

**Kaleb Pretto Gatto**

**“ANÁLISE DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS DE *Pseudis tocantins*  
(ANURA, HYLIDAE)”**

**Campinas, 2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**KALEB PRETTO GATTO**

**“Análise dos cromossomos sexuais de  
*Pseudis tocantins* (Anura, Hylidae)”**

Este exemplar corresponde à  
redação final da Dissertação  
defendida pelo candidato  
***Kaleb Pretto Gatto***  
e aprovada pela Comissão Julgara.

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia da UNICAMP para obtenção  
do Título de Mestre em Biologia  
Celular e Estrutural, na área de  
Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. *Luciana Bolsoni Lourenço* Morandini  
Coorientadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Busin

Campinas, 2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G229a Gatto, Kaleb Pretto, 1987-  
Análise dos cromossomos sexuais de *Pseudis tocantins* (Anura, Hylidae) /  
Kaleb Pretto Gatto. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Luciana Bolsoni Lourenço.  
Coorientador: Carmen Silvia Busin.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de  
Biologia.

1. Cromossomos sexuais. 2. Heterocromatina. 3. Hibridação genômica  
comparativa. 4. Microdissecação. 5. Hylidae. I. Lourenço, Luciana Bolsoni, 1972-  
II. Busin, Carmen Silvia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Analysis of the sex chromosomes of *Pseudis tocantins* (Anura,  
Hylidae)

**Palavras-chave em inglês:**

Sex chromosomes

Heterochromatin

Comparative genomic hybridization

Microdissection

Hylidae

**Área de concentração:** Biologia Celular

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Luciana Bolsoni Lourenço [Orientador]

Patricia Pasquali Parise Maltempi

Ana Paula Zampieri Silva de Pietri

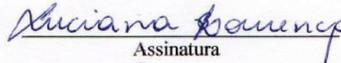
**Data de defesa:** 28-06-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

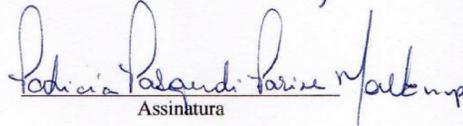
Campinas, 28 de junho de 2013.

**BANCA EXAMINADORA**

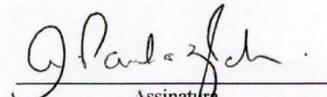
Profª. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini (Orientadora)

  
Assinatura

Profª. Dra. Patrícia Pasquali Parise Maltempi

  
Assinatura

Profª. Dra. Ana Paula Zampieri Silva De Pietri

  
Assinatura

Profª. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profª. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*Dedico esse trabalho aos meus pais,  
Rosmari Pretto Gatto e Neuromar  
Luiz Gatto, por toda dedicação e  
amor dispensados a mim e por todo o  
apoio a minha vida acadêmica.*

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Dr<sup>a</sup> Luciana Bolsoni Lourenço por ter me aceitado para orientação no mestrado e possibilitado a realização desse estudo. Todos os ensinamentos prestados foram de muita importância para o meu crescimento profissional e pessoal. Sua postura ética com a pesquisa sempre será um exemplo de atuação profissional. Tenho muito a agradecer também pela confiança e amizade em mim depositada durante esses dois anos.

Agradeço também à Professora Dr<sup>a</sup> Carmen Silvia Busin, minha co-orientadora, por todos os ensinamentos desde a Iniciação Científica, pelo carinho e, principalmente, a amizade. Mesmo com a distância sempre foi presente na minha vida acadêmica, servindo como um espelho para a minha vida profissional.

Um grande agradecimento também aos professores do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional pelos ensinamentos passados durante o curso. Principalmente aos Professores Drs. Edson Rosa Pimentel e Shirlei Maria Recco-Pimentel.

Um agradecimento especial à Professora Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Prado Veiga-Menoncello pelo carinho e amizade dispensados durante esses dois anos, além das valiosas discussões científicas e momentos de descontração.

Agradeço às Professoras Dras. Ana Paula Zampieri Silva-de-Pietri e Patricia Pasquali-Parise Maltempì, membros da banca examinadora, pelas valiosas contribuições dadas ao presente trabalho.

Agradeço aos colegas e amigos de laboratório Débora, Lívia, Karin, Willian, Júlio, Lenita, Maria, Stenio, Reinaldo, Raffael e Caíque pelos momentos de estudo, discussões e auxílios durante os trabalhos. Em especial agradeço aos amigos Juliana, Daniel e a “mãe” Cíntia por todos os momentos divertidos, tristes, de companheirismo e acadêmicos compartilhados durante esses dois anos.

Agradeço aos colegas do programa de Biologia Celular e Estrutural, que mesmo com o pouco tempo de contato foram importantes durante a minha caminhada acadêmica.

Agradeço a secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Líliam Alves Senne Panágio por toda a atenção dispensada durante o decorrer do curso.

Agradeço aos meus familiares por todo o apoio e incentivos prestados durante toda a minha vida, principalmente aos meus avós Ana, Albino, David e Neli pelo amor e carinho dispensados a mim.

Agradeço a minha namorada Caroline por todo o amor e carinho, bem como as conversas e a compreensão durante quaisquer momentos que passamos juntos.

Agradeço aos meus amigos e colegas da UPF que estão no Rio Grande do Sul, que mesmo com a distância sempre estiveram presentes comigo, em especial ao José, ao Serrado e a Carol por tudo que vivenciamos.

Agradeço aos meus amigos da República Viracopos pela amizade e momento de descontração.

Agradeço à CAPES e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

## Sumário

I – Resumo .....	8
II - Abstract.....	9
III - Introdução.....	10
III.1 - Aspectos taxonômicos e filogenéticos de <i>Pseudis</i> .....	11
III.2 – Aspectos citogenéticos de <i>Pseudis</i> e <i>Lysapsus</i> .....	13
III.3 – Cromossomos sexuais.....	15
III.3.1 – Aspectos gerais da diferenciação dos cromossomos sexuais .....	16
III.3.2 – Os cromossomos sexuais de <i>Anura</i> .....	18
III.4 – A análise de sequências de DNA repetitivas no estudo de cromossomos sexuais .....	21
III.4.1 – Genes ribossomais.....	22
III.4.2 – DNA satélite.....	24
III.5 – Pintura cromossômica e Hibridação Genômica Comparativa (CGH) nos estudos de cromossomos sexuais.....	26
III.5.1 - Hibridação genômica comparativa .....	26
III.5.2 - Pintura cromossômica .....	27
IV - Objetivos do Estudo .....	29
IV.1 - Geral.....	30
IV.2 - Específicos.....	30
V - Materiais e Métodos .....	31
V.1 - Espécimes.....	32
V.2 - Preparações cromossômicas .....	32
V.3 - Colorações com fluorocromos .....	32
V.4 - Hibridação Genômica Comparativa – CGH .....	32
V.5 - Microdissecção e Pintura Cromossômica .....	33
V.6 - Isolamento e clonagem de DNAr 5S e PcP190EcoRI.....	33
V.7 - Sequenciamento dos fragmentos de DNA clonados.....	34
V.8 - Hibridação in situ Fluorescente (FISH) – mapeamento de DNAr 5S, PcP190EcoRI e sequência telomérica.....	34
V.9 – Captura e Edição de Imagens .....	35
VI - Resultados .....	36
VI.1. Coloração com fluorocromos DAPI e MM .....	37
VI.2 – Localização de sequências teloméricas.....	38
VI.3 – Hibridação Genômica Comparativa – CGH .....	38
VI.4 – Pintura cromossômica.....	39
VI.5 – Isolamento e mapeamento de DNAr 5S.....	40
VI.6 – Isolamento de sequências PcP190EcoRI .....	44
VII – Discussão.....	47
VII.1 – Avanços na caracterização dos cromossomos de <i>P. tocantins</i> .....	48
VII.2 - Localização de sequências teloméricas .....	48
VII.3 - Mapeamento cromossômico de DNAr 5S.....	49
VII.4 - Os cromossomos sexuais de <i>P. tocantins</i> .....	50
VIII – Conclusões .....	54
IX – Referências Bibliográficas .....	56

## I – Resumo

O gênero *Pseudis* é composto atualmente por 7 espécies, todas elas já cariotipadas. Dentre essas, apenas *P. tocantins* apresenta cromossomos sexuais heteromórficos Z e W, o que sugere que a diferenciação desses cromossomos tenha sido um evento recente na história evolutiva do gênero. O cromossomo Z de *P. tocantins* é metacêntrico e apresenta uma NOR intersticial no braço longo, adjacente a uma banda heterocromática pericentromérica. Já o cromossomo W é submetacêntrico, portador de uma NOR pericentromérica no braço longo, adjacente a uma banda heterocromática bastante evidente, maior do que aquela presente no cromossomo Z, o que é responsável, inclusive, pela diferença de tamanho observada entre esses cromossomos. A distinta posição relativa ocupada pela NOR e pela banda heterocromática no braço longo dos cromossomos Z e W evidencia a ocorrência de inversão paracêntrica ao longo da diferenciação evolutiva desses cromossomos. Já o tamanho diferencial da banda heterocromática sugere que um fenômeno de amplificação tenha ocorrido durante esse processo. Mesmo com todas essas informações, a caracterização citogenética clássica não permite avaliar as diferenças moleculares entre esses cromossomos sexuais. No presente trabalho, a fim de melhor comparar os cromossomos Z e W foram empregadas as técnicas de hibridação genômica comparativa (CGH) e de pintura cromossômica com sondas construídas a partir de cópias do cromossomo Z microdissecadas. Sequências PcP190EcoRI, pertencentes a uma família de DNA satélite derivada de DNAr 5S isolada originalmente do anuro *Physalaemus cuvieri*, também foram investigadas. Para melhor análise desses resultados, foram também caracterizadas e mapeadas sequências de DNAr 5S. Nos experimentos de CGH foi possível identificar um sinal de hibridação W-específico correspondente ao segmento heterocromático DAPI-positivo no braço longo desse cromossomo. A microdissecção de cópias do cromossomo Z permitiu a construção de uma sonda, denominada 190.1Z, que revelou sinais de hibridação na região heterocromática do cromossomo Z, porém nenhum sinal dela foi observado no cromossomo W. Esses resultados permitem a inferência de que os blocos heterocromáticos presentes no braço longo dos cromossomos Z e W, além de diferirem no tamanho, diferem também em composição, o que ainda não havia sido observado. Foram isolados dois tipos de DNAr 5S, um com 227 pb, chamado de DNAr 5S do tipo I, e outro com 760 pb, chamado de DNAr 5S do tipo II. Esse último foi mapeado no cromossomo 5 de *P. tocantins*. Sequências do DNA repetitivo PcP190EcoRI foram isoladas a partir do DNA genômico de fêmeas e também a partir de cópias do cromossomo Z microdissecadas. Todas apresentaram alta similaridade com sequências de PcP190EcoRI de *Physalaemus cuvieri*, embora aquelas isoladas do cromossomo Z tenham apresentado maior similaridade (70,31%) do que as obtidas de amostras do DNA genômico (66,83%). Um dos fragmentos isolados a partir de amostras do DNA genômico mostrou duas repetições adjacentes, o que permitiu verificar o tamanho completo de um monômero (166 pb). Os fragmentos de PcP190EcoRI isolados de DNA genômico de fêmeas quando utilizados como sondas em experimentos de FISH detectaram exclusivamente a região heterocromática do braço longo do cromossomo W. Um forte sinal de hibridação dessas sondas se estendeu por toda essa região heterocromática, enquanto nenhum sinal foi observado na banda heterocromática do cromossomo Z. Esse resultado e a não amplificação, a partir do DNA isolado de cromossomos Z, da sequência PcP190EcoRI mapeada no cromossomo W levanta a possibilidade de que este seja exclusivo do cromossomo W. Embora essa possibilidade ainda necessite de confirmação, os dados disponíveis já permitem concluir que, ao menos em relação ao número de repetições de sequências da família PcP190EcoRI, os blocos heterocromáticos dos cromossomos Z e W diferem bastante. Portanto, o DNA repetitivo PcP190EcoRI parece ter exercido um importante papel na diferenciação dos cromossomos sexuais de *P. tocantins*. As sequências isoladas no presente estudo fornecem novos elementos para a análise mais aprofundada dos cromossomos das demais espécies do gênero, especialmente de seus pares cromossômicos 7, provavelmente homeólogos ao par sexual de *P. tocantins* e, dessa forma, poderão ainda auxiliar no estudo da evolução cariotípica ocorrida nesse grupo.

## II -Abstract

The genus *Pseudis* is currently composed of 7 species, all of them already karyotyped. Among them, only *P. tocantins* shows Z and W heteromorphic sex chromosomes, suggesting that the differentiation of these chromosomes was a recent event on evolutionary history of the genus. The *P. tocantins* Z chromosome is metacentric and presents an interstitial NOR on the long arm, which is adjacent to a pericentromeric heterochromatin. Meanwhile the submetacentric W chromosome carries a pericentromeric NOR on the long arm, adjacent to a quite evident heterochromatic band, which is greater than that found on Z chromosome and responds to the size difference observed between these chromosomes. The distinct relative position of the NOR and heterochromatin band in the long arm of the Z and W chromosomes is an evidence of the occurrence of paracentric inversion along the evolution of these chromosomes. In addition, the differential size of the heterochromatic band in the long arm of these chromosomes suggests the occurrence of amplification phenomenon. Despite all these inferences, molecular differences between these sex chromosomes remain to be elucidated. In the present work, to better evaluate the differences between Z and W chromosomes, we employed comparative genomic hybridization (CGH) and chromosome painting with probes generated from microdissected copies of the Z chromosome. Sequences of PcP190EcoRI, belonging to a satellite DNA family derived from 5S rDNA, which was originally isolated from the anuran *Physalaemus cuvieri*, were also investigated. For a better analysis of PcP190EcoRI results, sequences of the 5S rDNA were characterized and mapped. CGH identified a Wq-specific region, coincident with the heterochromatic DAPI-positive segment of this chromosome arm. The probe generated from the microdissected Z chromosome copies, named 190.1Z probe, did not enable the detection of the entire chromosome but did reveal a region in the heterochromatic segment of Zq. In contrast, this probe produced no hybridisation signal in the W chromosome. These results allow to infer that the heterochromatic blocks in the long arm of the Z and W chromosomes differ not only in size, but also in composition. Two types of 5S rDNA were isolated, one of them with a putative repetitive unit of 227 bp, called type I 5S rDNA, and another with a repetitive unit of 760 bp, called type II 5S rDNA. The last one was mapped to chromosome 5 of *P. tocantins*. Sequences of the repetitive DNA PcP190EcoRI were isolated from female genomic DNA and from microdissected copies of the Z chromosome. All sequences exhibited high similarity with PcP190EcoRI sequences of *Physalaemus cuvieri*, although those isolated from the microdissected Z chromosomes had greater similarity (70,31%) than those obtained from genomic DNA (66,83%). One of the PcP190EcoRI fragments isolated from genomic DNA of *P. tocantins* showed two adjacent repeats, allowing to verify that a complete monomer sizes 166 bp. The PcP190EcoRI probe isolated from genomic DNA detected exclusively the heterochromatic region of the long arm of the W chromosome in FISH experiments. An intense hybridization signal of this probe extends for this entire heterochromatic region, while no signal was observed in the heterochromatic region of the Z chromosome. This FISH result and the absence of amplification, from the microdissected Z chromosomes, of the PcP190EcoRI sequence mapped to the W chromosome raise the possibility that this type of PcP190EcoRI sequence is exclusive of the W chromosome. While this possibility needs further confirmation, the available data leads to the conclusion that, at least in relation to the number of repeats of PcP190EcoRI sequences, the heterochromatic blocks of the Z and W chromosomes differ widely. Thus, the repetitive DNA PcP190EcoRI seems to have played an important role in the differentiation of the sex chromosomes of *P. tocantins*. Besides the above-mentioned conclusions, the present work provides new tools for a deeper analysis of the chromosomes of the remaining species of the genus, especially of their chromosome pairs 7, which are probably homeologous to the sex chromosomes of *P. tocantins* and, thus, our work may help further studies on the karyotypic evolution in *Pseudis*.

## **III - Introdução**

### III.1 - Aspectos taxonômicos e filogenéticos de *Pseudis*

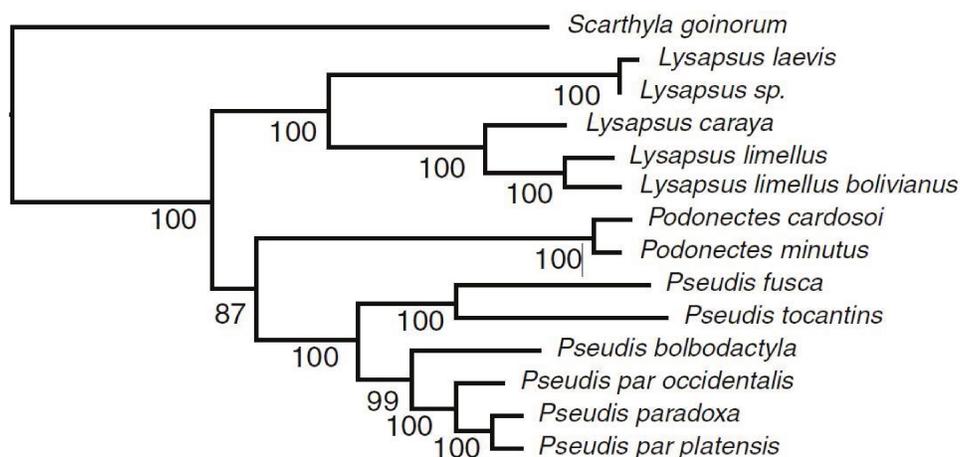
O gênero *Pseudis* Wagler, 1830, compreende espécies de hílídeos neotropicais de origem recente (Mioceno – Plioceno) na América do Sul. Atualmente, ocorrem no Brasil e também no Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia, Peru, Venezuela, ilha de Trinidad e Guianas (Frost, 2013). As espécies de *Pseudis* apresentam cerca de 70 mm de comprimento, olhos grandes e protuberantes dispostos na região dorsal da cabeça e membranas interdigitais bem desenvolvidas, uma característica adaptativa relacionada ao hábito de vida aquático dessas espécies. Apresentam pele verrugosa ou não, com membros posteriores longos. Algumas espécies apresentam artelhos com uma falange adicional e outras, discos terminais nos dedos. Os ovos são depositados em corpos aquáticos e os girinos são, geralmente, maiores que os indivíduos adultos, chegando a 250 mm em *Pseudis paradoxa* (Savage e Carvalho, 1953; Gallardo, 1972; Cei, 1980; Duellman e Trueb, 1985).

Desde sua descrição até os dias atuais, o gênero *Pseudis* passou por várias reorganizações taxonômicas e diversos estudos (morfológicos, comportamentais e citogenéticos) contribuíram de maneira significativa nesse contexto. Atualmente são catalogadas sete espécies para o gênero *Pseudis* (Frost, 2013): *P. paradoxa* (Linnaeus, 1758), *P. bolbodactyla* Lutz, 1925, *P. fusca* Garman 1883, *P. platensis* Gallardo, 1961, *P. minuta* Günther, 1858, *P. tocantins* Caramaschi e Cruz, 1998 e *P. cardosoi* Kwet, 2000. A espécie-tipo do gênero é *P. paradoxa* (originalmente descrita como *Rana paradoxa* por Linnaeus em 1758) e, durante vários anos, os táxons hoje reconhecidos como *P. bolbodactyla*, *P. fusca* e *P. platensis* foram considerados subespécies dela (ver reconhecimento das subespécies em Gallardo, 1961 e as propostas de revalidação de *P. bolbodactyla* e *P. fusca* em Caramaschi e Cruz, 1998 e de *P. platensis* em Aguiar-Jr. et al., 2007). *Pseudis tocantins* é uma espécie diagnosticada pela ausência de calo carpal, também característica de *P. bolbodactyla* e *P. fusca*, cabeça mais longa que larga, faixas longitudinais estreitas na face ventral da coxa, e ocorre nos estados brasileiros de Mato Grosso, Goiás, Maranhão e Tocantins (Charamaschi e Cruz, 1988).

Desde o trabalho de Savage e Carvalho (1953), o gênero *Pseudis* é considerado próximo filogeneticamente das espécies do gênero *Lysapsus*. Estudos filogenéticos mais recentes utilizando dados moleculares mostraram um melhor entendimento sobre as relações entre os dois gêneros. O monofiletismo de *Pseudis* foi questionado por trabalhos realizados por Aguiar-Jr et al. (2007) e Garda e Cannatella (2007), baseados em inferências realizadas a partir de sequências nucleotídicas de genes mitocondriais e um gene nuclear (Aguiar-Jr et al., 2007) ou apenas mitocondriais (Garda e Cannatella, 2007). Em ambos os trabalhos, foram recuperadas três linhagens distintas. Uma delas apresentou todas as espécies de *Lysapsus*, outra foi composta por *P. paradoxa*, *P. tocantins*, *P. fusca* e *P. bolbodactyla*, e uma terceira linhagem foi composta por *P. minuta* e *P. cardosoi* e constituiu o clado-irmão daquele composto pelas duas primeiras linhagens. Para resolver o

problema taxonômico gerado pelo parafiletismo inferido para *Pseudis*, no entanto, os autores dos trabalhos em questão apresentaram diferentes propostas. Enquanto Garda e Cannatella (2007) propuseram a revalidação do gênero *Podonectes* para alocar *P. minuta* e *P. cardosoi*, Aguiar-Jr. et al. (2007) sugeriram que *Lysapsus* fosse sinônimo júnior de *Pseudis*.

Contudo, Wiens et al. (2010), utilizando genes nucleares e mitocondriais em uma vasta análise da família Hylidae, não reconheceram o parafiletismo entre *Pseudis* e *Lysapsus*. Nesse estudo, os autores recuperaram o clado formado por *P. minuta*+*P. cardosoi* como grupo irmão do clado contendo as demais espécies do gênero *Pseudis* (Figura 1), diferindo do que foi inferido tanto por Garda e Cannatella (2007) quanto por Aguiar-Jr et al (2007). Portanto, Wiens et al. (2010) consideraram desnecessárias as propostas taxonômicas de Aguiar-Jr. et al. (2007) e Garda e Cannatella (2007), citadas anteriormente. Já o monofiletismo de *Pseudis* + *Lysapsus*, clado denominado por Garda e Cannatella (2007) de “Pseudae”, foi também inferido por Wiens et al. (2010). No presente trabalho, nós seguimos a proposta de Wiens et al. (2010) e utilizamos os nomes genéricos *Pseudis* e *Lysapsus* conforme reconhecidos naquele trabalho, decisão também adotada por Garda et al. (2010) e Frost (2013).



**Figura 1.** Visão parcial do cladograma obtido por Wiens et al. (2010), com base na análise de genes mitocondriais e nucleares. \*Com base nesse cladograma, Wiens et al. (2010) sugerem a sinonimização de *Podonectes* a *Pseudis* (ver explicação no texto).\*\*Wiens e colaboradores optam por usar, no cladograma, a designação das subespécies de *P. paradoxa*, embora as considerem como espécies potencialmente distintas.<sup>1</sup>

Além das questões relativas aos relacionamentos interespecíficos, também as relações de *Pseudis* e *Lysapsus* com outros gêneros permanece pouco elucidada e têm sido

<sup>1</sup> A relação filogenética de *P. p. occidentalis*, *P. p. platensis* e *P. p. paradoxa* apontada por Wiens et al. (2010) difere daquela apontada por Aguiar-Jr. et al. (2007) e Garda & Cannatella (2007), o que sugere que uma melhor delimitação das espécies atualmente reconhecidas como *P. paradoxa* e *P. platensis* ainda dependa de futuros estudos.

alvos de diversas discussões. Os gêneros *Pseudis* e *Lysapsus* já foram alocados na família Ranidae (Günther, 1858), na família Leptodactylidae (Noble, 1922) e na família Hylidae (Parker, 1935). Já constituíram também uma família, denominada Pseudidae (Savage e Carvalho, 1953). Estudos de grande abrangência (de táxons e caracteres moleculares) têm corroborado a proposta de que *Pseudis* e *Lysapsus* sejam hilídeos e têm apontado que o gênero *Scarthyla* seja o grupo irmão de *Pseudis*+*Lysapsus* (Faivovich et al., 2005; Frost et al., 2006; Wiens et al., 2010).

### III.2 – Aspectos citogenéticos de *Pseudis* e *Lysapsus*

A primeira comunicação abordando os cromossomos das espécies de *Pseudis* e *Lysapsus* foi feita por Barrio e Rubel (1970) e consistiu na descrição cariotípica de três espécies: *Pseudis minuta* (à época denominada *Lysapsus mantidactylus*), *Lysapsus limellum* e *Pseudis paradoxa*. Os cariótipos dessas espécies apresentaram  $2n = 24$ , tendo sido os pares 1, 7, 10, 11 e 12 classificados como metacêntricos e os pares 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9, como submetacêntricos. Barrio e Rubel também destacaram a posição diferencial de uma constrição secundária do par cromossômico 7 do cariótipo do exemplar de *Lysapsus* em relação aos de *Pseudis*. Enquanto essa constrição era localizada na porção mediana do braço longo do cromossomo 7 de *Lysapsus*, ela ocupava uma posição pericentromérica em *Pseudis*.

A descrição de padrões de bandamento para os cromossomos de *Pseudis* e *Lysapsus*, bem como uma maior amostragem das espécies desses gêneros, se fazia necessária não apenas para o levantamento de um novo conjunto de caracteres úteis em estudos taxonômicos, mas também para a análise das mudanças cariotípicas ocorridas ao longo da evolução desses anuros. Os trabalhos de Busin et al. (2001, 2006, 2008) contribuíram muito nesse sentido, já que permitiram uma descrição detalhada da morfologia cromossômica e da localização de bandas heterocromáticas e de regiões organizadoras de nucléolo (NORs) de outras cinco espécies de *Pseudis* e duas de *Lysapsus*. Mais recentemente, Suárez (2010) analisou citogeneticamente *L. laevis*, completando assim a descrição dos cariótipos de todas as espécies do grupo *Pseudis* + *Lysapsus*. Em todas as espécies desse grupo, o número diploide encontrado foi 24, exceto em *P. cardosoi*, que apresentou  $2n = 28$  (Busin et al., 2001). Com base na análise comparativa de cariótipos submetidos ao bandamento C e ao método Ag-NOR, Busin et al. (2001) inferiram várias homeologias cromossômicas e sugeriram que o cariótipo de *P. cardosoi* tenha originado a partir da fissão cêntrica de cromossomos de um cariótipo ancestral composto por 24 cromossomos, inferência esta corroborada por Aguiar-Jr. et al. (2007). Segundo a hipótese de Busin et al. (2001), os eventos de fissão teriam envolvido dois cromossomos portadores de dois braços, gerando assim quatro pares de cromossomos telocêntricos como aqueles observados no cariótipo de *P. cardosoi*.

A NOR principal está localizada no par cromossômico 7 em todas as espécies de *Pseudis* que apresentam  $2n = 24$  (Busin et al., 2001; 2008) e em todas as espécies de *Lysapsus*, exceto em *L. caraya*, cuja NOR principal está no par cromossômico 6, embora o cromossomo 7 seja portador de NOR em alguns espécimes (Busin et al., 2006). Em *L. bolivianus*, NORs adicionais foram observadas nos pares cromossômicos 1 e 8 (Busin et al., 2001; Busin et al., 2006; Busin et al., 2008). Segundo Busin et al. (2006), a NOR presente no cromossomo 6 foi originada daquela presente no cromossomo 7, sendo, portanto, a NOR no cromossomo 7 uma condição plesiomórfica compartilhada por várias espécies de *Pseudis* e *Lysapsus*. Além disso, a localização que a NOR ocupa no braço longo do cromossomo 7 varia entre as espécies em questão, indicando que rearranjos, como inversões, ocorreram durante a evolução desse par cromossômico (Busin et al., 2008).

Busin et al. (2008) também destacam outra característica marcante para o gênero *Pseudis*: a existência de cromossomos sexuais heteromórficos do sistema ZZ/ZW em *P. tocantins*. Sendo assim, a presença de cromossomos sexuais heteromórficos em *P. tocantins* seria uma autapomorfia para essa espécie. O par de cromossomos sexuais em questão é o classificado como número 7, sendo os dois homólogos metacêntricos em machos (ZZ), porém nas fêmeas um dos cromossomos desse par é submetacêntrico e maior (W) do que seu cromossomo homólogo metacêntrico. Além disso, enquanto o cromossomo Z apresenta uma banda heterocromática pericentromérica no braço longo e adjacente a ela uma NOR de localização distal, no braço longo do cromossomo W é a NOR que ocupa posição pericentromérica, enquanto a banda heterocromática adjacente a ela assume localização intersticial. Com base nesses resultados, Busin et al. (2008) sugerem que uma inversão possa estar envolvida na diferenciação desses cromossomos. A grande quantidade de heterocromatina no cromossomo W é também outra intrigante característica observada nesse cariótipo (Busin et al., 2008; Figura 2).



**Figura 2.** Ideograma do par de cromossomos sexuais de *P. tocantins* (baseado em Busin et al., 2008). Blocos em preto representam as regiões heterocromáticas e círculos cinzas as NORs.

A evidência de inversão cromossômica e de amplificação de heterocromatina no cromossomo W de *P. tocantins* (Busin et al., 2008) tornam o estudo dos cromossomos sexuais de *P. tocantins* um assunto muito interessante. Um estudo mais detalhado da composição molecular dos cromossomos sexuais em *P. tocantins* pode fornecer importantes dados sobre os processos de diferenciação que acarretaram no heteromorfismo desses cromossomos, bem como permitir futuras abordagens comparando-os com os

cromossomos 7 de outras espécies de *Pseudis* e *Lysapsus* a fim de se obter um melhor entendimento da evolução desses cromossomos.

### III.3 – Cromossomos sexuais

Em vertebrados, o sexo pode ser determinado por fatores ambientais (ESD - *environmental sex determination*) ou genéticos (GSD - *genetic sex determination*). No caso do mecanismo ambiental de determinação sexual, presente em várias espécies de répteis, o sexo de determinado organismo será definido por fatores tais como a temperatura de incubação dos ovos, que para tartarugas e crocodilianos constitui o principal fator responsável pela ativação diferencial da transcrição de genes envolvidos na determinação sexual. Em répteis, o mecanismo ESD pode ter se originado a partir de mecanismos GSD e tanto hipóteses adaptativas quanto neutras explicam a sua origem e evolução (Bull, 1983; Valenzuela, 2004). Os mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento sexual em organismos com mecanismo ambiental de determinação sexual ainda são pouco conhecidos, apesar de evidências sugerirem que variações ambientais (como a temperatura de incubação dos ovos) atuem sobre mecanismos genéticos de enzimas esteroideogênicas ou receptores de hormônios durante a determinação sexual (revisão de Sarre et al., 2004; Graves, 2008).

Enquanto nos organismos com ESD a determinação do sexo não depende de diferenças entre os genótipos/genomas de machos e fêmeas, naqueles em que ocorre o mecanismo genético de determinação sexual há diferenças genéticas entre os sexos, de tal maneira que um dos sexos origina gametas de um único tipo (sexo homogamético) e o outro, dois diferentes tipos (sexo heterogamético). As diferenças genéticas observadas entre os sexos em organismos com GSD podem consistir em diferenças alélicas referentes a um único *locus*, ou na existência de um *locus* sexo-específico (como o *Sry* em mamíferos) ou ainda em sistemas que se baseiam na dosagem de um gene (como o *Dmrt1* em aves) (para revisão, Solari, 1994; Ayling e Griffin, 2002; Ferguson-Smith, 2007; Graves, 2008). Os cromossomos portadores do *locus* de determinação sexual e seus homólogos constituem os pares de cromossomos sexuais das espécies com GSD.

O gene de determinação sexual de mamíferos, exceto monotremados, já é bem conhecido e denominado *Sry* (Sinclair et al., 1990; Berta et al., 1990; revisão de Goodfellow e Lovell-Badge, 1993). Mesmo sendo um gene de determinação sexual na maioria dos mamíferos, ele é muito pouco conservado, havendo diversos sítios com substituição não sinônima entre espécies (revisão de Ezaz et al., 2006a; Graves, 2006; Graves, 2008). Para aves, em que o sexo heterogamético é a fêmea (sistema de determinação sexual ZZ/ZW), o maior candidato a gene determinante do sexo é o *Dmrt1*. Nessa classe de vertebrados, o gene *Dmrt1* é mapeado no cromossomo Z e inexistente no cromossomo W. Dessa maneira, esse gene atua na determinação sexual pela sua

dosagem no genoma (presença de duas cópias leva ao desenvolvimento de gônadas masculinas, presença de uma cópia gera gônadas femininas) (revisão de Ferguson-Smith, 2007; Graves, 2008). Entretanto, Hori et al. (2000) isolaram uma forma alterada do gene *PKCI* repetido diversas vezes no cromossomo W de *Gallus gallus* (*Wpkci*), que pode estar envolvido no desenvolvimento de gônadas femininas.

Em répteis que possuem cromossomos sexuais, como serpentes, ainda não foi identificado nenhum gene candidato a fator principal da determinação sexual. Dentre os peixes, grupo em que diversos sistemas cromossômicos de determinação sexual existem, apenas *Oryzias latipes* já teve um gene candidato a exercer a função de determinação sexual apontado. Trata-se de um gene parálogo ao *Dmrt1*, que foi chamado de *DMY* (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002). O papel do *DMY* como gene determinante sexual em *O. latipes* foi corroborado por experimentos de reversão sexual em fêmeas geneticamente XX e em machos nocautes para *DMY* (Paul-Prasanth et al., 2006; Matsuda et al., 2007).

Em anuros, foi isolado em *Xenopus laevis* o gene *DM-W* (parálogo de *Dmrt1*) ligado ao cromossomo W, bem como a expressão desse gene ocorre durante a determinação sexual de fêmeas (Yoshimoto et al., 2008). Além disso, é proposto que o gene *DM-W* divergiu de *Dmrt1* como um gene dominante-negativo inibindo a cascata de diferenciação sexual que leva a formação testicular (Yoshimoto et al., 2010).

### III.3.1 – Aspectos gerais da diferenciação dos cromossomos sexuais

Os cromossomos sexuais se originam de autossomos quando esses adquirem genes de determinação sexual e a supressão na recombinação meiótica entre esses homólogos acarreta, progressivamente, o acúmulo de diferenças entre eles (Muller, 1964; Ohno, 1967; revisão de Graves, 2008). Várias espécies possuem cromossomos sexuais homomórficos, ou então com um leve heteromorfismo, demonstrando que diferentes graus de heteromorfismo resultam de processos e estágios diferentes na evolução dos cromossomos sexuais (Bull, 1983). A razão evolutiva para a supressão inicial da recombinação é a necessidade de prevenir que esta ocorra entre os *linkages* de determinação sexual, permitindo que mutações sejam fixadas no cromossomo do sexo heterogamético, bem como reduzindo a probabilidade de que esta mutação seja reparada (revisão de Ayling e Griffin, 2002; e Bergero e Charlesworth, 2008). Progressivamente, os cromossomos sexo-específicos (Y e W) perdem genes e ficam expostos a forças seletivas especiais, constituindo a parte mais variável do genoma dos animais (Bull, 1983; revisões de Charlesworth et al., 2005; e de Graves, 2008).

Diferenças entre os cromossomos sexuais X e Y ou Z e W podem ser resultantes de rearranjos estruturais como inversões, translocações e também adição e/ou duplicação de segmentos heterocromáticos (para revisão, Ayling e Griffin, 2002). Eventos de inversão

têm sido apontados como importantes rearranjos envolvidos nas etapas iniciais de diferenciação de cromossomos sexuais. Inversões por si só não inibem o crossing-over entre os cromossomos, porém esses rearranjos podem permitir uma situação na qual a falta de recombinação seja selecionada positivamente (Ohno, 1967). O acúmulo/amplificação de segmentos heterocromáticos também pode ser o passo que precede a diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais. O acúmulo de segmentos de DNA repetitivo, constituintes de blocos heterocromáticos, pode gerar assincronia no padrão de replicação dos dois cromossomos, concomitantemente auxiliando na redução da frequência de recombinação entre os cromossomos sexuais (Singh et al., 1976; Singh et al., 1980).

A análise de serpentes, as quais possuem sistema cromossômico de determinação sexual do tipo ZZ/ZW oferece evidências do importante papel tanto de inversões cromossômicas como de duplicação na diferenciação morfológica de cromossomos sexuais. Na família Boidae, que ocupa uma posição mais basal na filogenia das serpentes, todos os pares cromossômicos, tanto de machos quanto de fêmeas, são homomórficos. Na família Colubridae, muitas espécies exibem cromossomos sexuais heteromórficos, estando a diferença entre os cromossomos Z e W possivelmente relacionada, em algumas espécies, à ocorrência de uma inversão pericêntrica no cromossomo W e, em outros casos, à duplicação de segmentos do W. Já a família Viperidae apresenta espécies com alto grau de heteromorfismo entre os cromossomos sexuais, sendo o cromossomo W de tamanho bastante reduzido e heterocromático (Beçak et al., 1964; revisão de Oguiura et al., 2009). Mais recentemente, Matsubara et al. (2006) propuseram que a diferenciação dos cromossomos sexuais em serpentes começou na região distal no braço curto do par ancestral destes a partir da aquisição de um *locus* de determinação sexual, o que levou à supressão da recombinação entre os cromossomos homólogos e consequente acúmulo de sequências repetitivas. Estudos filogenéticos recentes (revisão de Oguiura et al., 2010; Pyron et al., 2013) apontam a família Colubridae (que apresenta cromossomos sexuais com diferenciação intermediária) como mais derivada do que a Viperidae (que apresenta cromossomos sexuais altamente diferenciados). Dessa maneira, é provável que a diferenciação dos cromossomos sexuais de serpentes tenha tido uma origem comum e que tenha prosseguido independentemente em diferentes linhagens evolutivas (ver revisão de Oguiura et al., 2010).

Schmid et al. (1979), estudando salamandras identificadas à época como pertencentes ao gênero *Triturus*, consideram a heterocromatinização como passo anterior à diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais. Os cromossomos X e Y de espécimes antes identificados como *Triturus alpestris alpestris* (atualmente *Ichthyosauria alpestris*) e *Triturus vulgaris vulgaris* (atualmente *Lisotriton vulgaris*) apresentam mesmo tamanho e morfologia, porém o cromossomo Y dessas espécies apresenta um segmento heterocromático terminal no braço longo (Schmid et al., 1979).

### III.3.2 – Os cromossomos sexuais de Anura

Em anfíbios a ocorrência de cromossomos sexuais heteromórficos é limitada a poucas espécies, porém há uma grande diversidade no que diz respeito ao tipo de sistema cromossômico (ZW ou XY) e ao grau de diferenciação. De acordo com Hillis e Green (1990), o sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW é a condição plesiomórfica para anfíbios e sistemas do tipo XX/XY se originaram independentemente em diversas linhagens evolutivas. No entanto, estudos recentes que envolveram análises filogenéticas de populações de *Glandirana rugosa* mostraram que, nessa espécie, que apresenta populações com heterogametia feminina e populações com heterogametia masculina, os sistemas cromossômicos do tipo ZZ/ZW (heterogametia feminina) evoluíram independentemente a partir do sistema XX/XY (heterogametia masculina) (Ogata et al., 2008).

Em anuros, de todas as espécies já cariotipadas, apenas 47 têm cromossomos sexuais identificáveis com algum nível de heteromorfismo (Tabela 1). Ocorrem, dentre os anuros, sistemas de determinação sexual que envolve a presença de cromossomo supranumerário único, como em *Leiopelma hochstetteri* (00/0W) (Green, 1988), até sistemas cromossômicos múltiplos, como em *Strabomantis bipocartus* (XXAA ♀/ XYAA ou XAA<sup>Y</sup> ♂) (Schmid et al., 1992; Schmid et al., 2010).

**Tabela 1.** Espécies de Anura com cromossomos sexuais heteromórficos já descritos.

Família/Espécies	Sistema	Cromossomos sexuais	
		Heteromorfismo	Referências
Bufonidae			
<i>Rhinella marina</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), CGH	Abramyan et al. (2009)
<i>Bufo viridis</i>	ZZ/ZW	pbr	Odierna et al. (2007)
Centrolenidae			
<i>Vitreorana antisthenesi</i>	XX/XY	ic, pbc	Schmid et al. (1989)
Cycloramphidae			
<i>Eupsophus insularis</i>	XX/XY	ic, pbc	Cuevas e Formas (1996)
<i>Eupsophus migueli</i>	XX/XY	ic, pbc	Iturra e Veloso (1981)
<i>Eupsophus roseus</i>	XX/XY	pbc	Iturra e Veloso (1989)
<i>Proceratophrys boiei</i>	ZZ/ZW	pbc	Ananias et al. (2007); Amaro et al. (2012)
Hemiphractidae			
<i>Gastrotheca ovifera</i>	XX/XY	tc (X > Y), pbc	Schmid et al. (1988); Schmid et al. (2002 b)
<i>Gastrotheca peruana</i>	XX/XY	ic, pbc	Schmid et al. (2012)
<i>Gastrotheca pseustes</i>	XX/XY	pbc	Schmid et al. (1990)
<i>Gastrotheca riobambae</i>	XX/XY	tc (X < Y), pbc, pn	Schmid et al. (1983, 1986, 1988, 2002 b)
<i>Gastrotheca walkeri</i>	XX/XY	tc (X > Y), pbc	
Hylidae			
<i>Hyla femoralis</i>	XX/XY	pn	Schmid e Steinlein (2003)
<i>Pseudis tocantins</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), ic, pbc, pn	Busin et al. (2008)
Leiopelmatidae			
<i>Leiopelma archeyi</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), ic, pbc	Green (2002)
<i>Leiopelma hamiltoni</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), pbc	Green (1988 a)
<i>Leiopelma hochstetteri</i>	00/0W	snu	Green (1988 b)

Leptodactylidae			
<i>Physalaemus ephippifer</i>	ZZ/ZW	pbc, pn	Nascimento et al. (2010)
<i>Engystomops petersi</i>	XX/XY	tc (X > Y), ic, pbc	Targueta et al. (2010)
<i>Engystomops freibergeri</i>	XX/XY	tc (X > Y), ic, pbc	Targueta et al. (2010)
<i>Engystomops coloradorum</i>	ZZ/ZW	pn	Targueta et al. (2011)
<i>Pseudopaludicola saltica</i>	XX/XY	ic	Duarte et al. (2010)
Myobatrachidae			
<i>Crinia bilingua</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), ic, pbc	Mahony (1991)
Pyxicephalidae			
<i>Pyxicephalus adspersus</i>	ZZ/ZW	tc (Z > W), pbc	Schmid (1980 a), Schmid (1980 b)
<i>Pyxicephalus edulis</i>	ZZ/ZW	tc (Z > W)	Schmid et al. (2012)
<i>Tomopterna delalandii</i>	ZZ/ZW	ic, pbc	Schmid (1980 b)
Ranidae			
<i>Pelophylax lessonae</i>	XX/XY	pbr	Schempp e Schmid (1981)
<i>Rana tagoi</i>	XX/XY	pbr, pbc	Ryuzaki et al. (1999)
<i>Rana sakurai</i>	XX/XY	ic	Ryuzaki et al. (1999)
<i>Glandirana rugosa</i>	XX/XY	ic, pbr	Nishioka et al. (1993);
	ZZ/ZW	ic, pbr	Nishioka et al. (1994)
Rhacophoridae			
<i>Buergeria buergeri</i>	ZZ/ZW	pbc, pn	Ohta et al. (1999); Schmid et al (1993)
Eleutherodactylidae			
<i>Eleutherodactylus albipes</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), pbc	Schmid et al. (2010)
<i>Eleutherodactylus caspari</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), pbc	Schmid et al. (2010)
<i>Eleutherodactylus cuneatus</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), ic, pbc	Schmid et al. (2010)
<i>Eleutherodactylus emiliae</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), pbc	Schmid et al. (2010)
<i>Eleutherodactylus glamyrus</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), ic, pb	Schmid et al. (2010)
<i>Eleutherodactylus turquinensis</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), ic, pbc	Schmid et al. (2010)
<i>Eleutherodactylus</i> sp. nov. G	ZZ/ZW	tc (Z < W), pbc	Schmid et al. (2010)
<i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	XX/XY	ic	Schmid et al. (2010)
<i>Eleutherodactylus oxyrhyncus</i>	XX/XY	tc (X < Y), pbc	Schmid et al. (2010)
<i>Eleutherodactylus cavernicola</i>	XXAA/XYAA ou XAA <sup>Y*</sup>	tc (X < Y), ic, pbc	Schmid et al. (2010)
Strabomantidae			
<i>Pristimantis euphronides</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), ic, pbc	Schmid et al. (2002 c)
<i>Pristimantis shrevei</i>	ZZ/ZW	tc (Z < W), ic, pbc	Schmid et al. (2002 c)
<i>Pristimantis pulvinatus</i>	XXAA/XYAA ou XAA <sup>Y*</sup>	tc (X < Y), ic	Schmid et al. (2010)
<i>Pristimantis riveroi</i>	XXAA/XYAA ou XAA <sup>Y*</sup>	tc (X < Y), ic	Schmid et al. (2003)
<i>Pristimantis</i> sp. nov. H	XXAA/XYAA ou XAA <sup>Y*</sup>	tc, ic, pbc, pn	Schmid et al. (2010)
<i>Strabomantius bipocartus</i>	XXAA/XYAA ou XAA <sup>Y*</sup>	tc (X < Y), ic	Schmid et al. (1992, 2002a)

CGH: heteromorfismo detectado após hibridação genômica comparativa; tc: heteromorfismo relativo ao tamanho cromossômico; ic: heteromorfismo relativo ao índice centromérico; pbc: heteromorfismo relativo ao padrão de banda C; pn: heteromorfismo relativo ao padrão da NOR; pbr: heteromorfismo relativo ao padrão de banda de replicação; fusão A<sup>Y</sup>: fusão entre cromossomo Y e um autossomo (i.e. cromossomos sexuais múltiplos). \*Tanto machos com cromossomo Y fundido a um autossomo como machos sem essa fusão cromossômica são encontrados.

Também em anuros, eventos de adição/amplificação de heterocromatina e inversões cromossômicas parecem ter importante papel na diferenciação de cromossomos sexuais. Em *Gastrotheca pseutes*, os cromossomos X e Y do citótipo B são diferenciados apenas por um segmento heterocromático presente na região terminal do cromossomo Y<sup>B</sup> (Schmid et al., 1990). Em *Proceratophrys boiei*, os cromossomos Z e W são homomórficos em tamanho e morfologia, porém o cromossomo W é quase que inteiro heterocromático, enquanto o cromossomo Z possui somente um bloco heterocromático centromérico (Ananias et al., 2007).

Entretanto, nos anuros *Gastrotheca walkerii* e *Gastrotheca ovifera*, ambas com sistema XX/XY, é relatado não o ganho, mas sim a perda de segmentos heterocromáticos na região pericentromérica do cromossomo Y (Schmid et al., 1988). Tal condição, de perda de heterocromatina, foi também inferida para anuros do gênero *Eupsophus* (Cuevas e Formas 1996; Iturra e Veloso, 1989).

Em algumas espécies de anuros é possível inferir a ocorrência tanto de eventos de adição de heterocromatina quanto de inversões cromossômicas durante a diferenciação dos cromossomos sexuais. Schmid (1980 a, b) descreve essa situação para *Pyxicephalus adspersus* e *P. dellandi*. No que diz respeito aos cromossomos sexuais de *P. adspersus* o cromossomo Z é maior que o cromossomo W, cujo braço curto é totalmente heterocromático. Já em *P. delandii*, que apresenta cromossomos Z e W homeólogos aos de *P. adspersus*, os cromossomos Z e W têm o mesmo tamanho, diferindo apenas em decorrência de um possível evento de inversão cromossômica. Com base nesses dados, foi inferido que os cromossomos Z e W em *P. delandii* podem corresponder a um estágio mais inicial de diferenciação dos cromossomos sexuais do que aquele observado em *P. adspersus* (Schmid 1980b). Bem como em tal situação, inversão cromossômica e heterocromatinização possivelmente ocorreram ao longo da diferenciação dos cromossomos sexuais de *Pseudis tocantins* (Busin et al., 2008).

Outra espécie para a qual existem evidências de inversão cromossômica durante a diferenciação dos cromossomos sexuais é *Glandirana rugosa*, já citada anteriormente. Nessa espécie, que apresenta tanto populações com sistema de cromossomos sexuais XX/XY, como populações caracterizadas pelo sistema cromossômico de determinação sexual ZZ/ZW (*Rana rugosa* em: Nishioka et al., 1993; Nishioka et al., 1994; Miura et al., 1997; Uno et al., 2008), foram encontradas evidências de inversões pericêntricas recorrentes, as quais teriam sido as responsáveis pela mudança da morfologia desses cromossomos (Miura et al., 1997; Uno et al., 2008; Nakamura et al., 2013). Além disso, observa-se uma clara homeologia entre os cromossomos Z e Y e entre os cromossomos X e W, demonstrada pelo mapeamento cromossômico de genes relacionados à diferenciação sexual realizado por Uno et al. (2008). O caso desse anuro é um dos poucos casos bem documentados sobre a interessante transição entre os sistemas cromossômicos XX/XY e ZZ/ZW.

Os estudos sobre a diferenciação dos cromossomos sexuais em anuros são ainda escassos. Entretanto, para vários outros organismos, a análise de sequências específicas localizadas nos blocos heterocromáticos dos cromossomos sexuais ou técnicas que permitam a comparação desses cromossomos sem prévio isolamento e caracterização de segmentos específicos, como as de pintura cromossômica e CGH, estão sendo utilizadas e têm permitido grande avanço no estudo de cromossomos sexuais, como será discutido nos itens a seguir.

### III.4 – A análise de sequências de DNA repetitivas no estudo de cromossomos sexuais

Diversos tipos de DNA repetitivo estão presentes no genoma dos eucariotos e podem ser classificados de acordo com o seu grau de repetição, sua atividade gênica e sua organização no genoma. Uma sequência é considerada moderadamente repetitiva quando apresenta cerca de  $10^3$ - $10^5$  cópias por genoma haploide, já o DNA classificado como altamente repetitivo apresenta  $10^6$  ou mais cópias por genoma haploide (revisão de Jelinek e Schmid, 1982; Charlesworth et al., 1994; Plohl et al 2008). Algumas sequências de DNAs repetitivos transcrevem moléculas de RNA, como os genes de RNA ribossomal (RNAr) e as sequências responsáveis pela transcrição de *snRNAs* (*small nuclear RNAs*), outras codificam proteínas, como os genes codificadores de histonas, enquanto várias sequências repetitivas são consideradas não-codificantes. Já em relação à sua organização no genoma, as sequências repetitivas podem se apresentar dispersas no genoma ou agrupadas *in tandem* (para revisão, Jelinek e Schmid, 1982; Charlesworth et al., 1994; López-Flores e Garrido-Ramos, 2012).

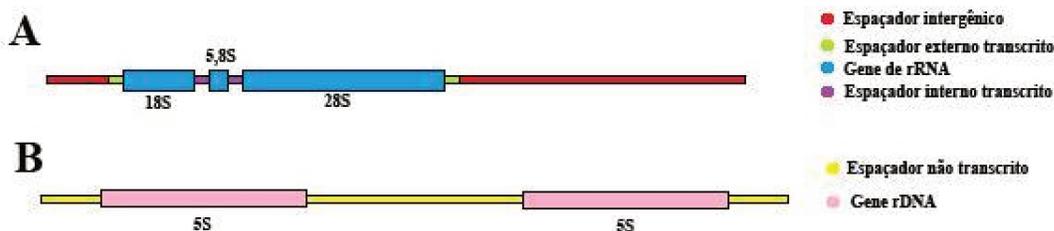
Dentre os DNAs repetitivos dispersos pelo genoma encontram-se os elementos transponíveis (ETs), que são sequências de DNA capazes de se moverem de uma região cromossômica para outra dentro do mesmo genoma (revisão de López-Flores e Garrido-Ramos, 2012). Estes são divididos em duas classes: retrotransposons ou elementos transponíveis da classe I (que utilizam uma molécula de RNA como intermediária durante a transposição) e transposons de DNA ou da classe II (que se movem no genoma via um intermediário de DNA). Os elementos da classe I ainda são subdivididos em duas categorias, baseadas na presença ou não de longas repetições terminais (LTRs) (revisão de Tollis e Boissinot, 2012). Vários estudos têm mostrado a ocorrência de um grande acúmulo de elementos transponíveis nas regiões não recombinantes de cromossomos sexuais (Baker e Wichman, 1990; e revisão de Abe et al., 2005; e Steinemann e Steinemann, 2005). Scoot et al. (2006), por exemplo, reportaram o acúmulo de retrotransposons LINE-1 no cromossomo X de roedores *Tokudaia osimensis*, que apresentam o sistema de cromossomos sexuais XX/X0, e chegaram à conclusão de que o acúmulo destes elementos ocorreu após a evolução desse sistema. No peixe *Semaprochilodus taeniurus*, com sistema cromossômico ZZ/ZW, a invasão de retrotransposons Rex-1 após a supressão da recombinação dos cromossomos proto-Z e proto-W pode ter exercido importante papel no processo de heterocromatinização do cromossomo W (Terencio et al., 2012).

Dentre os DNAs repetitivos *in tandem* utilizados como marcadores citogenéticos podem ser destacados os genes de RNAr, genes codificadores de histonas e os genes de U snRNAs (alguns exemplos em Cabral-de-Mello et al., 2011; Cabral-de-Mello et al., 2012; Nakajima et al., 2012). Já dentre os DNAs repetitivos não codificantes, a análise de sequências de DNA satélite, principais constituintes de regiões heterocromáticas dos cromossomos (revisão de López-Flores e Garrido-Ramos, 2012), têm permitido grandes avanços no estudo de cromossomos sexuais de diversos grupos (exemplos em Singh et al., 1976; Itoh e Mizuno, 2002; Parise-Maltempi et al., 2007). Maiores detalhes sobre os genes

ribossomais e DNA satélites, sequências de especial interesse no presente estudo, são apresentados a seguir.

### III.4.1 – Genes ribossomais

Os genes de RNAr pertencem a famílias multigênicas, estão arranjados *in tandem* no genoma e transcrevem as diferentes moléculas de RNAr que executam funções tanto estruturais quanto catalíticas nos ribossomos (revisões de Long e Dawid, 1980; e López-Flores e Garrido-Ramos, 2012). A família de DNAr 45S é composta por genes responsáveis pela produção de RNAr 5,8S e 28S, constituintes da subunidade maior do ribossomo, e de RNAr 18S, constituinte da subunidade menor do ribossomo. A unidade repetitiva característica dessa família gênica é ainda composta por espaçadores externos e internos que também são transcritos (*external transcribed spacers* – ETS – e *internal transcribed spacers* – ITS) e por um espaçador externo não transcrito (NTS) (Figura 3A) (revisão de Raška et al., 2004, dentre várias outras). As cópias dessas unidades repetitivas agrupadas *in tandem* compõem as regiões organizadoras de nucléolo (NOR), que estão presentes em variados números nos diferentes organismos (revisão de Raska et al., 2006; Boisvert et al., 2007; e Cmarko et al., 2008).



**Figura 3.** Esquema geral da organização dos genes de RNAr 45S (A) e RNAr 5S (B). Adaptado de Raška et al. (2004).

Já as sequências que compõem a família de DNAr 5S não fazem parte das NORs, estando agrupadas em outros sítios do genoma (revisão de Long e Dawid, 1980). Porém, há relatos, para algumas espécies de fungos, protistas e crustáceos (revisão de Drouin e Moniz-de-Sá, 1995), de co-localização entre as duas famílias de rDNA. O DNAr 5S tem uma organização mais simples que o DNAr 45S, já que sua unidade repetitiva é composta por uma região transcritora de cerca de 120 pb, conservada entre diversos táxons, e um espaçador não transcrito (NTS), variável em tamanho e composição nucleotídica principalmente devido a mutações pontuais ou eventos de deleção-inserção (para revisão, Long e Dawid, 1980; Barciszewska et al 2001) (Figura 3B). Em vertebrados, é comum a presença de duas diferentes classes de DNAr 5S, as quais diferem entre si principalmente pelo NTS (Martins e Wasko, 2004). Dentre os anuros, a presença de diferentes tipos de DNAr já foi descrita para espécies do gênero *Xenopus* (Korn & Brown, 1978; Peterson et

al., 1980; Nietfeld et al., 1988), para *Physalaemus cuvieri* (Vittorazzi et al., 2011) e para espécies amazônicas de *Engystomops* (Rodrigues et al 2012).

O mapeamento cromossômico tanto de sequências de DNAr 45S quanto de sequências de DNAr 5S tem fornecido valiosa informação para estudos de homeologias cromossômicas e de diferenças inter e intraespecíficas (exemplos em: Ferreira et al., 2007; Aguilar e Galleti-Jr, 2008; Quinderé et al., 2009). Em muitos organismos, sítios de DNAr são encontrados em cromossomos sexuais e o papel dessas sequências na evolução de cromossomos sexuais tem sido discutido por alguns autores. Reed & Phillips (1997), por exemplo, argumentam que a NOR presente nos cromossomos sexuais do peixe *Salvelinus alpinus* possam funcionar como ponto preferencial de recombinação entre esses cromossomos e, dessa maneira, a NOR poderia reduzir a frequência de recombinação em áreas adjacentes a ela, onde hipoteticamente pode estar localizado o *locus* relacionado à determinação sexual. Dessa maneira, a NOR contribuiria para a diferenciação desses segmentos sexo-específicos.

Em Anura, existem também casos em que a NOR é um importante marcador no estudo de cromossomos sexuais. Em *Buergeria buergeri* e *Hyla femoralis*, o heteromorfismo reativo à presença de NOR é o único notável entre os cromossomos sexuais (Schmid et al., 1993; Schmid e Steinlein, 2003). Em *Hyla femoralis*, a NOR está exclusivamente presente no cromossomo X, sendo provável que tenha ocorrido a deleção da NOR e da maioria da heterocromatina associada no proto-Y (Schmid e Steinlein, 2003). Em *Buergeria buergeri*, a NOR está presente no cromossomo Z, porém apresenta-se ausente no cromossomo W possivelmente devido a um evento de deleção dessas (Schmid et al., 1993), bem como inferido para *H. femoralis*. Algumas espécies de anuros, cujos cromossomos sexuais podem ser diferenciados pela morfologia cromossômica e/ou padrão de bandamento, também apresentam diferenças relacionadas a NOR. Em *Physalaemus ephippifer*, por exemplo, além do heteromorfismo do padrão de bandamento C entre os cromossomos Z e W, esses são também diferenciados pela presença, no cromossomo W, de um sítio adicional de NOR no braço curto, enquanto o cromossomo Z apresenta somente uma NOR no braço longo (também presente no cromossomo W) (Nascimento et al., 2010).

Embora o mapeamento de NORs seja amplamente empregado em estudos com anuros, são ainda poucos os estudos que envolvem a análise molecular e o mapeamento cromossômico de DNAr 5S nos cariótipos desses anfíbios. A localização cromossômica do DNAr 5S em anuros é conhecida em algumas espécies das famílias Ascaphidae, Ranidae e Discoglossidae (Vitelli et al., 1982; Schmid et al., 1987), em *Xenopus laevis* e *X. borealis* (Harper et al., 1983), *P. ephippifer* e *P. cuvieri* (Nascimento et al., 2010; Vittorazzi et al., 2011), *E. petersi* e *E. freibergi* (Rodrigues et al., 2012), *Strabomantis bipocartus* (*Eleutherodactylus maussi* em Schmid et al., 2002a) e *Craugastor taurus* e *C. ranoides* (Schmid et al., 2010). Entretanto, alguns trabalhos relatam somente a sequência

nucleotídica do gene de RNAr 5S de *Gastrotheca riobambae* (del Pino et al., 1992) e de *Bufo americanos* e *Rana pipiens* (Gaskins et al., 1992).

Para o gênero *Pseudis*, nenhuma informação acerca da organização molecular ou cromossômica de DNAr 5S está disponível na literatura.

#### III.4.2 – DNA satélite

DNAs satélites são sequências de DNA altamente repetitivo, organizadas *in tandem* e constituintes de uma parte considerável do genoma de eucariotos. Geralmente esta classe de DNA repetitivo é caracterizada por unidades monoméricas com mais de 100 pb, sendo comumente encontrados em regiões heterocromáticas dos cromossomos (para revisão, Charlesworth et al., 1994; Ugarković e Plohl, 2002; Vicari et al., 2010; López-Flores e Garrido-Ramos, 2012; Plohl et al., 2012).

Durante muito tempo essas sequências repetitivas foram consideradas como “DNA lixo” devido à própria natureza repetitiva, à extrema diversidade e pelo fato de não serem regiões codificadoras (revisão de Plohl et al., 2012). Porém, claramente estes segmentos repetitivos têm um importante papel no genoma de eucariotos, como efeitos locais de regulação na expressão gênica, facilitação na formação do cinetocoro propiciado por DNA satélite centromérico, organização cromossômica, correto pareamento dos cromossomos durante a meiose e segregação destes (Masumoto et al., 2004; e revisão de Plohl et al., 2012).

Os monômeros de DNA satélite são categorizados como os componentes mais dinâmicos dos genomas eucarióticos e a divergência nucleotídica entre as sequências de uma mesma família de DNA satélite é em geral muito baixa (revisões de Ugarković e Plohl, 2002; e López-Flores e Garrido-Ramos, 2012). A homogeneização de sequências de DNA satélite resulta da evolução não independente dos monômeros (*concerted evolution*) segundo a qual mudanças nas unidades repetitivas básicas podem ser espalhadas para os diversos sítios cromossômicos portadores de sequências da mesma família de DNA repetitivo e, em um segundo nível, podem ser fixadas na população, um processo chamado *molecular drive* (Dover, 1982; para revisão do assunto, ver Ugarković e Plohl, 2002; Plohl et al., 2012). O processo de *molecular drive* depende de uma variedade de mecanismos de trocas não recíprocas (conversão gênica, *crossing-over* desigual, inserção de DNA circular extracromossomal [eccDNA], transposição e trocas mediadas por RNA) entre os sítios portadores das sequências repetitivas (presentes em um mesmo cromossomo ou não), bem como de deriva genética e seleção natural (Dover, 1982; Cohen e Segal, 2009). A taxa de homogeneização de sequências repetitivas difere entre as famílias de sequências e, em uma mesma família, é geralmente observado um decréscimo gradativo na eficiência de homogeneização quando são considerados monômeros adjacentes, monômeros presentes

em cromossomos homólogos e monômeros de cromossomos não-homólogos (revisão de Plohl et al., 2008).

Os DNA satélites apresentam variações também no número de unidades monoméricas. Tais variações geralmente estão ligadas à ocorrência de *crossing-over* desigual, eventos de deleção, *slippage* da DNA polimerase e inserção de cópias de DNA satélite constituintes de DNA circular extracromossomal (eccDNA) (para revisão, Charlesworth et al., 1994; Ugarković e Plohl, 2002; Plohl et al., 2012). *Crossing-over* desigual, em combinação com deriva genética e seleção podem ter um forte efeito tanto no acúmulo quanto na redução destas sequências no genoma (revisão de Charlesworth et al., 1994).

Muitas vezes, espécies próximas filogeneticamente compartilham famílias de DNA satélite ao mesmo tempo em que detém sequências repetitivas espécie-específicas (revisão de Ugarković e Plohl, 2002). O isolamento e mapeamento de DNA satélite já se mostrou uma importante ferramenta para o estudo de evolução e estrutura cromossômica, genômica e, particularmente, de cromossomos sexuais, como visto em invertebrados (exemplos em: Mandrioli et al., 2003; Palomeque et al., 2005; Yoshimura et al., 2006), peixes (exemplos em: Martins et al., 2006; Silva et al., 2012 e revisão de Vicari et al., 2010), répteis (exemplos em: Singh et al., 1976; Giovannotti et al., 2009) e mamíferos (exemplos em: Louzada et al., 2008; Matsubara et al., 2008; Acosta et al., 2010). Dentre os trabalhos com DNA satélites encontrados em cromossomos sexuais, diferentes situações têm sido encontradas. Zhao et al. (2008), por exemplo, relataram um acúmulo diferencial de duas classes de DNA satélite derivado do DNAr 5S nos cromossomos X e Y do peixe *Mastacembelus aculeatus*. Já para o peixe *Leporinus elongatus*, foi reportada a existência de uma sequência de 174 pb de DNA satélite (nomeada de L'46) específica do cromossomo W dessa espécie (Nakayama et al. 1994). Devido ao fato de essa sequência não ser encontrada em outra espécie próxima, os autores sugeriram que isso pode ser efeito de um acúmulo recente no genoma de *L. elongatus*.

São poucos os estudos em anuros nos quais foram realizados o isolamento, a caracterização e o mapeamento de DNAs satélites. Odierna et al. (2004), por exemplo, isolaram de *Pseudepidalea viridis* (espécie antes denominada *Bufo viridis*) uma sequência de aproximadamente 400 pb (pBv) que é amplamente conservada na família Bufonidae, como observado em experimentos de Southern Blotting. Outras sequências repetitivas também foram isoladas de *Lithobates catesbeianus* (*Rana catesbeiana* em Wu et al., 1986), *Discoglossus pictus* (Amor et al., 2009; Odierna et al., 1999) e *Pelophylax esculentus* (*Rana esculenta* em Ragghianti et al., 1995).

Mais recentemente, Vittorazzi et al. (2011) isolaram de espécimes de *Physalaemus cuvieri* provenientes de Palmeiras-BA um DNA satélite cujos monômeros apresentaram 190 pb e alta similaridade com a região transcritora de DNAr 5S. Com base nesses dados, os autores concluíram se tratar de uma sequência derivada de DNAr 5S, que foi

denominada de PcP190EcoRI. Quando usada como sonda em experimentos de hibridação *in situ*, a sequência PcP190EcoRI revelou as regiões centroméricas e pericentroméricas de vários cromossomos do cariótipo de *P. cuvieri*. No cromossomo 3 dessa espécie o DNA satélite foi mapeado no mesmo sítio em que foram detectadas sequências de DNAr 5S do tipo I, no entanto os experimentos de FISH não mostraram evidência de co-localização entre a sequência PcP190EcoRI e as sequências de DNAr 5S do tipo II (Vittorazzi et al., 2011).

Curiosamente, experimentos ainda em desenvolvimento em nosso laboratório têm mostrado que sequências similares à PcP190EcoRI são também encontradas em diversas outras espécies de anuros (Vittorazzi et al., dados não publicados). A presença desse tipo de sequência em *Pseudis tocantins*, no entanto, ainda permanece não investigada.

### **III.5 – Pintura cromossômica e Hibridação Genômica Comparativa (CGH) nos estudos de cromossomos sexuais**

Muitas descobertas interessantes sobre possíveis processos envolvidos na diferenciação de cromossomos sexuais de diversos organismos têm sido decorrência de estudos detalhados acerca da organização molecular de segmentos heterocromáticos presentes nesses cromossomos (exemplos em Singh et al., 1976; Nakayama et al., 1994; Terencio et al., 2012) como discutido no item anterior. No entanto, outras estratégias, que não dependem do isolamento ou conhecimento específico acerca de determinada sequência, também têm se mostrado extremamente interessantes na busca de importantes diferenças presentes entre cromossomos sexuais. Dentre elas estão a hibridação genômica comparativa (CGH, de *comparative genomic hybridization*) e a pintura cromossômica, detalhadas a seguir.

#### *III.5.1 - Hibridação genômica comparativa*

A técnica de CGH, aplicada ao estudo dos cromossomos sexuais, é realizada pela marcação do DNA genômico total de fêmeas e machos com dNTPs ligados a fluorocromos (como Cy-3-dUTP e FITC-dUTP). Tal DNA marcado é então utilizado como sonda para hibridar em metáfases do organismo do sexo heterogamético, ou de ambos os sexos, com o objetivo de identificar que tipos de cromossomos sexuais estão presentes naquela espécie (Traut et al., 2001).

Essa ferramenta foi utilizada pela primeira vez em estudos de cromossomos sexuais por Traut et al. (1999) a fim de verificar os níveis de diferenciação molecular entre esses cromossomos. Os mesmos autores ainda relatam que o sucesso do reconhecimento de cromossomos sexuais por CGH requer que estes tenham um alto grau de diferenciação molecular. Entretanto, alguns estudos revelam a possibilidade de identificar cromossomos sexuais pouco diferenciados. No dragão australiano *Pogona vitticeps*, Ezaz et al. (2005)

conseguiram identificar um par de microcromossomos do tipo ZZ/ZW por meio de CGH. Similarmente, na tartaruga *Chelodina longicollis*, foi possível identificar um sistema de cromossomos sexuais do tipo XX/XY por CGH, em que os cromossomos X e Y eram microcromossomos não diferenciados no que diz respeito à morfologia e ao padrão de bandamento C (Ezaz et al., 2006b). Utilizando a mesma técnica, Abramyan et al. (2009) identificaram um sistema ZZ/ZW no anuro *Rhinela marina* (= *Bufo marinus*) graças à detecção, exclusivamente em fêmeas, de uma pequena região em um cromossomo morfologicamente indistinguível de seu homólogo.

Em outras situações, estudos com cromossomos um pouco mais diferenciados também mostraram regiões sexo-específicas. Na tartaruga *Emydura macquarii*, a qual tem cromossomos sexuais com heteromorfismo de tamanho, morfologia cromossômica e padrão de bandamento C, o CGH revelou claramente um pequeno segmento sexo-específico no cromossomo Y (Martinez et al., 2008). Em outra tartaruga, *Pelodiscus sinensis*, cujo cromossomo W claramente difere do Z por apresentar uma amplificação de um segmento portador de banda C e NOR, Kawai et al. (2007), utilizando CGH, identificaram um elemento sexo-específico no cromossomo W, co-localizado com aquele bloco nele amplificado.

Já no caso do anuro *Glandirana rugosa*, os resultados obtidos por CGH revelaram apenas um pequeno segmento W-específico, embora esse cromossomo seja facilmente diferenciado do cromossomo Z por técnicas citogenéticas convencionais (Miura et al., 2009). Isso ocorre porque a diferenciação em *G. rugosa* resultou de inversões pericêntricas, como inferido em vários estudos (ver revisão de Nakamura, 2013).

Apenas as duas espécies de anuros citadas anteriormente (*G. rugosa* e *R. marina*) já tiveram seus cromossomos sexuais investigados por CGH. Essa é, portanto, uma técnica que pode auxiliar na comparação dos cromossomos sexuais de *Pseudis tocantins*, espécie alvo do presente estudo.

### III.5.2 - Pintura cromossômica

A pintura cromossômica é uma técnica muito utilizada para reconhecimento de segmentos e/ou cromossomos homeólogos entre espécies (exemplos em: Yang et al., 1995; Yang et al., 1997; Trifonov et al., 2003; Musilova et al., 2007; Hass et al., 2008; Trifonov et al., 2011; Nagamachi et al., 2013). A técnica se baseia no isolamento de um segmento cromossômico ou uma cópia inteira de um cromossomo por citometria de fluxo (Gray et al., 1975) ou microdissecção (Meltzer et al. 1992; Kubickova et al., 2002). As cópias cromossômicas ou segmentos destas capturados passam por etapas de amplificação por DOP-PCR (*degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction*) (Telenius et al., 1992), por *linker-adaptor* PCR (Thalhammer et al., 2004) ou utilizando kits para amplificação genômica (como o utilizado por Krylov et al., 2010).

Diversos são os exemplos da aplicação da pintura cromossômica no estudo dos cromossomos sexuais. Diniz et al. (2008), por exemplo, utilizando sondas derivadas de cópias microdissecadas do cromossomo Z do peixe *Triportheus nematurus*, comprovaram que o cromossomo Z é muito conservado no gênero *Triportheus*, já que sinais de hibridação são encontrados nos cromossomos Z de outras espécies desse gênero. Outro exemplo é o de *Hoplias malabaricus* e *Erythrinus erythrinus*, duas espécies da mesma família, que compartilham a existência de cromossomos sexuais múltiplos. Estudos de pintura cromossômica realizados por Cioffi et al. (2011) sugeriram que os cromossomos sexuais presentes nessas espécies não são correspondentes, já que as sondas construídas com os cromossomos sexuais de uma espécie detectaram cromossomos autossômicos da outra, sugerindo origens independentes dos sistemas cromossômicos de determinação sexual dessas espécies. Em *Characidium*, Machado et al. (2011) inferiram, utilizando pintura cromossômica, a origem dos cromossomos Z e W nas espécies desse gênero. Utilizando sondas construídas a partir de cromossomos W de *C. gomesi*, os autores observaram sinais de hibridação nos cromossomos Z e W de outras espécies de *Characidium*, corroborando a hipótese de origem comum dos cromossomos sexuais nesse gênero. No que diz respeito à diferenciação desses cromossomos, Machado et al. (2011) inferem que a condição ancestral, sem cromossomos sexuais heteromórficos, seria parecida a observada em *C. zebra*, no qual sinais de hibridação dispersos pelo cariótipo com a sonda derivada do cromossomo W de *C. gomesi* são observadas.

Mesmo sendo uma técnica muito utilizada em alguns grupos, a pintura cromossômica não tem sido aplicada com frequência em anuros. O primeiro e único trabalho envolvendo pintura cromossômica em Anura foi o de Krylov et al. (2010). Nele, os autores reportaram a reconstrução do cariótipo tetraploide de *Xenopus laevis* utilizando sondas derivadas da microdissecção de cromossomos de *X. tropicalis*. Dessa forma foi possível obter informações sobre a homeologia entre, por exemplo, o cromossomo 1 de *X. tropicalis* com os cromossomos 1 e 2 de *X. laevis*. Com seus resultados, os autores deram suporte à hipótese de origem de *X. laevis* por alotetraploidia .

Sendo assim, o uso de pintura cromossômica em *P. tocantins* pode também nos trazer mais informações sobre os cromossomos Z e W dessa espécie.

## **IV - Objetivos do Estudo**

#### **IV.1 - Geral**

Considerando que os cromossomos sexuais heteromórficos de *P. tocantins* ainda não foram comparados por técnicas de citogenética molecular e que a composição dos blocos heterocromáticos neles presentes, que diferem entre si tanto na localização intracromossômica quanto no tamanho, permanece totalmente desconhecida, o presente trabalho objetiva investigar alguns aspectos da composição molecular desses cromossomos e, dessa maneira, pretende fornecer novos elementos para a análise dos processos envolvidos em sua diferenciação.

#### **IV.2 - Específicos**

1. Avaliar o grau de diferenciação dos cromossomos Z e W de *P. tocantins* com as técnicas de CGH e pintura cromossômica, com o intuito de reconhecer regiões específicas de cada cromossomo.
2. Mapear sequências de DNAr 5S e sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> no cariótipo de *P. tocantins*.
3. Isolar, caracterizar e mapear sequências do DNA repetitivo PcP190EcoRI no cariótipo de *P. tocantins*.

## **V - Materiais e Métodos**

### **V.1 - Espécimes**

Foram utilizados quatro machos e sete fêmeas de *Pseudis tocantins* provenientes de Porto Nacional-TO. Todos os espécimes estão depositados no Museu de Zoologia da UNICAMP (ZUEC) ou no Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), sob os números ZUEC 13227-13234, MNRJ 35456-35458.

### **V.2 - Preparações cromossômicas**

As preparações cromossômicas de *P. tocantins* foram obtidas a partir de suspensões de células do epitélio intestinal disponíveis no banco de células do Laboratório de Estudos Cromossômicos do Instituto de Biologia da UNICAMP, previamente produzidas por Busin et al. (2008).

### **V.3 - Colorações com fluorocromos**

As preparações cromossômicas de *P. tocantins* foram submetidas ao bandamento C de acordo com Sumner (1972) e coradas com os fluorocromos DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) e mitramicina (MM).

### **V.4 - Hibridação Genômica Comparativa – CGH**

Amostras de DNA obtidas de fígado de machos e fêmeas de *P. tocantins* foram marcadas com FITC-12-dUTP – Roche e Cy-3-dCTP – GE Healthcare, com o auxílio dos kits Nick Translation Kit – Roche ou Nick Translation - GE Healthcare, de acordo com as instruções dos fabricantes. Cerca de 1 µg da sonda do genoma de macho marcada com FITC e 1 µg da sonda do genoma de fêmea marcada com Cy-3 foram co-precipitadas na presença de 4 µg de DNA competidor<sup>2</sup> e 1 µg de DNA de esperma de salmão. As sondas foram ressuspensas em solução de 50% de formamida, 2x SSC e 10% de dextran sulfato.

O método de hibridação utilizado foi o mesmo descrito a seguir, no item IV.8, tendo sido realizada a hibridação das preparações cromossômicas de fêmeas com as sondas em um período de três dias. As preparações cromossômicas foram coradas com DAPI logo após as lavagens realizadas para a remoção das sondas não hibridadas.

---

<sup>2</sup> O DNA competidor consistiu em fragmentos (entre 75 pb e 500 pb) do genoma de machos de *P. tocantins* obtidos por autoclavagem de amostras do DNA genômico em NaCl 0,3 M por 30 minutos a 1,4 atm/120°C. As sondas foram ressuspensas em solução de 50% formamida, 2x SSC e 10% de dextran sulfato. Para a obtenção do DNA competidor, amostras de DNA de machos de *P. tocantins* foram autoclavadas durante 30 minutos a 1,4 atm sob 120°C. O DNA autoclavado foi então desnaturado à 95° por 10 minutos e, após renaturação, tratado com S1 nuclease (1U/ µg) por 5 minutos. Em seguida as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e extraídas utilizando um volume igual de fenol:clorofórmio, centrifugando por 5 minutos a 13000 rpm logo após coletando a fase aquosa. O DNA foi precipitado utilizando 2,5 volumes de etanol 100% e ressuspensão em água de Milli-Q autoclavada.

## V.5 - Microdissecção e Pintura Cromossômica

Suspensões celulares de fêmeas de *P. tocantins* foram gotejadas em lâminas contendo uma membrana de polietileno-naftalato (PEN), previamente expostas à radiação UV por 30 minutos. As lâminas foram coradas com Giemsa 10%. Os cromossomos foram microdissecados utilizando o sistema PALM - Zeiss. Os cortes foram realizados com UV a 0,5-0,6  $\mu\text{J}/\text{pulso}$  e a captura da região isolada com um pulso de 0,2  $\mu\text{J}$ . Os testes envolvidos por hora se limitaram ao número de cópias cromossômicas (15 a 25 cópias) e as porções cromossômicas capturadas (cromossomo inteiro ou somente o braço longo). Os cromossomos Z e W microdissecados foram capturados, separadamente, na tampa de tubos de 0,2 mL, contendo 1  $\mu\text{L}$  de óleo mineral. Os tubos contendo os cromossomos foram mantidos invertidos por cerca de 10 horas.

O material capturado foi amplificado por PCR com o auxílio do kit de amplificação GenomePlex Single Cell WGA4 - Sigma-Aldrich. O produto da amplificação foi verificado após eletroforese de uma amostra em gel de agarose 1,5%. O processo de re-amplificação e marcação da sonda foi realizado por GenomePlex WGA3 - Sigma-Aldrich seguindo o protocolo descrito por Krylov et al. (2010). O produto dessas reações também foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1,5% e, em seguida, foi purificado com o uso do kit GeneJet PCR Purification – Fermentas. O protocolo para a hibridação *in situ* fluorescente dessas sondas também seguiu as recomendações de Krylov et al. (2010).

## V.6 - Isolamento e clonagem de DNAr 5S e PcP190EcoRI

Amostras de DNA genômico foram obtidas a partir do fígado de espécimes de *P. tocantins*, conforme descrito por Targueta et al. (2010), porém utilizando solução de TNES 5 vezes menos concentrada (250mM de tampão Tris pH 7.5; 2M de NaCl; 100 mM de EDTA e 2,5% de SDS) do que a utilizada naquele trabalho. A partir dessas amostras, foram isoladas unidades repetitivas do DNAr 5S através de PCR realizada na presença dos primers 5S-A (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5S-B (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (Pendás et al., 1994).

Para o isolamento de sequências repetitivas PcP190EcoRI, foram utilizadas tanto amostras de DNA genômico, obtidas conforme descrito acima, quanto cópias do cromossomo Z microdissecadas conforme descrito no item IV.5. O material microdissecado foi amplificado com o auxílio do kit GenomePlex WGA3 - Sigma-Aldrich, seguindo protocolo descrito por Krylov et al (2010). Amostras desse material amplificado bem como do DNA genômico de *P. tocantins* foram submetidas a reações de PCR na presença dos primers P190F (5'-AGACTGGCTGGGAATCCCAG-3') e P190R (5'-AGCTGCTGCGATCTGACAAGG-3'), previamente descritos por Vittorazzi et al. (2011).

Os fragmentos amplificados por PCR foram observados em gel de agarose 1%, purificados utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System – Promega e inseridos em plasmídeo (pGEM-T Easy Vector – Promega), de acordo com as instruções dos fabricantes. Esses vetores foram utilizados para a transformação de bactérias *E. coli* JM 109, com o auxílio do kit TransformationAid Bacterial Transformation Kit - Fermentas, seguindo as especificações do fabricante. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido na presença de ampicilina (100 µg/mL de meio), X-gal (4 µg/mL de meio) e IPTG (0,1 mM) e deixadas em crescimento *overnight*. As colônias recombinantes foram coletadas, semeadas novamente em meio LB sólido e deixadas *overnight* a 37°C. Os plasmídeos foram então extraídos pelo método de Mini-Prep descrito por Sambrook et al (1989).

#### **V.7 - Sequenciamento dos fragmentos de DNA clonados**

Os fragmentos clonados foram amplificados por PCR em termociclador Mastercycler Personal - Eppendorf com os primers T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3') e o tamanho dos fragmentos obtidos foi avaliado após eletroforese em gel de agarose 1%. O produto da reação de amplificação foi purificado com o auxílio dos kits GFX PCR and Gel Band Purification - GE Healthcare e Wizard SV Gel and PCR Clean-up System - Promega, seguindo as recomendações dos fabricantes. O material purificado foi utilizado para o sequenciamento das regiões de interesse pelo método de interrupção da replicação pela incorporação de ddNTP conjugados a fluorocromos. Para isso, reações de amplificação foram realizadas em termociclador com componentes do kit BigDye Terminator (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante.

Os produtos das reações de sequenciamento foram purificados através de precipitação por etanol 80%, seguida de centrifugação a 15.000 g por 30 minutos e posterior lavagem com etanol 70% (também seguida de centrifugação). Após secos, os precipitados foram enviados para o serviço de sequenciamento de DNA (SSDNA) do Departamento de Bioquímica (Instituto de Química) da Universidade de São Paulo.

As sequências obtidas foram editadas com o auxílio do software BioEdit v. 7.0.9.0 (Hall, 1999), alinhadas por ClustalW e comparadas com sequências depositadas no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### **V.8 - Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) – mapeamento de DNAr 5S, PcP190EcoRI e sequência telomérica**

Experimentos de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foram realizados utilizando como sondas sequências de DNAr 5S e PcP190EcoRI isoladas de *P. tocantins* e sequências teloméricas. As sondas teloméricas [(CCCTAA)<sub>3</sub> – PNA Bio] estavam marcadas

diretamente com Cy3-dUTP e sua hibridação com as preparações cromossômicas de *P. tocantins* foi realizada de acordo com as especificações do fabricante.

As sondas de DNAr 5S e PcP190EcoRI foram sintetizadas por PCR (PCR Dig Probe Synthesis Kit - Roche) ou por *nick translation* (Nick Translation Kit – Roche ou Bionick Labelling System – Invitrogen), precipitadas na presença de DNA de esperma de salmão (concentração final = 100 ng/ $\mu$ L) e ressuspendidas em meio de hibridação (formamida 50%, 2x de SSC e dextran sulfato 10%). As condições de hibridação das sondas com as preparações cromossômicas e posterior lavagem do excesso de sondas seguiram o método descrito por Viegas-Péquignot (1992). Para a detecção das sondas, as preparações cromossômicas foram incubadas com anticorpo anti-digoxigenina conjugado com rodamina – Roche (600 ng/ $\mu$ L), em câmara umedecida com PBT (1x PBS, 0,12% de BSA e 0,1% de Tween 20), por 45 minutos. As preparações cromossômicas foram coradas com DAPI (0,5  $\mu$ g/mL).

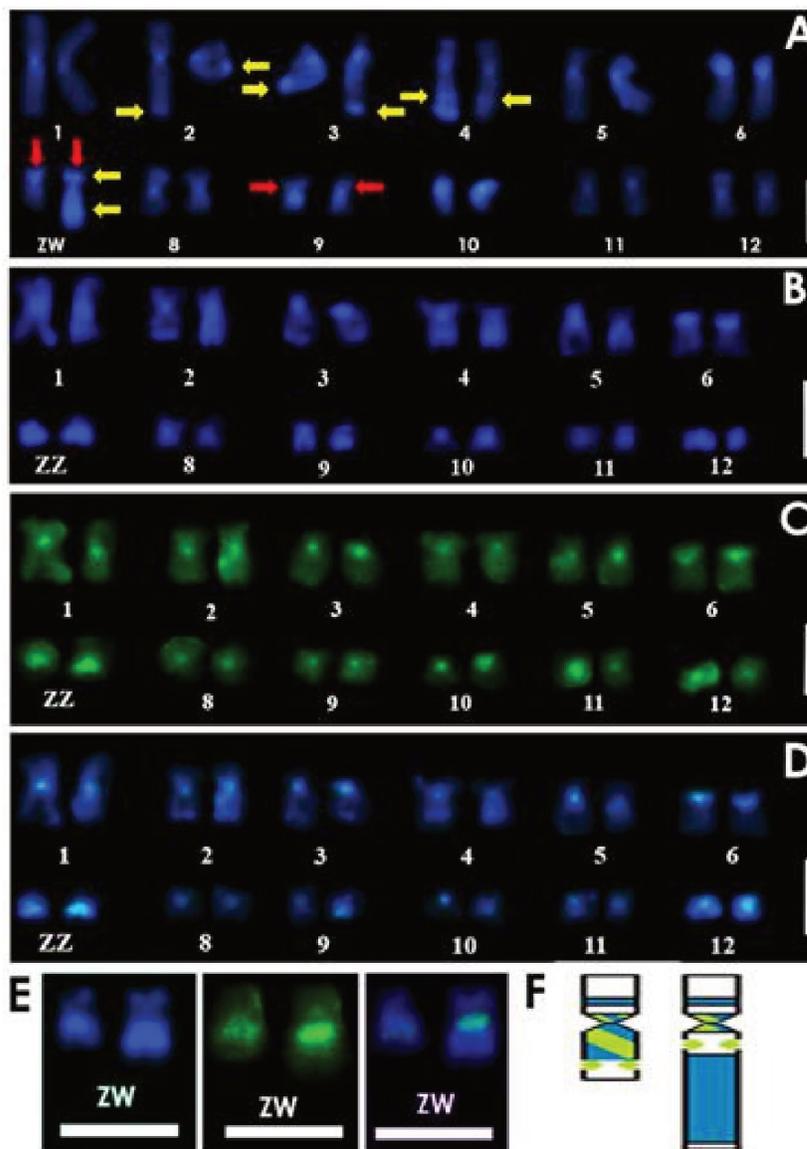
#### **V.9 – Captura e Edição de Imagens**

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência Olympus Bx60 com câmera digital (Q-Color3). As imagens foram editadas com o auxílio dos softwares Adobe Photoshop CS3 e/ou Image ProPlus 4.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

## **VI - Resultados**

## VI.1. Coloração com fluorocromos DAPI e MM

As regiões centroméricas de todos os cromossomos foram coradas tanto por DAPI quanto por MM em metáfases previamente submetidas ao bandamento C (Figura 4). Uma banda heterocromática também foi detectada por DAPI e por MM no braço curto dos cromossomos Z e W, e outra, no braço longo do cromossomo Z (Figura 4). Já o grande bloco heterocromático do braço longo do cromossomo W apresentou-se fortemente corado por DAPI, enquanto a MM corou apenas a região pericentromérica desse braço, aparentemente coincidente com NOR (Figura 4 D). Adicionalmente o DAPI corou fortemente as bandas C terminais dos braços longos dos cromossomos 2 e 3, a banda C intersticial do braço longo do cromossomo 4 e a do braço curto do cromossomo 9.

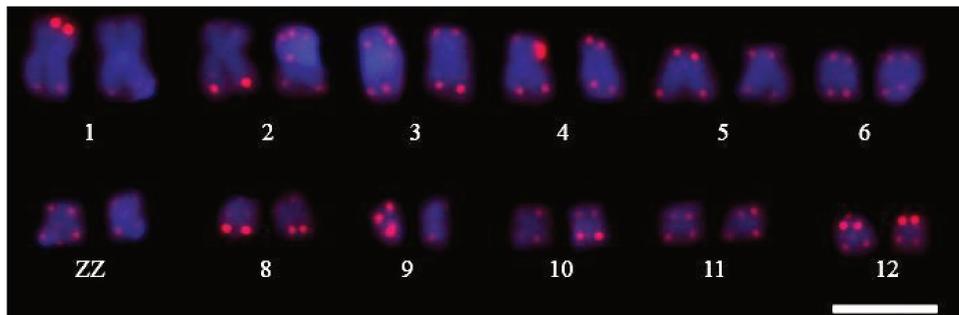


**Figura 4.** Cariótipo de *P. tocantins* (A-D) submetido sequencialmente ao bandamento C e às colorações com DAPI (A,B) e MM (C). Em D, a sobreposição das imagens mostradas em B e C. Em A, as setas vermelhas correspondem a blocos heterocromáticos não descritos anteriormente, já as setas amarelas indicam regiões

que se coram por DAPI e não por MM. E. Pares de cromossomos Z e W submetidos ao bandamento C e coloração sequencial com DAPI (esquerda) e com MM (centro). À direita, a sobreposição das duas imagens anteriores. F. Ideograma dos cromossomos sexuais Z e W de *P. tocantins*. Segmentos azuis e verdes representam segmentos corados com DAPI e MM, respectivamente. Barras: 5  $\mu\text{m}$ .

## VI.2 – Localização de seqüências teloméricas

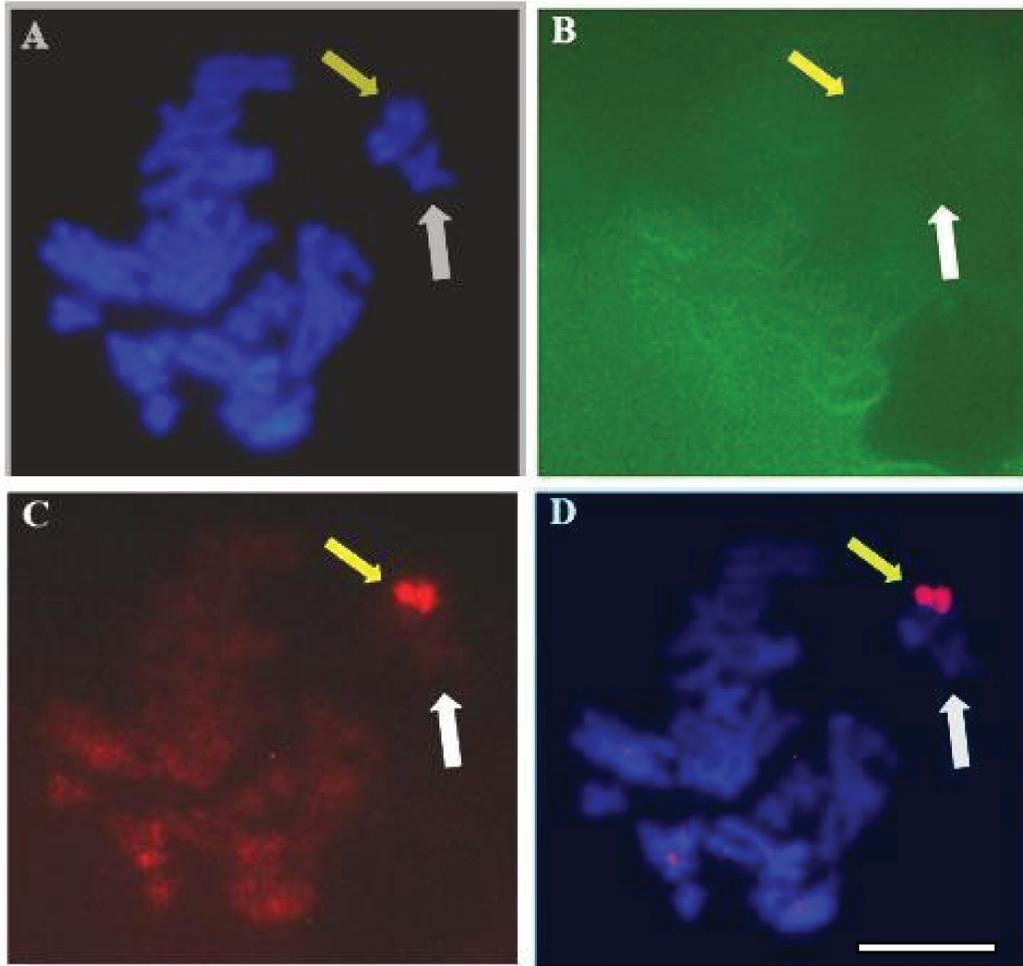
A hibridação das sondas  $(\text{CCCTAA})_{x3}$  no cariótipo de *P. tocantins* revelou as regiões terminais em todos os cromossomos (Figura 5) e nenhuma ITS (*Interstitial Telomeric Sequence*) foi identificada.



**Figura 5.** Cariótipo de *P. tocantins* hibridado com sonda telomérica  $(\text{CCCTAA})_{x3}$ . Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

## VI.3 – Hibridação Genômica Comparativa – CGH

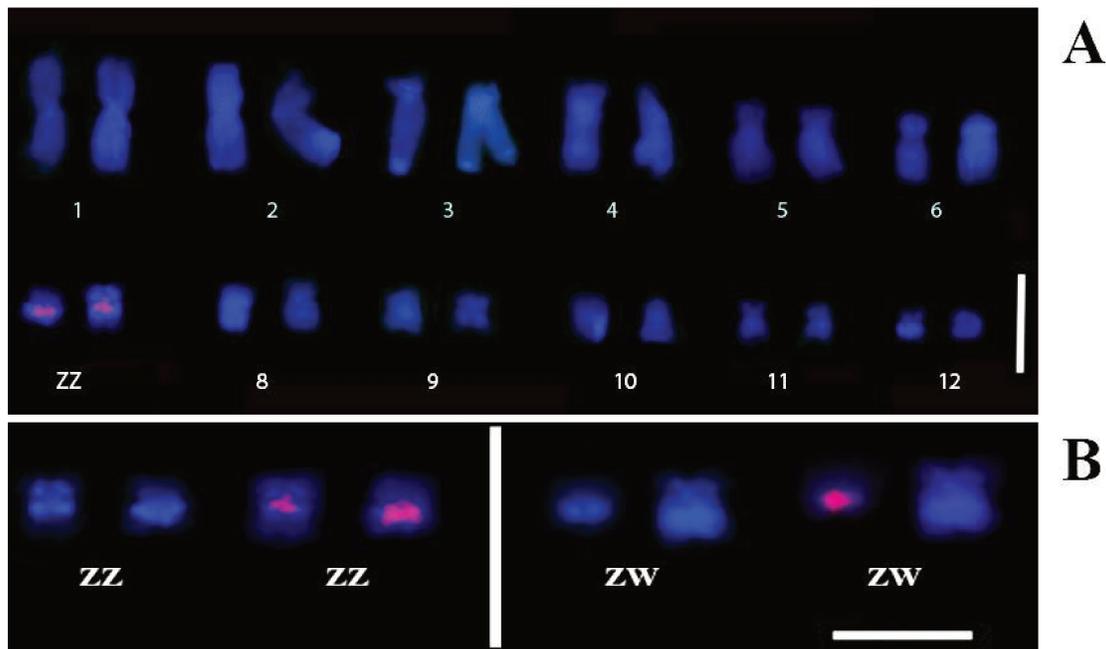
Nos experimentos de CGH, uma região cromossômica correspondente à banda heterocromática do braço longo do cromossomo W de *P. tocantins* foi revelada pela sonda do genoma de fêmeas dessa espécie (Figura 6). Nenhum outro segmento desse cromossomo ou do cromossomo Z ou de qualquer autossomo foi revelado por essa técnica.



**Figura 6.** Hibridação genômica comparativa (CGH) em *P. tocantins*. **A.** Cromossomos corados com DAPI. **B.** Sinal de hibridação da sonda derivada de macho marcada com FITC. **C.** Sinal de hibridação da sonda derivada de fêmea marcada com Cy-3. **D.** Sobreposição das imagens observadas em A e C. Setas amarelas indicam o cromossomo W e setas brancas, o cromossomo Z. Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

#### VI.4 – Pintura cromossômica

A utilização de 19 cromossomos Z microdissecados possibilitou uma boa amplificação das sequências neles presentes. Quando usadas como sondas (sonda 190.1Z) em metáfases de *P. tocantins*, tais sequências mostraram sinais de hibridação na região DAPI positiva do braço longo do cromossomo Z, e nenhum sinal foi detectado no cromossomo W (Figura 7). Nenhuma sonda que permitisse a detecção satisfatória do cromossomo W de *P. tocantins* foi obtida, embora vários testes tenham sido realizados.

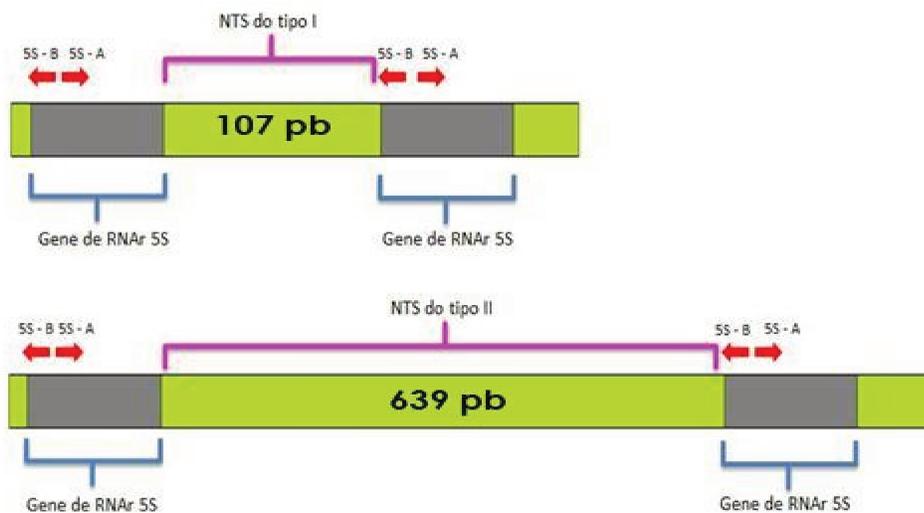


**Figura 7.** A. Hibridação da sonda 190.1Z no cariótipo de um indivíduo macho de *P. tocantins*. B. Pares ZZ e ZW de *P. tocantins* corados com DAPI (esquerda) e hibridados com a sonda 190.1Z (direita). Barra: 5  $\mu$ m.

### VI.5 – Isolamento e mapeamento de DNAr 5S

O isolamento de DNAr 5S por PCR utilizando os primers 5S-A e 5S-B gerou dois tipos de fragmentos, um com cerca de 200 pb e outro com cerca de 750 pb, facilmente diferenciados após eletroforese em gel de agarose (Figura 8). A análise da sequência nucleotídica de dois dos insertos menores, que apresentaram 227 pb, mostrou que ambos são idênticos entre si (Figura 9). Mostrou, ainda, que sua presumida região transcritora é muito similar às das sequências de DNAr 5S do tipo I dos anuros *Engystomops petersi* (similaridade de 78,94%<sup>3</sup>), *Engystomops freibergi* (similaridade de 80,26%<sup>2</sup>) e *Physalaemus cuvieri* (similaridade de 78,94%<sup>2</sup>) (Figura 10). Já a sequência nucleotídica do NTS do DNAr 5S do tipo I de *P. tocantins*, composta por 107 pb (Figura 10A), difere daquela dos NTS dos demais DNAr 5S do tipo I em análise.

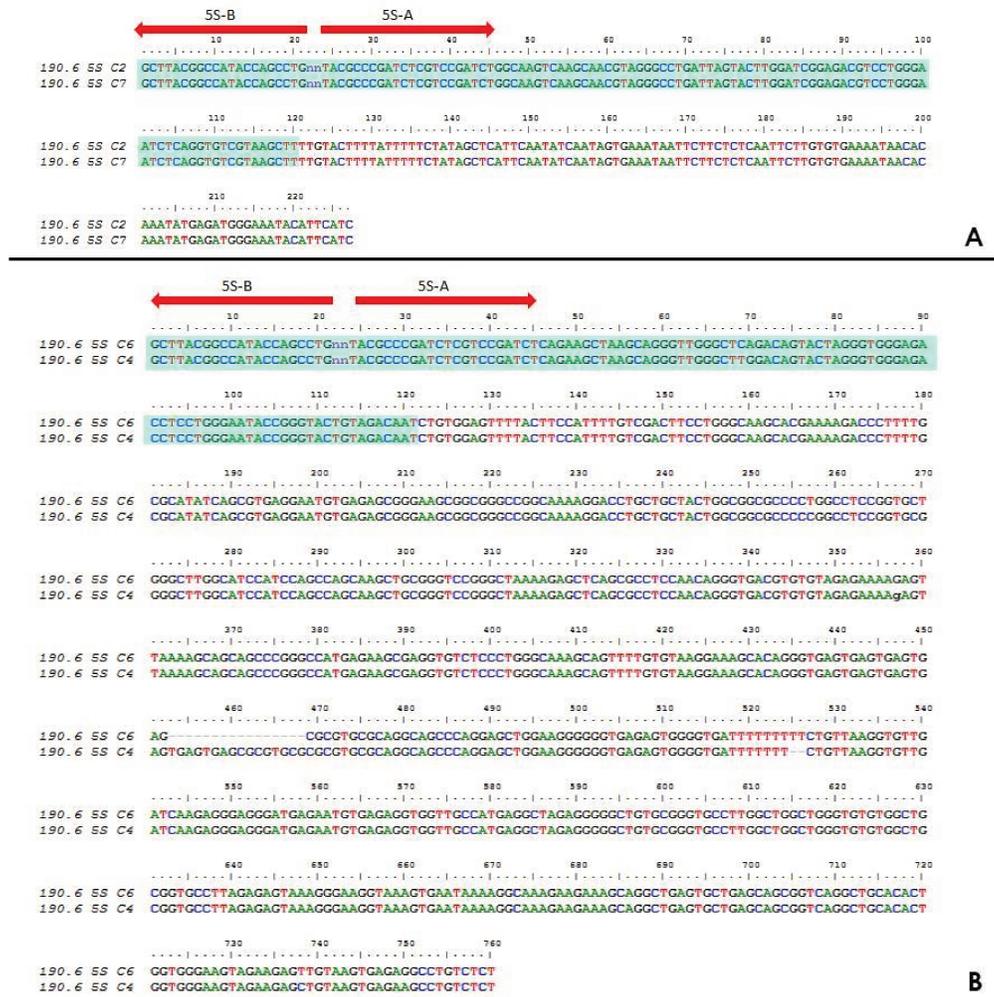
<sup>3</sup> Para o cálculo das similaridades, não foram consideradas as regiões dos *primers*.



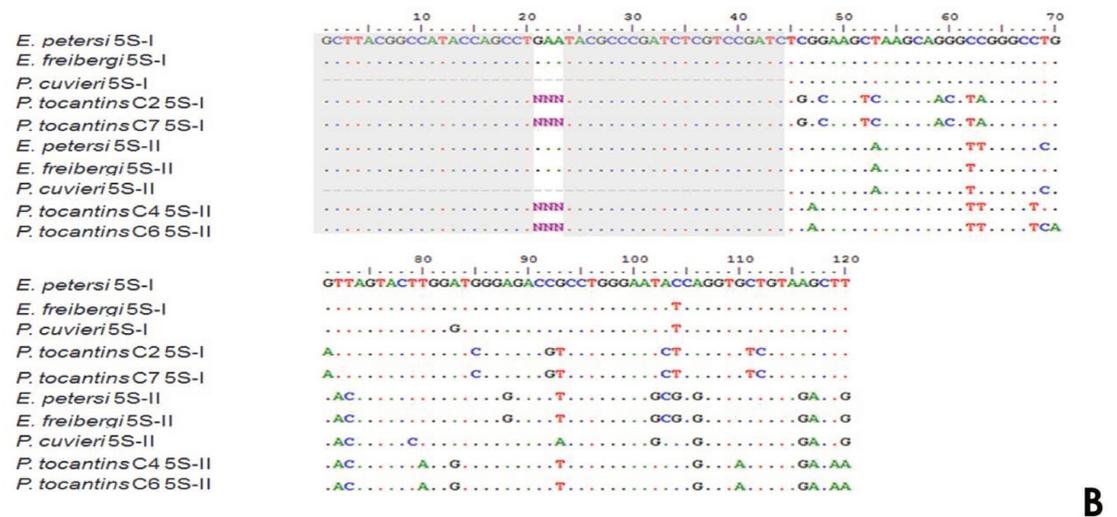
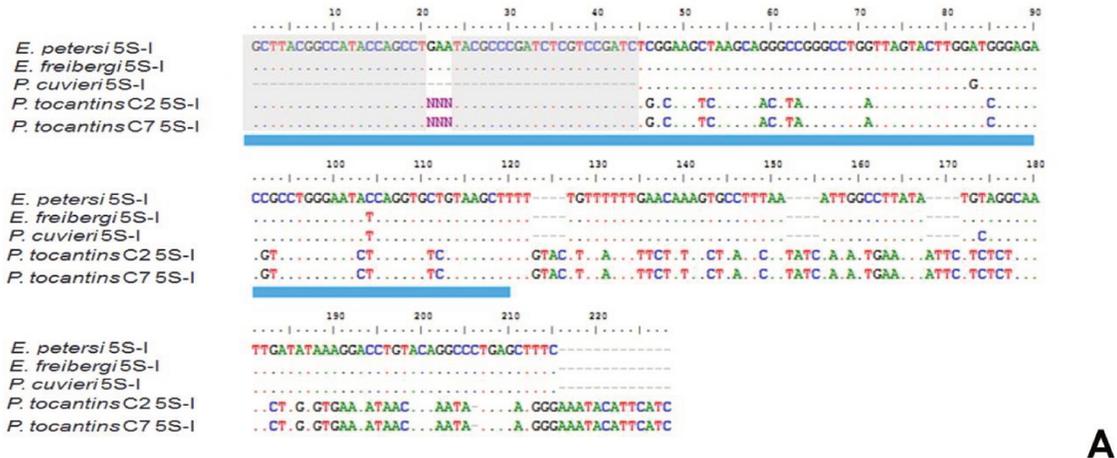
**Figura 8.** Esquema do arranjo das sequências de DNAr 5S isoladas no presente estudo.

Quando dois dos segmentos maiores do DNAr 5S isolados de *P. tocantins* (com 759 pb) foram comparados, mostraram alta similaridade entre si (96,6%) (Figura 9) e a sua provável região transcritora também apresentou grande similaridade com as do DNAr 5S do tipo II de *E. petersi* (82,89%<sup>2</sup>), *E. freibergi* (81,57%<sup>2</sup>) e *P. cuvieri* (82,89 %<sup>2</sup>) (Figura 10B). A região equivalente ao NTS do DNAr 5S do tipo II de *P. tocantins* é composta por 639pb e sua sequência nucleotídica difere daquela dos NTS do DNAr 5S do tipo II de *Engystomops* e *P. cuvieri*.

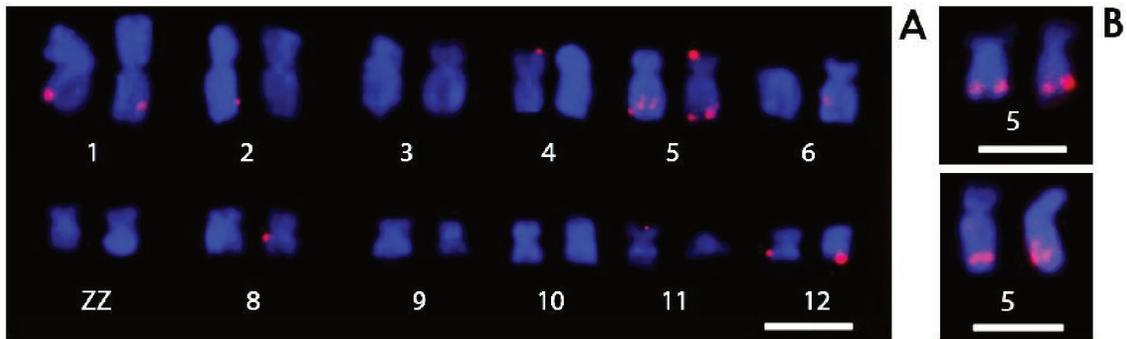
A comparação das presumidas regiões transcritoras das sequências de DNAr 5S do tipo I com as do DNAr 5S do tipo II de *P. tocantins* mostrou similaridade média de 66%<sup>2</sup>. O DNAr 5S do tipo II foi mapeado na região terminal dos cromossomos do par 5 de *P. tocantins* (Figura 11). Embora vários testes de hibridação tenham sido realizados, não foi possível localizar as sequências de DNAr 5S do tipo I no cariótipo dessa espécie.



**Figura 9.** Sequências nucleotídicas do DNAr 5S do tipo I (A) e do tipo II (B) de *P. tocatins*. As regiões sombreadas indicam a caixa transcritora de 120 pb.



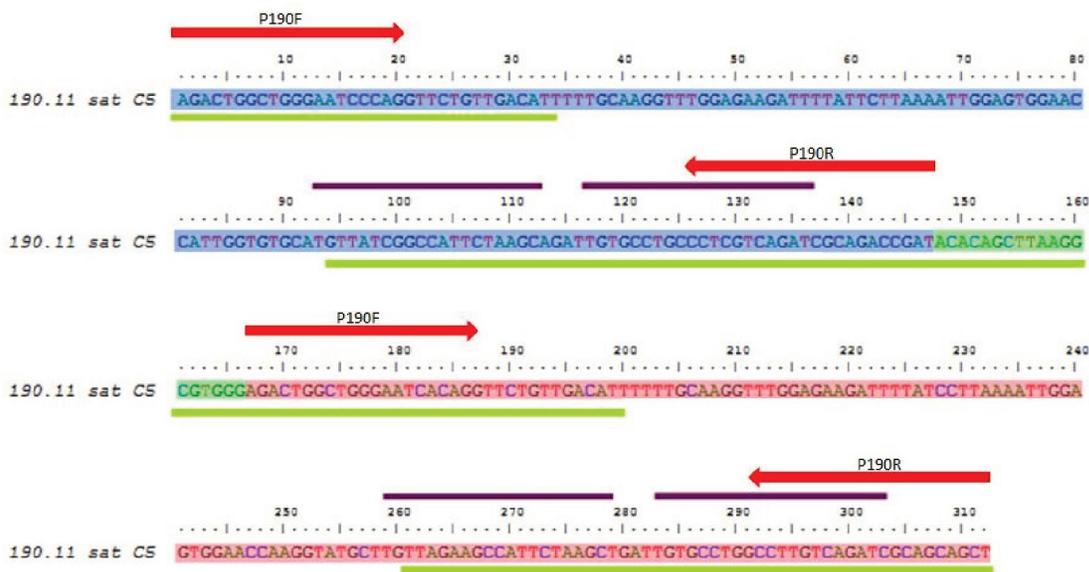
**Figura 10.A.** Alinhamento das unidades repetitivas do DNAr 5S do tipo I isoladas de *P. tocantins* (*P. tocantins* C2 5S-I e *P. tocantins* C7 5S-I) com as de *Engystomops freiberqi* (número de acesso no GenBank: JF325870.1), *Engystomops petersi* (número de acesso no GenBank: JF325862.1) e *Physalaemus cuvieri* (número de acesso no GenBank: JF281131.2). **B.** Alinhamento das presumidas regiões transcritoras das unidades repetitivas do DNAr 5S do tipo I (*P. tocantins* C2 5S-I e *P. tocantins* C7 5S-I) do tipo II isoladas de *P. tocantins* (*P. tocantins* C4 5S-II e *P. tocantins* C6 5S-II) com as de *Engystomops freiberqi* (número de acesso no GenBank: JF325870.1), *Engystomops petersi* (número de acesso no GenBank: JF325862.1) e *Physalaemus cuvieri* (número de acesso no GenBank: JF281131.2). Em **A**, as presumidas regiões transcritoras estão sublinhadas em azul. As regiões em cinza correspondem aos primers 5SA e 5SB.



**Figura 11. A.** Mapeamento do DNAr 5S do tipo II no cariótipo de macho de *P. tocantins*. **B.** Pares cromossômicos 5 hibridados com sonda de DNAr 5S do tipo II. Barras: 5 μm.

### VI.6 – Isolamento de sequências PcP190EcoRI

As reações de PCR com os primers P190F e P190R realizadas a partir de DNA genômico de uma fêmea de *P. tocantins* resultaram na obtenção de fragmentos com cerca de 150 e 350 pb. Cinco fragmentos de cerca de 150 pb e um fragmento de 312 pb, portador de dois segmentos repetidos, foram clonados e sequenciados. A análise do fragmento de 312 pb permitiu verificar que um monômero completo da sequência repetitiva isolada é composto por 166 pb (Figura 12). A comparação de todas essas sequências mostrou que são altamente similares (similaridade média de 87,84 %).



**Figura 12.** Sequência nucleotídica do fragmento com 312 pb isolado de *P. tocantins*, portador de duas unidades repetitivas de PcP190EcoRI, uma completa (segmento azul + segmento verde) e outra parcial (segmento vermelho). As setas indicam as regiões dos primers P190F e P190R. As regiões sublinhadas em verde correspondem à região transcritora dos genes de RNAr 5S (ver explicação no texto). As linhas púrpuras correspondem às regiões dos primers 5S-A e 5S-B.

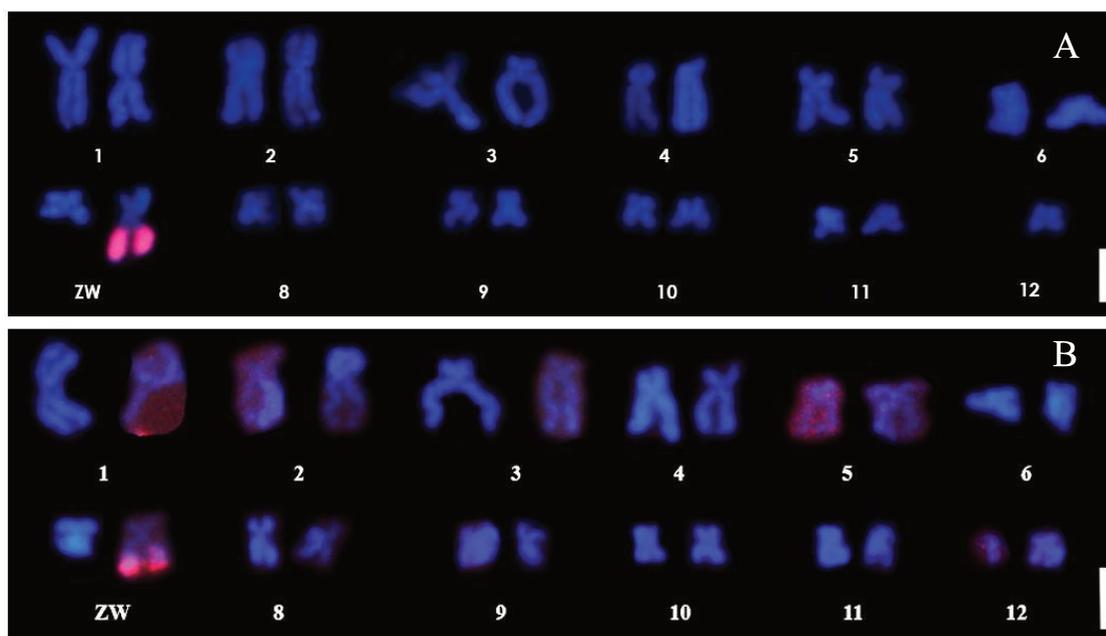
O isolamento por PCR de sequências Pcp190EcoRI a partir de cópias do cromossomo Z microdissecadas geraram fragmentos com cerca de 150 pb e cinco deles foram clonados e sequenciados. Tais fragmentos apresentaram alta similaridade entre si (similaridade média de 98,73%), mas curiosamente diferiram dos fragmentos isolados a partir do DNA genômico. As sequências obtidas a partir de cópias do cromossomo Z microdissecadas apresentaram uma média de similaridade com aquelas obtidas do DNA genômico de fêmea apenas de 70,99% (Figura 13).



**Figura 13.** Alinhamento das sequências Pcp190EcoRI isoladas de DNA genômico (sequências identificadas como 190.11) e do cromossomo Z (sequências identificadas como 190.1Z) de *P. tocantins* com uma sequência Pcp190EcoRI de *P. cuvieri* (Número de acesso no GenBank: JF281109). As regiões de anelamento dos primers estão sombreadas em vermelho. 190.11: isolado a partir de DNA genômico de fêmea; 190.1Z: isolado a partir de cromossomos Z microdissecados. As sequências 190.11 sat C5.1 e C5.2 correspondem às duas repetições encontradas no fragmento de 313 pb mostrado na Figura 10.

Quando comparadas com sequências PcP190EcoRI de *P. cuvieri*, as sequências isoladas do cromossomo Z mostraram, em média, 70,31% de similaridade. Já a similaridade média entre as sequências de PcP190EcoRI obtidas do genoma de *P. tocantins* e as sequências PcP190EcoRI de *P. cuvieri* foi de 66,83%. Quando as sequências PcP190EcoRI obtidas de *P. tocantins* são comparadas com as de DNAr 5S do tipo I e do tipo II (da mesma espécie e também de *P. cuvieri* e *Engystomops* spp.), não foi possível obter uma boa proposta de alinhamento entre as sequências, o que denota grande diferença entre elas.

O mapeamento cromossômico da sequência isolada de fêmea de *P. tocantins* revelou um *cluster* na região heterocromática do cromossomo W dessa espécie (Figura 14). Nenhum outro segmento cromossômico mostrou sinal de hibridação com a sonda da sequência em questão.



**Figura 14.** Hibridação *in situ* fluorescente da sequência PcP190EcoRI isolada de *P. tocantins* em metáfases (em **A**, uma metáfase parcial, em **B**, metáfase completa) de uma fêmea dessa espécie. Note a hibridação na região heterocromática do cromossomo W. Barras: 5  $\mu$ m.

## **VII – Discussão**

### **VII.1 – Avanços na caracterização dos cromossomos de *P. tocantins***

A coloração com DAPI de metáfases previamente submetidas ao bandamento C revelaram todas as bandas previamente detectadas por Busin et al. (2008) e também bandas adicionais no braço curto do cromossomo 9 e uma banda adicional no braço curto dos cromossomos Z e W. Todas as bandas centroméricas, bem como as bandas pericentroméricas do cromossomo 6 e o bloco heterocromático no braço longo do cromossomo Z foram também evidenciadas por MM.

É interessante notar que também em *Lysapsus laevis*, uma espécie pertencente ao gênero irmão de *Pseudis*, os centrômeros apresentam-se corados tanto por DAPI quanto por MM (Suárez, 2010). A coloração simultânea por DAPI e por MM nessas regiões cromossômicas pode ser explicada pela presença tanto de sequências repetitivas ricas em AT quanto de sequências repetitivas ricas em GC. É possível, ainda, que uma mesma sequência repetitiva se caracterize por conter um segmento rico em AT e outro rico em GC. Porém, alternativamente, é possível que estas regiões centroméricas sejam regiões neutras (nem ricas em AT nem em CG) e que sua revelação seja simples decorrência da remoção das regiões eucromáticas pelo bandamento C que precedeu a coloração com os fluorocromos.

Ao contrário das bandas centroméricas e da banda do braço curto dos cromossomos Z e W, a banda intersticial do braço longo do cromossomo 4, as bandas terminais do braço longo dos cromossomos 2 e 3, bem como a banda heterocromática do braço longo do cromossomo W de *P. tocantins* apresentaram-se exclusivamente coradas com DAPI, não sendo reveladas pela MM, o que sugere que sejam ricas em AT.

A diferença na coloração das bandas Wq e Zq sugere que sejam distintas tanto na quantidade de heterocromatina quanto na composição nucleotídica. Tal inferência é corroborada pelo uso de outras técnicas (ver item V.3, V.4 e V.6).

Os sítios das NORs de *P. tocantins* (região distal do braço longo do cromossomo Z e região pericentromérica do cromossomo W) foram fortemente detectados por mitramicina, assim como as NORs de diversos organismos, inclusive anuros como *Rhinella marina* (Schmid, 1980a), *Pristimantis euphronides* (*Eleutherodactylus euphronides* em Schmid et al., 2002c), *Leptodactylus cf marmoratus* (Campos et al., 2009), *L. podicipinus* (Gazoni et al., 2012), *Hypsiboas albopunctatus* (Gruber et al., 2007) e *Aplastodiscus perviridis* (Gruber et al., 2012).

### **VII.2 - Localização de sequências teloméricas**

Os telômeros são regiões que oferecem proteção aos cromossomos contra recombinação ilegítima, degradação e ataque de exonucleases e danos oxidativos ao DNA (para revisão, ver Bolzan e Bianchi, 2006). Sondas teloméricas têm sido utilizadas para investigar a presença de sequências teloméricas intersticiais (ITS), que poderiam ser

indícios da prévia ocorrência de rearranjos cromossômicos ou ainda sítios potenciais para novos telômeros, permitindo, assim, algumas inferências sobre a evolução cromossômica em diversos taxa (Meyne et al., 1990; Fagundes e Yonenaga-Yasuda, 1998).

No caso de *P. tocantins* os sinais de hibridação das sondas teloméricas estão restritos às regiões terminais dos cromossomos, sem detecção de regiões intersticiais (ITS). Dessa forma, nenhum rearranjo cromossômico pode ser inferido a partir desses dados. No entanto, isso não significa que eventos envolvendo os telômeros não tenham ocorrido ao longo da evolução de *P. tocantins*, já que sequências ITS podem ser perdidas, devido ao encurtamento gradual e degradação dos arranjos (TTAGGG)<sub>n</sub> intersticiais não funcionais, como já discutido por outros autores (Pagnozzi et al., 2000; Nanda et al., 2002).

### VII.3 - Mapeamento cromossômico de DNAr 5S

Foi possível isolar dois tipos de sequências de DNAr 5S, um com 227 pb (denominado de tipo I) e outro com 759 pb (denominado de tipo II), facilmente diferenciados pelo tamanho das presumidas regiões de NTS, que apresentam, respectivamente, 107 pb e 639 pb. Em relação à composição nucleotídica, não há similaridade entre os NTS do tipo I e os do tipo II de *P. tocantins*. Já as regiões potencialmente transcritoras desses DNAr 5S são facilmente comparáveis, tendo apresentado similaridade média de 66%. Assim como já verificado para outros anuros (Rodrigues et al., 2012), a presumida região transcritora do DNAr 5S do tipo I e a do DNAr 5S do tipo II de *P. tocantins* apresentaram maior similaridade com as regiões transcritoras de RNAr 5S do tipo I e do tipo II de outros anuros (*P. cuvieri* e *Engystomops* spp.), respectivamente, do que entre si. Tal observação sugere que a divergência desses tipos de DNAr não é um evento recente na história evolutiva de *P. tocantins*. Apesar da alta similaridade das sequências encontradas em *P. tocantins* com aquelas de DNAr 5S já descritas para outros anuros, testes adicionais ainda são necessários a fim de verificar sua funcionalidade nessa espécie de *Pseudis*.

São poucos os estudos com anfíbios em que os *clusters* de DNAr 5S foram citogeneticamente mapeados, embora esse possa ser um interessante marcador para comparações cariotípicas. Nos anuros *Xenopus laevis* e *X. borealis* (Harper et al., 1983), *Lithobates catesbianus* (*Rana catesbiana* em Vitelli et al., 1982), *Strabomantis bipocartus* (*Eleutherodactylus maussi* em Schmid et al., 2002a), os *clusters* de DNAr 5S estão localizados em regiões cromossômicas terminais. Também no cariótipo de *P. tocantins*, a localização das sequências de DNAr 5S do tipo II foi revelada por FISH em uma região distal do braço longo do cromossomo 5. Em *P. cuvieri* (Vittorazzi et al., 2011), *E. freibergi* e *E. petersi* (Rodrigues et al., 2012), as sequências de DNAr 5S do tipo II também são encontradas em regiões distais dos cromossomos 6, no entanto o mesmo não ocorre com a localização do *cluster* de DNAr 5S do tipo I, que ocupa uma região pericentromérica nesses cariótipos. De maneira semelhante, não foram localizados em regiões cromossômicas

terminais os *clusters* de DNAr 5S de *Craugastor taurus* e *C. ranoides* (Schmid et al., 2010), *Bombina variegata* (Vitelli et al., 1982), *Discoglossus pictus* e *Alytes obstetricans* (Schmid et al., 1987).

Nakajima et al. (2012), ao analisar a localização cromossômica de DNAr 5S em peixes, inferem que a presença de *clusters* de DNAr 5S em sítios não terminais pode representar uma condição ancestral da organização dos genes transcritores de RNAr 5S. Para anuros, no entanto, ainda não é possível nenhuma conclusão da prevalência ou não de determinada localização cromossômica de sítios de DNAr 5S, já que o número de espécies com tais sítios mapeados é muito baixo e não representativo do grupo.

Em *P. tocantins* o DNAr 5S do tipo II foi mapeado na região terminal do cromossomo 5. Entretanto, não foi possível o mapeamento por FISH de sequências do DNAr 5S do tipo I. Tal resultado sugere que as sequências do DNAr 5S do tipo I não sejam encontradas em um grande número de cópias no genoma de *P. tocantins*. Essa hipótese se soma aos questionamentos sobre a funcionalidade do DNAr 5S do tipo I em *P. tocantins*. Estudos adicionais com essas sequências ainda são necessários para testar essas possibilidades.

Na literatura são descritos casos que mostram que o DNAr 5S é altamente dinâmico, e são descritos desde DNA satélites derivados deste DNAr (Martins et al., 2006) até sequências invertidas e pseudogenes no NTS de DNAr 5S (Martins et al., 2002). É interessante notar que na mesma região pericentromérica do braço curto do cromossomo 3 de *P. cuvieri* em que foi detectado um sítio de DNAr 5S foi também localizada a sequência de DNA satélite derivada de DNAr 5S denominada PcP190EcoRI, isolada a partir de fragmentos gerados por restrição do DNA genômico dessa espécie com a enzima EcoRI (Vittorazzi et al., 2011). Além desse sítio cromossômico, a sonda PcP190EcoRI também detectou regiões pericentroméricas/centroméricas de outros cromossomos de *P. cuvieri* (Vittorazzi et al., 2011). Outros estudos já relataram a existência de DNA satélite derivados ou relacionados ao DNAr 5S (Zhao et al., 2008; Martins et al., 2006), mas a sequência PcP190EcoRI foi o primeiro caso descrito para anuros. A investigação de sequências relacionadas à PcP190EcoRI em *P. tocantins* pôde trazer importantes contribuições para o estudo dos cromossomos sexuais dessa espécie, como pode ser visto no próximo item.

#### **VII.4 - Os cromossomos sexuais de *P. tocantins***

De acordo com Ohno (1967), a diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais ocorre a partir de um par autossômico homomórfico e depende, como passo inicial, da supressão da recombinação meiótica entre os homólogos, que pode ser resultado de rearranjos cromossômicos como inversões, translocações, fissões e/ou fusões. O envolvimento de inversão pericêntrica na diferenciação de cromossomos sexuais foi bastante estudado em serpentes da família Colubridae (Beçak et al., 1964; Beçak, 1983).

Em *Glandirana rugosa*, rã japonesa que exibe os dois tipos de sistemas de cromossomos sexuais (XX/XY e ZZ/ZW), inversões também são observadas entre os cromossomos X e Y, bem como entre os cromossomos Z e W (*Rana rugosa* em Nishioka et al., 1993; Nishioka et al., 1994; Miura et al., 1997; Uno et al., 2008). No caso de *Tomopterna dellalandi*, Schmid (1980b) observou que uma inversão é perceptível no cromossomo W em estágio inicial de diferenciação. Em *P. tocantins*, evidências do envolvimento de inversão cromossômica no processo que levou à diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais já foram apontadas por Busin et al. (2008). Esses autores observaram que a posição relativa da NOR e do bloco heterocromático presentes no braço longo do cromossomo W de *P. tocantins* difere daquela observada no cromossomo Z dessa espécie e nos cromossomos 7 (homeólogos ao cromossomo Z de *P. tocantins*) dos cariótipos de *P. fusca*, *P. paradoxa*, *P. platensis* e *P. bolbodactyla*, sugerindo o envolvimento de inversão na diferenciação desses cromossomos sexuais de *P. tocantins* (Busin et al., 2008).

Além de inversões cromossômicas, o acúmulo diferencial de heterocromatina é outro importante fenômeno associado à diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais em vários organismos (Beçak, 1964; Ohno, 1967). Em anuros, o acúmulo diferencial de heterocromatina entre os cromossomos sexuais já foi notado em *Proceratophrys boiei* (Ananias et al., 2007) e em *Pristimantis euphronides* e *P. shrevei* (Schmid et al., 2002b), espécies em que o cromossomo W é mais rico em heterocromatina do que o cromossomo Z; e também em *Gastrotheca riobambae* (Schmid et al., 1983), em que um acúmulo de heterocromatina é notado no cromossomo Y. Porém, a perda de heterocromatina também é reportada na diferenciação dos cromossomos sexuais, como observado em anuros do gênero *Eupsophus* (Iturra e Veloso, 1989; Cuevas e Formas, 1996).

Em *P. tocantins*, diferenças no padrão de localização de bandas heterocromáticas nos cromossomos Z e W já haviam sido notadas por Busin et al. (2008), que sugeriram a ocorrência de amplificação de heterocromatina no braço longo do cromossomo W no processo de diferenciação desses cromossomos. Com o emprego da sonda 190.1Z construída a partir de cromossomos Z de *P. tocantins* microdissecados, os experimentos de CGH e o mapeamento de sequências repetitivas PcP190EcoRI por nós realizados, foi possível inferir que o bloco heterocromático do braço longo do cromossomo Z e aquele do braço longo do cromossomos W dessa espécie diferem não apenas no tamanho, mas também em sua composição.

Os testes de CGH realizados em *P. tocantins* revelaram sinais fortes de hibridação da sonda do genoma de fêmeas na região heterocromática do braço longo do cromossomo W, o que sugere que esse segmento heterocromático seja distinto daquele presente no cromossomo Z, não revelado pelo CGH. Já a sonda 190.1Z, produzida a partir de cromossomos Z microdissecados, mostrou sinais de hibridação na região heterocromática adjacente ao centrômero do braço longo do cromossomo Z, mas nenhum sinal dessa sonda

foi notado no cromossomo W. Esse resultado corrobora a hipótese de que a composição da banda heterocromática do cromossomo W difere daquela presente na banda heterocromática do braço longo do cromossomo Z. No entanto, com base apenas nesses dados ainda não é possível esclarecer se a diferença relativa aos blocos heterocromáticos dos cromossomos Z e W se restringe a uma variação no número de sequências repetitivas neles presentes ou se também é devida a diferenças na constituição nucleotídica dessas sequências repetitivas. Em estudos com a mariposa *Cydia pomonella*, após a clonagem de fragmentos componentes de uma sonda cromossômica específica para o cromossomo W, Fuková et al. (2007) puderam comprovar que nela estavam presentes tanto sequências específicas daquele cromossomo, como sequências prevalentemente nele presentes, além de algumas sequências localizadas preferencialmente no cromossomo Z ou em autossomos. No caso de *P. tocantins*, ainda não foi possível analisar as sequências presentes na sonda 190.1Z, mas um importante avanço em direção à caracterização das diferenças inferidas em relação às regiões heterocromáticas dos cromossomos Z e W dessa espécie pôde ser obtido após a análise da sequência repetitiva PcP190EcoRI.

A sequência repetitiva PcP190EcoRI isolada do genoma de fêmea de *P. tocantins*, cuja a unidade repetitiva apresenta 166 pb, é comparável com as sequências PcP190EcoRI isoladas de *P. cuvieri* por Vittorazzi et al. (2011), com as quais apresenta pouco mais de 60% de similaridade. Vittorazzi et al. (2011) sugerem que o DNA satélite PcP190EcoRI tenha surgido a partir do DNAr 5S, baseados na alta similaridade (em torno de 66-70%) observada entre a unidade repetitiva desse DNA satélite e a região transcritora do DNAr 5S. A baixa similaridade da sequência PcP190EcoRI isolada de fêmea de *P. tocantins* com o DNAr 5S dessa espécie e sua alta similaridade com sequências PcP190EcoRI de *P. cuvieri* sugerem que ambas compartilham uma ancestralidade comum.

Curiosamente, a sequência PcP190EcoRI isolada a partir de cópias microdissecadas do cromossomo Z mostrou similaridade ainda maior com o DNA satélite isolado de *P. cuvieri* (70,31%). Quando a sequência PcP190EcoRI isolada do genoma de fêmeas de *P. tocantins* foi usada como sonda em experimentos de FISH, um grande bloco heterocromático do braço longo do cromossomo W foi detectado e nenhum sinal foi observado em qualquer outro cromossomo do complemento diploide. É possível, portanto, que a sequência isolada a partir do genoma de fêmeas seja exclusiva do cromossomo W, assim como é também possível que ela seja prevalente no cromossomo W e que esteja presente em outros cromossomos, em baixo número de cópias, o que impossibilitaria sua detecção por FISH. Os experimentos de PCR realizados a partir de cópias do cromossomo Z microdissecadas, realizados com os *primers* específicos para a amplificação de sequências PcP190EcoRI (P190F e P190R), não permitiram isolar nenhuma sequência igual àquelas mapeadas no cromossomo W. No entanto, apenas pequeno número de sequências foi obtido e novos experimentos devem ser realizados para a obtenção de uma amostra mais significativa. De qualquer maneira, até o momento, não há nenhuma

evidência de que a sequência mapeada no cromossomo W esteja presente no cromossomo Z.

É comum ocorrerem divergências entre sequências de DNA repetitivo presentes nos diferentes cromossomos sexuais de uma mesma espécie. Nakayama et al. (1994), por exemplo, isolaram duas sequências repetitivas sexo-específicas para o peixe *Leporinus elongatus*, as quais estão presentes no cromossomo W dessa espécie. Mariotti et al. (2009) descrevem o acúmulo de DNA satélite específico do cromossomo Y na planta *Rumex acetosa*. Tais diferenças resultam da aceleração da diferenciação molecular verificada nos cromossomos sexuais em decorrência da supressão de recombinação (revisão de Graves, 2008).

No caso de *P. tocantins*, estudos futuros ainda são necessários para esclarecer se a sequência PcP190EcoRI isolada de fêmeas é exclusiva do cromossomo W, mas os dados disponíveis já permitem concluir que, ao menos em relação ao número de repetições de sequências da família PcP190EcoRI, os blocos heterocromáticos dos cromossomos Z e W diferem bastante. Há vários relatos na literatura de acúmulo e amplificação de DNAs repetitivos nos cromossomos sexuais (exemplos em Singh et al., 1976; Nakayama et al., 1994; Hobza et al., 2006; Parise-Maltempi et al., 2007). Segundo Singh et al. (1976) e Singh et al. (1980), o acúmulo de segmentos de DNA repetitivo em sítios heterocromáticos nos cromossomos W ou Y resulta em assincronia no padrão de replicação dos dois cromossomos sexuais homólogos, concomitantemente auxiliando na redução da frequência de recombinação entre eles. Ainda, de acordo com King (1991), o acúmulo de heterocromatina previne a formação de quiasmas.

Sendo assim, com os dados obtidos no presente trabalho com o mapeamento de sequências repetitivas, microdissecção e pintura cromossômica e CGH, é possível inferir que eventos relacionados à sequência repetitiva PcP190EcoRI podem ter exercido relevante papel no processo de diferenciação dos cromossomos sexuais de *P. tocantins*. Contudo, uma pergunta ainda permanece: qual evento foi primordial para a diferenciação dos cromossomos Z e W de *P. tocantins*, inversão paracêntrica ou acúmulo diferencial de sequências heterocromáticas? Para responder a essa questão se fazem necessários estudos de pintura cromossômica interespecífica e isolamento e mapeamento de sequências repetitivas, como PcP190EcoRI, em táxons relacionados à *P. tocantins* (i.e. *P. fusca* e/ou *P. bolbodactyla*). Além disso, a construção de bibliotecas de BACs e a utilização de plataformas de sequenciamento de nova geração com bibliotecas dos cromossomos Z e W também podem ser interessantes ferramentas nessa análise.

## **VIII – Conclusões**

- ❖ Nenhum sítio específico do braço curto do cromossomo Z ou do cromossomo W de *P. tocantins* foi detectado pelas técnicas de CGH. Tanto Zp quanto Wq apresentam uma banda heterocromática intersticial revelada pelo bandamento C. Dessa maneira, com as técnicas empregadas até o momento, não foi possível observar nenhuma diferença entre os braços curtos dos cromossomos sexuais de *P. tocantins*.
- ❖ O DNAr 5S do tipo II foi mapeado no cromossomo 5 de *P. tocantins* e diferenças entre as sequências das presumidas regiões transcritoras do DNAr 5S do tipo I e as do DNAr 5S do tipo II denotam que essa divergência não é um fenômeno recente, além de levantar questionamentos sobre a funcionalidade destas sequências em *P. tocantins*.
- ❖ A técnica de CGH revelou uma região específica do bloco heterocromático do braço longo do cromossomo W, enquanto a sonda construída a partir de DNA isolado do cromossomo Z detectou uma região específica da banda heterocromática desse cromossomo, evidenciando que tais blocos heterocromáticos apresentam um maior grau de diferenciação do que suposto anteriormente.
- ❖ As sequências PcP190EcoRI isoladas de *P. tocantins* apresentam alta similaridade com as de *P. cuvieri*, o que sugere uma possível origem comum dessas sequências. No entanto, não descartamos a possibilidade de que a similaridade observada seja resultante da origem paralela dessas sequências a partir de DNAr 5S.
- ❖ Dois tipos de sequências da família PcP190EcoRI foram encontradas em *P. tocantins*, uma mapeada no cromossomo W e outra isolada do cromossomo Z. A sequência mapeada no cromossomo W pode ser específica desse cromossomo, já que não é possível isolar (por meio de PCR) tal sequência a partir de cópias microdissecadas do cromossomo Z. Ainda que essa hipótese não seja confirmada em estudos futuros, os dados disponíveis já permitem concluir que, ao menos em relação ao número de repetições de sequências da família PcP190EcoRI, os blocos heterocromáticos dos cromossomos Z e W diferem bastante. Portanto, o DNA repetitivo PcP190EcoRI parece ter exercido um importante papel durante a diferenciação dos cromossomos sexuais em *P. tocantins*.

## **IX – Referências Bibliográficas**

- Abe, H.; Mita, K.; Yasukochi, Y.; Oshiki, T.; Shimada, T. (2005). Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 110, p. 144-151.
- Abramyan, J.; Ezaz, T.; Graves, J.A.M.; Koopman, P. (2009). Z and W chromosomes in the cane toad (*Bufo marinus*). **Chromosome Res.**, v. 17, p. 1015-1024.
- Acosta, M.J.; Marchal, J.A.; Fernández-Espartero, C.; Romero-Fernández, I.; Rovatsos, M.T.; Giagia-Athanasopoulou, E.B.; Gornung, E.; Castiglia, R.; Sánchez, A. (2010). Characterization of the satellite DNA Msat-160 from species of *Terricola* (*Microtus*) and *Arvicola* (Rodentia, Arvicolinae). **Genetica**, v. 138, p. 1085-1098.
- Aguiar-Jr., O.; Bacci-Jr., M.; Lima, A.P.; Rossa-Feres, D.C.; Haddad, C.F.B.; Recco-Pimentel, S.M. (2007). Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Cladistics**, v. 23, p. 455-463.
- Aguillar, C.T.; Galetti-Jr., P.M. (2008). Chromosome mapping of 5S rDNA genes differentiates Brazilian populations of *Leporellus vittatus*. **Genet. Mol. Biol.**, v. 31, p. 188-194.
- Amaro, R.C.; Rodrigues, M.T.; Yonenaga-Yassuda, Y.; Carnaval, A.C. (2012). Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 62, p. 880-888.
- Amor, N.; Odierna, G.; Chinali, G.; Said, K.; Picariello, O. (2009). Unusual chromosomal distribution of a major satellite DNA from *Discoglossus pictus* (Amphibia, Anura). **Cytogenet. Genome Res.**, v. 127, p. 33-42.
- Ananias, F.; Modesto, A.D.S.; Mendes, S.C.; Napoli, M.F. (2007). Unusual primitive heteromorphic sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-band interpopulational polymorphism. **Hereditas**, v. 144, p. 206-212.
- Ayling, L.J.; Griffin, D.K. (2002). The evolution of sex chromosomes. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 99, p. 125-140.
- Barciszewska, M.Z.; Szymański, M.; Erdmann, V.A.; Barciszewski, J. (2001). Structure and functions of 5S rRNA. **Acta Biochim. Pol.**, v. 48, p. 191-198.
- Baker, R.J.; Wichman, H.A. (1990). Retrotransposon *Mys* is concentrated on the sex chromosomes: implications for copy number containment. **Evolution**, v. 44, p. 2083-2088.

Barrio, A.; Rubel, D.P. (1970). Características del cariótipos de los pseudidos. **Physis**, v. 79, p. 505-510.

Beçak, W. (1983). Evolution and differentiation of sex chromosomes in lower vertebrates. **Differentiation**, v. 23 (Suppl.), p. S3-S12

Beçak, W.; Beçak, M.L.; Nazareth, H.R.S.; Ohno, S. (1964). Close karyological kinship between reptilian suborder Serpentes and the class Aves. **Chromosoma**, v. 15, p. 606-617.

Berta, P.; Hawkins, J.R.; Sinclair, A.H.; Taylor, A.; Griffiths, B.L.; Goodfellow, P.N.; Fellous, M. (1990). Genetic evidence equating *SRY* and the testis-determining factor. **Nature**, v. 348, p. 448-450.

Boisvert, F.M.; van Koningsbruggen, S.; Navascués, J.; Lamond, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 574-585.

Bolzan, A.D.; Bianchi, M.S. (2006). Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. **Mutat. Res.**, v. 612, p. 189-214.

Bergero, R.; Charlesworth, D. (2008). The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. **Trends Ecol. Evol.**, v. 24, p. 94-102. Bull, J.J. (1983). **Evolution of Sex Determining Mechanisms**. Menlo Park – California, v. Benjamin/Cummings Publishing Company, 297 p.

Burger, W.L. (1954). Two family groups of Neotropical frogs. **Herpetologica**, v. 10, p. 194-196.

Busin, C.S.; Vinciprova, G.; Recco-Pimentel, S.M. (2001). Chromosomal rearrangements as a source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). **Genetica**, v. 110, p. 131-141.

Busin, C.S. Lima, A.P.; Almeida-Prado, C.P.; Strüssmann, C.; Siqueira-Junior, S.; Recco-Pimentel, S.M. (2006) Chromosomal differentiation of populations of *Lysapsus limellus limellus*, *L. l. bolivianus*, and of *Lysapsus caraya* (Hylinae, Hylidae). **Micron**, v. 37, p. 355-362.

Busin, C.S.; Andrade, G.V.; Bertoldo, J.; Del-Grande, M.L.; Uetanabaro, M.; Recco-Pimentel. (2008). Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with description of the ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. **Genetica**, v. 133, p. 119-127.

Cabral-de-Mello, D.C.; Martins, C.; Souza, M.J.; Moura, R.C. (2011). Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Procospidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 132, p. 89-93.

- Cabral-de-Mello, D.C.; Valente, G.T.; Nakajima, R.T.; Martins, C. (2012). Genomic organization and comparative mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Res.**, v. 20, p. 279-292.
- Campos, J.R.C.; Ananias, F.; Brasileiro, C.A.; Yamamoto, M.; Haddad, C.F.B.; Kasahara, S. (2009). Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. **Hereditas**, v. 146, p. 104-111.
- Caramaschi, U.; Cruz, C.A.G. (1998). Notas taxonômicas sobre *Pseudis fusca* German e *Pseudis bolbodactyla* A. Lutz, com a descrição de uma nova espécie correlata. **Rev. Bras. Zool**, v. 15, n. 4, p. 929-944.
- Cei, J.M. (1987). Amphibians of Argentina. **Monitore Zool. Ital.**, v. 2, p. 209-272.
- Charlesworth, D.; Charlesworth, B.; Marais, G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, p. 118-128.
- Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220.
- Cioffi, M.B.; Sánchez, A.; Marchal, J.A.; Kosyakova, N.; Liehr, T.; Trifonov, V.; Bertollo, L.A.C. (2011). Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamilial Erythrinidae fishes. **BMC Evol. Biol.**, v. 11: 186.
- Cmarko, D.; Smigova, J.; Minichova, L.; Popov, A. (2008). Nucleolus: the ribosomal factory. **Histol. Histopathol.**, v. 23, p. 1291-1298.
- Cohen, S.; Segal, D. (2009). Extrachromosomal circular DNA in eukaryotes: possible involvement in the plasticity of tandem repeats. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 124, p. 327-338.
- Cuevas, C.C.; Formas, J.R. (1996). Heteromorphic sex chromosomes in *Eupsophus insularis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). **Chromosome Res.**, v. 4, p. 467-470.
- Diniz, D.; Laudicina, A.; Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C. (2008). Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triplotheus* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenet. Genome Res.**, v. 122, p. 163-168.
- Dover, G. (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. **Nature**, v. 299, p. 111-117.
- Drouin, G.; Moniz-de-Sá, M. (1995). The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. **Mol. Biol. Evol.**, v. 12, p. 481-493.

Duarte, T.C.; Veiga-Menoncello, A.C.P.; Lima, J.F.R.; Strüssmann, C.; Del-Grande, M.L.; Giaretta, A.A.; Pereira, E.G.; Rossa-Feres, D.C.; Recco-Pimentel, S.M. (2010). Chromosome analysis in *Pseudopaludicola* (Anura, Leiuperidae), with description of sex chromosomes XX/XY in *P. saltica*. **Hereditas**, v. 147, p. 43-52.

Duellman, W.E.; Trueb, L. (1985). **Biology of amphibians**. New York, McGraw-Hill Book Co., p. 535-536.

Ezaz, T.; Quinn, A.E.; Miura, I.; Sarre, S.D.; Georges, A.; Graves, J.A.M. (2005). The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. **Chromosome Res.**, v. 13, p. 763-776.

Ezaz, T.; Stiglec, R.; Veyrunes, F.; Graves, J.A.M. (2006a). Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. **Curr. Biol.**, v. 16, p. 736-743.

Ezaz, T.; Valenzuela, N.; Grützner, F.; Miura, I.; Georges, A.; Burke, R.L.; Graves, J.A.M. (2006b). An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination. **Chromosome Res.**, v. 14, p. 139-150.

Fagundes, V.; Yonenaga-Yassuda, Y. (1998). Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. **Chromosome Res.**, v. 6, p. 643-648.

Faivovich, J.; Haddad, C.F.B.; Garcia, P.C.A.; Frost, D.R.; Campbell, J.A.; Wheeler, W.C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **B. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 294, p. 1-240.

Ferguson-Smith, M. (2007). The evolution of sex chromosomes and sex determination in vertebrates and the key role of *DMRT1*. **Sex. Dev.**, v. 1, p. 2-11.

Ferreira, I.A.; Bertollo, L.A.C.; Martins, C. (2007). Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5S*Hind*III repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* 'species complex'. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 118, p. 78-83.

Frost, D.R. **Amphibian Species of the World: An Online Reference**. Version 5.6. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>> Acesso em: 03 de fev. de 2013.

Frost, D.R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R.H.; Haas, A.; Haddad, C.F.B.; de Sá, R.O.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S.C.; Raxworthy, C.J.; Campbell, J.A.; Blotto,

B.L.; Moler, P.; Drewes, R.C.; Nussbaum, R.A.; Lynch, J.D.; Green, D.M.; Wheeler, W.C. (2006). The Amphibian tree of life. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 297, p. 1-291.

Fukova, I.; Traut, W.; Vítková, M.; Nguyen, P.; Kubíčková, S.; Marec, F. (2007). Probing the W chromosome of the cloding moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. **Chromosoma**, v. 116, p. 135-145.

Gallardo, J.M. (1961). On the species of Pseudinae. **Bull. Mus. Comp. Zool.**, v. 125, p. 111-134.

Gallardo, J.M. (1972). Anfíbios de la provincial de Buenos Aires: observaciones sobre ecología y zoogeografía. **Cienc. Invest.**, v 28, p. 3-14.

Garda, A.A.; Cannatella, D. (2007). Phylogeny and biogeography of paradoxical frogs (Anura, Hylidae, Pseudae) inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 44, p. 104-114.

Garda, A.A.; Santana, D.J.; São-Pedro, V.A. (2010). Taxonomic characterization of paradoxical frogs (Anura, Hylidae, Pseudae): geographical distribution, external morphology, and morphometry. **Zootaxa**, v. 2666, p. 1-28.

Gaskins, C.J.; Smith, J.F.; Ogilvie, M.K.; Hanas, J.S. (1992). Comparision of the sequence and structure of Transcription Factor-III A from *Bufo americanus* and *Rana pipiens*. **Gene**, v. 120, p. 197-206.

Gazoni, T.; Gruber, S.L.; Zampieri-Silva, A.P.; Araújo, O.G.S.; Narimatsu, H.; Strüssmann, C.; Haddad, C.F.B.; Kasahara, S. (2012). Cytogenetics analyses of eight species in the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1843 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), including a new diploid number and a karyotype with multiple translocations. **BMC Genet.**, v. 13:109.

Giovannotti, M.; Cerioni, P.N.; Caputo, V.; Olmo, E. (2009). Characterisation of a GC-rich telomeric satellite DNA in *Eumeces schneideri* Daudin (Reptilia, Scincidae). **Cytogenet. Genome Res.**, v. 125, p. 272-278.

Goodfellow, P.N.; Lovell-Badge, R. (1993). *SRY* and sex determination in mammals. **Annu. Rev. Genet.**, v. 27, p. 71-92.

Graves, J.A.M. (2006). Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. **Cell**, v. 124, p. 901-914.

Graves, J.A.M. (2008). Weird animal genomes and evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. **Annu. Rev. Genet.**, v. 42, p. 565-586.

Gray, J.W.; Carrano, A.V.; Steinmetz, L.L.; van-Dilla, M.A.; Moore II, D.H.; Mayall, B.H.; Mendelsohn, M.L. (1975). Chromosome measurement and sorting by flow systems. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 72, p. 1231-1234.

Green, D.M. (1988 a). Heteromorphic sex chromosomes in the rare and primitive frog *Leiopelma hamiltoni* from New Zealand. **J. Hered.**, v. 79, p. 165-169.

Green, D.M. (1988 b). Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex chromosome system. **Chromosoma**, v. 97, p. 55-70.

Green, D.M. (2002). Chromosome polymorphism in Archey's frog (*Leiopelma archeyi*) from New Zealand. **Copeia**, v. 2002, p. 204-207.

Gruber, S.L.; Haddad, C.F.B.; Kasahara, S. (2007). Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference of a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of  $2n=24$  to  $2n=22$  in the genus. **Genetica**, v. 130, p. 281-291.

Gruber, S.L.; Zina, J.; Narimatsu, H.; Haddad, C.F.B.; Kasahara, S. (2012). Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hylinae, Hylidae). **BMC Genet.**, v. 13:28.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98.

Harper, M.E.; Price, J.; Korn, L.J. (1983). Chromosomal mapping of *Xenopus* 5S genes: somatic-type versus oocyte-type. **Nucleic Acids Res.**, v. 11, p. 2313-2323.

Hass, I.; Sbalqueiro, I.J.; Müller, S. (2008). Chromosomal phylogeny of four Akodontini species (Rodentia, Cricetidae) from Southern Brazil established by Zoo-FISH using *Mus musculus* (Muridae) painting probes. **Chromosome Res.**, v. 16, p. 75-88.

Hillis, D.M.; Green, D.M. (1990). Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibians. **J. Evol. Biol.**, v. 3, p. 49-64.

Hobza, R.; Lengerova, M.; Svoboda, J.; Kubekova, H.; Kejnovsky, E.; Vyskot, B. (2006). An accumulation of tandem DNA repeats on the Y chromosome in *Silene latifolia* during early stages of sex chromosome evolution. **Chromosoma**, v. 115, p. 376-382.

Hori, T.; Asakawa, S.; Itoh, Y.; Shimizu, N.; Mizuno, S. (2000). *Wpkci*, encoding an altered form of *PKCI*, is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryo: implications of its role in female sex determination. **Mol. Biol. Cell**, v. 11, p. 3645-3660.

Itoh, Y.; Mizuno, S. (2002). Molecular and cytological characterization of *Ssp-I* family repetitive sequence on chicken W chromosome. **Chromosome Res.**, v. 10, p. 499-511.

Iturra, P.; Veloso, A. (1989). Further evidence for early sex chromosome differentiation of Anuran species. **Genetica**, v. 78, p. 25-31.

Iturra, P.; Veloso, A. (1981). Evidence for heteromorphic sex chromosomes in male amphibians (Amphibia-Leptodactylidae). **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 31, p. 108-110.

Jelinek, W.R.; Schmid, C.W. (1982). Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 51, p. 813-844.

Kawai, A.; Nishida-Umehara, C.; Ishijima, J.; Tsuda, Y.; Ota, H.; Matsuda, Y. (2007). Different origins of bird and reptile sex chromosomes inferred from comparative mapping of chicken Z-linked genes. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 117, p. 92-102.

King, M. (1991). The evolution of heterochromatin in the amphibian genome. In.: Green, D.M.; Sessions, S.K. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. San Diego, Academic Press, Inc., p. 359-391.

Korn, L.J.; Brown, D.D. (1978). Nucleotide sequence of *Xenopus borealis* oocyte 5S DNA: Comparison of sequences that flank several related eukaryotic genes. **Cell**, v. 15, p. 1145-1156.

Krylov, V.; Kubickova, S.; Rubes, J.; Macha, J.; Tlapakova, T.; Seifertova, E.; Sebkova, N. (2010). Preparation of *Xenopus tropicalis* whole chromosome painting probes using laser microdissection and reconstruction of *X. laevis* tetraploid karyotype by Zoo-FISH. **Chromosome Res.**, v. 18, p. 431-439.

Kubickova, S.; Cernohorska, H.; Musilova, P.; Rubes, J. (2002). The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. **Chromosome Res.**, v. 10, p. 571-577.

Kwet, A. (2000). The genus *Pseudis* (Anura: Pseudidae) in Rio Grande do Sul, southern Brazil, with description of a new species. **Amphibia-Reptilia**, v. 21, p. 39-55.

Long, E.O.; Dawid, I.B. (1980). Repeated genes in eukaryotes. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 727-764.

López-Flores, I.; Garrido-Ramos, M.A. (2012). The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In: Garrido-Ramos, M.A. **Repetitive DNA**. Basel, Karger, v. 7, p. 1-28.

Louzada, S.; Paço, A.; Kubickova, S.; Adega, F.; Guedes-Pinto, H.; Rubes, J.; Chaves, R. (2008). Different evolutionary trails in the related genomes *Cricetus cricetus* and

*Peromyscus eremicus* (Rodentia, Cricetidae) uncovered by orthologous satellite DNA repositioning. **Micron**, v. 39, p. 1149-1155.

Machado, T.C.; Pansonato-Alves, J.C.; Pucci, M.B.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. (2011). Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **BMC Genet.**, v. 12: 65.

Mahony, M.J. (1991). Heteromorphic sex chromosomes in the Australian frog *Crinia bilingua* (Anura: Myobatrachidae). **Genome**, v. 34, p. 334-337.

Mandrioli, M.; Manicardi, G.C.; Marec, F. (2003). Cytogenetic and molecular characterization of the MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). **Chromosome Res.**, v. 11, p. 51-56.

Mariotti, B.; Manzano, S.; Kejnovský, E.; Vyskot, B.; Jamilena, M. (2009). Accumulation of Y-specific satellite DNAs during the evolution of *Rumex acetosa* sex chromosomes. **Mol. Genet. Genomics**, v. 281, p. 249-259.

Martinez, P.A.; Ezaz, T.; Valenzuela, N.; Georges, A.; Graves, J.A.M. (2008). An XX/XY heteromorphic sex chromosome system in the Australian chelid turtle *Emydura macquarii*: A new piece in the puzzle of sex chromosome evolution in turtles. **Chromosome Res.**, v. 16, p. 815-825.

Martins, C.; Ferreira, I.A.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Galetti-Jr., P.M. (2006). A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, v. 127, p. 133-141.

Martins, C.; Wasko, A.P. (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams, C.R. **Focus on Genome Research**, Hauppauge, Nova Science Publishers, p. 335-363.

Martins, C.; Wasko, A.P.; Oliveira, C.; Porto-Foresti, F.; Parise-Maltempi, P.P.; Wright, J.M.; Foresti, F. (2002). Dynamics of 5S rDNA in tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 98, p. 78-85.

Masumoto, H.; Nakano, M.; Ohzeki, J. (2004). The role of CENP-B and  $\alpha$ -satellite DNA: *de novo* assembly and epigenetic maintenance of human centromeres. **Chromosome Res.**, v. 12, p. 543-556.

Matsubara, K.; Tarui, H.; Toriba, M.; Yamada, K.; Nishida-Umehara, C.; Agata, K.; Matsuda, Y. (2006). Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 18190-18195.

Matsubara, K.; Yamada, K.; Umemoto, S.; Tsuchiya, K.; Ikeda, N.; Nishida, C.; Chijiwa, T.; Moriwaki, K.; Matsuda, Y. (2008). Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the A and B chromosomes of the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*, Muridae, Rodentia). **Chromosome Res.**, v. 16, p. 1013-1026.

Matsuda, M.; Nagahama, Y.; Shinomiya, A.; Sato, T.; Matsuda, C.; Kobayashi, T.; Morrey, C.E.; Shibata, N.; Asakawa, S.; Shimizu, N.; Hori, H.; Hamaguchi, S.; Sakaizumi, M. (2002). *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. **Nature**, v. 417, p. 559-563.

Matsuda, M.; Shinomiya, A.; Kinoshita, M.; Suzuki, A.; Kobayashi, T.; Paul-Prasanth, B.; Lau, E.; Hamaguchi, S.; Sakaizumi, M.; Nagahama, Y. (2007). *DMY* gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 3865-3870.

Meltzer, P.S.; Guan, X.Y.; Burgess, A.; Trent, J.M. (1992). Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. **Nat. Genet.**, v. 1, p. 24-28.

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. (1990). Distribution of non-telomeric sites of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, v. 99, p. 3-10.

Miura, I.; Ezaz, T.; Ohtani, H.; Uno, Y.; Nishida, C.; Matsuda, Y.; Graves, J.A.M. (2009). The W chromosome evolution and sex-linked gene expression. in the Japanese frog *Rana rugosa*. In: Weingarten, C.N.; Jefferson, S.E. **Sex Chromosomes: genetics, abnormalities and disorders**. New York, Nova Science Publishers, p. 123-140.

Miura, I.; Ohtani, H.; Hanada, H.; Ichikawa, Y.; Kashiwagi, A.; Nakamura, M. (1997). Evidence for two pericentric inversions in sex lampbrush chromosomes of *Rana rugosa*. **Chromosoma**, v. 106, p. 178-182.

Muller, H.J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. **Mutat. Res.**, v. 1, p. 2-9.

Nagamachi, C.Y.; Pieczarka, J.C.; O'Brien, P.C.M.; Pinto, J.A.; Malcher, S.M.; Pereira, A.L.; Rissino, J.D.; Rossi, R.V.; Ferguson-Smith, M.A. (2013). FISH with whole chromosome and telomeric probes demonstrates huge karyotypic reorganization with ITS between two species of Oryzomyini (Sigmodontinae, Rodentia): *Hylaeamys megacephalus* probes on *Cerradomys langguthi* karyotype. **Chromosome Res.**, v. 21, p. 107-119.

- Nakajima, R.I.; Cabral-de-Mello, D.C.; Valente, G.I.; Venere, P.C.; Martins, C. (2012). Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12:198.
- Nakamura, M. (2013). Is a sex-determining gene(s) necessary for the sex-determination in amphibians? Steroid hormones may be the key factor. **Sex. Dev.**, v. 7, p. 104-114.
- Nakayama, I.; Foresti, F.; Tewari, R.; Schartl, M.; Chourrout, D. (1994). Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. **Chromosoma**, v. 103, p. 31-39.
- Nanda, I.; Kondo, M.; Hornung, U.; Asakawa, S.; Winkler, C.; Shimizu, A.; Shan, Z.; Haaf, T.; Shimizu, N.; Shima, A.; Schmid, M.; Schartl, M. (2002). A duplicated of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 11778-11783.
- Nanda, I.; Schrama, D.; Feichtinger, W.; Haaf, T.; Schartl, M.; Schmid, M. (2002). Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in avian chromosomes. **Chromosoma**, v. 111, p. 215-227.
- Nascimento, J.; Quinderé, Y.R.S.D.; Recco-Pimentel, S.M.; Lima, J.R.F.; Lourenço, L.B. (2010). Heteromorphic Z and W sex chromosomes in *Physalaemus ephippifer* (Steindachner, 1864) (Anura, Leiuperidae). **Genetica**, v. 2010, p. 1127-1132.
- Nietfeld, W.; Digweedt, M.; Mentzel, H.; Meyerhof, W.; Köster, M.; Knöchel, W.; Erdmann, V.A.; Pieler, T. (1988). Oocyte and somatic 5S ribosomal RNA and 5S RNA encoding genes in *Xenopus tropicalis*. **Nucleic Acid Res.**, v. 16, p. 8803-8815.
- Nishioka, M.; Hanada, H.; Miura, I.; Ryuzaki, M. (1994). Four kinds of sex chromosomes in *Rana rugosa*. **Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol. Hiroshima Univ.**, v. 13, p. 1-34.
- Nishioka, M.; Miura, I.; Saitoh, K. (1993). Sex chromosomes of *Rana rugosa* with special reference to local differences in sex-determining mechanism. **Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol. Hiroshima Univ.**, v. 12, p. 55-81.
- Noble, G.K. (1922). The phylogeny of the Salientia. I. The osteology and the thigh musculature; their bearing on classification and phylogeny. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 46, p. 3-87.
- Odierna, G.; Aprea, G.; Capriglione, T.; Castellano, S.; Balletto, E. (2004). Evidence for chromosome and *Pst* I satellite DNA family evolutionary stasis in the *Bufo viridis* group (Amphibia, Anura). **Chromosome Res.**, v. 12, p. 671-681.

- Odierna, G.; Aprea, G.; Capriglione, T.; Castellano, S.; Balletto, E. (2007). Cytological evidence for population-specific sex chromosome heteromorphism in Palearctic green toads (Amphibia, Anura). **J. Biosc.**, v. 32, p. 763-768.
- Odierna, G.; Aprea, G.; Capriglione, T.; Parisi, P.; Arribas, O.; Morescalchi, M.A. (1999). Chromosomal and molecular analysis of some repeated families in *Discoglossus* Otth, 1837 (Anura, Discoglossidae): taxonomic and phylogenetic implications. **Ital. J. Zool.**, v. 66, p. 273-283.
- Ogata, M.; Hasegawa, Y.; Ohtani, H.; Mineyama, M.; Miura, I. (2008). The ZZ/ZW sex-determining mechanism originated twice and independently during evolution of the frog, *Rana rugosa*. **Heredity**, v. 100, p. 92-99.
- Ohno, S. (1967). **Sex chromosomes and sex-linked genes**. New York, Springer-Verlag, 192 p.
- Oguiura, N.; Ferrarezzi, H.; Batistic, R.F. (2009). Cytogenetics and molecular data in snakes: a phylogenetic approach. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 127, p. 128-142.
- Ohta, S.; Sumida, M.; Nishioka, M. (1999). Sex-determining mechanism in *Buergeria buergeri* (Anura, Rhacophoridae). III. Does the ZZW triploid frog become female or male? **J. Exp. Zool.**, v. 283, p. 295-306.
- Pagnozzi, J.M.; Silva, M.J.J.; Yonenaga-Yassuda, Y. (2000). Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). **Chromosome Res.**, v. 8, p. 585-591.
- Parise-Maltempo, P.P.; Martins, C.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 116, p. 218-223.
- Parker, H.W. (1935). The frogs, lizards, and snakes of British Guiana. **Proc. Zool. London**, v. 1935, p. 505-530.
- Palomeque, T.; Muñoz-López, M.; Carrillo, J.A.; Lorite, P. (2005). Characterization and evolutionary dynamics of a complex family of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina carnifex* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Chromosome Res.**, v. 13, p. 795-807.
- Paul-Prasanth, B.; Matsuda, M.; Lau, E.; Suzuki, A.; Sakai, F.; Kobayashi, T.; Nagahama, Y. (2006). Knock-down of *DMY* initiates female pathway in the genetic male medaka, *Oryzias latipes*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 351, p. 815-819.
- Pendás, A.M.; Moran, P.; Freije, J.P.; Garcia-Vazquez, E. (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 67, p. 31-36.

- Peterson, R.C.; Doering, J.L.; Brown, D.D. (1980). Characterization of two *Xenopus* somatic 5S DNAs and one minor oocyte-specific 5S DNA. **Cell**, v. 20, p. 131-141.
- del Pino, E.M.; Murphy, C.; Masson, P.H.; Gall, J.G. (1992). 5S rRNA-encoding genes of the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. **Gene**, v. 111, p. 235-238.
- Plohl, M.; Luchetti, A.; Meštrović, N.; Mantovani, B. (2008). Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. **Gene**, v. 409, p. 72-82.
- Plohl, M.; Meštrović, N.; Mravinac, B. (2012). Satellite DNA evolution. In: Garrido-Ramos, M.A. **Repetitive DNA**. Basel, Karger, v. 7, p. 126-152.
- Pyron, R.A.; Burbrink, F.T.; Wiens, J.J. (2013). A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4.161 species of lizards and snakes. **BMC Evol. Biol.**, v. 13:93.
- Quinderé, Y.R.S.D.; Lourenço, L.B.; Andrade, G.V.; Tomatis, C.; Baldo, D.; Recco-Pimentel, S.M. (2009). Polytropic and polymorphic cytogenetic variations in the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on nucleolar organizer regions. **Biol. Res.**, v. 42, p. 79-92.
- Ragghianti, M.; Guerrini, F.; Bucci, S.; Mancino, G.; Hotz, H.; Uzzell, T.; Guex, G.D. (1995). Molecular characterization of a centromeric satellite DNA in the hemiclinal hybrid frog *Rana esculenta* and its parental species. **Chromosome Res.**, v. 3, p. 497-506.
- Raška, I.; Koberna, K.; Malínský, J.; Fidlerová, H.; Mašata, M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 579-594.
- Raška, I.; Shaw, P.J.; Cmarko, D. (2006). Structure and function of the nucleolus in the spotlight. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 18, p. 325-334.
- Reed, K.M.; Phillips, R.B. (1997). Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative sex chromosomes of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related. **Chromosome Res.**, v. 5, p. 221-227.
- Rodrigues, D.S.; Rivera, M.; Lourenço, L.B. (2012). Molecular organization and chromosomal localization of 5S rDNA in Amazonian *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). **BMC Genet.**, v. 13:17.
- Ryuzaki, M.; Hanada, H.; Okumoto, H.; Takizawa, N.; Nishioka, M. (1999). Evidence for heteromorphic sex chromosomes in males of *Rana tagoi* and *Rana sakuraii* in Nishitama district of Tokyo (Anura: Ranidae). **Chromosome Res.**, v. 7, p. 31-42.
- Sambrook, J.; Fritschi, E.F.; Maniats, T. (1989). **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sarre, S.D.; Georges, A.; Quinn, A. (2004). The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. **BioEssays**, v. 26, p. 639-645.

Savage, J.M.; Carvalho, A.L. (1953). The family position of the neotropical frogs currently referred to the genus *Pseudis*. **Zoologica**, v. 38, p. 193-200.

Schempp, W.; Schmid, M. (1981). Chromosome banding in Amphibia: VI. BrDU – replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta*. **Chromosoma**, v. 83, p. 697-710.

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

Schmid, M. (1980a). Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma**, v. 77, p. 83-103.

Schmid, M. (1980b). Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). **Chromosoma**, v. 80, p. 69-96.

Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steilein, C.; Haaf, T.; Schartl, M.; Visbal-García, R.; Manzanilla-Pupo, J.; Fernández-Badillo, A. (2002a). Chromosome banding in Amphibia. XXVI. Coexistence of homomorphic XY sex chromosomes and a derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenet. Genome Res.**, v. 99, p. 330-340.

Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steinlein, C.; Nanda, I.; Mais, C.; Haaf, T.; Visbal-García, R.; Fernández-Badillo, A. (2002b). Chromosome banding in Amphibia. XXII. Atypical Y chromosomes in *Gastrotheca walkeri* e *Gastrotheca ovifera* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Genome Res.**, v. 96, p. 228-238.

Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steilein, C.; Rupprecht, A.; Haaf, T.; Kaiser, H. (2002c). Chromosome banding in Amphibia. XXIII. Giant W chromosome and extremely small genomes in *Eleutherodactylus euphronides* and *Eleutherodactylus shrevei* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenet. Genome Res.**, v. 97, p. 81-94.

Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steilein, C.; Visbal-García, R.; Fernández-Badillo, A. (2003). Chromosome banding in Amphibia. XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and a derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenet. Genome Res.**, v. 101, p. 62-73.

Schmid, M.; Haaf, T.; Geile, B.; Sims, S. (1983). Chromosome banding in Amphibia: VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). **Chromosoma**, v. 88, p. 69-82.

Schmid, M.; Ohta, S.; Steinlein, C.; Guttenbach, M. (1993). Chromosome banding in Amphibia: XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Buergeria buergeri* (Anura, Rhacophoridae). **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 62, p. 238-246.

Schmid, M. Olert, J.; Klett, C. (1979). Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. **Chromosoma**, v. 71, p. 29-55.

Schmid, M.; Sims, S.H.; Haaf, T.; Macgregor, H.C. (1986). Chromosome banding in Amphibia: X. 18S and 28S ribosomal RNA genes, nucleolus organizer regions and nucleoli in *Gastrotheca riobambae*. **Chromosoma**, v. 94, p. 139-145.

Schmid, M.; Steinlein, C. (2003). Chromosome banding in Amphibia. XXIX. The primitive XY/XX sex chromosomes of *Hyla femoralis* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Genome Res.**, v. 101, p. 74-79.

Schmid, M.; Steinlein, C.; Feichtinger, W. (1992). Chromosome banding in Amphibia. XVII. First demonstration of multiple sex chromosomes in amphibians: *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). **Chromosoma**, v. 101, p. 284-292.

Schmid, M.; Steinlein, C.; Feichtinger, W. (1989). Chromosome banding in Amphibia. XIV. The karyotype of *Centrolenella antisthenesi* (Anura, Centrolenidae). **Chromosoma**, v. 97, p. 434-438.

Schmid, M.; Steinlein, C.; Feichtinger, W.; Almeida, C.G.; Duellman, W.E. (1988). Chromosome banding in Amphibia. XIII. Sex chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hylidae). **Chromosoma**, v. 97, p. 33-42.

Schmid, M.; Steinlein, C.; Friedl, R.; Almeida, C.G.; Haaf, T.; Hillis, D.M.; Duellman, W.E. (1990). Chromosome banding in Amphibia. XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseutes* (Anura, Hylidae). **Chromosoma**, v. 99, p. 413-423.

Schmid, M.; Steinlein, C.; Bogart, J.P.; Feichtinger, W.; Haaf, T.; Nanda, I.; del Pino, E.M.; Duellman, W.E.; Hedges, S.B. (2012). **The Hemiphraetid Frogs: Phylogeny, Embryology, Life History, and Cytogenetics**. Basel, SW. S. Karger AG, 384 p.

Schmid, M.; Steinlein, C.; Bogart, J.P.; Feichtinger, W.; León, P.; La Marca, E.; Díaz, L.M.; Sanz, A.; Chen, S.H.; Hedges, S.B. (2010). **The Chromosomes of Terraranan Frogs: insights into vertebrate cytogenetics**. Basel, SW. S. Karger AG, 559 p.

Schmid, M.; Vitelli, L.; Batistoni, R. (1987). Chromosome banding im Amphibia. XI. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. **Chromosoma**, v. 95, p. 271-284.

Scott, L.A.; Kuroiwa, A.; Matsuda, Y.; Wichman, H.A. (2006). X accumulation of LINE-1 retrotransposons in *Tokudaia osimensis*, a spiny rat with the karyotype X0. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 112, p. 261-296.

Silva, E.L.; Borba, R.S.; Parise-Maltempi, P.P. (2012). Chromosome mapping of repetitive sequences in Anostomidae species: implications for genomic and sex chromosome evolution. **Molecular Cytogenetics**, v. 5: 45.

Sinclair, A.H.; Berta, P.; Palmer, M.; Hawkins, J.R.; Griffiths, B.L.; Smith, M.J.; Foster, J.W.; Frischauf, A.M.; Lovell-Badge, R.; Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature**, v. 346, p. 240-244.

Singh, L.; Purdom, I.F.; Jones, K.W. (1976). Satellite DNA and evolution of sex chromosomes. **Chromosoma**, v. 59, p. 43-62.

Singh, L.; Purdom, I.F.; Jones, K.W. (1980). Sex chromosome associated satellite DNA: evolution and conservation. **Chromosoma**, v. 79, p. 137-157.

Solari, A.J. (1994). Sex chromosomes and sex determination in Amphibia. In: \_\_\_\_\_, **Sex chromosomes and sex determinations in vertebrates**. Boca Raton, CRC Press, p. 9-25.

Steinemann, S.; Steinemann, M. (2005). Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 110, p. 134-143.

Suárez, P. (2010). **Estudos cromossômicos em anuros das famílias Hylidae e Leptodactylidae (Amphibia: Anura)**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Pará.

Sumner, A.T. (1972). A simple technique demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, v. 75, p. 304-306.

Targueta, C.P.; Rivera, M.; Lourenço, L.B. (2011). Karyotypic differentiation via 2n reduction and a finding of a case of triploidy in anurans of the genus *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). **Genetica**, v. 139, p. 1339-1347.

Targueta, C.P.; Rivera, M.; Souza, M.B.; Recco-Pimentel, S.M.; Lourenço, L.B. (2010). Cytogenetic contributions for the study of the Amazonian *Engystomops* (Anura; Leiuperidae) assessed in the light of phylogenetic relationships. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 54, p. 709-725.

Telenius, H.; Pelmeur, A.H.; Tunnacliffe, A.; Carter, N.P.; Behmel, A.; Ferguson-Smith, M.A.; Nordenskjöld, M.; Pfrangner, R.; Ponder, B.A.J. (1992). Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. **Gene Chromosome Canc.**, v. 4, p. 257-263.

Terencio, M.L.; Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C. Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Feldberg, E. (2012). Repetitive sequences associated with differentiation of W chromosome in *Semaprochilodus taeniurus*. **Genetica**, v. 140, p. 505-512.

Thalhammer, S.; Langer, S.; Speicher, M.R.; Heck, W.M.; Geigl, J.B. (2004). Generation of chromosome painting probes from single chromosomes by laser microdissection and linker-adaptor PCR. **Chromosome Res.**, v. 12, p. 337-343.

Toillis, M.; Boissinot, S. (2012). The evolutionary dynamics of transposable elements in eukaryotes genomes. **Genome Dyn.**, v. 7, p. 68-91.

Trifonov, V.; Giovannotti, M.; O'Brien, P.C.M.; Wallduck, M.; Lovell, F.; Parise-Maltempa, P.P.; Caputo, V.; Ferguson-Smith, M.A. (2011). Chromosomal evolution in Gekkonidae. I. Chromosome painting between *Gekko* and *Hemidactylus* species reveals phylogenetic relationships within the group. **Chromosome Res.**, v. 19, p. 843-855.

Trifonov, V.; Yang, F.; Ferguson-Smith, M.A.; Robinson, T.J. (2003). Cross-species chromosome painting in the Perissodactyla: delimitation of homologous regions in Burchell's zebra (*Equus burchellii*) and the white (*Ceratotherium simum*) and black rhinoceros (*Diceros bicornis*). **Cytogenet. Genome Res.**, v. 103, p. 104-110.

Traut, W.; Eickhoff, U.; Schorch, J.C. (2001). Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization.

Traut, W.; Sahara, K.; Otto, T.D.; Marec, F. (1999). Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. **Chromosoma**, v. 108, p. 173-180.

Ugarcović, D.; Plohl, M. (2002). Variation in satellite DNA profiles – causes and effects. **EMBO J.**, v. 21, p. 5955-5959

Uno, Y.; Nishida, C.; Oshima, Y.; Yokoyama, S.; Miura, I.; Matsuda, Y.; Nakamura, M. (2008). Comparative chromosome mapping of sex-linked genes and identification of sex chromosomal rearrangements in the Japanese wrinkled frog (*Rana rugosa*, Ranidae) with ZW and XY sex chromosomes systems. **Chromosome Res.**, v. 16, p. 637-647.

Valenzuela, N. (2004). Evolution and maintenance of temperature-dependent sex determination. In: Valenzuela, N.; Lance, V. **Temperature Dependent Sex Determination in Vertebrates**. Washington, D.C. Smithsonian Books, p. 131-147.

Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Noletto, R.B.; Cestari, M.M.; Cioffi, M.B.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **J. Fish Biol.**, v. 76, p. 1094-1116.

Viégas-Péquignot, E., 1992. In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson, D. (Ed.): **In Situ Hybridization: A Practical Approach**. Oxford University Press, IRL Press, Oxford, pp. 137– 158.

Vitelli, L.; Batistoni, R.; Andronico, F.; Nardi, I.; Barsacchi-Pilone, G. (1982). Chromosomal localization of 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse anuran amphibians. **Chromosoma**, v. 80, p. 475-491.

Vittorazzi, S.E.; Lourenço, L.B.; Del-Grande, M.L.; Recco-Pimentel, S.M. (2011). Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenet. Genome Res.**, v. 134, p. 101-107.

Wu, Z.; Murphy, C.; Gall, J.G. (1986). A transcribed satellite DNA from the bull frog *Rana catesbeiana*. **Chromosoma**, v. 93, p. 291-297.

Wiens, J.J.; Kuczynski, C.A.; Hua, X.; Moen, D.S. (2010). An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequences data. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 55, p. 871-882.

Yang, F.; Carter, N.P.; Shi, L.; Ferguson-Smith, M.A. (1995). A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. **Chromosoma**, v. 103, p. 642-652.

Yang, F.; O'Brien, P.C.M.; Wienberg, J.; Neitzel, H.; Lin, C.C.; Ferguson-Smith, M.A. (1997). Chromosomal evolution of the Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). **Chromosoma**, v. 106, p. 37-43.

Yoshimoto, S.; Ikeda, N.; Izutsu, Y.; Shiba, T.; Takamatsu, N.; Ito, M. (2010). Opposite roles of *DMRT1* and its W-linked paralogue, *DM-W*, in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: implications of a ZZ/ZW-type sex-determining system. **Development**, v. 137, p. 2519-2526.

Yoshimoto, S.; Okada, E.; Umemoto, H.; Tamura, K.; Uno, Y.; Nishida-Umehara, C.; Matsuda, Y.; Takamatsu, N.; Shiba, T.; Ito, M. (2008). A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 2469-2474.

Yoshimura, A.; Nakata, A.; Kuru-o, M.; Obara, Y.; Ando, Y. (2006). Molecular cytogenetic characterization and chromosomal distribution of the satellite DNA in the genome of *Oxya hyla intricata* (Orthoptera: Catantopidae). **Cytogenet. Genome Res.**, v. 112, p. 160-165.

Zhao, G.; Yu, Q.X.; Zhang, W.W.; Zhang, Y.M.; Chen, J.; Long, H.; Liu, J.D. (2008). The 5S rDNA related repetitive sequences in the sex chromosomes of the spiny eel (*Mastacembelus aculeatus*). **Cytogenet. Genome Res.**, v. 121, p. 143-148.