

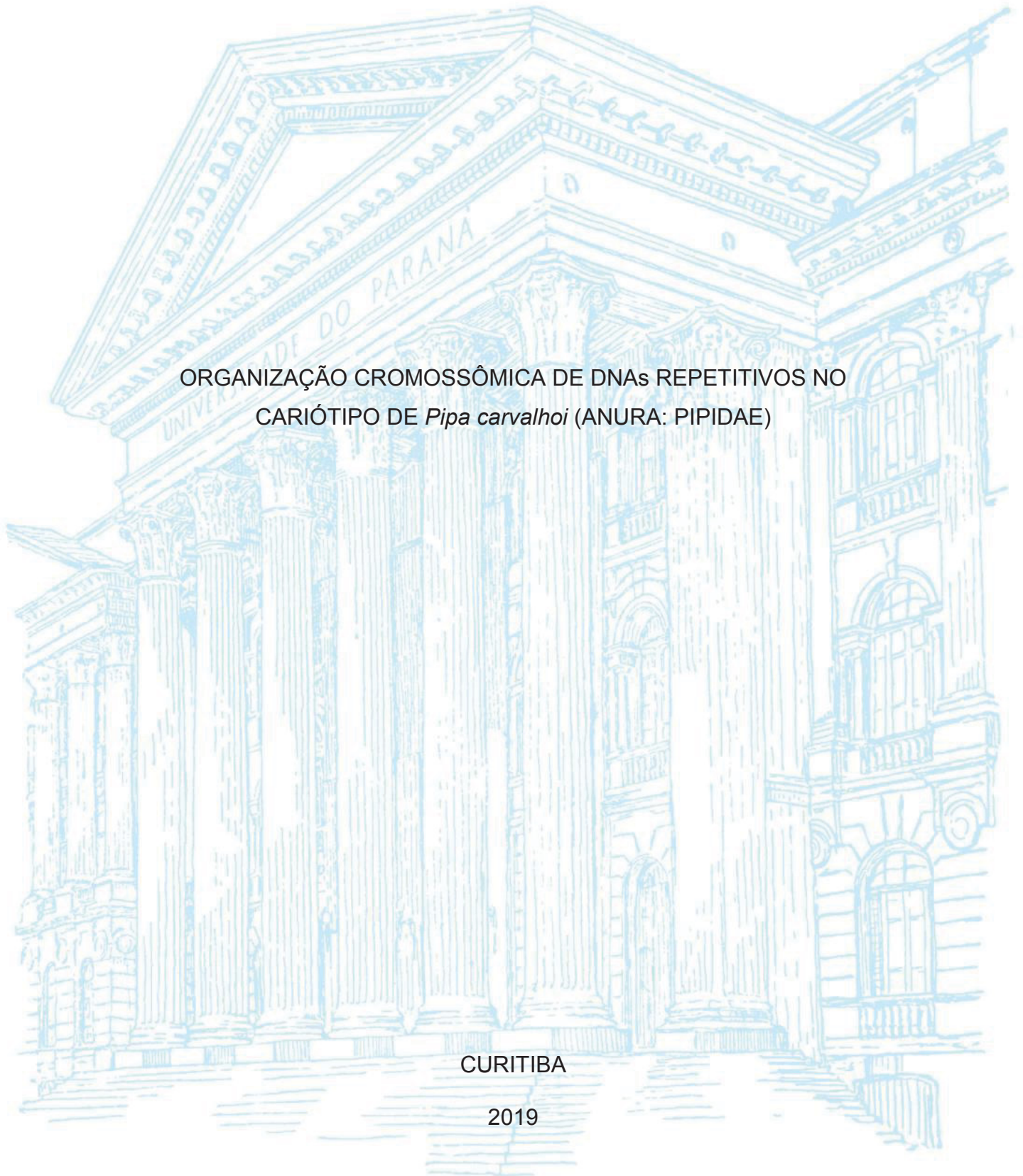
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELLE LOUISE ZATTERA

ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE DNAs REPETITIVOS NO
CARIÓTIPO DE *Pipa carvalhoi* (ANURA: PIPIDAE)

CURITIBA

2019



MICHELLE LOUISE ZATTERA

ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE DNAs REPETITIVOS NO
CARIÓTIPO DE *Pipa carvalhoi* (ANURA: PIPIDAE)

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Genética, no curso
de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi
Coorientador: Dr. Thiago Gazoni

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Zattera, Michelle Louise

Organização cromossômica de DNAs repetitivos no cariótipo de *Pipa carvalhoi* (Anura: Pipidae). / Michelle Louise Zattera. – Curitiba, 2019.
93 p.: il.

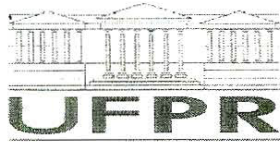
Orientador: Daniel Pacheco Bruschi

Coorientador: Thiago Gazoni

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Anuros 2. Elementos de DNA transponíveis 3. Repetições de microssatélites 4. Sequências repetitivas dispersas I. Título II. Bruschi, Daniel Pacheco III. Gazoni, Thiago IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 591.15



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MICHELLE LOUISE ZATTERA** intitulada: **Organização cromossômica de DNAs repetitivos no cariótipo de *Pipa carvalhoi* (Anura, Pipidae)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Março de 2019.

DANIEL PACHECO BRUSCHI
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARCELO RICARDO VICARI
Avaliador Interno (UEPG)

KALINE ZIEMNICZAK
Avaliador Externo (UNESPAR)

*Dedico esta dissertação para as cinco
mulheres às quais eu devo absolutamente
tudo: Maria, Amanda, Ariete, Mercedes e
Lara. Vocês são minhas mais profundas
raízes.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a CAPES, pelo apoio financeiro durante o mestrado.

À UFPR, o departamento de Genética e ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência da UFPR por fornecer todo o suporte técnico necessário.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi que aceitou me pegar pela mão e me ensinar tanto, em tão pouco tempo, como profissional e como ser humano.

Ao meu co-orientador, Dr. Thiago Gazzoni, à Prof. Dr. Patrícia Parise Maltempi, Marcello, Jeffersson e toda a equipe do laboratório da UNESP – Rio Claro, por terem me acolhido tão bem e terem me ajudado tanto.

Toda a equipe do laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese ambiental, em especial à Amanda, Fernanda, Iraine, Joana, Deborah, Gi Bueno, Julia e Camilla: dizem que nós somos a soma das cinco pessoas com as quais mais convivemos, minha conta passa disso, porém, tenho muito orgulho em pensar que sou um pouco da soma de todos vocês.

À todas as pessoas que tenho sorte de ter como amigos, aqui e nos quatro cantos desse país. Obrigada pelo apoio incondicional, por vibrarem comigo em cada conquista e por respeitarem minhas ausências nesses dois anos.

À toda minha família, em especial Tia Ari, Nonna Mercedes e Amanda, que nunca deixaram nada além de palavras de apoio incondicional entrarem no meu coração. Mãe, você é minha razão de tudo e para tudo, obrigada por estar do meu lado em cada passo do caminho e apoiar todos os meus sonhos mais malucos. Você é pura força e me inspira a sempre dar o melhor de mim.

À Deus e Nossa Senhora que sempre se fizeram constantes na minha vida, e a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para essa dissertação. Muito obrigada!

*“me levanto
sobre o sacrifício
de um milhão de mulheres que vieram antes
e penso
o que é que eu faço
para deixar esta montanha mais alta
para que as mulheres que vierem depois
de mim possam ver além*

- Legado”.

- Rupi Kaur

RESUMO

A espécie *Pipa carvalhoi* (MIRANDA-RIBEIRO, 1937) pertence à família Pipidae, dentro do gênero *Pipa* que possui apenas dois cariótipos completamente descritos e estes apresentam uma variação cariotípica de $2n=22$ (*Pipa pipa*) e $2n=30$ (*Pipa parva*). Os espécimes de *Pipa* são os únicos representantes não africanos desta família, sendo que a separação das demais linhagens ocorreu devido ao evento vicariante da separação de Gondwana, onde o gênero *Xenopus*+*Silurana* permaneceu na região da atual África. As sequências repetitivas de DNA, em *tandem* e dispersas no genoma representam grande parte do genoma dos eucariotos e são componentes importantes na evolução cariotípica das espécies. O presente trabalho teve por objetivo realizar a descrição cariotípica da espécie de *P. carvalhoi* de populações da Bahia e Pernambuco, Brasil, bem como, analisar a organização de sequências repetidas em *tandem* (microsatélites, snoRNA U2 e histona H3), nos cariótipos de *P. carvalhoi* e *X. tropicalis* e dispersas no genoma (transposon de DNA hAT) no cariótipo de *P. carvalhoi*. Para a descrição do cariótipo foram utilizados métodos de coloração convencional, como giemsa, bandamento – C, coloração com fluorocromos e impregnação por nitrato de prata (Ag-NOR) e, para determinação da localização/organização das sequências de DNA repetitivo, foi utilizado o método de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). O número diplóide de *P. carvalhoi* encontrado foi de $2n=20$, possuindo pares metacêntricos (1, 4, 8), submetacêntricos (2 e 7), subtelo-cêntricos (3, 5, 6), e telocêntricos (9 e 10). Blocos de heterocromatina estão localizados principalmente nas regiões centroméricas dos cromossomos e a NOR foi detectada no cromossomo 9 deste cariótipo. Experimentos de FISH detectaram a presença de sequências teloméricas intersticiais (ITS), bem como clusters de U2 snRNA e histona H3, sendo estes dois últimos encontradas em posições conservadas entre *P. carvalhoi* e *X. tropicalis*. Sondas de microsatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (GATA)₈, (CGC)₁₀, (CAG)₁₀, (GAA)₁₀, (GACA)₄, mapeadas em *P. carvalhoi* e *Xenopus tropicalis*, foram encontradas majoritariamente na região terminal dos cromossomos, com exceção de (CA)₁₅ e (GA)₁₅ em *P. carvalhoi* que foram encontrados mais em regiões centroméricas. Sondas de (GAA)₁₀, (GACA)₄ foram detectadas apenas em *P. carvalhoi*, o que indica um possível marcador cromossômico para essa espécie. Finalmente, foi detectada pela primeira vez cópias do elemento genético móvel de classe II (transposons) da família hAT na espécie de *P. carvalhoi*. Os resultados deste trabalho descrevem o cariótipo e a organização cromossômica de algumas classes de DNAs repetitivos de *P. carvalhoi*, demonstrando que elementos como snoRNA U2 e histona H3 são conservados entre as espécies e podem vir a ser utilizados como marcadores cromossômicos para estudo de evolução cariotípica dentro deste grupo, ao passo que microsatélites se apresentaram de maneira distinta evidenciando a evolução destas sequências de maneira independente. A presença de ITS, ainda, parece não indicar rearranjo cromossômico, podendo ter surgido de maneira independente dentro deste grupo.

Palavras-chave: *Amphibia*, DNA repetitivo, elementos transponíveis, sequência telomérica intersticial (ITS), FISH.

ABSTRACT

The species *Pipa carvalhoi* (MIRANDA-RIBEIRO, 1937) belongs to Pipidae, within the *Pipa* genus that has only two completely described karyotypes and these present a karyotype variation of $2n=22$ (*Pipa pipa*) and $2n=30$ (*Pipa parva*). The specimens of *Pipa* are the only non-African representatives of this family, and the separation of the other lineages occurred due to the vicariant event of the separation of Gondwana where the genus *Xenopus* + *Silurana* remained in the region of present-day Africa. Repetitive DNA sequences *in tandem* and dispersed in the genome represent a large part of the eukaryotic genome and are important components in the karyotype evolution of the species. This study aimed to perform the karyotypic description of the *P. carvalhoi* species from Bahia and Pernambuco, Brazil, as well as to analyze the organization of repeated sequences *in tandem* (microsatellites, snoRNA U2, and histone H3) in the karyotypes of *P. carvalhoi* and *X. tropicalis* and dispersed in the genome (transposon of DNA hAT) into the *P. carvalhoi* karyotype. For the description of the karyotype, conventional staining methods such as giemsa, C - banding, fluorochrome staining, and silver nitrate impregnation (Ag-NOR) were used and, to determine the location/organization of the repetitive DNA sequences, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) method was applied. The diploid number of *P. carvalhoi* found was $2n=20$, with metacentric (1, 4, 8), submetacentric (2 and 7), subtelocentric (3, 5, 6), and telocentric (9 and 10) pairs. Heterochromatin blocks are located mainly in centromeric regions of chromosomes and the NOR site was detected on chromosome 9 of this karyotype. FISH experiments detected the presence of interstitial telomeric (ITS) sequences in *P. carvalhoi* and as clusters of U2 snRNA and histone H3 were found in conserved positions between *P. carvalhoi* and *X. tropicalis*. Microsatellite probes (CA)₁₅, (GA)₁₅, (GATA)₈, (CGC)₁₀, (CAG)₁₀, (GAA)₁₀, (GACA)₄, mapped on *P. carvalhoi* and *Xenopus tropicalis*, were found predominantly in the terminal region of the chromosomes, except for (CA)₁₅ and (GA)₁₅ in *P. carvalhoi* that were found more in centromeric regions. Probes of (GAA)₁₀, (GACA)₄ were not detected only in *P. carvalhoi*, indicating a possible chromosomal marker for this species. Finally, copies of class II (transposons) mobile genetic element of the *hAT* family were detected for the first time in *P. carvalhoi* species. The results of this work describe the karyotype and the chromosomal organization of some classes of repetitive DNA of *P. carvalhoi*, demonstrating that elements such as snoRNA U2 and histone H3 are conserved among the species and can be used as chromosomal markers for study of karyotype evolution within this group, whereas microsatellites presented in a distinct way evidencing the evolution of these sequences independently. The presence of ITS does not appear to indicate chromosomal rearrangement and may have arisen independently within this group.

key words: *Amphibia*, repetitive DNA, interstitial telomeric sequences (ITS), transposable element, FISH.

LISTA DE FÍGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1 - Karyotype of *P. carvalhoi*, prepared by conventional Giemsa staining (**A**) and C-banding (**B**), followed by DAPI staining (**C**). The arrow indicates the NOR site.....31

FIGURA 2 - (**A**) Karyotype of *P. carvalhoi* from Bahia, Brazil, hybridized with the 28S rDNA probe. In (**B**), note the NOR-bearing chromosome highlighted by DAPI-staining, the Ag-NOR method, and FISH with 28S rDNA. (**C**) *In situ* hybridization with the telomeric probe in the karyotype of *Pipa carvalhoi* from Pernambuco, Brazil.....32

CAPÍTULO II

FIGURA 1 - Cromossomos metafásicos de *Pipa carvalhoi* submetidos ao experimento de hibridação *in situ* fluorescente com as sondas de U2 snRNA (**A**) e histona H3 (**B**). Em destaque, pares cromossômicos portadores de sinais de hibridação detectados em ambas as cromátides de cada homólogo.....46

FIGURA 2 - Cromossomos metafásicos de *Pipa carvalhoi* (**A, B, C**) e *Xenopus tropicalis* (**D, E, F**) submetidos aos experimentos de hibridação *in situ* fluorescente com sondas de repetições microssatélites com motivos (GA)₁₅ (**A e D**), (CA)₁₅ (**B e E**) e (GATA)₈ (**C e F**). As setas indicam pequenos sinais de hibridação, detectados em regiões não terminais dos cromossomos.....49

FIGURA 3 - Cromossomos metafásicos de *Pipa carvalhoi* (**A, B**) e *Xenopus tropicalis* (**D, E**) submetidos aos experimentos de hibridação *in situ* fluorescente com sondas de repetições microssatélites com motivos (CAG)₁₀ (**A e E**), (CCG)₁₀. As setas indicam pequenos sinais intersticiais de hibridação, detectados nos cromossomos.....50

FIGURA 4 - Cromossomos metafásicos de *Pipa carvalhoi* submetidos aos experimentos de hibridação *in situ* fluorescente com sondas de repetições

microsatélites com motivos (GACA)₄ **(A)** e (GAA)₁₀ **(B)**. As setas indicam sinais intersticiais de hibridação detectados nos cromossomos.....51

CAPÍTULO III

FIGURA 1- Alinhamento e representação esquemática do elemento de transposição da família *hAT* baseado nas cópias isoladas do genoma de *Pipa carvalhoi*. **(A)** alinhamento do clone *Pcarvalhoi_clone17* com os contigs recuperados do genoma da referida espécie. Em rosa estão as TSDs, amarelo representa as TIRs e cinza representa a sequência nucleotídica do elemento. **(B)** Representação esquemática do elemento. Nucleotídeos em vermelho na TSD representa SNPS detectados.....67

FIGURA 2 - Cromossomos metafásicos de *P. carvalhoi* submetidos à FISH com sonda do elemento de transposon de DNA *hAT*. Setas indicam pequenos sinais de hibridação, detectados em ambas as cromátides de alguns pares cromossômicos.....68

FIGURA 3- Ideograma representando pares cromossômicos com sinais de hibridação com as sondas do elemento *hAT* isolado e clona a partir do DNA genômico de *P. carvalhoi*. Reportamos a presença de sinais de hibridação com repetições (TTAGGG)_n (ver legenda) e indicamos os locais de hibridação dos motivos de microsatélites [(CA)₁₅ e (GA)₁₅], de acordo com Zattera *et al.* (Capítulos I e II, respectivamente). Todos os sítios representam blocos de heterocromatina detectados por bandamento C seguindo Zattera *et al* (em preparação – capítulo I).....70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1: Detailed cytogenetic data available for species of the Pipidae family. NOR: Nucleolar Organizer Region; M= metacentric; SM= submetacentric; ST=subtelocentric; T=telocentric; p= short arm; q=long arm; (--) no data.....35

CAPÍTULO II

TABELA 1 - Motivos microssatélite hibridados no cariótipo de *P. carvalhoi* e *X. tropicalis*. Asteriscos (*) representam a presença de sinais de hibridação em todos os pares do cariótipo, (-) ausência de marcação, Cen= marcação na região centromérica, Per= marcação pericentromérica, Int= marcação intersticial; Subt=marcação subterminal; “p”= braços curtos; “q”=braços longos.....48

CAPÍTULO III

TABELA 1- Análise comparativa da identidade do clone isolado do genoma de *P. carvalhoi* (*Pcarvalhoi_clone17*) em relação aos *contigs* recuperados do genoma da referida espécie (colunas 1 e 2) e sua comparação quanto à similaridade (%) do melhor hit recuperado no REPBASE. Valores de identidade (%) recuperados de comparações realizadas no BLAST. A análise de presença e tamanho (pb) de repetições invertidas terminais (TIRs) também é fornecida. XT: *Xenopus tropicalis*; (-):ausência de TIRs.....66

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

2n - número diplóide

Ag-NOR- impregnação por nitrato de prata

BLAST – *basic local alignment search tool*

CGH- hibridação genômica comparativa

DBS- *double – strand breaks*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Eu- ITS – *euchromatic Interstitial Telomeric Sequences*

Het – ITS – *Heterochromatic Interstitial Telomeric Sequences*

FISH – Hibridação *in situ* fluorescente

IGS – Espaçadores intergênicos

ITS – *Interstitial Telomeric Sequences*

SnoRNA - *Small nucleolar RNAs*

LTR- Longas repetições terminais

NCBI – *National Center for biotechnology information*

NOR – Regiões organizadoras de nucléolos

NTS- espaçador interno não transcrito

ORF- *Open reading frame*

pb – Pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

rDNA – DNA ribossomal

rRNA- RNA ribossomal

SatDNA - DNA satélite

SNPs- *single nucleotide polymorphism*

STR – *Shot tandem repeats*

TE- Elemento transponível

TIR - repetições terminais invertidas

TDS – *target site duplication*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 AS SEQUÊNCIAS DE DNA REPETITIVO	17
2.1.1 As sequências repetitivas organizadas em tandem.....	18
2.1.2 As sequências repetitivas dispersas no genoma.....	18
2.2. DA CLÁSSICA À GENÔMICA: DIVERSIDADE DE FERRAMENTAS NO ESTUDO DA EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ANUROS.....	20
2.3 A FAMÍLIA PIPIDAE E <i>Pipa carvalhoi</i> COMO MODELO DE ESTUDO	22
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.1.1 Objetivos específicos	26
CAPÍTULO I	27
1. ABSTRACT.....	27
2. INTRODUCTION.....	28
3. MATERIAL AND METHODS	29
4. RESULTS.....	31
5. DISCUSSION.....	33
6. CONCLUSION	40
CAPÍTULO II	41
1. RESUMO	41
2. INTRODUÇÃO	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4. RESULTADOS.....	46
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	58
CAPÍTULO III	59
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAL E MÉTODOS	62
3. RESULTADOS.....	64
4. DISCUSSÃO	68
4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS	75

1.INTRODUÇÃO

A família Pipidae, da ordem Anura, reúne atualmente quatro gêneros: *Hymenochirus* (Boulenger, 1896), *Pipa* (Laurenti, 1768), *Pseudohymenochirus* (Chabanaud, 1920) e *Xenopus* (Wagler, 1827) (FROST, 2019), com representantes encontrados na África e na América, sendo considerado monofilético, onde as espécies do gênero *Pipa* são os únicos representantes da família não-africanos (CANNATELLA e TRUEB, 1988; IRISARRI et al., 2011). Dentro do gênero *Pipa* somente duas espécies possuem o número diploide conhecido e o cariótipo descrito, sendo *P. parva* apresenta $2n=30$ (MORESCALCHI, 1968) e *P. pipa* $2n=22$ cromossomos (WICKBOM, 1950, MORESCALCHI, 1968).

As sequências de DNA repetitivo se encontram de maneira significativa no genoma dos organismos e estas podem ser organizadas em *tandem* ou se encontrarem dispersas no genoma, sendo estas últimas conhecidas como elementos transponíveis (TEs). Os TEs podem estar envolvidos na evolução cromossômica de alguns organismos ao promoverem rearranjos cromossômicos, como deleções, duplicações e translocações, logo, a identificação destas sequências é valiosa para estudos de citogenética evolutiva (NASCIMENTO et al., 2015). As sequências repetidas em *tandem* são bastante utilizadas para estudos como marcadores cromossômicos, porém, sua localização e distribuição ainda precisam ser melhor compreendidas em grande parte dos organismos (RUIZ-RUANO et al., 2015).

Portanto, estudos que visem explorar o desenvolvimento de marcadores cromossômicos de sequências de DNAs repetitivos, bem como, promover uma melhor compreensão da localização e distribuição dessas sequências, são importantes para o entendimento dos processos evolutivos que podem estar ocorrendo dentro desse gênero. Este trabalho teve como objetivo, portanto, descrever cariotipicamente a espécie *Pipa carvalhoi* e observar a organização destas sequências de DNA repetitivo dentro desta espécie, bem como de *Xenopus tropicalis*, grupo-irmão, de *Pipa* para buscar desenvolver marcadores moleculares que permitam estudar mais profundamente a evolução cariotípica do grupo em estudos futuros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AS SEQUÊNCIAS DE DNA REPETITIVO

O termo "sequências repetitivas" refere-se a fragmentos de DNA que estão presentes em múltiplas cópias no genoma (MEHROTRA; GOYAL, 2014) e a análise deste DNA repetitivo tornou-se parte integrante dos estudos das sequências de DNA eucariótico embora sua função não seja, ainda, completamente compreendida (JURKA et al., 2005; BISCOTTI, OLMO., 2015)

Estas sequências estão presentes na maioria dos organismos em uma proporção variável e, em alguns deles representam o componente mais abundante do genoma (GARBUS et al., 2015). A quantidade e a complexidade das sequências de DNA repetitivo variam de espécie para espécie. Normalmente, espécies que apresentam os maiores genomas costumam possuir também, maior quantidade destas sequências repetitivas (KIDWELL et al., 2002; GARBUS et al., 2015).

Estudos sugerem o envolvimento destas sequências no processo de replicação do DNA, recombinação e na regulação da expressão gênica (BIET et al., 1999; LIU et al., 2001; LI et al., 2002), além de estarem envolvidas no funcionamento do centrômero, formação da heterocromatina, regulação da cromatina e de genes ligados ao X em *Drosophila* (KUHN et al, 2015). Essas sequências repetitivas dos cromossomos podem, também, ser encontradas em pontos de ocorrência de rearranjos cromossômicos sendo responsáveis, em grande parte, pela variedade cariotípica que pode ser observada nos mais diversos grupos animais e vegetais (KIDWELL, 2002; FRESCHOTTE et al., 2007; GONZÁLEZ et al., 2012).

Mas, para entendermos de maneira efetiva a evolução, comportamento e potencial funcional das sequências repetitivas dentro do genoma dos eucariotos, é necessário um conhecimento acerca da distribuição, organização genômica e cromossômica, e origem evolutiva destas sequências (PLOHL, 2010). Estes DNAs repetitivos são, ainda, divididos em duas classes: (1) **repetições em tandem**, representados principalmente por DNAs microssatélites, minissatélites e satélites, além de algumas famílias multigênicas importantes (e.g., genes de rDNA e de histonas) e (2) **repetições dispersas** que são representados pelos elementos genéticos móveis

(*Transposable Elements* - TEs) presentes no genoma, elementos que são capazes de realizar sua transposição dentro do mesmo (JURKA et al., 2005; BISCOTTI; OLMO, 2015).

2.1.1 SEQUÊNCIAS REPETITIVAS ORGANIZADAS EM TANDEM

As sequências organizadas em *tandem* são caracterizadas por apresentar uma sequência de nucleotídeos repetidas de maneira adjacente e na mesma orientação, em um padrão conhecido como *head to tail* ou “cabeça para cauda” (ZHOU et al., 2014).

Tradicionalmente, essas repetições são categorizadas de acordo com o tamanho de sua unidade, podendo ser divididas em (i) microssatélites (*short tandem repeats* ou STRs, 1-6 bp, 1-10 em algumas publicações), (ii) minissatélites (10 a aproximadamente 100 pb) e (iii) DNA satélite (unidades repetidas de > 100 pb) (MAYER *et al*, 2010). Tratando-se dos DNA satélite (satDNA), essas sequências estão preferencialmente na região centromérica, pericentromérica e subtelomérica dos cromossomos, mas também são encontrados em posições intersticiais (PLOHL et al., 2012; BISCOTTI; OLMO., 2015).

Algumas dessas repetições em *tandem* são encontradas, também, em famílias multigênicas, que consistem em um grupo de genes que descendem de um gene ancestral comum e, portanto, têm funções semelhantes e sequências de DNA similares (NEI e RONNEY, 2006), como é o caso dos genes de DNAs ribossomais, por exemplo.

Os genes de DNA ribossomais (rDNA), sendo seu produto (rRNAs) os componentes básicos das subunidades ribossomais, estão organizados em famílias multigênicas e na grande maioria dos eucariotos esses genes de rDNA são classificados em duas classes: os de rDNA 45s, que transcrevem os rRNAs 18S, 5.8S e 28S, e a família de rDNA 5S que transcreve o rRNA 5S (MARTINS, 2004). O rDNA 5s contém uma região de 120pb conservada e um espaçador interno não transcrito, que possui tamanho e sequência nucleotídica bastante variável entre as espécies (BARCISZEWSKA et al., 2001; CASTRO et al., 2016).

Outra família multigênica importante compreende os genes que codificam para as histonas, que são componentes essenciais para o empacotamento do DNA em cromatina, um processo primordial em todas as células (FRANSZ; DE JONG, 2011). As histonas são as principais proteínas organizadoras da cromatina e estão envolvidas em sua estrutura e função, além de estarem envolvidas na regulação da expressão gênica, e representam componentes evolutivamente bem conservados entre os eucariotos (THATCHER; GOROVSKY, 1994; SIVIERO et al., 2016).

2.1.2 SEQUÊNCIAS REPETITIVAS DISPERSAS NO GENOMA

Os elementos genéticos móveis, também conhecidos como elementos transponíveis (TE), são sequências de DNA repetitivo que se encontram dispersas no genoma e possuem a capacidade de se mover, se transpor, no genoma no qual está presente (BOWEN, JORDAN, 2002).

Os elementos transponíveis podem ser divididos em duas classes, de acordo com a maneira com que sua mobilidade é realizada dentro do genoma. Os elementos de classe I, conhecidos como retrotransposons, são sequências de DNA que necessitam de um intermediário de RNA para conseguir se transpor. Já os elementos de classe II (transposons de DNA) conseguem se mover sem este intermediário, utilizando mecanismos como “copia e cola” e/ou replicação por círculo rolante, por exemplo (WICKER et al., 2007; REBOLLO et al., 2012).

Elementos retrotransponíveis, que codificam a enzima transcriptase reversa, transcrevem o RNA em cDNA para produção de novas cópias do retroelemento. Como a cópia original não é excluída do genoma, acaba ocorrendo uma duplicação deste material. Essa duplicação e subsequente inserção em um novo sítio genômico, também chamada de retrotransposição, é amplamente responsável pelo alto número de cópias que essas sequências apresentam no genoma dos vertebrados (BÖHNE et al., 2008).

Os elementos de classe I podem, ainda, ser divididos em duas subclasses de acordo com a presença ou ausência de longas repetições terminais (*Long Terminal Repeats* – LTR): **retrotransposons LTR** e **retrotransposons não-LTR** (VOLFF et al., 2001; EICKBUSH, MALIK., 2002), sendo que essas terminações são as sequências de repetições que flanqueiam

a região de codificação interna que inclui genes que codificam proteínas estruturais e enzimáticas (HAVECKER et al., 2004).

Os elementos de Classe II, por sua vez, podem ser classificados de acordo com o número de fitas clivadas no momento de sua transposição, apresentando a subclasse I, onde o mecanismo utilizado é o clássico “corta e cola”, onde as duas fitas de DNA são clivadas e a subclasse II inclui elementos que clivam apenas uma fita de DNA no momento de sua transposição (WICKER et al., 2007).

A subclasse I, apresenta a ordem TIR, caracterizadas pela presença de repetições terminais invertidas (TIRs), embora estas apresentem comprimento variável abrangendo nove superfamílias, diferenciadas pelas sequências das TIRs e tamanho da TSD (duplicação do sítio-alvo) e a ordem Crypton, que apresenta apenas a superfamília de mesmo nome (WICKER et al., 2007). A subclasse II apresenta duas ordens Helitron e Maverick, sendo estas compostas por apenas uma superfamília cada, dando nome às suas respectivas ordens (WICKER et al., 2007).

Dentro da subclasse I e ordem TIR, está presente a superfamília *hAT* (WICKER et al., 2007) que se encontra bastante difundida sendo encontrada tanto em plantas quanto no reino animal (ARENSBURGER et al., 2011). Esta superfamília é assim nomeada segundo o nome de três elementos transponíveis que estão presentes na mesma, sendo estes o elemento *hobo*, de *Drosophila melanogaster*, o ativador *Ac* de *Zea mays* (milho) e o *Tam3* de *Antirrhinum majus* (Boca – de – leão) (KODAMA et al., 2008; ZHANG et al., 2013).

Os elementos transponíveis podem ainda ser divididos entre (i) os que não codificam as proteínas necessárias para realizarem a transcrição reversa (e por consequência, sua transposição), sendo, portanto, elementos **não-autônomos** e (ii) os elementos **autônomos** que conseguem codificar as proteínas necessárias para efetuar a sua transposição (BOHNE et al., 2008).

A atividade genômica de cópias de TEs podem causar mutações e, portanto, afetar a expressão/estrutura de genes, podendo alterar a atividade/função dentro do organismo (KAPITONOV; JURKA, 2007). Por outro lado, tem sido demonstrado que estes elementos também podem se tornar

estáveis e assumir novas funções dentro do genoma do organismo hospedeiro, num processo chamado de domesticação molecular (MILLER et al., 1997).

Em nível cromossômico, os TEs têm sido encontrados associados com eventos de rearranjos cromossômicos, como deleções, duplicações e inversões (GREY, 2000) sendo que essa transposição pode ter ação direta na arquitetura do genoma em elementos como no tamanho do mesmo (CHÉNAIS et al. 2012). Além disso, os TEs são agora considerados um componente importante dos genomas de organismos vivos e sua capacidade de se mover e replicar, seu número e seu envolvimento em numerosos processos como resistência ao estresse ou adaptação às condições ambientais, demonstram que estes podem ser vistos como fatores-chave na a evolução dos organismos vivos (HERMANN et al., 2014).

2.2 DA CLÁSSICA À GENÔMICA: DIVERSIDADE DE FERRAMENTAS NO ESTUDO DA EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ANUROS

Os estudos de citogenética molecular, em um contexto comparativo, estão permitindo a compreensão da natureza e comportamento das sequências repetitivas e são vitais para examinar a distribuição e evolução das sequências repetitivas (BISCOTTI; OLMO; 2015). Existem alguns métodos de coloração diferencial que possibilitam tentativas de reconhecimento de homologias entre os cariótipos e, por sua vez, o entendimento dos mecanismos evolutivos envolvidos nas diferenciações cariotípicas e das relações filogenéticas entre anuros (KASAHARA, 2009; TARGUETA et al, 2018).

Entre estes métodos os mais comuns estão o (i) **bandamento C** que identifica regiões heterocromáticas, formando blocos escuros distribuídos ao longo dos pares cromossômicos; (ii) o método de impregnação pela Prata (**Ag-NOR**), onde utilizando a prata coloidal pode identificar o número e localização cromossômica das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) ativas; e (iii) coloração com **fluorocromos base- específicos** que permitem a distinção da riqueza nucleotídica (A:T ou G:C) de regiões cromossômicas (GUERRA, 1988; GALETTI, RASCH., 1993; SCHMID; GUTTENBACH., 1988).

Embora os métodos de coloração diferencial são muito informativos e muito utilizados em diversos grupos taxonômicos (SCHMID, 1978; GOLD et al., 1990;

WALIA; CHAHAL, 2016; HAN et al., 2017; BUSCHIAZZO et al., 2018) essas técnicas são limitadas à detecção das bandas heterocromáticas (bandamento C e fluorocromos), porém, não permitem identificar com maior precisão sequências de DNA específicas. Além disso, apesar de muitas vezes as metodologias de coloração diferencial permitirem identificar alterações cromossômicas em larga escala e determinadas variações estruturais envolvendo milhares de bases de tamanho (SCOUARNEC, 2012), elas são um tanto limitadas para pequenos rearranjos ocorridos ao longo da evolução cromossômica do grupo.

Ao utilizar metodologias que permitam evidenciar o conteúdo nucleotídico das sequências, há uma maior precisão sobre o reconhecimento de homologies entre os marcadores de espécies ao mesmo tempo que estas permitem a identificação de pequenos rearranjos intracromossômicos, imperceptíveis por essas metodologias consideradas mais clássicas.

As sequências de DNA repetitivo podem ser utilizadas como marcadores citogenéticos para os estudos em evolução, e podem ser úteis para identificar possíveis rearranjos cromossômicos observados dentro de diferentes grupos de organismos, como peixes (MARTINS, 2007) coleópteros (OLIVEIRA et al., 2013), mamíferos (MODI et al., 1996; GERDES et al., 2016; ARAUJO et al., 2017), anfíbios (VITTORAZZI et al., 2011; SUN et al., 2012) e plantas (RASKINA et al., 2008). Uma vez que tais sequências podem ser facilmente isoladas e encontram-se distribuídas em diversas regiões do genoma, gerando sinais de fácil visualização após hibridação nos cromossomos (BIÉMONT; VIEIRA, 2006; MARTINS et al., 2011) tornando essas sequências importantes marcadores cromossômicos.

Embora existam estudos com abordagens citogenéticas moleculares em anuros como a hibridação genômica comparativa – CGH (GATTO et al., 2016), com o mapeamento de elementos transponíveis (NASCIMENTO et al., 2015), DNA satélite (VITTORAZZI et al., 2014; GATTO et al., 2018) e ZOO-FISH (KRYLOV et al., 2010; KNYTL et al., 2017), por exemplo, a área de citogenética molecular ainda é tida como uma abordagem nova para o grupo dos anfíbios.

A pintura cromossômica e ZOO-FISH, tem sido uma importante ferramenta para detectar homologies cromossômicas e gerar informações sobre

o processo de evolução cariotípica (MATSUBARA et al., 2004), sendo um procedimento bastante eficaz para a comparação genômica de diferentes espécies, na identificação de antigas regiões de sintonia compartilhadas por espécies amplamente divergentes e pode, ainda, definir claramente os rearranjos cromossômicos entre as espécies (JAUCH et al., 1992; GIFALLI-IUGHETTI; KOIFFMANN, 2009). As regiões de sintonia podem indicar a estrutura provável dos cromossomos ancestrais enquanto os rearranjos cromossômicos indicam a dinâmica e os mecanismos de mudança cromossômica durante a evolução (RENS et al., 2006).

A recente utilização do sequenciamento genômico oferece a possibilidade de estudar as espécies baseado na sequência completa do genoma e, estas novas abordagens, abrem a possibilidade de integração entre a genômica e a citogenética nos estudos dos cromossomos (FANTINATTI; MARTINS, 2016). A medida que cada vez mais genomas completos estão disponíveis e o desenvolvimento das ferramentas de análise bioinformática associado com a possibilidade de mapeamento cromossômico por FISH facilitam a integração de dados genômicos e cromossômicos, e se tornaram ferramentas promissoras para os estudos citogenéticos (GRAPHODATSKY et al., 2002, MARTINS et al., 2011). Com a genômica comparativa entre as sequências disponíveis em banco de dados, é realizar a reconstrução de cariótipos baseado em análises “in silico”, como relatado por Kohn *et al.* (2006) em estudos envolvendo humanos, galinha, zebrafish e pufferfish para a reconstrução do cariótipo ancestral de vertebrados.

2.3. A FAMÍLIA PIPIDAE E *Pipa carvalhoi* COMO MODELO DE ESTUDO

A classe *Amphibia* é bastante diversificada, sendo que uma de suas maiores características são espécies que, em sua maioria, requer um ambiente aquático em suas formas iniciais de vida enquanto o adulto ocupa o ambiente terrestre (FERRIE et al., 2014). Atualmente, este grupo conta com 8.007 espécies (FROST, 2019), divididas em três ordens: Caudata (salamandras), Gymnophiona (cobras-cegas) e Anura (rãs, sapos e pererecas) (WELLS, 2010).

Cerca de 88% da classe *Amphibia* (7.058 espécies) pertencem a Anura (FROST, 2019), evidenciando a grande diversidade apresentada dentro desta ordem. Dentro de Anura, destaca-se a família Pipidae, que compreende

quatro gêneros: *Hymenochirus* (4 spp), *Pseudhymenochirus* (1 spp), *Xenopus* (29 spp) e *Pipa* (7 spp), sendo que apenas o último habita a América do Sul (FROST, 2019). Alguns autores ainda dividem o gênero *Xenopus* em dois, utilizando como critério a análise filogenética e o número diploide ancestral, reconhecendo as espécies portadoras $2n=20$ (e seus múltiplos, tratando-se de espécies poliploides) sob a denominação *Silurana* enquanto espécies derivadas de um ancestral de $2n=18$, e seus múltiplos, sob o a denominação *Xenopus*. Devido a essa questão sistemática, adotaremos neste trabalho a denominação *Xenopus* (= *Silurana*) para aqueles táxons cuja delimitação genérica está sob discussão.

Pipidae é a única família exclusivamente aquática e seus espécimes são caracterizados por apresentarem um corpo achatado dorsal-ventralmente e os membros traseiros adaptados à natação (POUGH et al., 2001; FERNANDES et al., 2011). Os espécimes desta família são encontrados na África e na América, sendo considerado monofilético e um dos grupos mais basais de anuros (CANNATELLA; TRUEB, 1988; IRISARRI et al., 2011). A diversificação de linhagens sul-americanas e africanas ocorreu a partir de um ancestral comum através de um evento vicariante decorrente da separação dos continentes africano e americano (TRUEB et al., 2005). Este isolamento teria tido como consequência a diversificação da linhagem que deu origem ao gênero *Pipa*, o único gênero não africano desta família, caracterizando este como grupo-irmão dos demais gêneros africanos (para referência, ver IRISARRI et al. 2011).

Apesar desse interessante contexto filogenético, existe uma grande disparidade de estudo entre os representantes da família Pipidae, possuindo *Xenopus* (= *Silurana*) como um modelo biológico bastante conhecido e utilizado em estudos de diversas natureza (biologia celular e molecular, genética, biologia do desenvolvimento) (LILLO et al., 2011; UNO et al., 2013) e, por outro lado, o gênero *Pipa*, cujo conhecimento ainda requer maior aprofundamento em diferentes abordagens.

Dentro do gênero *Pipa* são descritas as espécies: *P. pipa*, *P. carvalhoi*, *P. parva*, *P. myersi*, *P. snethlageae*, *P. arrabali* e *P. aspera* (FROST, 2019). A distribuição geográfica deste grupo compreende uma porção da América do Sul, ocupando as florestas equatoriais da Colômbia Equador, Peru, Venezuela,

Panamá, Suriname e Guianas, além das regiões Norte e Nordeste do Brasil, juntamente com o norte dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (FROST, 2019).

A espécie *Pipa carvalhoi* é a única deste gênero de ocorrência registrada no leste brasileiro (ARZABE et al., 2010; DA SILVA et al., 2010) podendo ser encontrada nos estados do Rio Grande do Norte, Sergipe, Pernambuco, Ceará e Paraíba, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo (FROST, 2019). Embora *Pipa* seja um gênero primariamente aquático, seus espécimes podem se mover sobre a terra durante chuvas fortes e, por esta razão, *P. carvalhoi* também pode ser encontrada, além de lagos e lagoas, ocasionalmente em savanas secas e úmidas, sendo registradas ocorrências tanto na Mata Atlântica quanto na caatinga brasileira (FONSECA et al., 2012)

O cuidado parental apresentado por *P. carvalhoi* e nas demais espécies do gênero é bastante característico onde após a fertilização, que ocorre na água, os ovos são incubados no dorso das fêmeas em câmaras de criação, sendo uma câmara para cada ovo, onde os embriões se desenvolvem até emergirem na forma de girinos, no caso de *P. carvalhoi*, e terminarem seu desenvolvimento na água ou emergirem com seu desenvolvimento completo, como ocorre em *P. pipa* (TRUEB; CANNATELLA, 1986; ARZABE et al., 2010; DA SILVA et al., 2010; FERNANDES et al., 2011).

Apesar dessas informações de caráter biológico, pouco se conhece a respeito da citogenética do gênero *Pipa*, bem como da espécie *P. carvalhoi*, contando dados disponíveis principalmente sobre o número cromossômicos e morfologia dos cromossomos. No entanto, mesmo nos poucos cariótipos conhecidos, é possível reconhecer uma interessante variação intragenérica de números cromossômicos, sendo *P. parva* apresenta $2n=30$ (MORESCALCHI, 1968), *P. carvalhoi* $2n=20$ (Mezassalma et al., 2015) e *P. pipa* $2n=22$ cromossomos (WICKBOM, 1950, MORESCALCHI, 1968). Segundo Morescalchi et al. (1968) uma provável causa para esta diversidade de número cromossômico foi uma redução no número de cromossomos de *P. parva* ($2n=30$) para *P. pipa* ($2n=22$), que pode ter sido causada por de mecanismos de translocação robertsoniana ou, ainda, mecanismos de fusão/fissão.

No entanto, essa proposta de Morescalchi et al., (1968) levou em consideração apenas a variação no número diploide, sem uma análise sob um

enfoque filogenético. Como Pipidae não apresenta uma filogenia robusta, grande parte desta se baseia em traços morfológicos e, com a análise dos mesmos, é possível que tenham ocorrido eventos de fissões cromossômicas e a condição pleiomórfica desta família seja $2n=20$, o apresentado por *P. carvalhoi*. Mezzasalma et al., (2015) inferiram que o ancestral Pipidade teria $2n=20$, condição mantida em *Xenopus* (= *Silurana*) *tropicalis*, *Hymenochirus boettgeri*+ *Pseudhymenochirus merlini* e *P. carvalhoi*, sendo este o caminho mais parcimonioso dentro da filogenia, uma vez que, para que as espécies do gênero *Pipa* passassem de um ancestral $2n=30$ para o cariótipo apresentado em *P. carvalhoi* seriam necessários, mais passos evolutivos, como inúmeras fusões, por exemplo. Neste aspecto, *P. carvalhoi*, teria mantido a condição plesiomórfica tendo sofrido apenas inversões que resultaram na atual morfologia dos seus cromossomos (MEZASSALMA et al., 2015).

Um marco importante nas pesquisas com *Xenopus* (= *Silurana*) foi o sequenciamento do genoma *X. tropicalis* (= *Silurana*), realizado pelo *Joint Genoma Institute* (JGI) em 2001. O projeto de sequenciamento do genoma confirmou que, de fato, *X. tropicalis* (= *Silurana tropicalis*) possui um genoma diplóide (GRAINGER, 2012) com o número cromossômico de $2n=20$ (TYMOWSKA; FISCHBERG, 1973; KRYLOV; TLAPAKOVA, 2015; UNO et al., 2013). *Pipa carvalhoi* e *X. tropicalis* (= *Silurana*), sendo estes próximos filogeneticamente, apresentam o mesmo número cromossômico ($2n=20$). *Xenopus tropicalis* (= *Silurana*) possui seu genoma sequenciado e disponível para acesso através de bases de dados online e *P. carvalhoi* teve seu genoma recentemente sequenciado por nosso grupo de pesquisa, tornando possível realizar o desenvolvimento de marcadores para um estudo de homologias cromossômicas entre estas espécies afim de, futuramente, utilizar tais marcadores para estudos das outras espécies pertencentes ao gênero *Pipa*, fazendo com que estes trabalhos possam ajudar a detectar alguns dos mecanismos de evolução cromossômica que atuaram dentro dessas espécies.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Acessar a organização cromossômica e o possível papel de sequências de DNA repetitivo (em *tandem* e dispersos no genoma) na diversificação cariotípica de *P. carvalhoi*.

3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Descrever o cariótipo de *P. carvalhoi* através de metodologias de coloração convencional e diferencial;
- Utilizar marcadores cromossômicos moleculares snoRNA U2, histona H3 e repetições microssatélites ((CA)₁₅, (GA)₁₅, (GATA)₈, (CGC)₁₀, (CAG)₁₀, (GAA)₁₀, (GACA)₄) para comparar a macroestrutura dos cariótipos de *P. carvalhoi* e *X. tropicalis*.
- Isolar, caracterizar e mapear fisicamente o elemento de transposição *hAT* no cariótipo de *P. carvalhoi*.

CAPÍTULO I

Chromosome spreading of the (TTAGGG)_n repeats in the *Pipa carvalhoi* (Pipidae, Anura) karyotype

Michelle Louise Zattera¹; Luana Lima²; Iraíne Duarte¹; Déborah Yasmin de Sousa¹; Olívia Gabriela dos Santos Araújo³, Thiago Gazoni³, Tamí Mott²; Shirlei Maria Recco-Pimentel⁴, Daniel Pacheco Bruschi^{1,4}

¹Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Curitiba-PR;

²Universidade Federal do Alagoas (UFAL);

³Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Campus Rio Claro – SP;

⁴Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – SP

Corresponding author: zatteralouise@gmail.com

Abstract: *Pipa carvalhoi* is a species of Pipidae, this clade of anurans diverged relatively early from other frogs in the phylogeny of the group. Pipids have a unique combination of morphological features, some of which appear to represent a mix of adaptations to aquatic life and plesiomorphic characters of Anura. The present study describes the karyotype of *P. carvalhoi* in populations from Bahia and Pernambuco, Brazil, including its morphology, heterochromatin distribution pattern, and location of the NOR site. The diploid number of *P. carvalhoi* is $2n=20$, including three metacentric pairs (1, 4, 8), two submetacentric (2 and 7), three subtelocentric (3, 5, 6), and two telocentric pairs (9 and 10). The C-banding detected centromeric blocks of heterochromatin in all chromosome pairs and the NOR site was detected in chromosome pair 9, as confirmed by the FISH using the rDNA 28S probe. The telomeric probes indicated the presence of ITSs, primarily in the centromeric region of the chromosomes, frequently associated with heterochromatin, which indicates that these repeats are a significant component of this region. The findings of the present study provide important insights for the understanding of the mechanisms of chromosomal evolution in the genus *Pipa*, and the diversification of the Pipidae as a whole.

Key-words: Pipidae, chromosome banding, interstitial telomeric sequences, chromosome evolution

Introduction

Chromosome studies provide important insights into the diversification of karyotypes and represent an effective approach for the identification of homologies among species (Targueta et al. 2018). This approach provides a systematic understanding of the rearrangements of the genome that have occurred during the evolutionary history of the target group.

Pipids are a clade of anurans that diverged relatively early from other frogs in the phylogeny of the group. Pipids have a unique combination of morphological features, some of which appear to represent a mix of adaptations to aquatic life and plesiomorphic characters of Anura (Cannatella and Trueb, 1988; Araújo et al. 2017; Cannatella, 2015). The frogs of the family Pipidae dwell in freshwater environments and have behavioral and physiological features that are unique in anuran amphibians, making this group an excellent model for evolutionary studies (Cannatella and De Sá, 1993; Cannatella and Trueb, 1988; Pough et al. 2001). The family currently includes four genera –*Hymenochirus* (4 species), *Pseudohymenochirus* (1 species), *Xenopus* (29 species), and *Pipa* (7 species), which are distributed in sub-Saharan Africa and South America (Frost, 2019).

However, based on molecular phylogenetic inferences and presumed ancestral diploid numbers, some authors have distinguished a fifth lineage, *Silurana*, which includes all the species derived from an ancestor with $2n = 20$ (Evans et al. 2004; Pyron and Wiens 2011), from *Xenopus*, which has an ancestral diploid number of $2n = 18$. Evans et al. (2015) suggested that *Xenopus* should be divided into two subgenera, *Xenopus* and *Silurana*. Other authors consider *Xenopus* and *Silurana* a monophyletic clade, without the necessity of separation of subfamilies or genera between them (e.g., De Sá and Hillis, 1990; Graf et al. 1996; Cannatella; De Sá, 1993), in this work we will consider them as a single group, *Xenopus tropicalis group* (Frost, 2019).

Pipa is the only non-African genus of the Pipidae, and the available evidence from a number of different sources indicates that this South American lineage is derived from an ancestor closely related to the extant members of the genus *Hymenochirus* as Pipidae was widely distributed in Gondwana and after its splintering those genus can today be found at the Afro-Tropical Region (*Hymenochirus*, *Pseudhymenochirus* and *Xenopus*) and Neotropical Region (*Pipa*) and this isolation resulted in the diversification of the ancestral lineage of the genus *Pipa*, which is found in South America, as far north as Panama (Trueb et al. 2005, Frost, 2019). The genus currently contains seven species: *P. arrabali*, *P. aspera*, *P. carvalhoi*, *P. myersi*, *P. parva*, *P. pipa*, and *P. snethlageae* (Frost, 2019).

In most cases, the only cytogenetic information available for the pipid species is the diploid number. The *Xenopus* + *Silurana* lineages (*sensu* Evans et al. 2015), the sister group of *Pipa*, have the largest number of karyotyped species, including recurrent cases of polyploidy, with the chromosomal number being used as a criterion for the description of new species (Evans et al. 2015). The karyotypes of *Hymenochirus boettgeri* and *Pseudhymenochirus merlini* (a monotypic genus) were described recently, filling gaps in the chromosomal history of the Pipidae (Mezzasalma et al. 2015). In the case of *Pipa* the cytogenetic available data are limited to the diploid numbers for *Pipa parva* ($2n = 30$) and *Pipa pipa*, with $2n = 22$ (Wickbom et al. 1950; Morescalchi et al. 1968, 1970).

As no data whatsoever are available for the other five *Pipa* species, further studies will be essential for the understanding of the genomic rearrangements that have occurred during the adaptive radiation of this lineage in South America. Here, we describe the karyotype of *Pipa carvalhoi*, including the position of the NORs and the distribution pattern of the heterochromatin. We also documented the intrachromosomal spread of the telomeric (TTAGGG) $_n$ motifs and discuss these findings in the context of the phylogenetic scenario of the family Pipidae.

Material and Methods

Samples

We analyzed three specimens of *Pipa carvalhoi* collected in Buerarema, in the state of Bahia, Brazil, and three from Buíque, Pernambuco, Brazil. The collection of specimens in Brazil was authorized by SISBIO/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade through protocol number 55481-1. The specimens were deposited in the “Célio Fernando Baptista Haddad” Amphibian Collection (CFBH), on the Rio Claro campus of São Paulo State University (UNESP) and in Natural History Museum in Universidade Federal de Alagoas (MHN-UFAL).

Staining procedures

The chromosomal preparations were obtained from intestinal and testicular cells treated with 2% colchicine for 4 hours, using techniques modified from King and Rofe (1976) and Schmid (1978). The mitotic metaphases were stained with 10% Giemsa for karyotyping. The heterochromatic regions were identified by C-banding, using the technique described by Sumner (1972), with modifications. To better highlight the heterochromatic regions, the C-banded chromosomes were stained with base-specific fluorochrome DAPI. We detected the NORs using the Ag-NOR method (Howell and Black, 1980). The chromosomes were ranked and classified according to the scheme of Green and Sessions (1991).

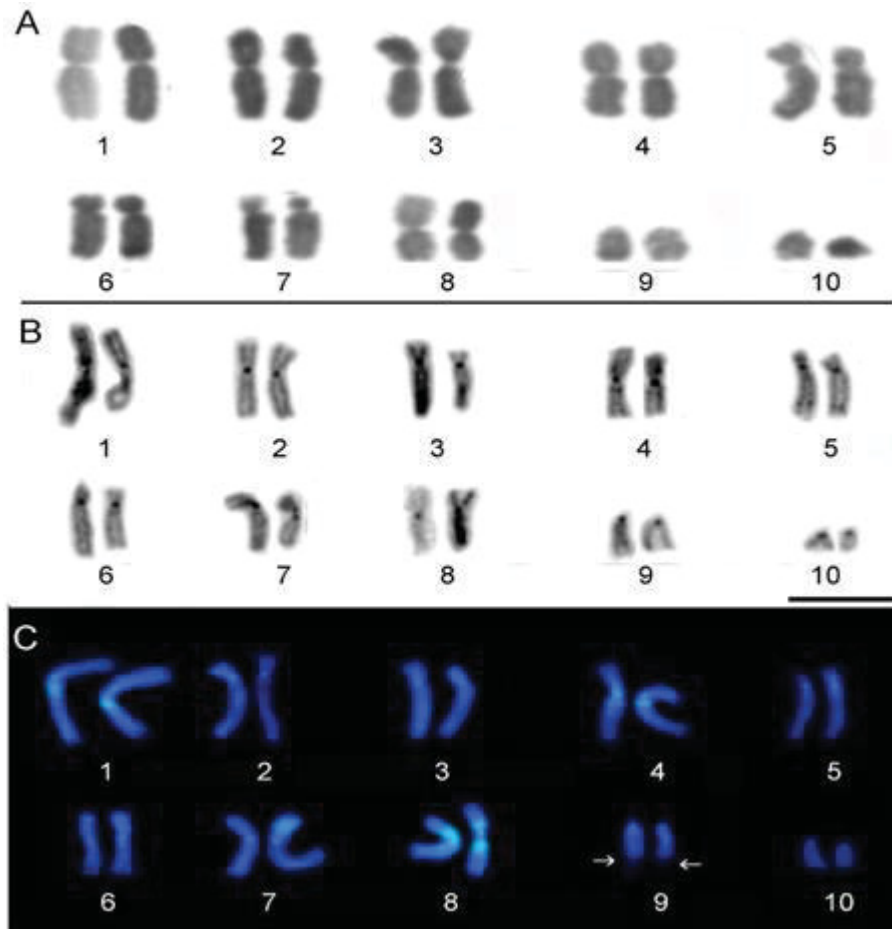
Fluorescence in situ hybridization

The 28S rDNA genes were mapped using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). We used the 28S fragment isolated by Bruschi *et al.* (2012) to detect the rDNA genes. This probe was PCR-labeled with digoxigenin and hybridized following the protocol of Viegas-Péquignot (1992). Finally, the vertebrate telomeric (TTAGGG)_n sequence probe was obtained by amplification and labeling, based on Ijdo *et al.* (1991).

Results

The diploid number of the *P. carvalhoi* karyotype was $2n = 20$ chromosomes (Fig. 1). The karyotype contains three metacentric pairs (1, 4, 8), two submetacentric (2 and 7), three subtelocentric (3, 5, 6), and two telocentric pairs, 9 and 10 (Fig. 1). The same karyotype was recorded in both populations.

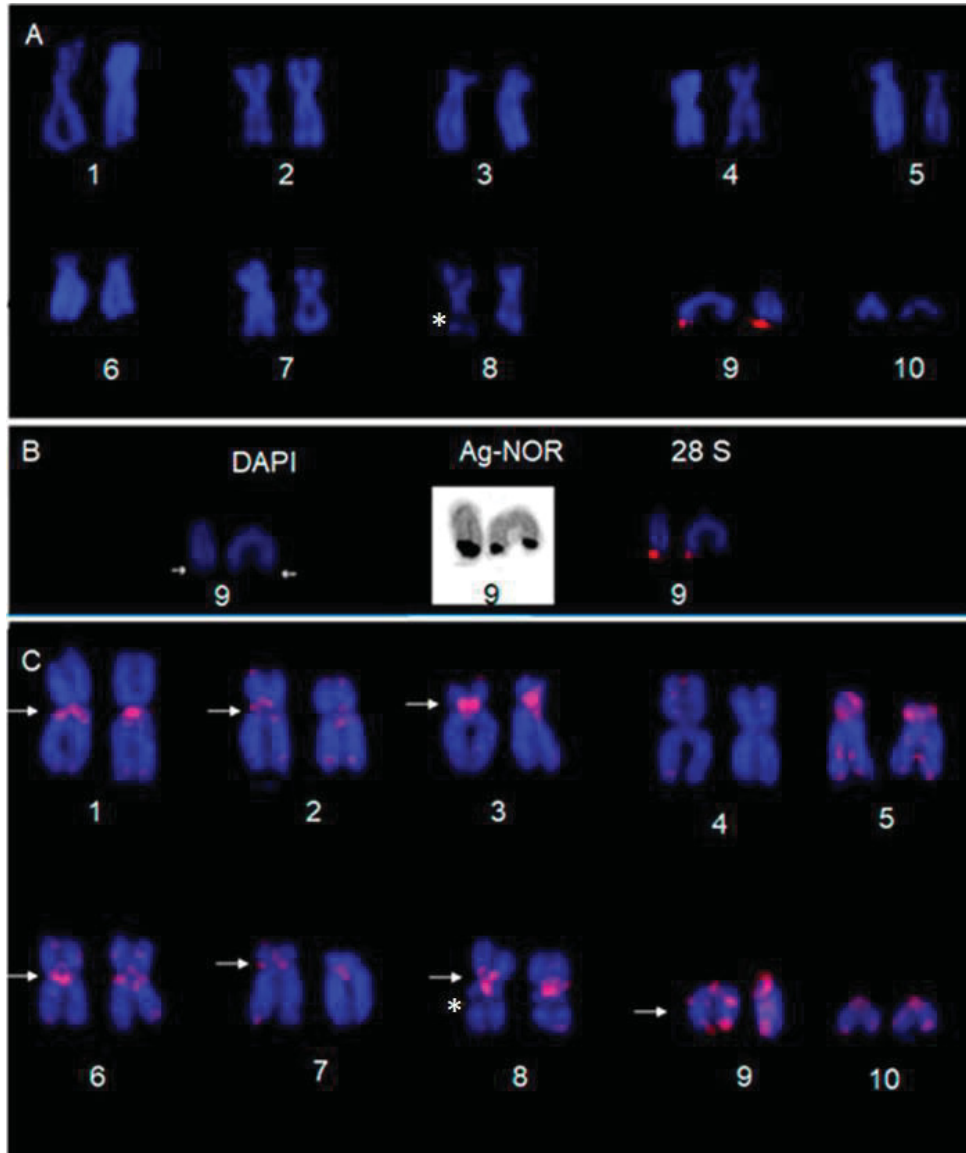
The C-banding technique detected centromeric blocks of heterochromatin in all chromosome pairs. Non-centromeric heterochromatin blocks were also detected in the interstitial region of the long arms of pair 5 (Fig. 1B). Pericentromeric C-positive banding was observed in the long arm of pair 4, and in the short arm of the submetacentric pair 7 (Fig. 1B). The base-specific fluorochrome staining applied following the C-banding of the chromosomes enhanced the detection of the heterochromatin, and revealed additional features of the study karyotypes. The centromeric blocks of heterochromatin presented DAPI-positive signals in all the chromosomes, in addition to pericentromeric heterochromatin in pair 4 (Fig. 1C). The DAPI staining also revealed a conspicuous bright signal in the pericentromeric regions of both arms of pair 8, as well as subterminal DAPI-positive blocks in the homologs of pair 3. Neither of these features were revealed by the C-banding (Fig. 1C).



Fonte: Autor (2019)

Figure 1: Karyotype of *P. carvalhoi*, prepared by conventional Giemsa staining (A) and C-banding (B), followed by DAPI staining (C). The arrow indicates the NOR site.

Under conventional Giemsa staining, a secondary constriction was observed in the subterminal regions of the homologs of pair 9, which coincides with the NOR site (in both populations), detected by the Ag-NOR method and confirmed by FISH using the rDNA 28S probe (Fig. 2A), and this region was DAPI-negative (Fig. 2B). The telomeric probe hybridized all the telomeres in the chromosomes of *P. carvalhoi*. Conspicuous signals of Interstitial Telomeric Sequences (ITSs) can be observed in the centromeric region of the homologs of pairs 1, 2, 3, 6, 7, and 8, and in the interstitial region of the long arm of chromosome pair 9. A secondary constriction was also observed in chromosome pair 8 (Fig. 2C).



Fonte: Autor (2019)

Figure 2: (A) Karyotype of *P. carvalhoi* from Bahia, Brazil, hybridized with the 28S rDNA probe. In (B), note the NOR-bearing chromosome highlighted by DAPI-staining, the Ag-NOR method, and FISH with 28S rDNA. (C) *In situ* hybridization with the telomeric probe in the karyotype of *Pipa carvalhoi* from Pernambuco, Brazil. The arrows indicate the interstitial telomeric sequences (ITs) and the constriction in chromosome 8.

Discussion

The chromosomal evolution of the pipids appears to have involved complex rearrangements, including recurrent polyploidization events and associated shifts in the diploid number (Table 1). In the present study, we described the karyotype of *P. carvalhoi*, including the distribution of the heterochromatin and the NOR site. In the phylogenetic reconstructions of the superfamily Pipoidae proposed by Pyron and

Wiens (2011) and Irissari et al. (2011), the $2n = 22$ diploid number was identified as the plesiomorphic condition, based on the karyotype of *Rhinophrynus dorsalis* (Bogart and Nelson, 1976), the only member of the Rhinophrynidae.

Subsequently, Mezzasalma et al. (2015) proposed that the ancestral karyotype of Pipidae had a diploid number of $2n = 20$, based on the conserved diploid numbers observed in *Xenopus* (= *Silurana*) *tropicalis* and *Hymenochirus boettgeri* + *Pseudhymenochirus merlini*. The phylogenetic inferences of Evans et al. (2004) and Irissari et al. (2011) indicated the existence of two clades in the clawed frogs (*Xenopus*), with a well-supported synapomorphy of the diploid number, which divides the species of this genus into two separate lineages: the subgenus *Silurana* ($2n = 20$) and the subgenus *Xenopus*, which has the primitive diploid number ($2n = 18$). The diploid number ($2n = 20$) found in *Xenopus* (= *Silurana*) *tropicalis* and the polyploidy of the species derived from this form [$2n = 4x = 40$: *Xenopus* (= *Silurana*) *calcaratus* Peters, 1877; *Xenopus* (= *Silurana*) *epitropicalis* Fischberg, Colombelli and Picard 1982; *Xenopus* (= *Silurana*) *mellotropicalis* Evans et al. 2015] correspond to a retention of the plesiomorphic condition of the pipids (Mezzasalma et al. 2015).

The diploid number ($2n=20$) recorded here in *Pipa carvalhoi* also corresponds to a retention of the plesiomorphic condition of the pipids, and an overview of all the known karyotypes of pipid species indicates that the morphology of pairs 1, 2, 3, and 4 is highly conserved, as it is in the outgroup, *Rhinophrynus dorsalis* (Mezzasalma et al. 2015). Despite the conservative karyology of the principal pipid clades, the known diploid numbers of *Pipa* species vary considerably. The two other species for which data are available are *P. parva*, which has a karyotype ($2n = 30$) composed entirely of telocentric pairs (Wickbom et al. 1950; Morescalchi et al. 1968), and *P. pipa*, which has a diploid number of $2n = 22$ (Morescalchi et al. 1970). Mezzasalma et al. (2015), proposed the karyotype formula for *Pipa carvalhoi*, showing a diploid number of 20, with heterochromatin blocks in the centromeric region, as well, being in accordance with our findings.

Table 1: Detailed cytogenetic data available for species of the Pipidae family. NOR: Nucleolar Organizer Region; M= metacentric; SM= submetacentric; ST=subtelocentric; T=telocentric; p= short arm; q=long arm; (--) no data.
Fonte: Autor (2019)

Species	Ploidy level	Karyotype formula	NOR site	Reference
<i>Xenopus tropicalis</i> group				
<i>X. tropicalis</i>	2n = 20	2 M + 14 SM + 4 A	5q	Tymowska, 1973; Uehara et al., 2002
<i>X. epitropicalis</i>	4n = 40	4M + 28 SM+ 8 A	5q	Tymowska and Fischberg, 1982; Tymowska, 1991
<i>X. new tetraploid 1</i>	4n = 40	4M + 28 SM+ 8 A	5q	Tymowska, 1991; Evans et al., 2004
<i>X. new tetraploid 2</i>	4n = 40	4M + 28 SM+ 8 A	5q	Evans et al., 2004
<i>Xenopus laevis</i> group				
<i>X. borealis</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	4p	Tymowska and Fischberg, 1973; Tymowska, 1991
<i>X. civii</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	4p	Tymowska and Fischberg, 1973; Tymowska, 1991
<i>X. fraseri</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	6q	Tymowska and Fischberg, 1973; Tymowska, 1991
<i>X. gilli</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	12p	Tymowska and Fischberg, 1973; Tymowska, 1991
<i>X. laevis laevis</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	12p	Tymowska, 1991
<i>X. laevis bunyoniensis</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	--	Tymowska, 1991
<i>X. laevis petersi</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	--	Tymowska and Fischberg, 1973; Tymowska, 1991

<i>X. laevis poweri</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	--	Tymowska, 1991
<i>X. laevis sudanensis</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	--	Tymowska, 1991
<i>X. laevis victorianus</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	--	Tymowska and Fischberg, 1973; Tymowska, 1991
<i>X. largeni</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	--	Tymowska, 1991
<i>X. muelleri</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	4p	Tymowska and Fischberg, 1973; Tymowska, 1991
<i>X. pygmaeus</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	6q	Loumont, 1986
<i>X. sp. nov. VI</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	4p	Tymowska, 1991
<i>X. sp. nov. IX</i>	4n = 36	6 M+ 14 SM+ 2 ST + 14 T	12p	Tymowska, 1991
<i>X. amieti</i>	8n = 72	12 M + 28 SM + 4 ST + 28 T	5q	Kobel et al., 1980
<i>X. andrei</i>	8n = 72	12 M + 28 SM + 4 ST + 28 T	18q	Loumont, 1983
<i>X. boumbaensis</i>	8n = 72	12 M + 28 SM + 4 ST + 28 T	6p+ 4p	Loumont, 1983
<i>X. itombwensis</i>	8n = 72	12 M + 28 SM + 4 ST + 28 T	--	Evans et al., 2008
<i>X. lenduensis</i>	8n = 72	12 M + 28 SM + 4 ST + 28 T	--	Evans et al., 2011
<i>X. vestitus</i>	8n = 72	12 M + 28 SM + 4 ST + 28 T	12p	Tymowska, 1991
<i>X. wittei</i>	8n = 72	12 M + 28 SM + 4 ST + 28 T	12p	Tymowska, 1991
<i>X. sp. nov. X</i>	8n = 72	12 M + 28 SM + 4 ST + 28 T	18q	Tymowska, 1991

<i>X. longipes</i>	12n 108	=	18 M + 42 SM + 6 ST + 42 T	7p	Loumont and Kobel, 1991
<i>X. ruwenzoriensis</i>	12n 108	=	18 M + 42 SM + 6 ST + 42 T	11q	Tymowska and Fischberg, 1973; Tymowska, 1991
<i>X. cf. boumbaensis</i>	12n 108	=	18 M + 42 SM + 6 ST + 42 T	7p	Evans, 2007
<i>X. sp. nov. Villa</i>	12n 108	=	18 M + 42 SM + 6 ST + 42 T	7p	Tymowska, 1991
<i>Pseudhymenochirus</i> genus					
<i>P. merlini</i>	2n=20		8 M + 4 SM + 6 ST + 2 T	10q	Mezzasalma et al., 2015
<i>Hymenochirus</i> genus					
<i>H. boettgeri</i>	2n=20		14 M + 2 SM + 4 ST	4p	Mezzasalma et al., 2015
<i>Pipa</i> genus					
<i>P. carvalhoi</i>	2n=20		6 M+ 4 SM+6 ST + 4 T	9q	Zattera et al., presente estudo.
<i>P. pipa</i>	2n=22		8 M + 14 A	--	Wickbom, 1950
<i>P. parva</i>	2n=30		30 T	--	Morescalchi, 1981

The comparison of the karyotypes of *P. carvalhoi* and *P. pipa* (Wickbom *et al.* 1950; Morescalchi *et al.*, 1970) indicates interspecific chromosomal homologies of the metacentric and submetacentric pairs 1, 2, 3, and 4. The minor differences between the *P. pipa* karyotypes published by Wickbom *et al.* (1950) and Morescalchi *et al.* (1970) are derived from variation in the chromosomal nomenclature adopted in the two studies, rather than any real karyotype differences among the *P. pipa* populations. As the *P. parva* karyotype contains only telocentric pairs, the recognition of chromosome homologies with other *Pipa* species are currently restricted by the lack of appropriate markers.

One other common feature of the pipid karyotypes described up until now is the existence of a pericentromeric heterochromatin block in the homologs of pair 4, which was identified in *P. carvalhoi* by the C-banding and DAPI staining. Interestingly, this heterochromatin block is rich in A-T, a trait shared with *Xenopus* (= *Silurana*) *tropicalis* (Tymowska and Fischberg, 1982), *Hymenochirus boettgeri*, and *Pseudhymenochirus merlini* (Mezzasalma *et al.* 2015), which all have a diploid number of $2n = 20$ chromosomes. As the configuration of the heterochromatin is a valuable marker for the interspecific comparison of karyotypes, the unique non-centromeric heterochromatin blocks found in some of the chromosomes of *P. carvalhoi* constitute an important diagnostic trait for the analysis of the interspecific variation in the pipids, based on C-banding.

We detected interstitial telomeric sequences (ITs) in the centromeric region of the metacentric and submetacentric chromosomes of the *P. carvalhoi* karyotype. Canonical telomeric repeats are located in the terminal regions of the chromosomes, but several vertebrate species have blocks of (TTAGGG) $_n$ repeats in non-terminal regions of their chromosomes (Mayne *et al.* 1990; Bolzán *et al.* 2017). Non-telomeric (TTAGGG) $_n$ repeats have been described frequently in anuran species see (Bruschi *et al.* 2014; Schmid and Steinlein, 2016; Schmid *et al.* 2018). For example, Nanda *et al.* (2008) reported the presence of ITs in pipid chromosomes for the first time, detecting a wealth of non-telomeric (TTAGGG) $_n$ repeats in the chromosomes of *Xenopus clivvi*, in pair 17 of the *X. laevis* karyotype, and associated with the NOR in *X. borealis* and *X. muelleri*. Interestingly, the ITS markers were fundamental to the discrimination of the karyotypes of these four species, which all share the same

diploid number ($2n = 36$) and have highly uniform chromosome morphology, when analyzed using a classical cytogenetic approach. The ITSs distinguish *X. clivii*, which has much more numerous ITSs in comparison with the other *Xenopus* karyotypes.

Despite being an unusual feature of vertebrate genomes, we found ITS sites in euchromatic regions (in pair 9, for example), as found in some other anuran species. Schmid and Steinlein (2016) proposed 'large ITSs in restricted euchromatic regions (restricted eu-ITSs)' as a new category of ITS in anuran karyotypes. These euchromatic ITSs have already been documented in chromosome pairs 2 and 9 of *Hypsiboas boans* (Schmid and Steinlein, 2016), which is consistent with the presence of these markers in pair 9 of *P. carvalhoi*.

Adopting the parsimony criterion, we rejected the hypothesis that the ITSs detected in the *P. carvalhoi* karyotype are remnants of centric (Robertsonian) fusions, given that *P. carvalhoi* has the plesiomorphic pipid diploid number. In fact, our data support the conclusion that the presence of the intrachromosomal telomeric motif (TTAGGG) $_n$ represents a component of the repetitive DNA sequences spread throughout these chromosomes. Furthermore, the ITSs found in the *P. carvalhoi* chromosomes coincide with the heterochromatic blocks detected by C-banding in chromosomes 1, 2, 3, 6, and 8. The role of telomeric repeats as repetitive motifs of part of the satellite DNA has already been described in a number of rodent genera, with a unique signal being found in the pericentromeric heterochromatin together with Msat-160 or in telomeric probes, in experiments with co-located het-ITSs and the Msat-160 satellite DNA (Rovatsos et al. 2011).

Ruiz-Herrera et al. (2008) proposed a model to account for the presence of short ITSs in the genome of vertebrates, in which the sequences originate from the insertion of telomeric repeats during the repair of double-strand breaks (DSBs) in the DNA, which may occur either with or without the intervention of telomerase, with the telomerase-mediated repair of the DSBs possibly leading to the appearance of ITSs. Bolzan et al. (2006) concluded that the amplification of these sequences may be related to (i) the insertion of telomeric repeats during the repair of double-strand breaks or (ii) transposable elements. In the former case (i), the telomerase may catalyze the addition of telomeric sequences directly to non-terminal regions through

the direct addition of (TTAGGG) n repeats to the ends of broken chromosomes (chromosome healing). The amplification of the ITSs may also occur through unequal crossing over between the repeats of sister chromatid breakage-fusion-bridge cycles, replication slippage (Lin et al., 2008), gene conversion, and excision and reintegration events through the 'rolling circle' mechanism (Bolzán et al., 2017).

Conclusion

Overall, then, the results of the present study indicate that the karyotype of *P. carvalhoi* ($2n=20$) represents the pleiomorphic condition of the pipids, with interspecific chromosomal homologies (such as the heterochromatin block in chromosome 4) indicating a highly conserved karyotype configuration. The presence of ITSs in some chromosomes may have originated independently during the chromosomal evolution of this species. The findings of the present study provide important insights into the mechanisms of chromosomal evolution in the genus *Pipa* and the diversification of the family Pipidae as a whole.

Acknowledgements

We are grateful to the São Paulo State Research Foundation, FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; Process 2016/07717-6). We thank the Brazilian agency CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) for provided scholarships to MLZ and LRL. We thank the Multi-User Confocal Microscopy Center of the Federal University of Paraná for the capture of the images included in this study. TM thanks for CNPq Fellowship (309904/2015-3).

CAPÍTULO II

Dinâmica evolutiva de sequências de DNAs repetitivos nos cariótipos de *Pipa carvalhoi* e *Xenopus tropicalis* (Anura, Pipidae)

Michelle Louise Zattera¹; Camilla Borges Gazolla¹, Thiago Gazoni², Shirlei Maria Recco-Pimentel³, Daniel Pacheco Bruschi^{1,3}

¹Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Curitiba-PR;

²Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Campus Rio Claro SP;

³Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – SP

Correspondence author: zatteralouise@gmail.com

Resumo: As espécies *Pipa carvalhoi* e *Xenopus tropicalis* pertencem a família Pipidae e são consideradas grupo-irmão. As sequências repetidas em *tandem* representam grande parte do genoma dos eucariotos e são componentes importantes na evolução cariotípica. O presente trabalho teve por objetivo realizar a análise da organização destas sequências no cariótipo de ambas as espécies utilizando hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Os clusters de U2 snRNA e histona H3 foram encontrados conservados entre as espécies, estando presentes nos cromossomos 2 (U2 snRNA), e nos pares 5 e 8 (histona H3). As sondas de microssatélites utilizadas foram (CA)₁₅, (GA)₁₅, (GATA)₈, (CGC)₁₀, (CAG)₁₀, (GAA)₁₀ e (GACA)₄, e a maioria destes motivos apresentou marcações subterminais e terminais em ambas as espécies, exceto (CA)₁₅ e (GA)₁₅ que em *P. carvalhoi* apresentou marcações centroméricas. Divergências foram ainda observadas nos sítios (GAA)₁₀ e (GACA)₄, ausentes em *X. tropicalis*, ao passo que *P. carvalhoi*, demonstrou para (GAA)₁₀ uma marcação conspícua no cromossomo 5 e (GACA)₄ apresentou sítios nas regiões pericentroméricas nos cromossomos 3 e 8. Portanto, este trabalho evidencia que, apesar de serem espécies relacionadas, o padrão de microssatélites observados foi distinto, revelando uma possível evolução independente de sua organização no cariótipo de ambas as espécies analisadas, ao passo que as sequências de snRNA U2 e histona H3, se revelaram bons marcadores moleculares para estas espécies, devido ao seu padrão altamente conservado.

Palavras: Pipidae, repetições *in tandem*, histona H3, snRNAU2, microssatélites

INTRODUÇÃO

Amphibia é considerado um importante capítulo da história evolutiva dos vertebrados já que representam o elo vivo da ligação entre os peixes e os demais amniotas terrestres (VOSS et al., 2011; SESSION et al., 2016). Apesar de poucos genomas já terem sido estudados, grande parte da variação reportada em termos de tamanho de genomas e na sua complexidade na montagem são relatadas devido ao grande conteúdo de sequência como as de DNA repetitivo (microsatélites, minissatélites e microssatélites) e elementos de transposição, por exemplo (SUN et al., 2015; LIEDTKE et al., 2018; SCLAVI; HERRICK, 2018). No entanto, quase nada se sabe sobre a distribuição cromossômica desses elementos repetitivos nos genomas de anfíbios (VITTORAZZI et al., 2011; GATTO et al., 2016; 2018).

Desde que essas sequências repetitivas deixaram de ser considerados elementos meramente estruturais dos cromossomos (DIMITRI, 1999), pesquisas têm revelado que essas repetições também desempenham papéis centrais no funcionamento dos genomas, estando envolvidos na estabilidade cromossômica, participação no ciclo celular (FOULONGNE-ORIOU et al., 2013) e regulação da expressão gênica (BISCOTTI; OLMO; 2015). Em um aspecto macroestrutural, as sequências de DNA repetitivo também podem estar envolvidas direta (PRAKHONGCHEEP et al., 2017) ou indiretamente (CAZAUX et al., 2011; GLUGOSKI et al., 2018) em eventos de rearranjos cromossômicos, sendo responsáveis, em grande parte, pela variedade cariotípica que pode ser observada nos mais diversos grupos animais e vegetais (KIDWELL, 2002; FESCHOTTE et al., 2007; GONZÁLEZ et al., 2012)

Amphibia também é uma das classes de vertebrados que apresenta grande variação de tamanho de genomas e evidências sugerem rápida taxa de evolução destes genomas (LIEDTKE et al., 2018). O grande conteúdo de DNA repetitivo é apontado como o principal responsável por esse tamanho dos genomas e importante substrato por essa rápida taxa de evolução. As repetições microsatélites, por exemplo, são sequências de DNA dispostas em *tandem*, compostas por unidade estruturais de 1-6 pares de base e podem ser encontradas em qualquer região do genoma, seja esta codificadora ou não (TÓTH et al., 2000). O mapeamento cromossômico de repetições microsatélites já foi utilizado para estimar a composição da heterocromatina em diversos grupos (KUBAT *et al.* 2008; MARTINS et al., 2013; PARISE-MALTEMPI et al., 2013; LOPES et al., 2014), sendo

detectada inclusive em regiões de eucromatina em alguns grupos como na espécie de besouro *Tribolium castaneum* (BRAJKOVIC et al., 2012; PAVLEK et al., 2015), *Drosophila* (Kuhn et al., 2011), algumas espécies de gafanhotos (RUIZ-RUANO et al., 2016) e em *Triatoma infestans* (PITA et al., 2017).

As ocorrências de microssatélites são menores em regiões de genes, uma vez que, essas sequências possuem uma alta taxa de mutação podendo apresentar um impacto na expressão gênica (VIEIRA et al., 2016).

Por outro lado, outras sequências de caráter repetitivo e que codificam para produtos fundamentais para as atividades celulares em eucariotos estão sujeitas a forte pressão seletiva e por isso, mantêm sequências de DNA conservadas ao longo da evolução das linhagens. Devido sua natureza repetitiva, que permite o limite de resolução para seu mapeamento cromossômico por FISH, faz dessas sequências promissores marcadores cromossômicos (OLIVEIRA et al., 2011; REGUEIRA NETO et al., 2013; GARCÍA-SOUTO et al., 2015). Por exemplo, genes que codificam para as histonas e genes que transcrevem para os RNAs não-codificadores nucleares (snoRNA) têm se revelado bons marcadores cromossômicos em citogenética comparativa (CABRERO et al., 2009; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011; ANJOS et al., 2015).

Pipa carvalhoi é uma espécie de anfíbio pertencente à família Pipidae e, como os demais membros desta família, apresentam inúmeras modificações morfofisiológicas para tornar essas espécies adaptadas para seu hábito de vida essencialmente aquático (CANNATELLA; TRUEB, 1988; POUGH et al., 2001; FERNANDES et al., 2011). Essa espécie é a única deste gênero de ocorrência registrada no leste brasileiro (ARZABE et al. 2010; DA SILVA et al., 2010) podendo ser encontrada nos estados do Rio Grande do Norte, Sergipe, Pernambuco, Ceará e Paraíba, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo (FROST, 2019).

A espécie *Xenopus tropicalis* está incluída no gênero que apresenta o maior número de espécies dentro de Pipidae (29 espécies descritas) e é típica da África subsaariana (FROST, 2019). *Xenopus tropicalis* única espécie deste gênero que apresenta um número cromossômico de $2n=20$ (TYMOWSKA; FISCHBERG, 1973; GRAINGER, 2012; KRYLOV; TLAPAKOVA, 2015; UNO et al., 2013) e possivelmente represente o cariótipo base para o surgimento dos inúmeros casos de poliploidia já relatados. Pouco se sabe sobre a citogenética do gênero *Pipa.*, sendo que cariótipo de *P. carvalhoi* constituído por $2n=20$ cromossomos e parece ter

mantido a condição plesiomórfica ancestral de Pipidae (MEZASSALMA et al., 2015; ZATTERA *et al.* em preparação, capítulo I). Sugestões de homologia primária entre o cariótipo dos demais pipídeos, baseada exclusivamente na morfologia dos pares cromossômicos têm sugerido hipóteses sobre a evolução cromossômica na família (MEZZASALMA et al., 2015; Zattera em preparação, capítulo I).

Por exemplo, ao compararmos o cariótipo de *P. carvalhoi* e *Xenopus tropicalis*, os cromossomos dos pares 1-4 apresentam morfologias similares. No entanto, a falta de marcadores cromossômicos comparáveis ainda é limitante nessas análises. Baseado em uma recente reconstrução filogenética, proposta por Irisarri et al., (2011), *Pipa* é grupo-irmão dos demais gêneros africanos que compõem a família Pipidae [(*Xenopus+Silurana*) + (*Hymenochirus+Pseudhymenochirus*)]. A hipótese de diversificação do gênero *Pipa* dos demais representantes africanos teria ocorrido a partir do evento vicariante dos continentes Americano e Africano, resultando na diversificação alopátrica dos únicos representantes de Pipídeos sul-americanos no gênero *Pipa* (TRUEB; ROSS; SMITH, 2005).

Dentro dessa perspectiva e considerando a importância das sequências repetitivas na evolução desses genomas, realizamos o mapeamento cromossômico das sequências de histona H3 e U2 snRNA e de motivos microssatélites no cariótipo de *P. carvalhoi* e *X. tropicalis*.

Material e Métodos

Preparações cromossômicas

Os espécimes de *Pipa carvalhoi* analisados foram coletados em Buíque, Pernambuco, Brasil (08°37' 23" S, 37° 09' 21" W), sob licença do SISBIO/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (protocolo 55481-1) e os espécimes foram depositados no Museu de História Natural da Universidade Federal do Alagoas (MHN-UFAL).

Para a obtenção das preparações cromossômicas de *Pipa carvalhoi*, os espécimes foram submetidos à uma injeção intraperitoneal de colchicina 2% (numa proporção de 0,02mL/g do animal) por 4 horas e as suspensões de intestino e testículos foram obtidas segundo o protocolo de King and Rofe (1976) e Schmid (1978).

As amostras de suspensões celulares de *Xenopus tropicalis* foram obtidas através de cultura celular de fibroblastos desenvolvidas no laboratório do Dr. Malcolm A. Ferguson-Smith, do Department of Veterinary Medicine da University of Cambridge e cedidas em parceria pela Dra. Patrícia P. Maltempi da Unesp/Rio Claro.

Preparação de sondas de histona H3 e snRNA U2 de Pipa carvalhoi

Um fragmento de 400pb do gene de histona H3 foi isolado do genoma de *P. carvalhoi* por meio de PCR utilizando os primers H3-F (5'ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3') e H3-R (5' ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC 3'), de acordo com Colgan et al., 1998. O produto de PCR foi purificado com o uso do *EasyPure Quick Gel Extraction Kit* (PROMEGA), segundo recomendações do fabricante, e inseridos em vetor de clonagem pJET 1.2/blunt. O DNA recombinante foi utilizado para transformar células de *Escherichia coli*, da linhagem *TOP10*. As colônias recuperadas foram submetidas a extração do mini-prep plasmidial, conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989). Foram recuperados 30 clones, sendo três sequenciados para confirmação da sequência nucleotídica isolada. O sequenciamento de DNA foi conduzido utilizando o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com recomendações do fabricante e aplicadas em sequenciador automático ABI/Prism (Applied Biosystems, Foster City, CA).

O fragmento de U2 snRNA foi isolado utilizando os primers U2F (5'-ATC GCT TCT CGG CCT TAT G-3') e U2R (5'-TCC CGG CGG TAC TGC AAT A-3') (BUENO et al., 2013), isolados de *Proceratophrys* sp. (Silva et al., em preparação). As mini-preparações plasmidiais foram utilizadas como molde para a produção de sondas por meio de marcação por PCR utilizando 11-digoxigenina- dUTP. Os experimentos de hibridação foram conduzidos utilizando o protocolo de Traut *et al* (2001) com algumas modificações.

Mapeamento de microssatélites em P. carvalhoi e X. tropicalis

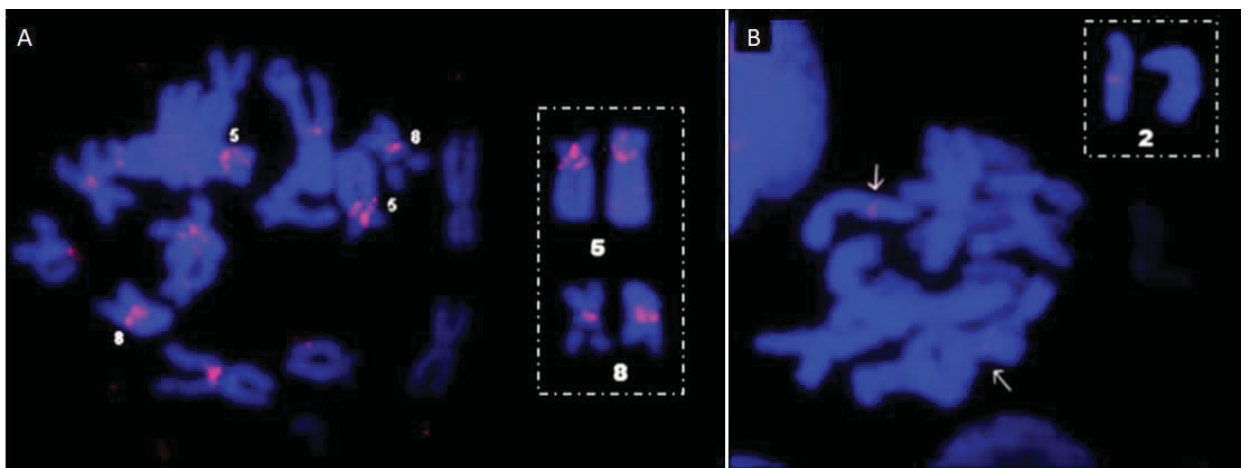
Foram mapeados os seguintes microssatélite nos cromossomos das espécies: (CA)₁₅ e (GA)₁₅ e (GATA)₈, (CGC)₁₀, (GAA)₁₀, (CAG)₁₀ e (GACA)₄. Foram

utilizadas sondas de oligonucleotídeos diretamente marcados com Cy5-fluorocromo em sua extremidade 5' durante sua síntese (Sigma-Aldrich). Os experimentos de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foram realizados segundo o protocolo de Kubat *et al.* (2008) em condições de alta estringência (77%). Todos os experimentos foram realizados em duplicata e sempre utilizando em um mesmo experimento metáfases de ambas as espécies.

Resultados

A análise da sequência nucleotídica do fragmento do gene de histona H3 isolado do genoma de *P. carvalhoi*, em conjunto com sequências do gene de histona H3 disponíveis no GenBank revelaram alta similaridade desta com a sequência dos anuros *Xenopus tropicalis* (DQ28350 – 99%), confirmando o isolamento do fragmento de interesse. Os experimentos de FISH detectaram sinais de hibridação presentes principalmente na região pericentromérica dos braços longos dos homólogos dos pares 5 e 8 (Figura 1A).

O mapeamento da sonda U2 snRNA no genoma de *P. carvalhoi* detectou um sinal de hibridação na região intersticial dos braços longos dos homólogos do par 2 (Figura 1B).



Fonte: Autor (2019)

Figura 1: Cromossomos metafásicos de *Pipa carvalhoi* submetidos ao experimento de hibridação *in situ* fluorescente com as sondas de histona H3 (A) e U2 snRNA (B). Em destaque, pares cromossômicos portadores de sinais de hibridação detectados em ambas as cromátides de cada homólogo.

O mapeamento de repetições microssatélites revelou um interessante padrão em seus sinais de hibridação (Tabela 1). Utilizando sondas dos motivos (CA)₁₅, (GA)₁₅ e (GATA)₈ no cariótipo de ambas as espécies, cariótipo de *Pipa carvalhoi* apresentou sinais para a sonda (GA)₁₅ em todos os cromossomos do cariótipo, com marcações fortes em regiões centroméricas (pares de homólogos 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 8), bem como na região subterminal do par 2 e homólogos do par 9 (Figura 2A). Já no cariótipo de *X. tropicalis*, as marcações da sonda (GA)₁₅ foram detectadas em todos os pares de homólogos, essencialmente nas regiões subterminais dos cromossomos (Figura 2D).

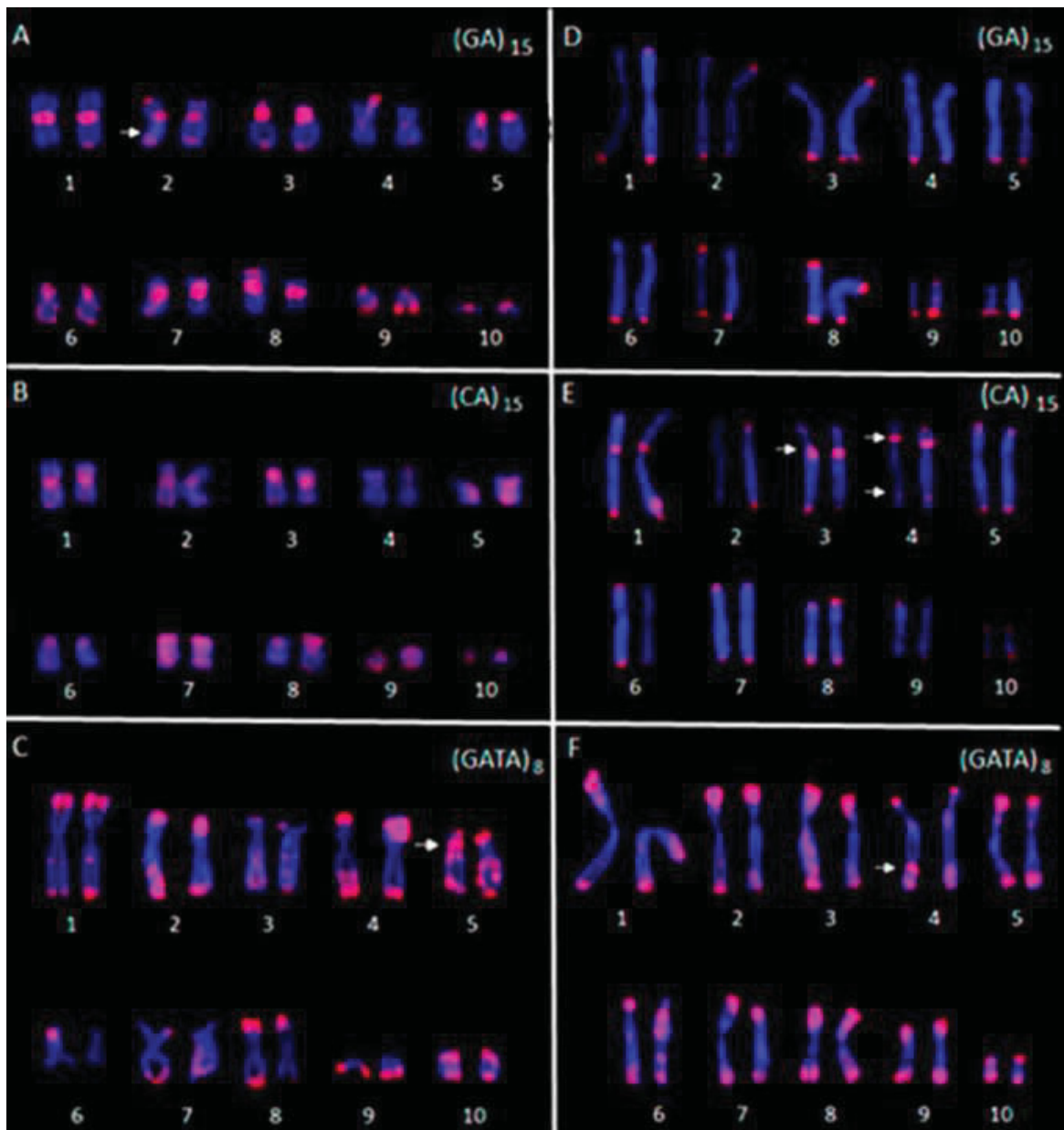
Para as sondas de (CA)₁₅ de *P. carvalhoi* (Figura 2B), foram encontradas marcações mais acentuadas em regiões centroméricas dos cromossomos 1, 2 e 3 e nas regiões terminais do telocêntrico cromossomo 9. Sinais mais fracos foram observados ao longo dos cromossomos 5, 6, 7 e 8. Já em *Xenopus tropicalis* (Figura 2E) foram detectadas marcações dessas repetições nas regiões terminais dos cromossomos de todos os componentes do cariótipo sendo possível observar, ainda, a presença de marcações pericentroméricas nos cromossomos de pares 1, 3 e 4 e algumas marcações intersticiais no braço longo do cromossomo 4.

Diferentemente do padrão observado nos demais microssatélites analisados em *P. carvalhoi*, a sequência de (GATA)₈ encontra-se presente em praticamente todos os cromossomos do cariótipo na sua região terminal (Figura 2C). Foram observados sinais de hibridação as regiões subterminais em ambos os homólogos de alguns cromossomos como nos pares 1, 2 4, 8, em ambos os braços destes cromossomos, e também no cromossomo 9 na região da NOR, além de marcações pontuais observadas regiões intersticiais do cromossomo 5, em ambos os homólogos, apresentando uma marcação mais acentuada na região pericentromérica do braço curto. Em *Xenopus tropicalis*, o padrão desta sequência foi muito semelhante ao observado nos demais microssatélites, estando presente de maneira significativa na região terminal de todos os cromossomos apresentando, também, uma marcação intersticial no braço longo do cromossomo 4 (Figura 2F).

Tabela 1: Motivos microssatélite hibridados no cariótipo de *P. carvalhoi* e *X. tropicalis*. Asteriscos (*) representam a presença de sinais de hibridação em todos os pares do cariótipo, (-) ausência de marcação, Cen= marcação na região centromérica, Per= marcação pericentromérica, Int= marcação intersticial; Subt= marcação subterminal; “p”= braços curtos; “q”=braços longos.

Fonte: Autor (2019)

Motivo repetitivo	<i>Pipa carvalhoi</i>	<i>Xenopus tropicalis</i>
(CA)15	*centromérica	*Subterminal+2qPer; 4qInt
(GA)15	*centromérica + 7qInt	*Subterminal
(GATA)8	*subterminal+5pPer	*subterminal+4qInt
(CGC)10	*subterminal+8pPer	*subterminal
(CAG)10	*subterminal	*subterminal
(GAA)10	5qPer + 7qInt	(-)
(GACA)4	3qPer + 8qInt	(-)



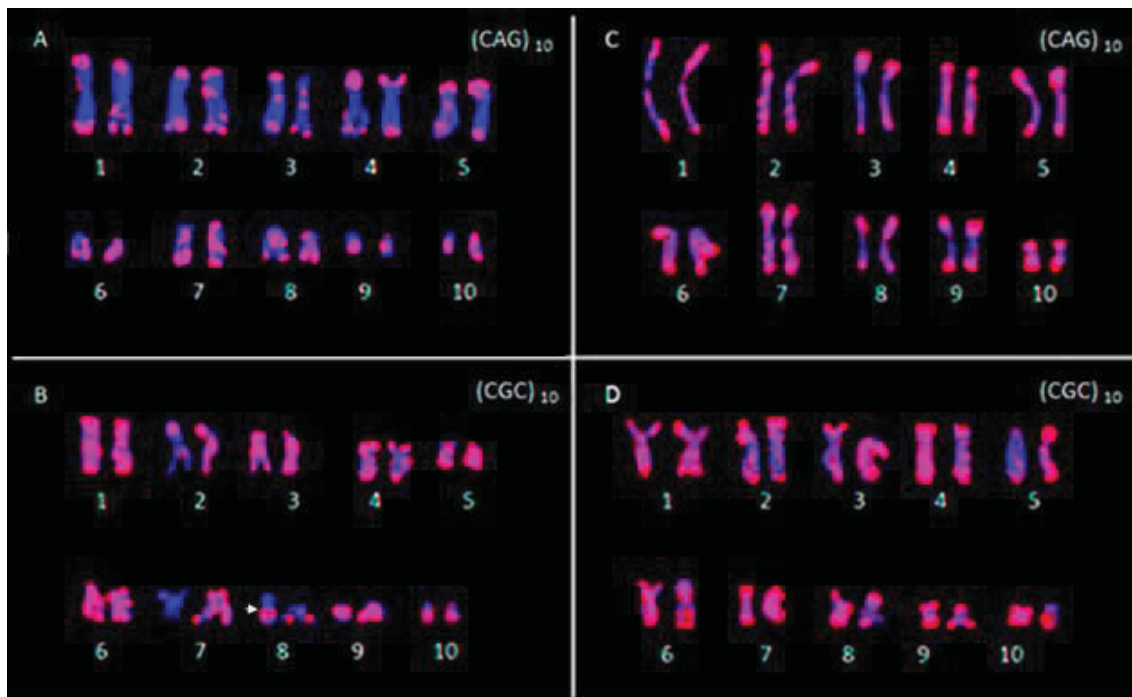
Fonte: Autor (2019).

Figura 2: Cromossomos metafásicos de *Pipa carvalhoi* (A, B, C) e *Xenopus tropicalis* (D, E, F) submetidos aos experimentos de hibridação in situ fluorescente com sondas de repetições microssatélites com motivos (GA)₁₅ (A e D), (CA)₁₅ (B e E) e (GATA)₈ (C e F). As setas indicam pequenos sinais de hibridação, detectados em regiões não terminais dos cromossomos.

Marcações com as três sondas de motivos microssatélites foram detectadas nos homólogos do par 9, na região subterminal, coincidindo com a NOR em *P. carvalhoi* (Zattera et al., em preparação – Capítulo I).

As sondas de motivos microssatélites (CGC)₁₀, (CAG)₁₀, em *P. carvalhoi* e em *X. tropicalis* demonstraram um padrão similar de hibridação entre as espécies para os respectivos marcadores, sendo que os microssatélites (CAG)₁₀ se apresentou

com predominâncias das regiões terminais dos cromossomos, principalmente em *P. carvalhoi* (Figura 3A), enquanto em *Xenopus tropicalis*, existem sinais fortes de hibridação ao longo das regiões intersticiais de alguns cromossomos, como os pares 2, 4, 5, 7 e 10, além dos sinais observados nas regiões terminais (Figura 3C). No caso das sondas do motivo (CGC)₁₀, *P. carvalhoi* apresentou sinais de hibridação ao longo de todos os cromossomos do cariótipo, porém, o cromossomo 8 apresentou fortes sinais do motivo na região pericentromérica dos homólogos (Figura 3B). *X. tropicalis* apresentou marcações deste microssatélite, também, ao longo de todos os cromossomos, porém, com maior intensidade nas regiões terminais dos mesmos (Figura 3D).

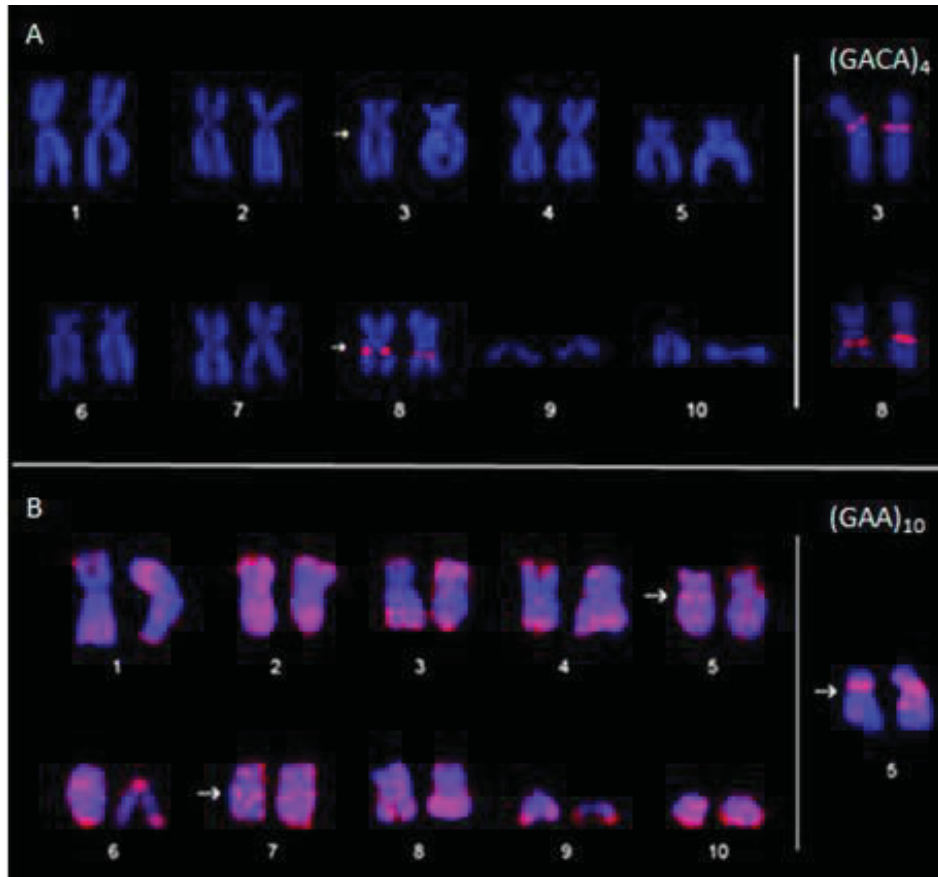


Fonte: Autor (2019)

Figura 3: Cromossomos metafásicos de *Pipa carvalhoi* (A, B) e *Xenopus tropicalis* (D, E) submetidos aos experimentos de hibridação in situ fluorescente com sondas de repetições microssatélites com motivos (CAG)₁₀ (A e E), (CGC)₁₀. As setas indicam pequenos sinais intersticiais de hibridação, detectados nos cromossomos

Foram testadas, em ambas as espécies, as sondas de microssatélites com motivos (GACA)₄ e (GAA)₁₀. Para (GAA)₁₀ em *P. carvalhoi* foram observadas marcações subterminais no cromossomo 4 e 9, assim como na região pericentromérica dos homólogos do par 5, além de sinais intersticiais detectados nos braços longos dos cromossomos do par 7 (Figura 4B), Sinais de hibridação com a sonda do motivo repetitivo (GACA)₄ revelaram acúmulo dessa repetição na região

pericentromérica dos braços longos de ambos os homólogos do par 3, além de um bloco repetitivo na região intersticial dos homólogos do par 8, coincidentes com uma constrição observada nessa região por Zattera et al. (manuscrito I - em preparação). Em *X. tropicalis*, no entanto, nenhuma marcação foi obtida com as sondas destes motivos.



Fonte: Autor (2019)

Figura 4: Cromossomos metafásicos de *Pipa carvalhoi* submetidos aos experimentos de hibridação *in situ* fluorescente com sondas de repetições microssatélites com motivos (GACA)₄ (A) e (GAA)₁₀ (B). As setas indicam pequenos sinais intersticiais de hibridação detectados nos cromossomos.

Discussão

Sintenia dos genes de histona H3 e snoRNA U2 sugerem bons marcadores cromossômicos no reconhecimento de homologias interespecíficas

Os cromossomos que carregam os sítios de histona H3 observados em *P. carvalhoi* são coincidentes com aqueles relatados para *Xenopus tropicalis*. Apesar

de não terem sido mapeados por FISH em *X. tropicalis*, o genoma dessa espécie está inteiramente montado (Xenbase – Genome *Xenopus tropicalis* 9.1), no nível de cromossomos, o que permite reconhecer sua posição no genoma da espécie. Já no genoma de *X. laevis* (Xenbase – Genome *Xenopus tropicalis* 9.2), sequências da histona H3 estão distribuídas no *Scaffold27161* e no *Scaffold1482*, e apresentam alta homologia com as sequências localizadas nos cromossomos 5 e 8 de *X. tropicalis*, respectivamente. *Xenopus laevis* é uma espécie $2n=36$, originada por um processo de aloploidização a partir possíveis progenitores já extintos $2n=18$. No entanto, Session et al. (2016) recuperam grandes regiões de sintenia entre *X. laevis* e *X. tropicalis*, que devem ter divergido a pelo menos 48 milhões de anos, sendo que os pares 5 e 8 dessa espécie (XLA5S e XLA8S) são conservados com os de *X. tropicalis*. Assim, o mapeamento físico desses genes no cariótipo de *P. carvalhoi* nesses mesmos pares cromossômicos reforça a conservação de sintenia dessas regiões a pelo menos 180 milhões de anos, tempo anterior à divergência intercontinental que abrigava o último ancestral comum dessas linhagens de Pipideos.

O mapeamento físico de histona H3 no genoma nunca havia sido realizado no cariótipo de anfíbios e pode ser informativo como marcador na busca por homologias cromossômicas. A conservação da posição dos sítios de H3 observada entre os cariótipos de *P. carvalhoi* e *X. tropicalis* é característica também reportada em outros grupos de eucariotos. Por exemplo, em estudos com 35 espécies de gafanhotos da família Acrididae, Cabrero *et al* (2009) demonstraram localização altamente conservada para o locus de H3, ao passo que, em bivalves estes loci apresentavam determinadas variações (ZHANG et al., 2007; GARCÍA-SOUTO et al., 2015). Esses dois últimos autores sugerem que eventos de rearranjo cromossômico, como inversões ou translocações, podem ter causado essas variações, sendo este gene considerado um bom marcador cromossômico no reconhecimento desses rearranjos ocorrido.

Semelhante cenário de manutenção do par cromossômico portador de gene de snoRNA U2 em *P. carvalhoi* e *X. tropicalis* também revelou o potencial desse marcador cromossômico para inferir homologias interespecíficas. Outros trabalhos têm reportado essa conservação dos pares cromossômicos portadores desses sítios ao longo da evolução cariotípica (PISCOR et al., 2016; 2018). Uma vez que tais marcadores como snoRNA U2 e histona H3 se mostraram bastante conservados

nestas espécies, é possível utilizar tais sequências para realizar a detecção de possíveis rearranjos cromossômicos que ocorram dentro destas espécies resultando, por exemplo, a mudança dos clusters destas sequências para outros cromossomos dentro do cariótipo, podendo ser efetivos nos estudos de evolução cariotípica de Pipidae.

Linhagens evolutivas independentes retêm padrões de organização cromossômica de motivos microssatélite similares

Utilizamos um conjunto de sete sondas de motivos de repetição microssatélite, considerando unidades repetitivas di-, tri- e tetranucleotídicas, para acessar a sua organização genômica no cariótipo das duas espécies aparentadas. Apesar de detectadas algumas generalidades, como a frequente detecção de sinais de hibridação nas porções terminais dos cromossomos, nossos dados também revelaram um padrão divergente de distribuição e abundância para alguns desses repetitivos no genoma de ambas as espécies.

Os dados revelaram acúmulo de motivos microssatélites nas porções subterminais de cromossomos de ambas as espécies, com grandes blocos de repetições tri- [(CAG)₁₀; (CGC)₁₀] e tetranucleotídicas [(GATA)₈] nessas regiões. O acúmulo de repetições microssatélite nas porções subterminais dos cromossomos já foi reportado no cariótipo de espécies de aves (OLIVEIRA et al., 2017), peixes (CIOFFI et al., 2011; XU et al., 2013; POLTRONIERI et al., 2014) e gafanhotos (RUIZ-RUANO et al., 2015) e parece ser uma característica comum nos cromossomos de eucariotos.

O enriquecimento de DNAs repetitivos nas porções subterminais dos cromossomos parece ter papel fundamental para a estabilização dessas regiões nos cromossomos eucarióticos (TORRES et al., 2011). Mais que isso, um elegante trabalho de Tashiro e colaboradores (2017) fornece argumentos robustos sobre a importância dessa organização da região subterminal para o funcionamento dos telômeros, regulação de genes adjacente e para a própria homeostasia dos cromossomos, o que pode explicar a similaridade de composição dos motivos repetitivos que compõem os cromossomos dessas espécies aparentadas.

Embora tenhamos reconhecido similaridades na organização cromossômica de alguns dos motivos microssatélite mapeados nos dois cariótipos, nós observamos

divergência na abundância e distribuição de outros motivos. Por exemplo, se compararmos o padrão dos motivos (CA)₁₅ e principalmente do motivo (GA)₁₅ entre as duas espécies é possível diferir os dois cariótipos entre si. Estas sondas se apresentaram no cariótipo de *P. carvalhoi* majoritariamente na região centromérica e pericentromérica de alguns cromossomos, enquanto no cariótipo de *X. tropicalis* essas repetições foram encontradas majoritariamente nas regiões terminais de todos os cromossomos do cariótipo.

Mesmo que repetições com motivo di ou tri-nucleotídicas já tenham sido mapeadas em regiões centroméricas de outros organismos, como peixes da espécie *P. scalare* e em espécies do gênero *Imparfinis* (SCHNEIDER et al., 2015; GOLVEIA et al., 2017), na espécie de cevada *Hordeum vulgare* (CUADRADO, JOUVE, 2007), em *Arabidopsis* (BRANDES et al. 1997) e até mesmo em anfíbios da família Hylidae (PEIXOTO et al., 2015) por exemplo, este não foi o padrão predominante em nossas análises.

Os sinais de hibridação com as sondas (GA)₁₅ e (CA)₁₅ são consistentes com o padrão de heterocromatina obtido por Zattera *et al.* (em preparação – Capítulo I), enquanto grande parte dos motivos repetitivos, principalmente em *X. tropicalis* foram encontrados nas regiões terminais dos cromossomos. Claramente, observamos variação na composição das classes de repetitivos que compõe a heterocromatina centromérica de *P. carvalhoi* e de *X. tropicalis*, e mais que isso, parece existir variação intragenômica nessa composição entre os pares de homólogos. De fato, a composição de repetitivos que compõe a região centromérica dos cromossomos pode variar tanto em nível intragenômico (LEE et al., 2005) quanto entre espécies relacionadas (PLOHL et al 2008; MELTERS et al., 2013; PLOHL et al., 2014).

Essa variação de conteúdo de DNAs repetitivos contrasta com a grande conservação da organização da cromatina e função dos centrômeros no funcionamento celular de eucariotos (Paradoxo do centrômero – para revisão, ver Henikoff et al. 2001). Microssatélites são reconhecidos justamente pela alta taxa de variação e recombinação, sendo as repetições de motivos dinucleotídicos diretamente relacionadas a essas taxas, já que estudos apontam alta afinidade de enzimas de recombinação por esse tipo de motivo (GUO et al., 2009).

Assim, uma vez que os centrômeros apresentam reduzida recombinação, o acúmulo de sequências microssatélite nessas regiões pode ocorrer por eventos estocásticos. Segundo Guo et al. (2009), o pouco acúmulo desse tipo de repetição

na composição da heterocromatina centromérica pode ser resultado de um certo nível de seleção purificadora criando um equilíbrio entre os polimorfismos genômicos e a função biológica destas sequências no funcionamento dos centrômeros. Melters e colaboradores (2013), analisaram 282 espécies de animais e plantas e identificaram alto nível de variação na composição dos DNAs repetitivos dessas regiões entre os organismos, sendo a principal característica unificadora o fato de serem principalmente compostos por longos arranjos de DNAs satélites e/ou reliquias de elementos genéticos móveis (Plohl et al., 2014). Assim, quando presente nas porções centroméricas, as repetições microssatélite devem representar um motivo repetitivo dentro das unidades de DNAs satélites que compõem essa região e não seu principal componente.

Outro fato que nos despertou interesse foi o de que, apesar dos repetidos esforços em mapear os motivos $(GAA)_{10}$ e $(GACA)_4$, não observamos sinais de hibridação no cariótipo de *X. tropicalis*, enquanto que em *P. carvalhoi*, essas sequências foram detectadas em um interessante padrão evidenciando que, por mais que estas espécies sejam relacionadas, o padrão de repetições microssatélites entre elas se apresenta de maneira distinta, e determinadas sequências de microssatélites presentes no cariótipo de *P. carvalhoi*, podem estar em menores quantidades no genoma de *X. tropicalis* não tendo sido, portanto, mapeados pelos experimentos de FISH.

Dentre os sinais de hibridação da repetição de microssatélite $(GAA)_{10}$ em *P. carvalhoi*, se destaca o sinal obtido no cromossomo 5, sendo coincidente com a localização dos genes de histona H3, e também uma marcação na região terminal do cromossomo 9, co-localizado com a região da NOR. Além dessa repetição específica, nós encontramos para *P. carvalhoi* associação entre sinais de hibridação de outros motivos microssatélites coincidentes com outras classes de DNAs repetitivos, como em associação com a NOR (todas as repetições com exceção de $(GACA)_4$) e com os sítios cromossômicos que abrigam os genes de histona H3 em *P. carvalhoi*, como observado também na repetição dinucleotídica de $(GA)_{15}$.

Esta associação acima citada, parece não ser aleatória, uma vez que muitos elementos repetitivos, como espaçadores de genes histona, elementos transponíveis (TEs) e espaçadores intergênicos de rDNA, inclusive em humanos, podem ser enriquecidos com motivos microssatélites (RUIZ-RUANO et al., 2015; AGRAWAL; GANLEY 2018), Análise por FISH, realizadas por Ruiz-Ruano et al. (2015), e das

próprias sequências genômica de duas espécies de gafanhotos revelaram acúmulo de microssatélites associados aos espaçadores desses genes, sendo os motivos de di- e trinucleotídicos os mais abundantes, como por exemplo a repetição de (AAG)₅. Estas observações podem explicar o fato de muitas das sequências de microssatélites deste trabalho terem sido encontradas na região da NOR no cromossomo 9, detectada por Zattera et al (em preparação – Capítulo I) e em associação com os blocos de histona H3.

A sequência de (GACA)₄ apresentou um padrão único no cariótipo de *P. carvalhoi*, sendo mapeada no cromossomo 8, na região correspondente à constrição por Zattera et al (em preparação- capítulo I) onde, além de ter sido encontrado este tetranucleotídeo, é possível observar que tal região é rica no motivo (CGC)₁₀. Mezassalma et al. (2015), encontraram uma região DAPI positiva na porção pericentromérica do cromossomo 8 de *Hymenochirus boettgeri*, fato também observado nesse par em *P. carvalhoi* (Zattera et al., em preparação – Capítulo I). A constrição observada, rica nestes dois motivos citados, se encontra próxima a estes sítios DAPI-positivo, porém, não são sobrepostos, uma vez que, essas repetições são mais abundantes em bases GC (DAPI-negativo), e podem representar uma classe de repetitivos restrita ao cariótipo de *P. carvalhoi*.

As repetições de microssatélites apresentam uma composição e até mesmo distribuição cromossômica bastante variável entre diferentes grupos de espécies (PLOHL et al., 2008), como pode ser observado no presente estudo. Inferir homologia ou perda de homologia interespecífica nos cariótipos baseando-se meramente em dados de presença/ausência de repetições microssatélite não é prudente, uma vez que, estas sequências sofrem pouca (ou nenhuma) interferência de pressão seletiva e se comportam como unidades evolutivas independentes (UGARKOVIĆ; PLOHL, 2002). Assim, alteração do número de cópias e na sequência de nucleotídeos de DNAs repetitivos, mesmo entre espécies próximas são bastante comuns (UGARKOVIĆ; PLOHL, 2002; CARABALLO; BELLUSCIO; ROSSI, 2010; PLOHL; MEŠTROVIĆ; MRAVINAC, 2010) e são uma característica que contribui significativamente na variação genômica entre as espécies.

No entanto, estas sequências merecem atenção especial uma vez que estas regiões apresentam grande potencial como sítios como *hotspots* para rearranjos cromossômicos, importantes para a diversificação dos cariótipos (ARMOUR, 2006; VIEIRA et al., 2016), fazendo com que este grupo de repetições se destaque como

um bom marcador para distinção entre cariótipos (FARRÉ et al., 2011; POKORNÁ et al., 2011; MEZZASALMA et al., 2015; TABOADA et al., 2018).

Modelo de bibliotecas de DNAs repetitivos como explicação dos padrões encontrados

Mesmo que *P. carvalhoi* e *X. tropicalis* sejam filogeneticamente relacionadas e partilhem de um mesmo número cromossômico, as sequências de DNA repetitivo e suas proporções no genoma apresentaram variação entre as duas espécies. Acredita-se que essas duas espécies tenham partilhado de um último ancestral comum a pelo menos 180 milhões de anos, já que estas linhagens foram separadas pelo evento vicariante da separação dos continentes onde *Xenopus*, assim como grande parte da família, permaneceu isolado no continente africano enquanto as linhagens ancestrais que deram origem à *Pipa* se diversificaram no continente americano (TRUEB et al. 2005).

Segundo Ugarkovic *et al.* (2002), essa alteração observada pode ser explicada devido ao fato de espécies próximas compartilharem algo conhecido como biblioteca de DNAs repetitivos, um modelo proposto por Fry e Salser (1977). Segundo este modelo, os padrões de DNA repetitivos apresentados em cada espécie são resultados da flutuação do número de cópias que estas apresentam das sequências presentes nesta biblioteca, sendo que a extensão desta flutuação também pode ser bem distinta em diversos grupos de organismos. Segundo Plohl et al. (2012) esta biblioteca representa uma fonte permanente de sequências que podem ser amplificadas de uma forma independente em cada espécie para um DNA satélite dominante.

Ou, seja, apesar de compartilharem uma biblioteca base advinda do seu ancestral comum, ainda seria possível perceber diferentes padrões na localização e presença ou ausência dessas sequências, uma vez que os mecanismos genéticos geradores dessas flutuações em sequências de DNA satélite são os mesmos que operam sobre repetições curtas (polimerase *slippage*, *crossing-over* desigual) (OLIVEIRA et al., 2006), portanto, nós atribuímos grande parte das generalidades de tipos de motivos repetitivos presentes e sua localização nos dois genomas como um traço cariotípico em comum entre as espécies, e possivelmente presente no último ancestral em comum entre as mesmas.

CONCLUSÃO

Nossos dados revelaram a manutenção evolutiva da organização de alguns repetitivo por pelo menos 180 milhões de anos o que pode destacar importante papel dessas sequências nas porções terminais dos cromossomos. Nós evocamos que a manutenção de sintenia das sequências de snoRNA e histona H3 revelou grande potencial destes marcadores para inferir homologias interespecíficas e, também, para a detecção de eventuais rearranjos dentro destes genomas. Ao passo que, o mapeamento das repetições microssatélites demonstrou um padrão divergente de distribuição e abundância para alguns desses repetitivos entre os genomas destas espécies, fato este que pode ser explicado pela biblioteca de DNA satélites que espécies compartilham devido ao fato de possuírem um ancestral comum.

CAPÍTULO III:

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DO
ELEMENTO TRANSPONÍVEL *hAT* EM *Pipa carvalhoi* (MIRANDA-RIBEIRO, 1937)
(ANURA: PIPIDAE)**

INTRODUÇÃO

Elementos de transposição (TEs) são o principal componente repetitivo no genoma de vertebrados, contribuindo não só no aumento do tamanho como também na arquitetura dos genomas (WICKER *et al.*, 2007). Considerando o genoma de *Xenopus tropicalis* (genoma de referência para os anfíbios), estima-se que TEs representam um terço de todo o genoma dessa espécie (HELLSTEN *et al.*, 2010).

São inúmeras as evidências de que a mobilidade desses elementos é responsável por induzir rearranjos cromossômicos como inversões (LIM; SIMMONS, 1994; DELPRAT *et al.*, 2009), deleções (LIM; SIMMONS, 1994), translocações (GREY, 2000; BENNETZEN, 2005), servindo, portanto, de importante substrato para remodelar os genomas durante a evolução (CHALOPIN *et al.*, 2015). Hellsten e colaboradores (2010) destaca que em anfíbios há presença de grande quantidade de cópias potencialmente ativas entre os TEs, muito semelhante ao observado em insetos, peixes e plantas e diferentemente do observado em mamíferos e aves, onde a maioria dessas cópias se encontram degeneradas.

Os TEs podem ser divididos em duas classes (I e II) de acordo com os mecanismos envolvidos em sua transposição no genoma (para referência, ver Wicker *et al.*, 2007). Os elementos de classe I são conhecidos como retrotransposons, elementos semelhantes a retrovírus, podendo ser divididos em **transposons LTR**, que apresentam repetições terminais longas (LTR) dispostas na mesma orientação e flanqueiam a parte codificante do elemento sendo necessárias para a transcrição e integração do cDNA, além de possuírem três *Open Reading frame* (ORFs) (BOHNE *et al.*, 2008) e os **não – LTR** que não contêm as LTRs e apresentam normalmente contêm uma ou duas ORFs (HAN, 2010).

Os elementos ditos de classe II, também chamados de transposons de DNA, são sequências que se movem e se amplificam sem a necessidade de um intermediário de RNA (WICKER, 2007; PIÉGU *et al.*, 2015).

Seguindo a classificação de Wicker *et al.* (2007), estes elementos de classe II podem, por sua vez, ser subdivididos em duas subclasses, sendo estas diferenciadas principalmente pelo número de fitas de DNA que são clivadas durante o mecanismo de transposição destes elementos. A primeira subclasse é caracterizada pelo mecanismo de “corta e cola”, envolvendo ambas as fitas de DNA, apresentando duas ordens: a TIR (*Terminal inverted repeat*), que apresenta nove superfamílias

(*PiggyBac*, *Tc-1-Mariner*, *Transib*, *CACTA*, *hAT*, *Merlin*, *Mutator*, *P* e *PIF-Harbinger*) e a ordem Crypton, que apresenta apenas a uma superfamília que dá nome à esta ordem (WICKER *et al.*, 2007). A subclasse II apresenta as ordens Helitron e Maverick, que abrangem superfamílias que também dão nomes às suas respectivas ordens e que são caracterizadas por utilizarem o mecanismo de transposição envolvendo apenas uma das fitas de DNA, como por exemplo, transposição via círculo rolante (WICKER *et al.*, 2007).

A superfamília de **hAT** está entre uma das nove superfamílias da subclasse I, e recebe este nome devido à três transposons de DNA, o (i) *hobo* de *Drosophila* (ii) **Ativador** de transposon de milho (Ac) foi o primeiro elemento de DNA móvel a ser descoberto por Barbara McClintock (1950) e (iii) *Tam3* de *Antirrhinum majus*, popularmente conhecida como Boca – de – leão (RUBIN *et al.*, 2001).

Os elementos presentes em *hAT* apresentam algumas particularidades que os diferem das outras famílias de transposons, como por exemplo, uma TSD (*target site duplication*) com oito nucleotídeos, uma repetição terminal invertida curta (TIR) com um tamanho variável entre 5-27 pb (WICKER *et al.*, 2007). Além disso, estes elementos apresentam um tamanho menor que 4kb, exceto o elemento *Gulliver* encontrado em *Chlamydomonas reinhardtii* que pode atingir um tamanho máximo de 12 kb (FERRIS *et al.* 1989). Em *Xenopus tropicalis*, referência em estudos genômicos de anfíbios já foi relatada forte presença de transposons de DNA, principalmente das superfamílias *Tc-Mariner*, *Harbinger*, *PiggyBac* e *T2/Kolobok* e *hAT* (CHALOPIN *et al.*, 2015; HELLSTEN *et al.*, 2010).

Dentro da Ordem Anura, a família Pipidae inclui atualmente quatro gêneros, sendo estes *Hymenochirus* (Boulenger, 1896), *Pipa* (Laurenti, 1768), *Pseudohymenochirus* (Chabanaud, 1920) e *Xenopus* (Wagler, 1827) (FROST, 2019). O gênero *Pipa* compreende atualmente sete espécies: *P. pipa*, *P. carvalhoi*, *P. parva*, *P. myersi*, *P. snethlageae*, *P. arrabali* e *P. aspera* (FROST, 2019). *Pipa carvalhoi* é uma espécie constituída por 2n=20 cromossomos (MEZZASALMA *et al.*, 2015; ZATTERA *et al.*, em preparação – Capítulo 1) e teve recentemente genoma sequenciado por nosso grupo de pesquisa.

Milhões de anos separam as linhagens africanas do gênero *Pipa*, único grupo sul-americano (TRUEB *et al.*, 2005) e considerando o papel dos elementos móveis na evolução dos genomas, o presente trabalho teve por objetivo mapear fisicamente no cariótipo de *Pipa carvalhoi* a fim de compreender mais efetivamente a

composição deste genoma, bem como o possível papel destas sequências de DNA dentro da evolução cariotípica observada neste grupo.

Material e Métodos

Amostras biológicas e obtenção das suspensões celulares

Os espécimes de *Pipa carvalhoi* analisados foram coletados no município de Buíque pertencente ao estado de Pernambuco, Brasil, sob licença do SISBIO/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (protocolo 55481-1). Após as análises, os animais foram depositados no Museu de História Natural da Universidade Federal do Alagoas (MHN-UFAL).

Para a obtenção de metáfases mitóticas foram utilizadas suspensões de células do intestino, previamente tratadas com colchicina 2% (numa proporção de 0,02mL/g do animal) por 4 horas, segundo o protocolo de King e Rofe (1976) e Schmid (1978).

Isolamento e clonagem

As amostras de DNA genômico foram extraídas de amostras de fígado e músculo de *P. carvalhoi* utilizando o método de extração de DNA por TNES, segundo Bruschi *et al.* (2012). As amostras foram amplificadas através de uma reação de PCR utilizando os primers *REX3-F* (5'-CGGTGAYAAAGGGCAGCCCTG-3') e *REX3-R* (5'-TGGCAGACNGGGGTGGTGGT-3'), de acordo com Volff *et al.*, 1999. Foram testados gradientes de temperatura entre 54°C – 60°C para verificação da melhor temperatura de anelamento e, na melhor condição (58°C), foram realizadas novas 49 rodadas de amplificação utilizando o ciclo de 95°C por 5 min/ (94°C – 1 min/ 58°C – 1 min/ 72°C – 1min30 seg 35X)/ 72°C – 5min.

O produto de PCR obtido foi submetido a corrida em gel de agarose 2,0% e as bandas foram purificadas a partir gel pelo *EasyPure Quick Gel Extraction Kit* (PROMEGA), seguindo as recomendações do fabricante. A banda de aproximadamente 250pb foi inserida no vetor pJET 1.2/blunt e o DNA recombinante gerado utilizado para transformação de bactérias *Escherichia coli*, da linhagem

TOP10 utilizando o CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific), seguindo recomendações do fabricante. A extração plasmidial dos clones selecionados foi realizada segundo o método de mini-prep de Sambrook *et al* (1989) e os clones foram sequenciadas através do método de Sanger.

Hibridização de Fluorescência in situ (FISH)

Os fragmentos obtidos através da clonagem, foram utilizados para a produção da sonda, marcada por PCR com 11-digoxigenina-dUTP. A sonda foi precipitada utilizando esperma de salmão 1ng/mL como DNA competidor e o tempo de hibridação das lâminas foi de 72h. O protocolo para realização do FISH foi baseado em Traut *et al* 2001, com algumas modificações (Zattera *et al.*, em preparação – Capítulo 2), e as lâminas foram analisadas com o auxílio do Microscópio Confocal Nikon.

Análise das sequências

Os clones foram sequenciados bidirecionalmente pelo método de Sanger utilizando kit Big Dye Terminator. As sequências foram editadas manualmente e utilizadas para as análises subsequentes.

Os *reads* provenientes do sequenciamento genômico de *P. carvalhoi* foram utilizadas como *query* para a realização de um BLAST local de nucleotídeos (tBLASTn) contra o genoma de *Pipa carvalhoi*, no intuito de recuperar os *contigs* com a sequência do elemento isolado. Esses *contigs* foram recuperados do genoma completo através de códigos em *python*, escritos para filtrar os resultados e acessar as sequências de interesse.

As sequências editadas foram submetidas a comparações quanto à identidade e similaridade entre sequências e genes de outros organismos no software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), presente no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), com a opção “*SomewhAT similar sequences BLASTn*” e o tamanho das palavras “*size 11*”.

Os *contigs* isolados do genoma de *P. carvalhoi* foram analisados através do banco de dados do REPBASE (disponível em: <https://www.girinst.org/replib/>). Buscas por domínios proteicos foram realizadas pela ferramenta online CD-search

(Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). A confirmação da presença das *TIRs* foi realizada através do BLAST *online*, onde as cópias foram analisadas individualmente por Blastn, opção “*Align two or more sequences*” e “*Optimize for SomewhAT similar sequences (blastn)*”, usando a mesma sequência como *query* e *subject*.

Resultados

Análise molecular

Os fragmentos obtidos das amostras de *P. carvalhoi* apresentaram duas bandas com tamanhos distintos, sendo uma encontrada com 250pb e outra 300pb. Foram obtidos cerca de 50 clones a partir da banda mais leve (~250pb), dois quais 15 foram enviados para sequenciamento. Neste presente trabalho, consta a análise de um desses clones (*Pcarvalhoi_clone 17*), utilizado nos ensaios de FISH (ver abaixo).

Uma vez que o genoma de *P. carvalhoi* está sequenciado, a estratégia foi confirmar se seria possível recuperar *contigs* com similaridade com a sequência isolada. Após inspeção, foram selecionados *contigs* considerando os melhores parâmetros de confiança (*E-value*) e *bit-score* e foram realizadas análises considerando a porcentagem de similaridade das cópias em relação ao clone. Dentre os *contigs* com melhor score, foi observado uma identidade variando de 91-94% com a sequência do clone isolado (Tabela 1).

A análise dos *contigs* utilizando o REPBASE revelou que a sequência clonada e os *contigs* isolados se tratam de um elemento de transposição de Classe II da família *hAT*. Nossa análise recuperou do banco de dados similaridade com cópias do transposon *hAT* presente no genoma de *Xenopus tropicalis* (*hAT-XT*). Dentre elas, destacamos *hAT-10_XT*, *hAT-9_XT* e *hAT-9A_XT* com similaridade variando entre 65,19% - 72, 73% (Tabela 1). A identidade entre os *contigs* e as sequências dos elementos isolados de *X. tropicalis*, de acordo com BLAST, variaram entre 68,25% e 94,44% (Tabela 1).

A análise estrutural do elemento não recuperou nenhum domínio conservado referente a transposase em nenhum dos *contigs* analisados, embora pequenas

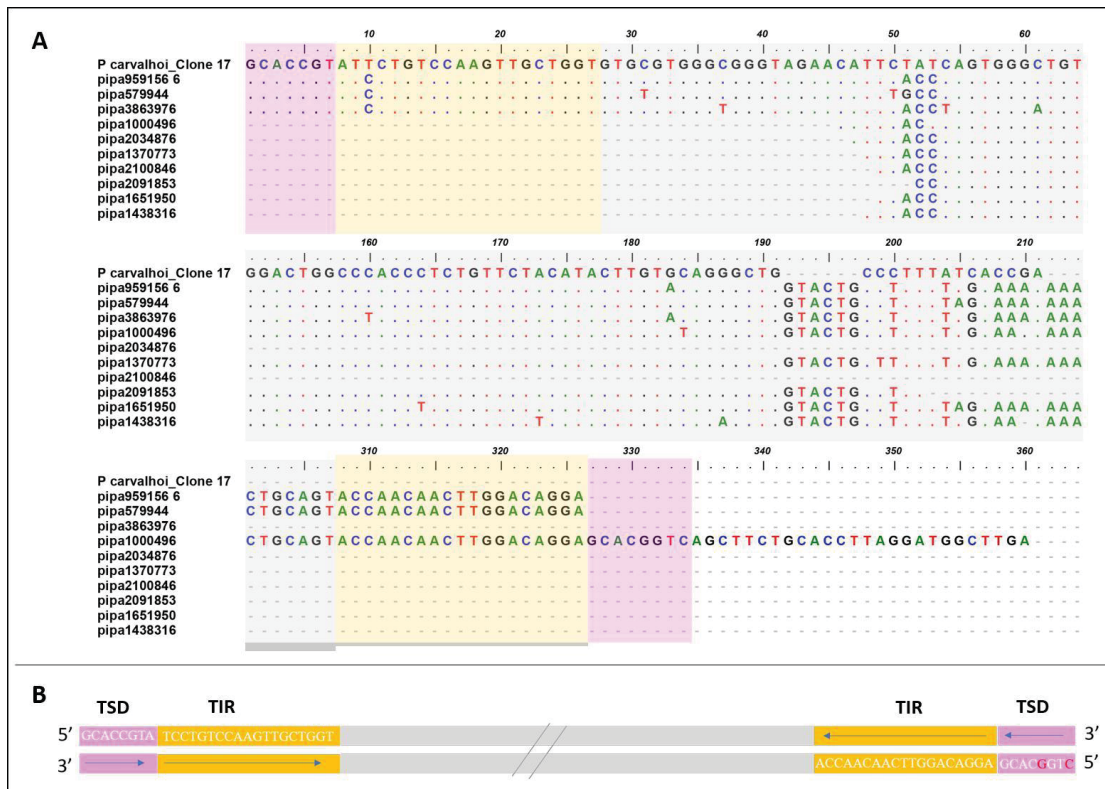
ORFs tenham sido identificadas. No entanto, em quatro *contigs* (*pipa100049*, *pipa959156*; *pipa579944* e *pipa3863976*) e na sequência clonada foi possível identificar repetições terminais invertidas (TIRs) e sítio alvo de duplicação (*target site duplication* – TSD) (Figura 1).

Foi observado, tanto no clone quanto nesses *contigs* uma sequência de 19pb (5' TCCTGTCCAAGTTGCTGGT 3') compatível com as TIRs. No restante dos *contigs*, não foi possível identificamos as TIRs, e isso pode se dar ao fato da sequência estar na ponta dos *contigs* (*pipa2073077*; *pipa1672127*; *pipa2091853*; *pipa1651950*) ou representar cópias muito pequenas do elemento (*pipa2034876*; *pipa1370773*; *pipa2100846*). As TSDs foram recuperadas também em dois dos *contigs* (*pipa100049*, *pipa959156*) e na sequência clonada, correspondendo a 8pb na região *upstream* (5'GCACCGTA 3') da TIR na porção 5' e 8pb na porção 3' (5' GCACGGTC 3') da TIR. Em ambas as cópias, a TIRs apresenta dois SNPs (*single nucleotide polymorphism*) nas TSDs da porção 3' do fragmento [(C[□]G); (A[□]C)], mesmo se tratando de *contigs* que representam cópias distintas, como observado pela pequena variação nucleotídica entre ambas.

Tabela 1: Análise comparativa da identidade da identidade do clone isolado do genoma de *P. carvalhoi* (*Pcarvalhoi_clone17*) em relação aos *contigs* recuperados do genoma da referida espécie (colunas 1 e 2) e sua comparação quanto à similaridade (%) do melhor hit recuperado no REPBASE. Valores de identidade (%) foram recuperados de comparações realizadas no BLAST. A análise de presença e tamanho (pb) de repetições invertidas terminais (TIRs) também é fornecida. XT: *Xenopus tropicalis*; (-): ausência de TIRs.

Fonte: Autor (2019)

CONTIGS	Identidade (%)	Mismatches	REPBASE	Similaridade (%)	Identidade (%)	TIRs
<i>pipa1000496</i>	94.37	8	<i>hAT_10_XT</i>	65,26	81,82	19 pb
<i>pipa959156</i>	93.16	11	<i>hAT_9_XT</i>	71,49	71,05	19 pb
<i>pipa579944</i>	93.16	11	<i>hAT_9_A_XT</i>	66,81	68,14	19-17 pb
<i>pipa3863976</i>	93.04	11	<i>hAT_9_A_XT</i>	66,85%	86,96	19 pb
<i>pipa2073077</i>	92.64	8	<i>hAT_9_XT</i>	65,19%	68,25	-
<i>pipa2034876</i>	92.31	13	<i>hAT_10_XT</i>	72,73%	73,33	-
<i>pipa1672127</i>	92.31	13	<i>hAT_9_A_XT</i>	68,31%	75,61	-
<i>pipa1370773</i>	92.37	11	<i>hAT_9_XT</i>	70,48%	94,44	-
<i>pipa2100846</i>	91.88	14	<i>hAT_10_XT</i>	68,83%	81,58	-
<i>pipa2091853</i>	91.88	14	<i>hAT_10_XT</i>	67,57%	81,58	-
<i>pipa1651950</i>	91.88	14	<i>hAT_9_A_XT</i>	68,64%	75,51	-
<i>pipa1438316</i>	91.88	14	<i>hAT_9_A_XT</i>	66,81%	81,40	-

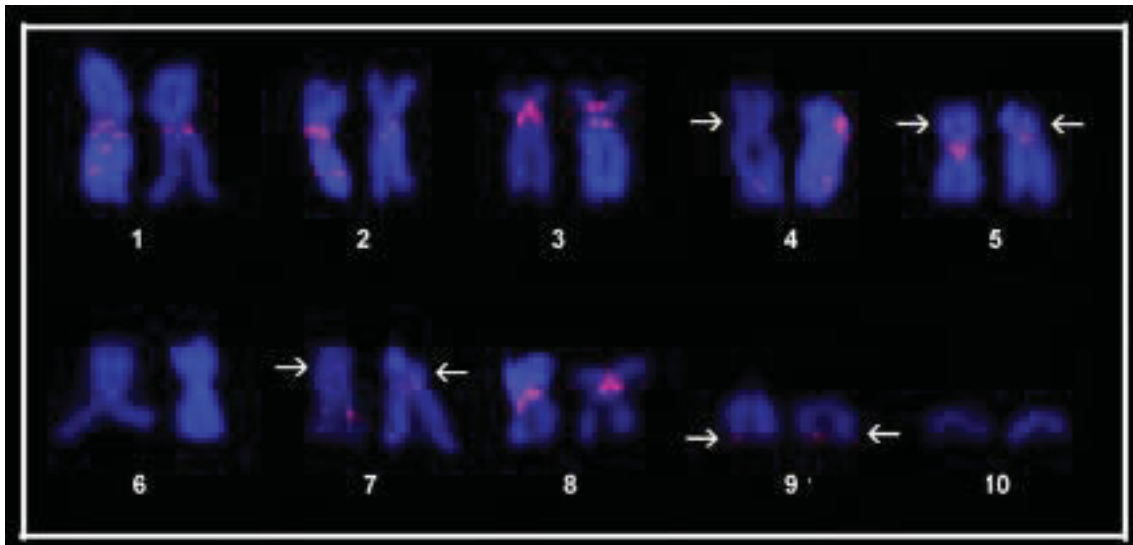


Fonte: Autor (2019)

Figura 1: Alinhamento e representação esquemática do elemento de transposição da família *hAT* baseado nas cópias isoladas do genoma de *Pipa carvalhoi*. **(A)** alinhamento do clone *Pcarvalhoi_clone 17* com os *contigs* recuperados do genoma da referida espécie. Em rosa estão as TSDs, amarelo representa as TIRs e cinza representa a sequência nucleotídica do elemento. **(B)** Representação esquemática do elemento. Nucleotídeos em vermelho na TSD representa SNPS detectados.

Mapeamento cromossômico

A sonda preparada a partir do fragmento *Pcarvalhoi_clone17* foi utilizada em experimentos de FISH e revelou sinais de hibridação desses elementos "clusterizados" em sítios cromossômicos distribuídos no genoma de *P. carvalhoi*. A maioria dos sinais foram detectados nas porções pericentroméricas dos cromossomos, observados como marcações nos braços curtos dos homólogos dos pares 2 e 3, além de sutis, porém pontuais, marcações detectadas nos pares 4, 5 e 7 (setas na Figura 1). Sinais de hibridação também foram detectados na região pericentromérica dos braços longos dos pares 1, 5 e 8, além um bloco subterminal, coincidente com o sítio da NOR nos homólogos do par 9 (Figura 2).



Fonte: Autor (2019)

Figura 2: Cromossomos metafásicos de *P. carvalhoi* submetidos à FISH com sonda do elemento de transposon de DNA *hAT*. Setas indicam pequenos sinais de hibridação, detectados em ambas as cromátides de alguns pares cromossômicos.

Discussão

Os elementos da superfamília de *hAT* podem apresentar uma ampla distribuição entre os eucariotos devido a sua origem que pode ser datada de antes da separação entre plantas, animais e fungos (WICKER et al., 2007) sendo encontrados, inclusive, em humanos onde representam os mais abundantes transposons de DNA (RUBIN et al., 2001; LANDER et al., 2001).

O elemento de *hAT* encontrado em *P. carvalhoi* foi similar ao já reportado em *Xenopus tropicalis*, um interessante dado, uma vez que, estes transposons de DNA já foram detectados também em outras espécies de anfíbios. Das cinco espécies de Anura com genoma sequenciado, estes elementos já foram reportados em *Nanorana parkeri*, *Xenopus tropicalis* (SUN et al., 2015) e *Rhinella marina* (EDWARDS et al 2018), sendo que nessa última o elemento *hAT-Ac* foi o mais abundante dentre os transposons de DNA encontrados. No entanto, uma análise aprofundada desse elemento em Anura nunca foi realizada, sendo esses dados de presença apenas recuperados das informações a partir da anotação do conteúdo de DNAs repetitivos fornecida nos trabalhos de montagem dos genomas dessas espécies.

A caracterização estrutural recuperou a presença de TIRs e TSDs, sendo uma evidência a mais de que a sequência recuperada se trata deste elemento. As repetições encontradas apresentam características específicas dos elementos desta

superfamília, como as TSDs (sítio alvo de duplicação) com o tamanho de 8pb e as repetições terminais invertidas (TIRs) relativamente curtas, que podem variar entre 5-27pb (WICKER et al., 2007). No entanto, entre as cópias inspecionadas, não encontramos nenhuma ORF específica que pudesse nos indicar a presença de integridade no aparato de mobilização dessas cópias.

A sequência de *hAT* mapeada em *P. carvalhoi* foi amplificada a partir de um primer heterólogo do retroelemento *Rex3*, utilizado por Volff et al., (1999) para isolar este retrotransposon em peixes do gênero *Xiphophorus*. Apesar do uso de primers heterólogos para o isolamento de elementos repetitivos ser prática relativamente comum entre os grupos de pesquisa, nosso trabalho demonstrou uma baixa transferibilidade desses iniciadores de peixes para anfíbios. Ao contrário do que ocorreu no presente trabalho, Nascimento e colaboradores (2015) conseguiram recuperar cópias do elemento Rex-1 no genoma de *Physalaemus cuvieri* utilizando os primers desenhados para isolamento desse retroelemento do genoma do peixe *Xiphophorus maculatus* (Vollf et al., 1999). Aparentemente, existem cópias semelhantes ao elemento Rex-3 entre os *contigs* do genoma de *P. carvalhoi* (*pipa84507*; dados em análises por nosso grupo de pesquisa), no entanto, não foram isoladas em nossos experimentos de PCR através desse conjunto de primers.

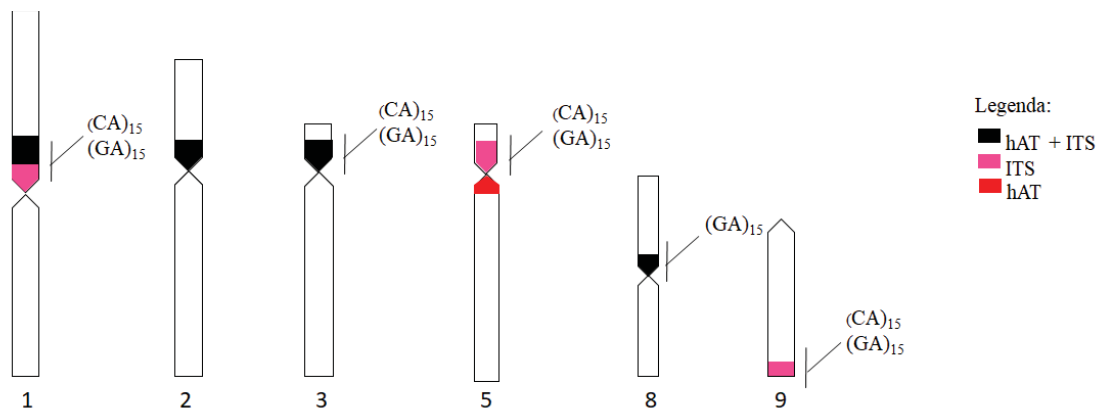
A cópia isolada em nosso trabalho a partir desses primers também é repetitiva e com acúmulo suficiente para ser mapeado cromossomicamente no genoma da espécie. *A posteriori*, foram buscados sítios de anelamento dos primers utilizados nos *contigs* do genoma de *P. carvalhoi* e foram reconhecidos pequenos sítios de anelamento, tanto da sequência *forward* quanto para a *reverse*, como no contig *pipa100049*, que apresentou 94% de similaridade com o clone, onde o fragmento esperado a partir da posição de anelamento dos primers apresenta um tamanho de 253pb, compatível com o tamanho do clone obtido.

O fato das bandas recuperadas terem sido isoladas a partir de um experimento de PCR utilizando um gradiente de temperatura, pode ter contribuído para reduzir a especificidade do primer pela sequência genômica-alvo, e como aparentemente essa sequência está presente em bastante cópias no genoma (vide distribuição de marcações por FISH), mesmo em condições não ideais de amplificação, essas cópias foram amplificadas.

Esse fato abriu novas perspectivas para nosso trabalho, uma vez que nesse momento do estudo, a presença do genoma de *P. carvalhoi* passou por um novo

round de montagem, o que facilita nossa busca por essas sequências, desenho de primers mais específicos para buscas de cópias íntegras desse elemento genético.

No presente trabalho mapeamos cópias do *hAT* principalmente nas regiões pericentroméricas (pares 1, 3, 5 e 8) e marcações pontuais em regiões intersticiais de alguns cromossomos (pares 1 e 7) e, em sua grande maioria, estas marcações são coincidentes com outras classes de DNAs repetitivos (repetições microssatélite, ITS e rDNAs) e parecem ser componente importante dos blocos de heterocromatina previamente detectados nessa região (Zattera et al., em preparação – Capítulo I) (Figura 3).



Fonte: Autor (2019)

Figura 3: Ideograma representando cromossomos com sinais de hibridação com as sondas do elemento *hAT* isolado e clonados a partir do DNA genômico de *P. carvalhoi*. Reportamos a presença de sinais de hibridação com repetições (TTAGGG)_n (ver legenda) e indicamos os locais de hibridação dos motivos de microssatélites [(CA)₁₅ e (GA)₁₅], de acordo com Zattera *et al.* (Capítulos I e II, respectivamente). Todos os sítios representam blocos de heterocromatina detectados por bandamento C seguindo Zattera et al (em preparação-capítulo I).

A evidência de sobreposição dos sinais de hibridação dos elementos de *hAT* e de motivos microssatélites na mesma região cromossômica, como os motivos (CA)₁₅ e (GA)₁₅ não surpreendeu, uma vez que, sequências de microssatélites são comuns próximas ou na mesma região onde são observados elementos transponíveis no genoma (KEJNOVSKÝ *et al.*, 2013), podendo inclusive estar presente na estrutura desses elementos. Alguns artigos sugerem que as regiões de microssatélites são possíveis alvos de tais elementos no momento de sua transposição (AKAGI *et al.*, 2001) ou podem ser o resultado da própria retroinserção destes em um novo sítio cromossômico (WILDER *et al.*, 2001; BUSCHIAZZO *et al.*, 2007).

Outro dado interessante de nosso trabalho foi a relação entre o elemento *hAT*

e sequências teloméricas intersticiais. Similar resultados já foram reportados por Glugoski *et al.* (2018), onde elementos de *hAT* inseridos dentro de uma cópia de rDNA 5S degenerado parece ter favorecido a ocorrência de rearranjos cromossômicos (fusões Robertsonianas) no cariótipo do peixe *Rineloricaria latirostris*. Experimentos de *double-fish* também revelaram a presença de sequências teloméricas intersticiais e podem corresponder a uma assinatura molecular do evento de fusão cromossômica e revela o papel desses DNAs repetitivos (rDNA 5S e TEs) gerando regiões susceptíveis a quebras cromossômicas e rearranjos.

O genoma de *P. carvalhoi* apresentou uma grande quantidade de elementos *hAT* em regiões heterocromáticas, corroborando dados presentes na literatura onde, no genoma dos eucariotos, grande parte dos seguimentos de heterocromatina são compostos por sequências repetitivas, como DNA satélites, sequências micro- e minisatélites e sequências dispersas no genoma, como retrotransposons e transposons de DNA (JURKA *et al.*, 2005). Acúmulo de cópias ativas ou não em porções heterocromáticas de cromossomos é característica frequente dessa cromatina de diferentes organismos (PIMPINELLI *et al.*, 1995; DEPRÁ *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017).

A suposta predileção dos elementos transponíveis em regiões heterocromáticas pode ser devido ao fato desta apresentar um impacto de seleção menor quando comparado à eucromatina, uma vez que a seleção atua de maneira mais forte nas regiões ricas em genes, o que reduz as chances destes elementos serem removidos do genoma do hospedeiro quando inseridos em porções heterocromáticas (KAPITONOV; JURKA 2003; LERAT *et al.* 2003; DEPRÁ *et al.*, 2010).

O cariótipo *P. carvalhoi* também apresentou marcações pontuais, com pequenos sinais de hibridação distribuídos em regiões eucromáticas dos cromossomos. A presença de elementos transponíveis nestas regiões de eucromatina já foi observada outros grupos de organismos como gafanhotos (MONTIEL *et al.*, 2012), *Drosophila melanogaster* (KAMINKER *et al.*, 2002; LIPATOV *et al.*, 2005) e peixes (OZOUF-COSTAZ *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2013) e uma possível explicação para tal observação, reside no fato de que quanto maior o genoma, maiores são os potenciais sítios na eucromatina tolerados para inserção destes elementos, sem que estes causem efeitos deletérios em genes, como locais

com espaçadores intergênicos e pseudogenes, por exemplo (MONTIEL et al., 2012). Estes apresentam pela primeira vez o mapeamento cromossômico de sequências do elemento *hAT*, que assim como em outros anfíbios, parece estar abundante dentro do genoma de *P. carvalhoi*, mostrando que este elemento apresenta uma manutenção evolutiva dentro do grupo de Anuros, estando presente até mesmo em grupo mais basais como no caso da família Pipidae.

Isso levanta, porém, a necessidade de mais estudos à cerca destes elementos e, dentro dessa abordagem, as perspectivas para o presente capítulo são **(i)** sequenciar um maior número de clones, representando ambas as bandas isoladas; **(ii)** realizar uma análise comparativa com as sequências do *hAT* dos demais anfíbios com genomas sequenciados, **(iii)** inspecionar um maior número de *reads* do genoma de *P. carvalhoi* e buscar por cópias intactas desse elemento e **(iv)** realizar o mapeamento cromossômico das cópias do *hAT* no genoma de *X. tropicalis*.

4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi possível verificar que *P. carvalhoi* apresenta número diplóide $2n=20$, corroborando o número diploide reportado na literatura, destacando a localização das regiões heterocromáticas e da NOR, além da observação de presença de sequências teloméricas intersticiais neste genoma;
- Os experimentos de hibridização *in situ* evidenciaram a presença dos sítios de histona H3 e snoRNA U2 bem conservados em relação à *Xenopus tropicalis*, grupo –irmão de *Pipa carvalhoi*. Nos experimentos com repetições microssatélites, foram observados alguns motivos com marcações bastante similares nestes genomas, indicando possível conservação na cromatina dessas porções cromossômicas;
- Evidenciamos diferenças nos sinais de hibridização de microssatélites $(GAA)_{10}$ e $(GACA)_4$ entre estas espécies, o que pode revelar potencial desses marcadores na distinção entre esses cariótipos e na evolução cariotípica no gênero *Pipa*;
- O mapeamento físico do transposon de DNA da superfamília hAT, demonstrou que esta sequência se encontra presente de maneira bastante significativa em *P. carvalhoi*, além de apresentar uma grande similaridade com as sequências deste elemento encontradas em *X. tropicalis*. Os elementos de hAT foram ainda encontrados fortemente associados à regiões heterocromáticas e, também, com repetições microssatélites e $(TTAGGG)_n$.
- As contribuições aqui apresentadas sugerem que *P. carvalhoi* manteve a condição pleiomórfica dentro de Pipidae com a presença de $2n=20$, logo, as sequências teloméricas intersticiais encontradas neste genoma, podem ter surgido de maneira independente sem, necessariamente, estarem ligadas à eventos de rearranjos. Sua associação com o elemento hAT pode também ser uma possível origem para a dispersão de repetições $TTAGGG_n$. Os dados do mapeamento de histona H3 e snoRNA U2 demonstram que mesmo estas espécies tendo sido separadas por milhões de anos, tais sequências parecem se manter conservadas ao longo da evolução destes genomas de maneira bastante significativa. Ressaltamos, ainda, que a diferença no padrão observado de determinados microssatélites não foi

surpreendente, uma vez que, alteração do número de cópias e na sequência de nucleotídeos de DNAs repetitivos são comuns mesmo entre espécies próximas e acabam contribuindo significativamente na variação genômica entre as espécies. Foi realizado, ainda, o mapeamento inédito do elemento da superfamília *hAT* em *P. carvalhoi*, evidenciando a presença deste transposon de DNA neste anfíbio, conforme já reportado para outras espécies de Anura, porém, os estudos com este elemento neste genoma em questão precisam, ainda, ser aprofundados.

REFERÊNCIAS

INTRODUÇÃO

- ARAUJO, N. P. *et al.* Identification and characterization of a subtelomeric satellite DNA in *Callitrichini* monkeys. **DNA Research**, v. 24, n. 4, p. 377–385, 2017.
- ARENSBURGER, P *et al.* Phylogenetic and Functional Characterization of the hAT Transposon Superfamily. **Genetics** 188: 45–57, 2011.
- ARZABE, C; SKUK, G, BEIER, M 2010. *Pipa carvalhoi*. **The IUCN Red List of Threatened Species** e.T58160A11728418
<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T58160A11728418.en>. 2010, Downloaded on 20 September 2018.
- BARCISZEWSKA, M. Z. *et al.* Structure and functions of 5S rRNA. **Acta biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, p. 191–8, 2001.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 521–524, 2006.
- BIET, E.; SUN, J. S.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: An effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 2, p. 596–600, 1999.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 415–420, 2015.
- BÖHNE, A. *et al.* Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromosome Research**, v. 16, n. 1, p. 203–215, 2008.
- BOWEN, N. J; JORDAN K. Transposable Elements and the Evolution of Eukaryotic Complexity. **Curr. Issues Mol. Biol**4, p. 65-76, 2002.
- BUSCHIAZZO, L. M. *et al.* Integrative analysis of chromosome banding, telomere localization and molecular genetics in the highly variable *Ctenomys* of the Corrientes group (Rodentia; Ctenomyidae). **Genetica**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.
- CANNATELLA, D. C.; TRUEB, L. Evolution of pipoid frogs: intergeneric relationships of the aquatic frog family Pipidae (Anura). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 94, n. 1, p. 1–38, 1988.
- CASTRO, S. I. *et al.* Molecular organization of the 5S rDNA gene type II in elasmobranchs. **RNA Biology**, v. 13, n. 4, p. 391–399, 2016.
- CHÉNAIS, B *et al.* The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: from genome size increase to genetic adaptation to stressful environments. **Gene**, v. 509, n.1, p: 7-15, Nov 1, 2012
- DA SILVA, E. T. *et al.* Amphibia, Anura, Pipidae, *Pipa carvalhoi* (Miranda-Ribeiro, 1937): Distribution extension and geographic distribution map in the southeast of Brazil. **Check List**, v. 6, n. 3, p. 451–453, 2010.

- EICKBUSH, T.H., MALIK, H.S. Origin and evolution of retrotransposons. In: Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A.M. (eds.). **Mobile DNA II**. American Society for Microbiology Press, Washington, USA, 2002.
- FANTINATTI, B. E. A.; MARTINS, C. Development of chromosomal markers based on next-generation sequencing: The B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* as a model. **BMC Genetics**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2016.
- FERNANDES, T. L. et al. Carrying Progeny on the Back: Reproduction in the Brazilian Aquatic Frog *Pipa carvalhoi* **South American Journal of Herpetology**, v. 6, n. 3, p. 161–176, 2011.
- FERRIE, G. M. et al. Nutrition and Health in Amphibian Husbandry. **Zoo Biology**, v.33, n. 6, p. 485–501, 2014.
- FONSECA, E. M. et al. The breathing pattern and the ventilatory response to aquatic and aerial hypoxia and hypercarbia in the frog *Pipa carvalhoi*. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 162, n. 3, p. 281–287, 2012.
- FRANSZ, P.; DE JONG, H. From nucleosome to chromosome: A dynamic organization of genetic information. **Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 4–17, 2011.
- FRESCHOTTE, C; PRITHAM, J.E. DNA transposons and evolution of eukaryotic genomics. **Annual Review of Genetics**, v.41, p.331-369, 2007.
- FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. American Museum of Natural History, New York, USA. **Electronic Database** accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Version 6.0 [Accessed 01/03/2019]
- GALETTI JR., P.M; RASCH, E.M. Chromosome studies in *Poecilia latipunctata* with NORs polymorphism as shown by silver nitrate and chromomycin A3 (Teleostei: Poeciliidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*. V.p.269-277, 1993.
- GARBUS, I. et al. Characterization of repetitive DNA landscape in wheat homeologous group 4 chromosomes. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, 2015.
- GATTO, K. P. et al. Sex chromosome differentiation in the frog genus *Pseudis* involves satellite DNA and chromosome rearrangements. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. August, p. 301, 2018.
- GATTO, K. P.; BUSIN, C. S.; LOURENÇO, L. B. Unraveling the sex chromosome heteromorphism of the paradoxical frog *Pseudis tocantins*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–23, 2016.
- GERDES, P. et al. Transposable elements in the mammalian embryo: Pioneers surviving through stealth and service. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–17, 2016.
- GIFALLI-IUGHETTI, C.; KOIFFMANN, C. P. Synteny of human chromosomes 14 and 15 in the *Platyrrhines* (Primates, Platyrrhini). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 786–791, 2009.

GONZÁLEZ, J; PETROV, D.A. Evolution of genome content: population dynamics of transposable elements in flies and humans. **Methods in Molecular Biology**, v.855, p. 361-383, 2012.

GOLD, J. R et al. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal of Fish Biology** 37,563-575, 1990

GRAINGER, R. M. *Xenopus* Protocols. v. 917, p. 1–11, 2012.

GRAPHODATSKY, A.S; YANG, F; PERELMAN, P.L. Comparative molecular cytogenetic studies in the order Carnivora: mapping chromosomal rearrangements onto the phylogenetic tree. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 96, p.137–145, 2002.

GRAY, Y. H. M. It takes two transposons to tango. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 10, p. 461–468, 2000.

GUERRA, M. Introdução a citogenética geral. Rio de Janeiro: Ed. **Guanabara**, p. 142p, 1988.

HAN, C. et al. Cytogenetics of Two *Onychostoma* Species in Taiwan by Ag-NOR and 18S rDNA Profiles. v. 25, 2017.

HAVECKER, E. R.; GAO, X.; VOYTAS, D. F. The diversity of LTR retrotransposons. **Genome Biology**, v. 5, n. 6, 2004.

HERMANN, D et al. An introduction to the vast world of transposable elements – what about the diatoms? **Diatom Research** Vol. 29, No. 1, 91–104, 2014

IRISARRI, I. et al. Reversal to air-driven sound production revealed by a molecular phylogeny of tongueless frogs, family Pipidae. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, 2011.

JAUCH, A. et al. Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. **Evolution**, v. 89, n. September, p. 8611–8615, 1992.

JURKA, J. et al. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1–4, p. 462–467, 2005.

KASAHARA, S. Introdução à Citogenética de Vertebrados. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 2009.

KAPITONOV, V. V.; JURKA, J. Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 10, p. 521–529, 2007.

KAPITONOV, V. V.; TEMPEL, S.; JURKA, J. Simple and fast classification of non-LTR retrotransposons based on phylogeny of their RT domain protein sequences. **Gene**, v. 448, n. 2, p. 207–213, 2009.

KIDWELL, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**. V.115, p49-63, 2002.

- KNYTL, M. et al. Chromosome divergence during evolution of the tetraploid clawed frogs, *Xenopus mellotropicalis* and *Xenopus epitropicalis* as revealed by Zoo-FISH. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–16, 2017.
- KOHN, M. et al. Reconstruction of a 450-My-old ancestral vertebrate protokaryotype. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 4, p. 203–210, 2006.
- KODAMA, K; TAKAGI, S; KOGA, A. The Tol1 element of the medaka fish, a member of the hAT transposable element family, jumps in *Caenorhabditis elegans*. **Heredity** 101, 222–227, 2008.
- KRYLOV, V. et al. Preparation of *Xenopus tropicalis* whole chromosome painting probes using laser microdissection and reconstruction of *X. laevis* tetraploid karyotype by Zoo-FISH. **Chromosome Research**, v. 18, n. 4, p. 431–439, 2010.
- KRYLOV, V.; TLAPAKOVA, T. *Xenopus* Cytogenetics and Chromosomal Evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 145, n. 3–4, p. 192–200, 2015.
- KUHN, G. C. S. Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*. **Heredity**, v. 115, n. 1, p. 1–2, 2015.
- LE SCOUARNEC, S.; GRIBBLE, S. M. Characterising chromosome rearrangements: Recent technical advances in molecular cytogenetics. **Heredity**, v. 108, n. 1, p. 75–85, 2012.
- LI, Y. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanism: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 253–256, 2002.
- LILLO, F.; FARAONE, F. P.; VALVO, M. LO. Can the introduction of *Xenopus laevis* affect native amphibian populations? Reduction of reproductive occurrence in presence of the invasive species. **Biological Invasions**, v. 13, n. 7, p. 1533–1541, 2011.
- LIU, Z. et al. Microsatellite-containing genes from the channel catfish brain: Evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 2, p. 317–324, 2001.
- MARTINS, C; WASKO, A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. **Focus on genome research**, 2004.
- MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. **Fish Cytogenetics**, p. 421–453, 2007.
- MARTINS, C., CABRAL-DE-MELLO, D.C., VALENTE, G.T et al. Animal genomes under the focus of cytogenetics. **Nova Science**, New York, USA, 2011.
- MATSUBARA, K. et al. Karyotypic evolution of *Apodemus* (Muridae, Rodentia) inferred from comparative FISH analyses. **Chromosome Research**, v. 12, n. 4, p. 383–395, 2004.

- MAYER, C.; LEESE, F.; TOLLRIAN, R. Genome-wide analysis of tandem repeats in *Daphnia pulex* - a comparative approach. 2010.
- MEHROTRA, S.; GOYAL, V. Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 164–171, 2014.
- MEZZASALMA, M. et al. Karyological analyses of *Pseudhymenochirus merlini* and *Hymenochirus boettgeri* provide new insights into the chromosome evolution in the anuran family Pipidae. **Zoologischer Anzeiger**, v. 258, p. 47–53, 2015.
- MILLER, W. J.; MCDONALD, J. F.; PINSKER, W. Molecular domestication of mobile elements. **Genetica**, v. 100, n. 1–3, p. 261–70, 1997.
- MODI, W.; GALLAGHER, D.; WOMACK, J. Evolutionary Histories of Highly Repeated DNA Families Among the Artidactyla, Mammalia. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, p. 337–349, 1996.
- MORESCALCHI, A. Initial cytotaxonomic data on certain families of amphibious Anura (Diplasiocoela, after Noble). **Experientia** v. 24, p.280–283, 1968.
- NASCIMENTO, J.; BALDO, D.; LOURENÇO, L. B. First insights on the retroelement Rex1 in the cytogenetics of frogs. **Molecular Cytogenetics**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2015.
- NEI, M; ROONEY, A.P. Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families. **Annu Rev Genet**. v.39, p.121–152, 2005.
- OLIVEIRA, S. G. et al. Chromosomal organization and evolutionary history of Mariner transposable elements in *Scarabaeinae* coleopterans. **Molecular Cytogenetics**, v. 6, n.1, p. 14–16, 2013.
- PLOHL, M. Those mysterious sequences of satellite DNAs. **Periodicum Biologorum**, v. 112, n. 4, p. 403–410, 2010.
- PLOHL, M et al. Satellite DNA Evolution. Repetitive DNA. **Genome Dyn. Basel, Karger**, vol 7, p.p 126–152, 2012.
- POUGH, F.H.; ANDREWS, R.M.; CADLE, J.E et al. **Herpetology, second edition**. Prentice-Hall, New York, 2001.
- RASKINA, O. et al. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: Speciation-related events in plant genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, n. 3–4, p. 351–357, 2008.
- REBOLLO, R.; ROMANISH, M. T.; MAGER, D. L. Transposable Elements: An Abundant and Natural Source of Regulatory Sequences for Host Genes. **Annual Review of Genetics**, v. 46, n. 1, p. 21–42, 2012.
- RENS, W. et al. Cross-species chromosome painting. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p.783–790, 2006.
- RUIZ-RUANO, F.J et al. Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. **Chromosoma** 124:221–234, 2015.

- SIVIERO, F. et al. The histone genes cluster in *Rhynchosciara americana* and its transcription profile in salivary glands during larval development. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 4, p. 580–588, 2016.
- SUN, C. et al. LTR retrotransposons contribute to genomic gigantism in plethodontid salamanders. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 168–183, 2012.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, v.66, p.361-368, 1978.
- SCHMID, M; GUTTENBACH, M. Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. **Chromosoma**, v.97, p;101-114, 1988.
- TARGUETA, C. P et al. Anuran Cytogenetics: An Overview. In: **An Essential Guide to Cytogenetics**, 2018.
- THATCHER, T. H.; GOROVSKY, M. A. Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 2, p. 174–179, 1994.
- TRUEB, L; CANNATELLA, D. C. Systematics, Morphology, And Phylogeny Of Genus *Pipa* (Anura: Pipidae). **Herpetologica**, 42(4) 412-449, 1986.
- TRUEB, L.; ROSS, C. F.; SMITH, R. A new pipoid anuran from the Late Cretaceous of South Africa. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 25, n. 3, p. 533–547, 2005.
- TYMOWSKA, J.; FISCHBERG, M. Chromosome complements of the genus *Xenopus*. **Chromosoma**, v. 44, n. 3, p. 335–342, 1973.
- UNO, Y. et al. Homoeologous chromosomes of *Xenopus laevis* are highly conserved after whole-genome duplication. **Heredity**, v. 111, n. 5, p. 430–436, 2013.
- VITTORAZZI, S. E. et al. Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 2, p. 101–107, 2011.
- VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in *leptodactylid* and hylodid frogs. **BMC Genetics**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2014.
- VOLFF, J. N. et al. Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. **Journal of Molecular Evolution**, v. 52, n. 4, p. 351–360, 2001.
- WALIA, G.; CHAHAL, S. S. Cytogenetic report on *Gynacanthaeschna sikkima* from India (Odonata : Aeshnidae). **Odonatologica**. June, 2016.
- WELLS, K. D. The ecology and behavior of amphibians. – **The University of Chicago Press: Chicago**, USA, 2010.

WICKER, T. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973–982, 2007.

WICKBOM, T. The chromosomes of *Pipa pipa*. **Hereditas**, n.36, p.363-370, 1950.

ZHANG, H. H et al. A novel hAT element in *Bombyx mori* and *Rhodnius prolixus*: its relationship with miniature inverted repeat transposable elements (MITEs) and horizontal transfer. **Insect Molecular Biology**, 2013.

ZHOU, K.; AERTSEN, A.; MICHIELS, C. W. The role of variable DNA tandem repeats in bacterial adaptation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 1, p. 119–141, 2014.

CAPÍTULO I

ARAÚJO, O.G.S; PUGENER, L.A; HADDAD, C.F.B; DA SILVA, H.R. Morphology and development of the hyolaryngeal apparatus of *Pipa arrabali* (Anura: Pipidae). *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, v.269, p. 78–88, 2017 doi:10.1016/j.jcz.2017.07.001

BOGART, J.P; NELSON, C.E. Evolutionary implications from karyotypic analysis of frogs of the families Aficrohylidae and Rhinophrynidae. **Herpetologica**, v.32, p. 199-208, 1976 www.jstor.org/stable/3891738.

BOLZÁN, A.D; BIANCHI, M.S. Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences and chromosomal aberrations. **Mutation Research**, v.612, p.189–214, 2006. doi:10.1016/j.mrrev.2005.12.003

BOLZÁN, A.D. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function, instability and evolution. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v.773, p. 51–65, 2017 doi: 10.1016/j.mrrev.2017.04.002

BRUSCHI, D.P; BUSIN C.S; SIQUEIRA S; RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetic analysis of two species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Anura, Hylidae). **Hereditas**, v. 149, p. 34–40, 2012 doi: 10.1111/j.1601-5223.2010.02236.x

BRUSCHI, D.P; RIVERA, M; LIMA, A.P; ZÚÑIGA, A.B; RECCO-PIMENTEL, S.M. Interstitial Telomeric Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights into the karyotypical evolution of Neotropical leaf frog species (*Phyllomedusa*, Hylidae, Anura). **Mol Cytogenet** v. 7, n.1, p.:22, 2014 doi: 10.1186/1755-8166-7-22.

CANNATELLA, D.C; TRUEB L. Evolution of pipoid frogs: Intergeneric relationships of the aquatic frog family Pipidae (Anura). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 94, p. 1–38, 1988. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1988.tb00880.x>

CANNATELLA, D.C; DE SÁ, R.O. *Xenopus laevis* as a Model Organism. **Systematic Biology**, v.42, n.4, p.476–507, 1993.doi:10.1093/sysbio/42.4.476

CANNATELLA D. *Xenopus* in Space and Time: Fossils, Node Calibrations, Tip-Dating, and Paleobiogeography. **Cytogenetic and Genome Research**, v.145,p.283–301, 2015 doi:10.1159/000438910

DE SÁ, R.O; HILLIS, D.M. Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. **Molecular Biology and Evolution**, v.7, p.365–376, 1990. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040612

EVANS, B.J; KELLEY, D.B; TINSLEY, R.C; MELNICK, D.J; CANNATELLA, D.C. A mitochondrial DNA phylogeny of clawed frogs: phylogeography on sub-Saharan Africa and implications for polyploid evolution. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.33, p. 197–213, 2004. doi:10.1016/j.ympev.2004.04.018

EVANS, B.J. Ancestry influences the fate of duplicated genes millions of years after polyploidization of clawed frogs (*Xenopus*). **Genetics**, v.176, p.1119–1130, 2007 doi: [10.1534/genetics.106.069690](https://doi.org/10.1534/genetics.106.069690)

EVANS, B.J; CARTER, T.F; TOBIAS, M.L; KELLEY, D.B; HANNER, R; TINSLEY, R.C. A new species of clawed frog (genus *Xenopus*) from the Itombwe Massif, Democratic Republic of the Congo: implications for DNA barcodes and biodiversity conservation. **Zootaxa**, v.1780, p.55-68, 2008. doi: 10.5281/zenodo.182322

EVANS, B.J; GREENBAUM, E; KUSAMBA, C; CARTER, T.F; TOBIAS, M.L; MENDEL, S.A; KELLEY, D.B. Description of a new octoploid frog species (Anura: Pipidae: *Xenopus*) from the Democratic Republic of the Congo, with a discussion of the biogeography of African clawed frogs in the Albertine Rift. **Journal of Zoology**. v.283, p. 276–290, 2011. doi:10.1111/j.1469-7998.2010.00769.x

EVANS, B.J; CARTER, T.F; GREENBAUM, E; GVOŽDÍK, V; KELLEY, D.B; MCLAUGHLIN, P.J; PAUWELS, O.S.G; PORTIK, D.M; STANLEY, E.L; TINSLEY, R.C; TOBIAS, M.L; BLACKBURN, D.C. Genetics, Morphology, Advertisement Calls, and Historical Records Distinguish Six New Polyploid Species of African Clawed Frog (*Xenopus*, Pipidae) from West and Central Africa. **PLoS ONE**, v.10, n.12, 2015. e0142823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142823>

FROST, DR: Amphibian Species of the World: An Online Reference. American Museum of Natural History, **New York, USA**. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Version 6.0 [Accessed 15. March 2019]

GRAFF, J.M; BANSAL, A; MELTON, D.A. *Xenopus* Mad Proteins Transduce Distinct Subsets of Signals for the TGF β Superfamily. **Cell**, v.85, n.4, p.479–487, 1996 doi:10.1016/s0092-8674(00)81249-0

GREEN, D.M; SESSIONS, S.K. Nomenclature for chromosomes. In Amphibian cytogenetics and evolution. San Diego: **Academic Press**; p.431–432, 1991.

HOWELL, W.M, BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a –1 step method. **Experientia**, v.36. p.1014–1015, 1980 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6160049>

IJDO, J.W; WELLS, R.A; BALDINI, A; REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG) $_n$ generated by PCR. **Nucleic Acids**

Research, v.19, n.17, p. 4780, 1991.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC328734/>

IRISSARRI, I. Reversal to air-driven sound production revealed by a molecular phylogeny of tongueless frogs, family Pipidae. **BMC Evol. Biol**, v.11, p.114, 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-114>

KING, M; ROFE, R. Karyotypic variation in the Australian gecko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). **Chromosoma**, v.54, p.75–87, 1976.

<https://doi.org/10.1007/BF00331835>

KOBEL, H.R; DU PASQUIER, L; FISCHBERG, M; GLOOR, H. *Xenopus amieti* sp. nov. (Anura: Pipidae) from the Cameroons, another case of tetraploidy. **Rev Suisse Zool** v.87. p.919–926, 1980.

<https://www.biodiversitylibrary.org/page/41421231#page/955/mode/1up>

LIN, K.W; YAN, J. Endings in the middle: Current knowledge of interstitial telomeric sequences. **Mutation Research**, v.658, p.95–110, 2008. doi: 10.1016/j.mrrev.2007.08.006

LOUMONT, C. Deux espèces nouvelles de *Xenopus* du Cameroun (Amphibia, Pipidae). **Rev Suisse Zool**, v.90, p.169–177, 1983.

<https://www.biodiversitylibrary.org/page/41302622#page/201/mode/1up>

LOUMONT, C. *Xenopus pygmaeus*, a new diploid pipid frog from rain forest of equatorial Africa. **Rev Suisse Zool**, v.3, p.755–764, 1986.

<https://www.biodiversitylibrary.org/page/41153932#page/177/mode/1up>

LOUMONT, C; KOBEL, H.R. *Xenopus longipes* sp. nov., a new polyploid pipid from western Cameroon. **Rev Suisse Zool**, v.98, p.731–738, 1991.

<https://www.biodiversitylibrary.org/page/41271016#page/291/mode/1up>

MEYNE, J; BAKER, R.J; HOBART, H.H; HSU, T.C; RYDER, O.A; WARD, O.G; WILEY, J.E; WURSTER-HILL, D.H, YATES T.L; MOYZIS, R.K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, v.99, p.3-10, 1990 <https://doi.org/10.1007/BF01737283>

<https://doi.org/10.1007/BF01737283>

MEZZASALMA, M. Karyological analyses of *Pseudhymenochirus merlini* and *Hymenochirus boettgeri* provide new insights into the chromosome evolution in the anuran family Pipidae. **Zoologischer Anzeiger**, v.258, p.47–53, 2015

<https://doi.org/10.1016/j.jcz.2015.07.001>

MORESCALCHI, A. Initial cytotaxonomic data on certain families of amphibious Anura (Diplasiocoela, after Noble). **Experientia**, v.24, p.280–283, 1968 doi: 10.1007/BF02152819

MORESCALCHI, A; GARGIULO, G; OLMO, E. Notes on the chromosomes of some Amphibia. **J. Herpetol.** v.4 p. 77–79, 1970. doi: 10.2307/1562706

NANDA, I; FUGATE, M; STEINLEIN, C; SCHMID, M. Distribution of (TTAGGG)_n

telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. **Cytogenet Genome Res**, v.122, p.396–400, 2008. doi: 10.1159/000167828

PAGNOZZI, J.M; DE JESUS SILVA, M.J; YONENAGA-YASSUDA, Y. Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)(n) sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). **Chromosome Research**, v.8, p.585–591, 2000 doi: 10.1023/A:1009229806649

POUGH, F.H; ANDREWS, R.M; CADLE, J.E; CRUMP, M.L; SAVITZKY, A.H; WELLS, K.D **Herpetology**. Prentice-Hall, New Jersey, 2001.

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. **Mol. Phylogenet. Evol**, v.61. p. 543–583, 2011 doi: 10.1016/j.ympev.2011.06.012

ROVATSOS, M.T; MARCHAL, J.A; ROMERO-FERNÁNDEZ, I et al. Rapid, independent, and extensive amplification of telomeric repeats in pericentromeric regions in karyotypes of arvicoline rodents. **Chromosome Research**, v.19, p. 869–882, 2011 doi: 10.1007/s10577-011-9242-3

RUIZ-HERRERA. A; NERGADZE, SG.; SANTAGOSTINO, M; GIULOTTO, E. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. **Cytogenetic and genome Research**, v.122, p.219–228, 2008. doi: 10.1159/000167807.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, v.66, p.361–368, 1978 <https://doi.org/10.1007/BF00328536>

SCHMID, M; STEINLEIN, C. Chromosome Banding in Amphibia. XXXIV. Intrachromosomal Telomeric DNA Sequences in Anura. **Cytogenet and Genome Research**, v.148, p.211–226, 2016 doi: 10.1159/000446298.

Schmid, M; Bogart, J.P; Hedges, S.B. The Arboranan Frogs: Evolution, Biology, and Cytogenetics. **Cytogenet Genome Research**, v.155, p.1–5, 2018 DOI: 10.1159/000492098

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp Cell Res**, v.83, p.438–442, 1972 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4117921>

TARGUETA, C.P et al. Anuran Cytogenetics: an overview. In: Naomi Norris & Carmen Miller. An Essential Guide to Cytogenetics. **Nova Science Publishers**, Inc. 2018. Chapter 1, p. 01-64, 2018.

TYMOWSKA, J, FISCHBERG, M. Chromosome complements of the genus *Xenopus*. **Chromosoma**, v.44, p.335–342, 1973 <https://doi.org/10.1007/BF00291027>

TYMOWSKA, J, FISCHBERG, M. A comparison of the karyotype, constitutive heterochromatin, and nucleolar organizer regions of a new tetraploid species *Xenopus epitropicalis* Fischberg and Picard with those of *Xenopus tropicalis* Gray

(Anura, Pipidae). **Cytogenet Cell Genet**, v. 34, p.49–157, 1982 doi: [10.1159/000131803](https://doi.org/10.1159/000131803)

TYMOWSKA, J. Polyploidy and cytogenetic variation in frogs of the genus *Xenopus*: In Green DM, Sessions SK (eds): **Amphibian Cytogenetics and Evolution**, p. 259–297, 1991.

Trueb, L, Ross, C.F, Smith, R. A new pipoid anuran from the Late Cretaceous of South Africa. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v.25, p.533–547, 2005. doi: [10.1671/0272-4634\(2005\)025\[0533:ANPAFT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1671/0272-4634(2005)025[0533:ANPAFT]2.0.CO;2)

UEHARA M, HARAMOTO, Y; SEKIZAKI, H; TAKAHASHI, S; ASASHIM, M. Chromosome mapping of *Xenopus tropicalis* using the G- and Ag-bands: tandem duplication and polyploidization of larvae heads. **Dev Growth Differ**, v.44, p.427–436, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1440-169X.2002.00656.x>

VIEGAS-PÉQUIGNOT, E. In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In situ Hybridization: a Practical Approach. Edited by Willernson D. Oxford: **Oxford University Press**; p.137–158, 1992.

WICKBOM, T. The chromosomes of *Pipa pipa*. **Hereditas**, v. 36, p. 363–366, 1950

CAPÍTULO II

AGRAWAL, S; GANLEY, A.R.D The conservation landscape of the human ribosomal RNA gene repeats. **PLOS ONE** | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207531> December 5, 2018

ANJOS, A. *et al.* U1 snDNA clusters in grasshoppers: Chromosomal dynamics and genomic organization. **Heredity**, v. 114, n. 2, p. 207–219, 2015. ARMOUR, J. A. L. Tandemly repeated DNA: Why should anyone care? **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 598, n. 1-2, p. 6–14, 2006.

ARZABE, C; SKUK, G, BEIER, M 2010. *Pipa carvalhoi*. **The IUCN Red List of Threatened Species** e.T58160A11728418. Downloaded on 20 September 2018

BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 415–420, 2015.

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, 2013.

BRAJKOVIC, J et al. Satellite DNA-Like Elements Associated With Genes Within Euchromatin of the Beetle *Tribolium castaneum*. **G3: Genes | Genomes | Genetics**, vol.2, 2018

BRANDES, A., THOMPSON, H., DEAN, C. et al. Multiple repetitive DNA sequences in the paracentromeric regions of *Arabidopsis thaliana* L. **Chromosome Res** 5: 238, 1997.

CABRAL-DE-MELLO, D. C. et al. Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient proscopiidae grasshopper species: Contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, n. 1–2, p. 89–93, 2011.

CABRERO, J. et al. Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. **Chromosome Research**, v. 17, n. 3, p. 397–404, 2009.

CANNATELLA, D. C.; TRUEB, L. Evolution of pipoid frogs: intergeneric relationships of the aquatic frog family Pipidae (Anura). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 94, n. 1, p. 1–38, 1988.

CARABALLO, D. A.; BELLUSCIO, P. M.; ROSSI, M. S. The library model for satellite DNA evolution: A case study with the rodents of the genus *Ctenomys* (Octodontidae) from the Iberá marsh, Argentina. **Genetica**, v. 138, n. 11, p. 1201–1210, 2010.

CAZAUX, B. et al. Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). **BMC Evolutionary Biology**. 11:124, 2011.

CIOFFI, M. B. et al. The Chromosomal Distribution of Microsatellite Repeats in the Genome of the Wolf Fish *Hoplias malabaricus*, Focusing on the Sex Chromosomes. **Cytogenet Genome Res** 132:289–296, 2011.

COLGAN, D. J. et al. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Australian Journal of Zoology**, v. 46, n. 5, p. 419–437, 1998.
CUADRADO, A; JOUVE, N. The nonrandom distribution of long clusters of all possible classes of trinucleotide repeats in barley chromosomes. **Chromosome Research** 15:711–720, 2007

DA SILVA, E. T. et al. Amphibia, Anura, Pipidae, *Pipa Carvalhoi* (Miranda- Ribeiro, 1937): Distribution extension and geographic distribution map in the southeast of Brazil. **Check List**, v. 6, n. 3, p. 451–453, 2010.

DIMITRI, P. Revising the selfish {DNA} hypothesis new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin The bulk of the eukaryotic genome is composed of families of repetitive sequences that are genetically silent. **Trends in Genetics**, v. 15, n. 4, p. 123–124, 1999.

FARRÉ, M. et al. Assessing the Role of Tandem Repeats in Shaping the Genomic Architecture of Great Apes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. 1–12, 2011.

FERNANDES, T. L. et al. Carrying Progeny on the Back: Reproduction in the Brazilian Aquatic Frog *Pipa carvalhoi* CARRYING PROGENY ON THE BACK:

REPRODUCTION IN THE BRAZILIAN AQUATIC FROG PIPA CARVALHOI.

South American Journal of Herpetology, v. 6, n. 3, p. 161–176, 2011.

FOULONGNE-ORIOU, M. *et al.* Genome-wide survey of repetitive DNA elements in the button mushroom *Agaricus bisporus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 55, p. 6–21, 2013.

FESCHOTTE, C; PRITHAM, J.E. DNA transposons and evolution of eukaryotic genomics. **Annual Review of Genetics**, v.41, p.331-369, 2007.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (22/08/2018). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. **American Museum of Natural History**, New York, USA, 2019.

FRY K, SALSER W. Nucleotide sequences of HS-alpha satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell**. 1977

GARCÍA-SOUTO, D. *et al.* Divergent evolutionary behavior of H3 histone gene and rDNA clusters in venerid clams. **Molecular Cytogenetics**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2015.

GATTO, K. P. *et al.* Sex chromosome differentiation in the frog genus *Pseudis* involves satellite DNA and chromosome rearrangements. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. August, p. 301, 2018.

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

GLUGOSKI, L *et al.* Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. **Gene**, 49–54, 2018.

GRAINGER, R. M. *Xenopus* Protocols. v. 917, p. 1–11, 2012.

GONZÁLEZ, J; PETROV, D.A. Evolution of genome content: population dynamics of transposable elements in flies and humans. **Methods in Molecular Biology**, v.855, p. 361-383, 2012.

GOLVEIA, J. G *et al.* Repetitive DNA in the Catfish Genome: rDNA, Microsatellites, and Tc1-Mariner Transposon Sequences in *Imparfinis* Species (Siluriformes, Heptapteridae). **Journal of Heredity**, 650–657, 2017.

GUO, W; LING, J. J; PING, L. Consensus features of microsatellite distribution: Microsatellite contents are universally correlated with recombination rates and are preferentially depressed by centromeres in multicellular eukaryotic genomes. **Genomics** 323–331, 2009.

HENIKOFF, S; KAHMAD, K; HARMIT, S. The Centromere Paradox: Stable Inheritance with Rapidly Evolving DNA. 10 AUGUST 2001 VOL 293 **SCIENCE**

HERRICK, J; SCLAVI, B. Genome size variation and species diversity in salamanders, 2016.

IRISARRI, I. *et al.* Reversal to air-driven sound production revealed by a molecular phylogeny of tongueless frogs, family Pipidae. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, 2011.

KIDWELL, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**. V.115, p49-63, 2002

KING, M; ROFE, R. Karyotypic variation in the Australian gecko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). **Chromosoma**, v. 54:75–87, 1976.

KUBAT, H. *et al.* Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, v. 51, n. 5, p. 350–356, 2008.

KUHN, G.C.S *et al.* The 1.688 Repetitive DNA of *Drosophila*: Concerted Evolution at Different Genomic Scales and Association with Genes. **Mol. Biol. Evol.** 29(1):7–11. 2012

KRYLOV, V.; TLAPAKOVA, T. Xenopus Cytogenetics and Chromosomal Evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 145, n. 3–4, p. 192–200, 2015.

LEE, HR *et al.* Chromatin immunoprecipitation cloning reveals rapid evolutionary patterns of centromeric DNA in *Oryza* species. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2005.

LIEDTKE, H. C. Macroevolutionary shift in the size of amphibian genomes and the role of life history and climate. **Nature Ecology & Evolution**, 2018.

LOPES, D. M. *et al.* Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. **Caryologia**, v. 67, n. 3, p. 222–226, 2014.

MARTINS, C. C. C. *et al.* Investigation of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) B chromosome origin. An approach by microdissection and whole chromosome painting. **Apidologie**, v. 44, n. 1, p. 75–81, 2013.

MELTERS, D.P *et al.*, Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. **Genome Biology**, 2013.

MENDES, J. *et al.* Heterochromatin Distribution and Chromosomal Mapping of Microsatellite Repeats in the Genome of *Frieseomelitta* Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **BioOne**, v. 1, p. 8, 2018.

MEZZASALMA, M. *et al.* Karyological analyses of *Pseudhymenochirus merlini* and *Hymenochirus boettgeri* provide new insights into the chromosome evolution in the anuran family Pipidae. **Zoologischer Anzeiger**, v. 258, p. 47–53, 2015.

MORESCALCHI, A. Initial cytotaxonomic data on certain families of amphibious Anura (Diplasiocoela, after Noble). **Experientia** v. 24, p.280–283, 1968

OLIVEIRA, N. L. *et al.* Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (acrididae, gomphocerinae): Extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. **Molecular Cytogenetics**, v. 4, n. 1, p. 24, 2011.

OLIVEIRA, T. D *et al.*, Genomic Organization of Repetitive DNA in Woodpeckers (Aves, Piciformes): Implications for Karyotype and ZW Sex Chromosome Differentiation. **PLOS ONE** | DOI:10.1371/journal.pone.0169987 January 12, 2017

OLIVEIRA, E. J *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29, 2, 294-307 (2006)

PARISE-MALTEMPI, P. P. *et al.* Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. **BMC Genetics**, v. 14, p. 9–13, 2013.

PAVLEK, M *et al.* Genome-wide analysis of tandem repeats in *Tribolium castaneum* genome reveals abundant and highly dynamic tandem repeat families with satellite DNA features in euchromatic chromosomal arms. **DNA Research**, 22(6), 387–401, 2015,

PEIXOTO, M. A. A *et al.* The karyotypes of five species of the *Scinax perpusillus* group (Amphibia, Anura, Hylidae) of southeastern Brazil show high levels of chromosomal stabilization in this taxon. **Genetics**. 143:729–739, 2015

PISCOR, D.; CENTOFANTE, L.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Highly Similar Morphologies Between Chromosomes Bearing U2 snRNA Gene Clusters in the Group *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Characiformes, Characidae): An Evolutionary Approach in Species with 2n = 36, 46, 48, and 50. **Zebrafish**, v. 13, n. 6, p. 565–570, 2016.

PISCOR, D.; FERNANDES, C. A.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Conserved number of U2 snDNA sites in *Piabina argentea*, *Piabarchus stramineus* and two *Bryconamericus* species (Characidae, Stevardiinae). **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 1, p. e170066, 2018.

PITA, S *et al.*, Comparative repeatome analysis on *Triatoma infestans* Andean and Non-Andean lineages, main vector of Chagas disease. **PLOS ONE**, July 19, 2017

POKORNÁ, M.; KRATOCHVÍL, L.; KEJNOVSKÝ, E. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). **BMC Genetics**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2011

POLTRONIERI, J *et al.* Comparative Chromosomal Mapping of Microsatellites in *Leporinus* Species (Characiformes, Anostomidae): Unequal Accumulation on the W

Chromosomes. **Cytogenet Genome Res** 142:40–45, 2014.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA evolution. **Genome Dynamics**, v. 7, p. 126–52, 2010.

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

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

POUGH, F.H.; ANDREWS, R.M.; CADLE, J.E et al. **Herpetology, second edition**. Prentice-Hall, New York, 2001.

PRAKHONGCHEEP, O. *et al.* Lack of satellite DNA species-specific homogenization and relationship to chromosomal rearrangements in monitor lizards (Varanidae, Squamata). **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2017.

REGUEIRA NETO, M.S et al. Chromosomal evolution of rDNA and H3 histone genes in representative Romaleidae grasshoppers from northeast Brazil. **Molecular Cytogenetics** 6:41, 2013.

RUIZ-RUANO, F.J et al. Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. **Chromosoma** 124:221–234, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). **Cold spring harbor laboratory press**, 1989.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, v.66, p.361-368, 1978.

SCHNEIDER, C.. H. Chromosomal distribution of microsatellite repeats in Amazon cichlids genome (Pisces, Cichlidae). **Comp Cytogen** 9(4): 595–605, 2015

SESSION, A. M et al. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. **Nature** , vol 538, 2016

SUN, Y. et al. Whole-genome sequence of the Tibetan frog *Nanorana parkeri* and the comparative evolution of tetrapod genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, n. 1257, p. 1262, 2015

TABOADA, X.; REY, M.; BOUZA, C.; VIÑAS, A. Cytogenomic analysis of several repetitive DNA elements in turbot (*Scophthalmus maximus*). **Gene**, v. 644, p. 4–12, 2018.

TASHIRO, S et al. NAR Breakthrough Article Subtelomeres constitute a safeguard for gene expression and chromosome homeostasis. **Nucleic Acids Research**, Vol. 45, No. 18, 2017

TORRES, G. A et al. Organization and Evolution of Subtelomeric Satellite Repeats in the Potato Genome. **G3: Genes | Genomes | Genetics** Volume 1 | July 2011

TÓTH, G. *et al.* Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome research**, v. 10, n. 7, p. 967–981, 2000.

TRAUT, W.; EICKHOF, U.; SCHORCH, J. C. Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). **Methods in Cell Science**, v. 23, p. 155–161, 2001.

TRUEB, L.; ROSS, C. F.; SMITH, R. A new pipoid anuran from the Late Cretaceous of South Africa. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 25, n. 3, p. 533–547, 2005.

TYMOWSKA, J.; FISCHBERG, M. Chromosome complements of the genus *Xenopus*. **Chromosoma**, v. 44, n. 3, p. 335–342, 1973.

UGARKOVIĆ, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles--causes and effects. **The EMBO journal**, v. 21, n. 22, p. 5955–9, 2002.

UNO, Y. *et al.* Homoeologous chromosomes of *Xenopus laevis* are highly conserved after whole-genome duplication. **Heredity**, v. 111, n. 5, p. 430–436, 2013.

VIEIRA, M. L. C. *et al.* Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312–328, 2016.

VITTORAZZI, S. E. *et al.* Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 2, p. 101–107, 2011.

VOSS, S.R *et al.* Origin of amphibian and avian chromosomes by fission, fusion, and retention of ancestral chromosomes. **Genome Research**, 21:1306–1312, 2011.

XU, D *et al.*, Chromosomal mapping of microsatellite repeats in the rock bream fish *Oplegnathus fasciatus*, with emphasis of their distribution in the neo-Y chromosome. **Molecular Cytogenetics** 6:12, 2013.

ZHANG, L. *et al.* Chromosome rearrangements in Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorpha) implied based on chromosomal localization of histone H3 gene in four scallops. **Genetica**, v. 130, n. 2, p. 193–198, 2007.

CAPÍTULO III

AKAGI, H., YOKOZEKI, Y., INAGAKI, A. *et al.* *Micron*, a microsatellite-targeting transposable element in the rice genome **Mol Gen Genomics** 266: 471, 2001.

BENNETZEN, J. L. Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants. **Current Opinion in Genetics & Development**, 15(6), 621–627, 2005.

BUSCHIAZZO, E; GEMMELL, N.J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **BioEssays**, n. 28, p. 1040–1050, 2006

CATHERINE OZOUF-COSTAZ, C et al. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. **Antarctic Science**, v.16, n. 1, p. 51–57, 2004

CHALOPIN, D. et al. Comparative Analysis of Transposable Elements Highlights Mobilome Diversity and Evolution in Vertebrates. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 567–580, 2015.

COSTA, G.W.W.F. Transposable Elements in Fish Chromosomes: A Study in the Marine Cobia Species. **Cytogenet Genome Res**, v.141, p. 126–132, 2013.

DEPRÁ, M et al. hosiary: a new hAT transposon group involved in horizontal transfer. **Mol Genet Genomics**, v. 283, p. 451–459, 2010.

DELPRAT, A. et al. The Transposon Galileo Generates Natural Chromosomal Inversions in *Drosophila* by Ectopic Recombination. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. 1–13, 2009.

EDWARDS, R.J et al. Draft genome assembly of the invasive cane toad, *Rhinella marina*. **Giga Science**, 2018.

FERRIS, P. J. Characterization of a *Chlamydomonas* transposon, Gulliver, resembling those in higher plants. **Genetics**, v.122, p. 363-377, 1989.

FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. American Museum of Natural History, New York, USA. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Version 6.0 [Accessed 22. August 2018]

GRAY, Y. H. M. It takes two transposons to tango. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 10, p. 461–468, 2000.

GLUGOSKI, L et al. Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. **Gene**, p. 49–54, 2018.

HELLSTEN, U. et al. The Genome of the western Clawed Frog *Xenopus tropicalis*. **Science**, v. 328, n. 5978, p. 633–636, 2010.

JURKA, J. et al. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1–4, p. 462–467, 2005.

KAMINKER, J.S et al. The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. **Genome Biology**, v.3, n.12, 2002.

KAPITONOV, V.V; JURKA, J. Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome. **PNAS**, vol. 100, no. 11, 2003.

KEJNOVSKÝ, E. et al. Expansion of Microsatellites on Evolutionary Young Y Chromosome. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

KING, M; ROFE, R. Karyotypic variation in the Australian gecko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). **Chromosoma**, v. 54:75–87, 1976.

LANDER, E. S et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, p. 860–921, 2001

LERAT, E; RIZZON, C, BIÉMONT, C. Sequence Divergence Within Transposable Element Families in the *Drosophila melanogaster* Genome. **Genome Research**. 13:1889–1896, 2003.

LI, S.F et al. Chromosome Evolution in Connection with Repetitive Sequences and Epigenetics in Plants. **Genes** 8, 290; 2017.

LIM, J. K.; SIMMONS, M. J. Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. **BioEssays**, v. 16, n. 4, p. 269–274, 1994.

LIPATOV, M et al. Paucity of chimeric gene-transposable element transcripts in the *Drosophila melanogaster* genome. **BMC Biology** 3:24, 2005.

MEZZASALMA, M. et al. Karyological analyses of *Pseudhymenochirus merlini* and *Hymenochirus boettgeri* provide new insights into the chromosome evolution in the anuran family Pipidae. **Zoologischer Anzeiger**, v. 258, p. 47–53, 2015.

MONTIEL, E. E et al. Gypsy, RTE and Mariner transposable elements populate *Eyprepocnemis plorans* genome. **Genetica** 140:365–374, 2012.

NASCIMENTO, J.; BALDO, D.; LOURENÇO, L. B. First insights on the retroelement Rex1 in the cytogenetics of frogs. **Molecular Cytogenetics**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2015.

PIÉGU, B et al. A survey of transposable element classification systems – A call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 86, 90–109, 2015

PIMPINELLI, S et al Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 92(9): 3804-- 3808., 1995.

RUBIN, E; LITHWICK, G; LEVY, A.A. Structure and Evolution of the hAT Transposon Superfamily. **Genetics** 158: 949–957, 2001

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). **Cold spring harbor laboratory press**, 1989.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Bufo and Hyla. **Chromosoma**, v.66, p.361-368, 1978.

SUN, Y. et al. Whole-genome sequence of the Tibetan frog *Nanorana parkeri* and the comparative evolution of tetrapod genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, n. 1257, p. 1262, 2015.

TRAUT, W.; EICKHOF, U.; SCHORCH, J. C. Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). **Methods in Cell Science**, v. 23, p. 155–161, 2001.

TRUEB, L.; ROSS, C. F.; SMITH, R. A new pipoid anuran from the Late Cretaceous of South Africa. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 25, n. 3, p. 533–547, 2005.

VOLFF, J. N. et al. The non-LTR retrotransposon Rex3 from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 11, p. 1427–1438, 1999.

WICKER, T. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature genetics**, v. 8, p. 973–982, 2007.

WILDER, J; HOLLOCHER, H. Mobile Elements and the Genesis of Microsatellites in Dipterans. **Mol. Biol. Evol**, v. 18, n.3, p. 384–392. 2001.