005.

FINNEGAN, D.J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends in genetics**, v. 5, p. 103-107, 1989.

FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Access: 24/08/2016). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. **American Museum of Natural History**, New York, USA, 2016.

FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.; HAAS, A.; HADDAD, C.F.B.; DE SÁ, R.O.; DONNELLAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.; WILKINSON, M.; CHANNING, A.; CAMPBELL, J.A.; BLOTTO, B.L.; MOLER, P.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.A.; LYNCH, J.D.; GREEN, D.; WHEELER, W.C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of natural History**, p. 1-291, 2006.

GAZONI, T. **Diversidade cariotípica e molecular de *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) e obtenção de sondas cromossomoespecíficas de anfíbio por citometria de fluxo**. 2015. 85 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2015.

GAZONI, T. **Marcadores Citológicos no Cariótipo de Espécies de *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) Analisado com Técnicas de Citogenética Clássica e Molecular**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2011.

GAZONI, T.; GRUBER, S.L.; SILVA, A.P.Z.; ARAUJO, O.G.S.; NARIMATSU, H.; STRUSSMANN, 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, n. 1, p. 109, 2012.

GRANT, T.; FROST, D.R.; CALDWELL, J.P.; GAGLIARDO, R.; HADDAD, C.F.B.; KOK, P.J.R.; MEANS, D.B.; NOONAN, B.P.; SCHARGEL, W.E.; WHEELER, W.C. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). **Bulletin of the American Museum of natural History**, p. 1-262, 2006.

GREEN, D.M.; SESSIONS, S.K. Karyology and cytogenetics. **Amphibian Biology**, v. 7, p. 2756-2841, 2007.

GUERRA, M. FISH: Conceitos e aplicações na citogenética. **Sociedade Brasileira de Genética**, 2004.

HEDGES, S.B.; DUELLMAN, W.E.; HEINICKE, M.P. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. **Magnolia Press**, 2008.

HEYER, W.R. The adaptive ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution**, p. 421-428, 1969.

HODNETT, J.L.; BUSCH, H. Isolation and characterization of uridylic acid-rich 7 S ribonucleic acid of rat liver nuclei. **Journal of Biological Chemistry**, 243(24), 6334-6342, 1968.

KING, M. Amphibia. **Gebrüder Borntraeger**, 1990.

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

LOURENÇO, A.C.C.; ZINA, J.; CATROLI, G.F.; KASAHARA, S.; FAIVOVICH, J.; HADDAD, C.F.B. A new species of the *Scinax catharinae* group (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 4154, n. 4, p. 415-435, 2016.

LOURENÇO, L.B.; BACCI, M.; MARTINS, V.G.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; HADDAD, C.F.B. Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). **Genetica**, v. 132, n. 3, p. 255-266, 2008.

LUND, E.; BOSTOCK, C.; ROBERTSON, M.; CHRISTIE, S.; MITCHEN, J. L.; DAHLBERG, E. U1 small nuclear RNA genes are located on human chromosome 1 and are expressed in mouse-human hybrid cells. **Molecular and cellular biology**, v. 3, n. 12, p. 2211-2220, 1983.

LUND, E.; NESBITT, M.N. The embryonic and adult mouse U1 snRNA genes map to different chromosomal loci. **Somatic cell and molecular genetics**, v. 14, n. 2, p. 143-148, 1988.

MANCHADO, M.; ZUASTI, E.; CROSS, I.; MERLO, A.; INFANTE, C.; REBORDINOS, L. Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. **Genome**, v. 49, n. 1, p. 79-86, 2006.

MARTINS, C.; GALETTI JR, P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, n. 5, p. 363-367, 1999.

MATERA, A.G.; WEINER, A.M.; SCHMID, C.W. Structure and evolution of the U2 small nuclear RNA multigene family in primates: gene amplification under natural selection?. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 11, p. 5876-5882, 1990.

MATTAJ, I.W.; ZELLER, R. *Xenopus laevis* U2 snRNA genes: tandemly repeated transcription units sharing 5' and 3' flanking homology with other RNA polymerase II transcribed genes. **The EMBO journal**, v. 2, n. 11, p. 1883, 1983.

MAXSON, R.; COHN, R.; KEDES, L.; MOHUN, T. Expression and organization of histone genes. **Annual review of genetics**, v. 17, n. 1, p. 239-277, 1983.

MURAMATSU, M.; HODNETT, J.L.; BUSCH, H. Base composition of fractions of nuclear and nucleolar ribonucleic acid obtained by sedimentation and chromatography. **Journal of Biological Chemistry**, 241(7), 1544-1550, 1966.

NAKAMURA, T.; PRESTAYKO, A.W.; BUSCH, H. Studies on nucleolar 4 to 6 S ribonucleic acid of Novikoff hepatoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, 243(7), 1368-1375, 1968.

NEI, M.; ROONEY, A.P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual review of genetics**, v. 39, p. 121, 2005.

NILSEN, T.W.; GRAVELEY, B.R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 457-463, 2010.

PALACIOS-GIMENEZ, O.M.; CASTILLO, E.R.; MARTÍ, D.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

POLETTI, A.B.; FERREIRA, I.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; NAKAJIMA, R.T.; MAZZUCHELLI, J.; RIBEIRO, H.B.; VENERE, P.C.; NIRCHIO, M.; KOCHER, T.D.; MARTINS, C. Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. **BMC genetics**, v. 11, n. 1, p. 1, 2010.

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 Phylogenetics and Evolution**, v. 61, n. 2, p. 543-583, 2011.

REDDY, R.; D. HENNING, P. EPSTEIN, AND H. BUSCH. 1981. Primary and secondary structure of U2 snRNA. **Nucleic Acids Res.** 9:5645-5658, 1981.

ROESSER, J.R. Both U2 snRNA and U12 snRNA are required for accurate splicing of exon 5 of the rat calcitonin/CGRP gene. **Rna**, v. 10, n. 8, p. 1243-1250, 2004.

RITCHIE, D.B.; SCHELLENBERG, M.J.; MACMILLAN, A.M. Spliceosome structure: piece by piece. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1789, n. 9, p. 624-633, 2009.

SCHMID M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, 66:361-388, 1978.

SCHUL, W.; VAN DRIEL, R.; DE JONG, L. Coiled bodies and U2 snRNA genes adjacent to coiled bodies are enriched in factors required for snRNA transcription. **Molecular biology of the cell**, v. 9, n. 5, p. 1025-1036, 1998.

SEGALLA, M.V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C.A.G.; GRANT, T.; HADDAD, C.F.B.; GARCIA, P.C.A.; BERNECK, B.V.M.; LANGONE, J. Brazilian amphibians: List of species. São Paulo, Brasil (Access: 19/09/2016). Electronic Database accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, 2016.

- SILVA, A.P.; 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, n. 402, p. 25-38, 1999.
- SILVA, A.P.Z.; GARCIA, P.C.; MARTINS, V.G.; BACCI, M.; KASAHARA, S. Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. gracilis delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. **Amphibia-Reptilia**, v. 25, n. 2, p. 185, 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, n. 1-3, p. 35-44, 2006.
- SUÁREZ, P. **Estudos cromossômicos em anuros das famílias Hyliidae Rafinesque, 1815 e Leptodactylidae Werner, 1896 (Amphibia: Anura)**. 2010. 132 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.
- TARGUETA, C. P.; RIVERA, M.; SOUZA, M.B.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; LOURENÇO, L.B. Cytogenetic contributions for the study of the Amazonian *Engystomops* (Anura; Leiuperidae) assessed in the light of phylogenetic relationships. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 54, n. 3, p. 709-725, 2010.
- ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M.A.; PALAZÓN, J.L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica**, v. 138, n. 7, p. 787-794, 2010.
- UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P.C.; PANSONATO-ALVES, J.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae): evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. **Cytogenetic and genome research**, v. 142, n. 4, p. 286-292, 2014.
- VALADKHAN, S. snRNAs as the catalysts of pre-mRNA *splicing*. **Current opinion in chemical biology**, v. 9, n. 6, p. 603-608, 2005.
- VAN ARSDELL, S.W.; WEINER, A.M. Human genes for U2 small nuclear RNA are tandemly repeated. **Molecular and cellular biology**, v. 4, n. 3, p. 492-499, 1984.
- WILEY, J.E.; MEYNE, J.; LITTLE, M.L.; STOUT, J.C. Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence on the chromosomes of some North American hylid frogs. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 61, n. 1, p. 55-57, 1992.
- WILL, C.L.; LÜHRMANN, R. Spliceosome structure and function. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 7, p. a003707, 2011.
- ZAVANELLI, M.I.; ARES, M. Efficient association of U2 snRNPs with pre-mRNA requires an essential U2 RNA structural element. **Genes & development**, v. 5, n. 12b, p. 2521-2533, 1991.

**AVALIAÇÃO DO USO DE SEQUÊNCIAS DE *snDNA* U2 COMO MARCADOR
CITOGENÉTICO NOS ESTUDOS DE EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA DE
Leptodactylus (AMPHIBIA, ANURA, LEPTODACTYLIDAE)**

NATHÁLIA SEPULVEDA DORIGON

Orientadora: Patricia Pasquali Parise Maltempi

Co-orientador: Thiago Gazoni

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

Rio Claro

2016