

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ, *CAMPUS* DE UNIÃO DA VITÓRIA
COLEGIADO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SABRINA CHELEGEL

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO MOLECULAR DE HETEROCROMATINAS EM
CARIÓTIPOS DE ANUROS DA FAMÍLIA HYLIDAE

UNIÃO DA VITÓRIA

2022

SABRINA CHELEGEL

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO MOLECULAR DE HETEROCROMATINAS EM
CARIÓTIPOS DE ANUROS DA FAMÍLIA HYLIDAE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas, ao Colegiado de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade estadual do Paraná, *Campus* de União da Vitória

Orientador: Prof. Dr. Rafael Bueno Noleto
Coorientador: Me. Sebastião Venâncio Neto

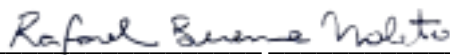
UNIÃO DA VITÓRIA
2022

TERMO DE APROVAÇÃO DA BANCA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

SABRINA CHELEGEL

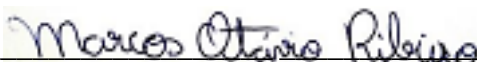
ESTUDO DA COMPOSIÇÃO MOLECULAR DE HETEROCROMATINAS EM
CARIÓTIPOS DE ANUROS DA FAMÍLIA HYLIDAE

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado com nota 8,8 como requisito parcial à obtenção do grau de licenciada em Ciências Biológicas, Colegiado de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Paraná, *Campus* de União da Vitória, pela seguinte banca examinadora:



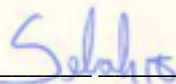
Orientador Prof. Dr. Rafael Bueno Noletto

Colegiado de Ciências Biológicas, UNESPAR



Prof. Dr. Marcos Otávio Ribeiro

Colegiado de Ciências Biológicas, UNESPAR



Me. Sebastião Venâncio Neto

Programa de Pós-graduação em Genética, UFPR

UNIÃO DA VITÓRIA, 16 DE DEZEMBRO DE 2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Raulita Rodycz Samulewski e Valdecir Chelegel, aos meus irmãos, Ana Julia e Willian e a minha avó Maria de Lurdes Rodycz (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo aos meus pais, a base de tudo, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, dando suporte emocional, ajuda financeira e acreditando no meu potencial! Sem vocês essa caminhada teria sido mais difícil e, apesar das diferenças que existem entre nós, sei que sempre posso contar com vocês! Gratidão e amor são as palavras e sentimentos que melhor definem o que sinto por vocês. Espero poder contribuir todos esses anos da vida de ambos, que foram dedicados a mim (e aos meus irmãos). Obrigada pela educação que me deram, pelo exemplo e força. Vocês são meu porto seguro!

Agradeço ao Paulo, que pra mim é como se fosse um irmão de outra mãe, que sempre esteve presente e me ajudando a segurar as pontas, mandando os melhores “memes” no Instagram para desconstrair a vida acadêmica. Obrigada por compartilhar a vida e os bons momentos dessa amizade comigo! Obrigada pelos cafés da tarde na Camafeus, pelas conversas, pelo apoio e claro pelas fofocas atualizadas. Desconstrair é necessário nessa vida acadêmica corrida.

Minha irmã, Ana Júlia, insuportável, mas eu não sei viver sem! Obrigada pela companhia, pelas risadas, pelo deboche, pela paciência e por tudo que somos e compartilhamos. Eu amo nossa conexão, apesar de não estarmos mais tão juntas, mas a vida depois de um certo momento é assim, cada uma segue seus passos, mas estaremos sempre aqui uma pra outra! Obrigada por ser exatamente como você é, sinto orgulho e isso me dá motivação para continuar na vida acadêmica.

Não poderia deixar de fora uma família super importante pra mim, que me confiou a vida do ser mais elétrico e amoroso desse universo, vulgo Shihiro. Obrigada Fernanda, Prof.º Rogério, Belinha, Lara, João, Sr. Leopoldo, Tallulah, Cipsela, Kiran, Pocoyo, Pepsi e Bismillah. Depois da perda que tive da Amora, meu coração foi preenchido de amor por essa família. A gente sabe como dói a perda de um animalzinho que consideramos como filhos e podem ter certeza que essa caminhada se fez mais doce e cheia de amor com a chegada da Shihiro. Obrigada mais uma vez, prometo continuar a dar a vida de rainha que a Shihiro merece.

É claro que também vou agradecer meus companheiros de caminhada, surtos, tristezas, deboche, fofoca e principalmente companheiros de Moreira. Queria poder agradecer um de cada vez, pois apesar de sermos a “Elite da Bio” como diz o Noletto, cada um tem suas particularidades. Obrigada Dani, Felipe, Ricardo e Aline, a famosa “Fofofauna Peçonhenta”, que segue firme igual gelatina desde o primeiro ano (risos). Seria muito triste não ter com quem

compartilhar os surtos desses quatro anos. Vocês foram e são essenciais! Sou grata pela nossa amizade e amo cada um de vocês. Também deixo aqui meus agradecimentos aos integrantes que se aglutinaram conosco depois e nos fizeram ser a “Anta de Jaleco”: Camila, Letícia, Jana e Maria. Espero que possamos perdurar nossa amizade por muito tempo!

Encerro aqui, com uma pessoa que foi super importante para a realização deste trabalho; meu mestre orientador Prof. Dr. Rafael Bueno Noleto. Obrigada pelos ensinamentos, puxões de orelha para eu me tornar uma pessoa mais serena, pela amizade construída nesses quatro anos e principalmente, por me apoiar e acreditar em mim e no meu potencial! Esses são pontos essenciais no desenvolvimento de um bom trabalho e acredito que fizemos exatamente isso. Se eu for metade do profissional que você é, estarei completamente realizada. Me inspiro demais em você. Obrigada por me mostrar as diversas faces da genética, assim me apaixonei cada vez mais por essa área e as “coisas de ET” que muitas vezes encontramos nela.

Aqui também deixo meu agradecimento a mais uma pessoa importante neste trabalho, meu amigo e coorientador Sebastião Venâncio Neto, vulgo Sebah. Obrigada pela companhia no laboratório, pelos ensinamentos, pela parceria e conversas. Também me inspiro em você! Você é um profissional incrível e sempre vou me lembrar do Noleto puxando sua orelha por deixar o fixador sem tampa (risos). Guardarei boas lembranças e espero que possamos continuar a desvendar a evolução do cariótipo de hilídeos, principalmente da *Boana albopunctata* (ai ai esse cromossomo B e esses microssatélites).

Por fim, agradeço a Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), pela estrutura e espaço nesses anos de graduação, pelas oportunidades com projetos de Iniciação Científica, Residência Pedagógica e tudo que essa universidade maravilhosa oferece! Agradeço a agência de fomento das minhas duas ICs, Fundação Araucária.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, meu muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Parece-me necessário difundir, na massa do povo, os conhecimentos que estão ao alcance dos homens de ciência, de modo que todos os cidadãos possam colaborar no seu progresso, não permanecendo este apenas obra da camada que se costuma chamar ‘elite’.”

(Bertha Lutz)

RESUMO

A ordem anura vem sofrendo uma forte ameaça à sua conservação diante da crescente destruição e fragmentação da Mata Atlântica. Hylidae é a família com mais ampla distribuição e maior número de espécies. Frente a vasta diversidade do grupo, estudos que aliam marcadores cromossômicos juntamente com outros caracteres têm sido importantes para compreender a evolução do clado, além de melhor resolver incertezas taxonômicas diante da importância ecológica que o grupo apresenta. A heterocromatina media diversas funções no núcleo da célula, incluindo a função centromérica, silenciamento gênico e organização nuclear. A estrutura condensada das heterocromatinas constitutivas está associada com uma intensa disposição de nucleossomos, organização esta que em parte pode estar associada com a natureza repetitiva das sequências de DNA que caracterizam tais compartimentos cromossômicos. O presente estudo investigou comparativamente a variação da porção heterocromática em cariótipos de híldeos provenientes da Mata Atlântica sul-paranaense, utilizando o bandamento C, fluorocromos base-específicos como o DAPI (AT) e o iodeto de propídeo (GC) e FISH com sonda do TE *Tc1/Mariner*. A análise da microestrutura cariotípica é ainda incipiente em anuros quando comparada a outros grupos animais. Estas colorações se mostraram interessantes na diferenciação cariotípica das espécies: em *Boana faber* todas as heterocromatinas centroméricas se mostram ricas em bases AT; em *Scinax fuscovarius* um padrão uniforme foi observado (ausência de sinal intenso para ambos os fluorocromos); em *Trachycephalus dibernardoi* o locus das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) se mostrou DAPI-negativo portanto, um domínio cromossômico rico em conteúdo GC. Em *Boana albopunctata*, algumas marcações intensas do TE *Tc1/Mariner* se mostraram colocalizadas com a heterocromatina. Este componente genômico pode se mostrar espécie-específico, seja pelo seu padrão de localização nos cariótipos e/ou pela composição de bases nitrogenadas, fornecendo assim subsídios para melhor entender os elementos sobre a modelagem dos cariótipos que observamos hoje na família Hylidae.

Palavras-chave: Elementos transponíveis. Evolução. Fluorocromos. Híldeos.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Espécie <i>Boana faber</i> , popularmente conhecida como rã ou sapo martelo..... | 21 |
| FIGURA 2 – Espécie <i>Boana albopunctata</i> , popularmente chamada de Perereca-cabrinha..... | 22 |
| FIGURA 3 – Espécie <i>Scinax fuscovarius</i> , chamada popularmente de Perereca-de-banheiro.... | 22 |
| FIGURA 4 – Espécie <i>Trachycephalus dibernardoi</i> , conhecida como Perereca-grudenta..... | 23 |
| FIGURA 5 - Cariótipos das espécies submetidos à técnica de bandamento C, demonstrando os padrões de heterocromatina constitutiva. (A) <i>Boana faber</i> ; (B) <i>Scinax fuscovarius</i> ; (C) <i>Trachycephalus dibernardoi</i> ; (D) <i>Boana albopunctata</i> | 28 |
| FIGURA 6 - Colorações com iodeto de propídeo (vermelho) e DAPI (azul). Em <i>Scinax fuscovarius</i> (A, B) não existe riqueza relativa em composição de bases AT/GC, enquanto que em <i>Boana faber</i> (C) todas as heterocromatins centroméricas se apresentam ricas em bases AT. As Regiões Organizadoras de Nucléolo são ricas em GC (setas). Em <i>Trachycephalus dibernardoi</i> (D) apenas o locus do rDNA 45S se mostrou compartimentalizado em composição GC (seta)..... | 30 |
| FIGURA 7 - Cariótipo da espécie <i>Boana Albopunctata</i> submetido a hibridização <i>in situ</i> fluorescente com sonda do TE <i>Tc1/Mariner</i> | 32 |
| FIGURA 8 - Regiões de colocalização entre heterocromatina constitutiva e o TE <i>Tc1/Mariner</i> em um dos cromossomos homólogos do par 1 em <i>Boana albopunctata</i> | 32 |
| FIGURA 9 - Idiogramas mostrando a distribuição de marcadores clássicos e classes de DNA repetitivo nas espécies estudadas..... | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag - Prata

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

FISH – Fluorescence *In Situ* Hybridization

GISH - Genomic *In Situ* Hybridization

HCl - Ácido Clorídrico

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

IP - Iodeto de Propídeo

KCl – Cloreto de Potássio

PCR – Polymerase Chain Reaction

RNA - Ácido Ribonucleico

RON – Região Organizadora de Nucléolo

rDNA - ribosomal DNA

SSC – Citrato de Sódio Salino

satDNA - satellite DNA

TE – Transposable Element

TIRs – Terminal Inverted Repeats

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 16 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3.1 Bioma mata atlântica | 17 |
| 3.2 Citogenética de anuros (com ênfase no gênero <i>Boana</i>) | 17 |
| 3.3 Fluorocromos | 18 |
| 3.4 Elemento Transponível <i>Tc1/Mariner</i> | 19 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| 4.1 TIPO DE PESQUISA | 21 |
| 4.2 ÁREA DE ABRANGÊNCIA | 21 |
| 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 23 |
| 4.3.1 Obtenção de metáfases mitóticas (BALDISSERA <i>et al.</i> 1993 com modificações) | 23 |
| 4.3.2 Detecção de heterocromatina constitutiva (SUMMER 1972, com modificações) | 24 |
| 4.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Hibridização in situ fluorescente – FISH (SCHEMBERGER <i>et al.</i> 2016; PINKEL <i>et al.</i> 1986, respectivamente) | 24 |
| 4.3.4 Dupla coloração Iodeto/DAPI (ANDRAS <i>et al.</i> 2000)..... | 24 |
| 4.3.5 Análises cromossômicas | 25 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 26 |
| 5.1 Número diploide e morfologia cromossômica | 26 |
| 5.2 Heterocromatina constitutiva..... | 27 |
| 5.3 Fluorocromos base preferenciais..... | 28 |

| | |
|---|----|
| 5.4 <i>Tc1-Mariner</i> em <i>Boana albopunctata</i> | 30 |
| 5.5 Cromossomo B em <i>Boana albopunctata</i> | 32 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 35 |
| REFERÊNCIAS | 36 |

1 INTRODUÇÃO

A ordem Anura, pertencente à classe dos anfíbios, apresenta uma diversidade de 7551 espécies descritas, alocadas em 50 famílias, distribuídas por quase todos os continentes, exceto na Antártida (FROST, 2022). Têm sido constantes as alterações na classificação deste grupo, como por exemplo as realizadas por Faivovich *et al.* (2005), quando baseado em marcadores moleculares, algumas espécies do gênero *Hyla* foram realocadas para o gênero *Hypsiboas*, atualmente chamado de *Boana* (DUBOIS, 2017).

A família Hylidae é um grupo monofilético de pererecas com suas 1035 espécies reconhecidas agrupadas em três subfamílias (Hylinae, Pelodyadinae, Phyllomedusinae) (FROST, 2022). A tribo Cophomantini (Hylinae, Hylidae) é um clado diverso de anuros neotropicais composto pelos gêneros *Aplastodiscus*, *Boana*, *Bokermannohyla*, *Hyloscirtus* e *Myersiohyla* (FERRO *et al.*, 2018; FROST, 2022). Essa tribo vem acompanhando as reorganizações que acontecem na família como um todo, já que subiu a nível de subfamília (como Cophomantinae) por Duellman *et al.* (2016) e recentemente retornou a nível de tribo após discordâncias encontradas por Caviedes-Solis, Kim e Leaché (2020) corroboradas por Faivovich *et al.* (2018) (FROST, 2022). Esta tribo inclui 191 espécies em cinco gêneros, incluindo *Boana* (sinônimo sênior de *Hypsiboas*) (DUBOIS, 2017) com 99 espécies amplamente distribuídas nas áreas úmidas da Mata Atlântica, Amazônia, Savana Brasileira e Caatinga (FROST, 2022). Entre os hílídeos há cerca de 340 espécies cariotipadas, o que os torna um dos grupos mais estudados entre os Anura (CARDOZO *et al.*, 2011; CATROLI e KASAHARA, 2009; BRUSCHI *et al.*, 2014; FERRO *et al.*, 2018; PAIVA *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2016). A maioria das espécies de Phyllomedusinae e Pelodyadinae compartilham $2n = 26$ cromossomos, enquanto a subfamília Hylinae apresentou $2n = 24$ cromossomos, o que sugere uma sinapomorfia putativa para Hylinae (DUELLMAN, 2001; FAIVOVICH *et al.*, 2005). Um novo arranjo taxonômico para hílídeos elevando Phyllomedusinae e Pelodyadinae como famílias foi proposto por Duellman *et al.* (2016). Portanto, tendo em vista a constante reorganização filogenética entre os hílídeos (CAVIEDES-SOLIS, KIM E LEACHÉ, 2020; FERRO *et al.*, 2018; FROST, 2022), seria necessário estudar um maior número de espécies para melhor compreender a distribuição desse caráter nas três linhagens, conforme citado anteriormente por Faivovich *et al.* (2005).

Os primeiros dados sobre a citogenética de anuros são das décadas de 1960 e 1970, porém os primeiros estudos focavam na descrição do cariótipo das espécies com base na

coloração convencional (Giemsa), identificando apenas o número e a morfologia dos cromossomos (KASAHARA, 2009). A utilização cada vez maior de marcadores cromossômicos (mapeamento de sequências repetitivas, padrão heterocromático dos cariótipos e a composição de domínios cromossômicos específicos) auxilia em melhor estabelecer as relações filogenéticas, melhorando a compreensão das relações entre gêneros e espécies (BUSIN, 2000; CARVALHO, 2012; REIS, 2016).

Desde seu descobrimento (HEITZ, 1928), a heterocromatina tem sido objeto de discussão. Compensação de dose, coesão de cromátides irmãs e manutenção de telômeros são funções específicas em adição a outros efeitos, como eliminação de DNA (diminuição de cromatina), replicação diferencial e variação por efeito de posição. As porções variáveis de famílias de DNA repetitivo no genoma, geralmente correspondem a regiões de heterocromatina constitutiva, reveladas pelo convencional bandamento C (SUMNER, 1972), através de uma diferenciada desnaturação de regiões do DNA. Esta técnica evidencia bandas heterocromáticas que, embora se mostrem frequentemente restritas ao centrômero, em algumas espécies/populações podem se mostrar estruturadas e utilizadas como marcadores espécie-específico.

As bandas heterocromáticas podem ocupar a mesma porção cromossômica (equilocalidade) ou o oposto, com distinção nas porções (heterogeneidade). O conceito de equilocalidade das porções de heterocromatina vem ganhando suporte à medida que diferentes marcadores, além do convencional bandamento C, são aplicados; o mapeamento dos DNAs repetitivos, por exemplo, é uma poderosa ferramenta na definição da composição de bases de regiões heterocromáticas específicas (NOLETO, 2009; SCHWEIZER; LOIDL, 1987). Entre os corantes comumente utilizados para estudos qualitativos, estão os fluorocromos. O princípio destes corantes baseia-se na ligação específica externamente à molécula de DNA em tandem (MANZINI *et al.*, 1983). A coloração com DAPI produz uma banda fluorescente azul brilhante nas regiões cromossômicas ricas em Adenina - Timina, enquanto o Iodeto de Propídeo se ligam as regiões ricas em Guanina - Citosina, emitindo fluorescência azul e vermelha, respectivamente (BAGULEY, 1982).

As características da Mata Atlântica favorecem a presença de endemismo principalmente da ordem Anura, que possuem sua história de vida influenciada pelo ambiente em que vivem (VENÂNCIO NETO, 2019). A biodiversidade, microhabitats, heterogeneidade desses habitats e o endemismo em conjunto com a vasta fragmentação e status de ameaçado que o bioma apresenta o tornam um *hotspot* prioritário para a conservação (CARVALHO, 2012; DUELLMAN, 1999). O rápido declínio observado nas espécies de anfíbios (não somente

anuros) pelas mudanças climáticas, perda de habitat e introdução de patógenos instiga a ampliação de estudos científicos na área da genética e biodiversidade, que busquem por estratégias de conservação a fim de evitar o risco de extinção e empobrecimento da comunidade de anfíbios presentes no bioma (CARVALHO, 2012).

Em anfíbios ainda é pequeno o número de informações que se tem a respeito da organização molecular da fração heterocromática de seus genomas e de sua localização cromossômica, especialmente se for considerado o grande número de espécies endêmicas da Mata Atlântica. Frente a vasta diversidade do grupo, estudos que aliam marcadores cromossômicos juntamente com outros caracteres têm sido importantes para compreender a evolução do clado, buscando assim melhor agrupá-los. Portanto, como parte de um esforço na caracterização cromossômica de anuros paranaenses, no presente estudo, propomos uma investigação qualitativa da heterocromatina constitutiva, baseada em colorações fluorescentes e organização molecular de DNAs repetitivos e sua localização cromossômica, enfocando a sua equilocidade, sua divergência entre espécies e sua relação com a evolução cariotípica em espécies de anfíbios anuros da família Hylidae, provenientes da região centro-sul do Estado do Paraná.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Frente à vasta diversidade do grupo, estudos que aliam marcadores moleculares juntamente com outros caracteres têm sido importantes para compreender a evolução do clado, buscando assim melhor agrupá-los. Logo, o principal objetivo deste trabalho é utilizar marcadores de citogenética molecular para melhor conhecer a estrutura de cariótipos de espécies de anfíbios anuros da família Hylidae, provenientes da Mata Atlântica paranaense.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a microestrutura cariotípica baseada no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (bandamento C);
- Determinar a predominância de bases AT e CG na porção heterocromática dos cariótipos, com o uso de fluorocromos base preferenciais;
- Localizar, por hibridização fluorescente *in situ*, o padrão do elemento de transposição *Tc1/Mariner* na espécie *Boana albopunctata*;
- Comparar com padrões de organização cromossômica dessa classe de DNA já estudada em outros grupos;
- Analisar se os marcadores cromossômicos utilizados são espécies-específicos ou populações-específicos;
- Adicionar novos dados cromossômicos de espécies de hílídeos, poucos explorados sobre a temática DNAs repetitivos e composição heterocromática;
- Discutir os resultados sob enfoques taxonômicos e evolutivos comparando-os com dados disponíveis na literatura.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bioma mata atlântica

A Mata Atlântica faz parte do bioma das florestas pluviais equatoriais; se estende ao longo da costa litorânea, banhada pelo oceano atlântico e grande parte pela bacia do rio Paraná, com temperatura média de 25°C e precipitação ao longo do ano todo (CHIROL; COSTA, 2018). Seu relevo montanhoso e acidentado é responsável pelo grande endemismo e diversidade do bioma, assim como os diversos subtipos de florestas (Ombrófila mista ou Mata das Araucárias, Ombrófila Densa e Aberta, Estacional Semidecidual e Decidual) com associação de ecossistemas (os manguezais, vegetação de restinga, campo de altitude etc.) (CHIROL; COSTA, 2018). O conjunto de diferentes ecossistemas favorece a biodiversidade que o bioma possui (importante para a regulação ambiental), entretanto atualmente a mata corresponde apenas 12,4% de sua extensão original, pois a mesma sofreu o processo de fragmentação pela ação humana (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2021).

Os anfíbios anuros presentes na Mata Atlântica são um dos grupos de vertebrados mais diversos do mundo e tem se mostrado promissores para estudos de filogeografia do bioma, que abriga cerca de 370 espécies de anuros (RIVA TONINI, 2010; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2021). Porém, o alto grau de devastação influencia a riqueza da anurofauna, pois os mesmos são ótimos bioindicadores de qualidade ambiental e totalidade dos ecossistemas por possuírem características da história de vida influenciadas pelo ambiente em que se encontram (VENÂNCIO NETO, 2019).

3.2 Citogenética de anuros (com ênfase no gênero *Boana*)

O gênero *Boana* (99sp), sinônimo sênior de *Hypsiboas*, é um grupo de pererecas neotropicais atualmente inserido na família Hylidae (1035sp) e tribo Cophomantini, com distribuição quase mundial e cerca de 99 espécies reconhecidas (FROST, 2022; DUELLMAN *et al.*, 2016), é uma das mais diversas entre os anuros. Além disso, o gênero integra sete grupo de espécies de acordo com dados morfológicos, ecológicos e genéticos: *B. albopunctata*, *B. benitezi*, *B. faber*, *B. pulchella*, *B. pellucens*, *B. punctata* e *B. semilineata* (FAIVOVICH *et al.*, 2005). A tribo Cophomantini é um clado diverso de anuros neotropicais composto pelos gêneros *Aplastodiscus*, *Boana*, *Bokermannohyla*, *Hyloscirtus* e *Myersiohyla*. (FERRO *et al.*, 2018).

O grupo *Boana albopunctata* possui distribuição geográfica no centro, sul e sudeste do Brasil; nordeste da Argentina (províncias de Misiones e Corrientes); norte do Uruguai; leste da Bolívia (Santa Cruz, Beni e Pando) e leste do Paraguai (FROST, 2022). Os dados taxonômicos e filogenéticos aumentaram consideravelmente nos últimos anos, após a revisão inicial feita por Faivovich *et al* (2005). Outros estudos abordam as relações desses grupos de espécies por amostragem de táxons distintos, com foco no grupo de *B. pulchella* (DUELLMAN *et al.*, 2016; FAIVOVICH *et al.*, 2005; FAIVOVICH *et al.*, 2021; KÖHLER *et al.*, 2010), no grupo de *B. albopunctata* (CAMINER; RON, 2014) e no grupo de *B. semilineata* (FOUQUET *et al.*, 2016).

Apesar de serem significativos os esforços a fim de esclarecer a sistemática dos hilídeos, se comparados a outros grupos de vertebrados, como peixes e mamíferos, os dados cariotípicos ainda são limitados. Neste sentido, conseqüentemente, são postuladas inferências errôneas sobre anfíbios possuírem cariótipos altamente conservados. No entanto, estudos com métodos de aplicação de bandamento cromossômico e citogenética molecular com diferentes marcadores cromossômicos, demonstram considerável variabilidade na microestrutura cromossômica (KASAHARA *et al.*, 2003).

Para o gênero *Boana* apenas 16% das espécies possuem dados citogenéticos com coloração cromossômica convencional, o que dificulta a compreensão da evolução cariotípica do grupo e torna pertinente o emprego de diferentes marcadores cromossômicos (PINHEIRO *et al.*, 2019, RABER *et al.*, 2004; ANANIAS *et al.*, 2004; GRUBER *et al.*, 2007; NUNES; FAGUNDES, 2008).

3.3 Fluorocromos

O uso de fluorocromos na citogenética teve maior intensidade no final da década de 1970, pois se tornaram conhecidas suas propriedades em revelar a composição de bases nitrogenadas em porções heterocromáticas específicas. Desde então o emprego de fluorocromos como marcadores base-preferenciais tornou-se promissor na citogenética, principalmente na comparativa (KASAHARA, 2009).

Os fluorocromos são corantes fluorescentes, ou seja, quando excitados por luz com determinado comprimento de onda, os mesmos emitem fluorescência e/ou luminescência em um processo de absorção da energia, onde parte da energia não absorvida, sendo a maior porção,

emite a fluorescência em comprimento de onda de luz visível. Para empregar esta técnica o microscópio de fluorescência é indispensável (MIRANDA, 2004). Segundo Sumner (1990), Carpersson foi o primeiro pesquisador a usar o fluorocromo conhecido como Quinacrina Mostarda, em 1968; apesar de posteriormente ter sido substituída pelo bandamento G, pela perda rápida de fluorescência (como grande parte dos fluorocromos), metodologias foram desenvolvidas para aprimorar a técnica e fornecer estabilidade a fluorescência, além da introdução de contracorantes para realçar a marcação dos fluorocromos (MIRANDA, 2004).

Há duas classes de fluorocromos que estão separadas de acordo com sua especificidade com as bases AT e CG e se são antibióticos ou não (KASAHARA, 2009). Nos fluorocromos utilizados no presente estudos detemos o Iodeto de propídeo, um agente intercalante que se comporta como preferencial para regiões CG, e o 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) preferencial para regiões AT (KASAHARA, 2009; NOLETO, 2009). Os fluorocromos podem ser utilizados ou não com contracorantes, porém fluorocromos que possuem a mesma preferência por bases podem produzir resultados divergentes, ou seja, usar diferentes fluorocromos e contracorantes possibilita obter um padrão mais evidente sobre o conteúdo de bases de regiões cromossômicas, dado o fato deles competirem por tais compartimentos cromossômicos. A mesma metáfase pode ser analisada com fluorocromos distintos, tornando vantajoso empregar a técnica (KASAHARA, 2009).

3.4 Elemento Transponível *Tc1/Mariner*

É de conhecimento que os Elementos Transponíveis (TEs) e DNAs repetitivos, favorecem a diversidade estrutural e tamanho dos genomas, mas por muito tempo foram vistos como parasitas genômicos sem função e inúteis (SOTERO-CAIO *et al*, 2017). Apesar disso, atualmente com seu papel na evolução do genoma, passou a receber atenção adicional, visto que tais elementos ocupam de 4 a 60% do genoma de vertebrados (SOTERO-CAIO *et al*, 2017) e possuem a capacidade de movimentar-se e replicar-se pelo mesmo, inserindo-se em locais do genoma do hospedeiro. Há dois mecanismos de transposição desses elementos: “corta e cola” (Classe II ou Transposons de DNA), onde o elemento deve transpor-se à frente da forquilha de replicação para aumentar seu número de cópias e “copia e cola” (Classe I ou Retrotransposons). Sendo assim, possuem milhares de famílias, superfamílias e classes diferentes de TEs. O TE *Tc1/Mariner* faz parte da Classe II, possui estrutura simples, com duas repetições terminais

invertidas (TIRs) e um quadro de leitura aberto da enzima transposase (WICKER *et al*, 2007; SOTERO-CAIO *et al*, 2017).

Os TEs favorecem a formação de satDNA e DNA microssatélite, principalmente nas regiões centroméricas e pericentroméricas, locais onde se acumulam pelo fato de serem regiões de difícil deleção por cruzamento (ZATTERA; BRUSCHI, 2022). No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade e distribuição de elementos transponíveis em anfíbios, visto que as porções de DNA repetitivo são subexploradas no grupo. Entender a diversidade de um TE é fundamental, dada sua presença em praticamente todos os genomas de vertebrados, impactos evolutivos e o volume crescente de dados genômicos gerados (SOTERO-CAIO *et al*, 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE PESQUISA

A pesquisa experimental baseia-se em determinar um objeto de estudo e observar o mesmo sob condições e variáveis que podem influenciá-lo, definindo formas de controle e observação dos efeitos que a variável produz no objeto. Possui as seguintes propriedades: manipulação, controle e distribuição aleatória (GIL, 2002).

4.2 ÁREA DE ABRANGÊNCIA

O presente estudo desenvolveu-se com espécies de três gêneros, que pertencem à família Hylidae e ocorrem na Mata Atlântica próximos ao município de União da Vitória- Paraná: *Boana faber* (Figura 1), *Boana albopunctata* (Figura 2), *Scinax fuscovarius* (Figura 3) e *Trachycephalus dibernardoi* (Figura 4). Os espécimes foram coletados em fragmentos de Mata Atlântica, no Município de União da Vitória/PR. Estamos amparados pela autorização permanente de coleta ICMBio N° 63336-3. Esse trabalho é autorizado pelo Comitê de Ética de Uso de Animal (Processo CEUA 2021/0001) da Universidade Estadual do Paraná.

FIGURA 1 – Espécie *Boana faber*, popularmente conhecida como rã ou sapo martelo. Barra = 5 cm.



Fonte: a autora

FIGURA 2 – Espécie *Boana albopunctata*, popularmente chamada de Perereca-cabrinha. Barra = 1cm.



Fonte: Maffei (2019)

FIGURA 3 – Espécie *Scinax fuscovarius*, chamada popularmente de Perereca-de-banheiro. Barra = 1cm.



Fonte: Aguiar Passos (2014)

FIGURA 4 – Espécie *Trachycephalus dibernardoi*, conhecida como Perereca-grudenta. Barra = 1 cm.



Fonte: EcoRegistros (2013)

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Obtenção de metáfases mitóticas (BALDISSERA *et al.* 1993 com modificações)

As preparações cromossômicas para obtenção de metáfases mitóticas a partir da medula óssea, foram baseadas no método de Baldissera *et al.* (1993), com modificações. Este método inicia-se com a injeção de solução de levedura glicosilada por um período de 48 horas. Subsequente se administra de Colchicina 1,0% intraperitonealmente. Decorridas 8-12 horas os espécimes são submetidos a uma overdose anestésica com lidocaína 2%, seguida da extração da medula óssea junto a solução hipotônica de Cloreto de Potássio (KCl) a 0,075M, com auxílio de uma seringa e recolhida em um tubo de 10 mL. Posteriormente o material é transferido a um tubo de centrífuga e incubado a 37°C por 45 minutos. Encerrando o método, efetua-se a fixação com fixador Carnoy (metanol e ácido acético, proporção 3:1), preparado no momento do uso. Centrifugação de 1000 rpm, durante 10 minutos, com descarte do sobrenadante e preenchimento com fixador. Este último procedimento é repetido por mais duas vezes antes do

material ser armazenado no freezer a -20°C . Os espécimes utilizados foram protocolados com número e procedência, sendo então tombados no acervo do Laboratório de Pesquisa Multidisciplinar de Biologia da Universidade Estadual do Paraná, *Campus* União da Vitória.

4.3.2 Detecção de heterocromatina constitutiva (SUMMER 1972, com modificações)

A detecção de heterocromatina constitutiva (bandamento C) baseou-se no método descrito por Sumner (1972) com modificações. As lâminas contendo o material celular foram tratadas em Ácido Clorídrico (HCl) 0,2M, à 37°C , durante 10 minutos. Incubadas em Hidróxido de Bário $\text{Ba}(\text{OH})_2$ a 5%, recém preparado e filtrado, à 25°C , durante 2 a 3 minutos. Mergulhadas em solução de Ácido Clorídrico 0,2M e lavadas com água destilada. Mergulhadas em solução salina 2xSSC, a 50°C , durante 30 minutos, em seguida lavadas com água destilada e secas ao ar. Por fim, foram coradas com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH 6,8 durante 15 minutos.

4.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Hibridização in situ fluorescente – FISH (SCHEMBERGER *et al.* 2016; PINKEL *et al.* 1986, respectivamente)

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizou-se oligonucleotídeos específicos para a amplificação do elemento transponível *Tc1/Mariner* (SCHEMBERGER *et al.* 2016). Em seguida, com posse das sondas de DNA repetitivo após a PCR, as lâminas contendo as preparações cromossômicas foram submetidas a técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), como descrito por Pinkel *et al.* (1986) com algumas modificações. Os cromossomos foram contracorados com o fluorocromo base preferencial DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole – $0,2\ \mu\text{g}/\text{mL}$).

4.3.4 Dupla coloração Iodeto/DAPI (ANDRAS *et al.* 2000)

Diluiu-se DAPI (1 mg/ml) e Iodeto de propídeo (1 mg/ml) em água destilada para concentração final de 10% e 2%, respectivamente; Adicionou-se $6\ \mu\text{L}$ de cada em $200\ \mu\text{L}$ de Antifade originando uma concentração final de $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI e $0,6\ \mu\text{g}/\text{ml}$ IP; Colocou-se cerca

de 50 μ L de solução DAPI/IP, após foi retirado o excesso em papel filtro. A análise foi feita após 15 minutos.

4.3.5 Análises cromossômicas

As preparações cromossômicas foram coradas com coloração convencional (giemsa a 5%) e analisadas em microscópio óptico comum. Análises mais detalhadas, de metáfases consideradas promissoras, foram efetuadas em microscópio de campo claro e epifluorescência Carl Zeiss AxioLab A1, em imersão. As imagens presentes neste estudo, foram capturadas através do software ZEN, por meio da câmera CCD AxioCam ICc 1 de 1,4 megapixel que está acoplada ao microscópio de campo claro e epifluorescência.

A organização e montagem cariotípica, bem como o idiograma, foram realizados por meio do software Photoshop® 7.0. A classificação cromossômica utilizada é a proposta por Green e Sessions (1991) baseada na relação de braços: (RB): braço maior/braço menor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Número diploide e morfologia cromossômica

Na espécie *B. albopunctata* a morfologia cromossômica se deu da seguinte forma: pares 1, 2, 8, 9 e 11 metacêntricos; pares 3, 4, 5, 6, 7 e 10 submetacêntricos (Figura 9). Alguns indivíduos apresentam um cromossomo supranumerário, conhecido como cromossomo B (presente estudo, GRUBER *et al.*, 2014). O cromossomo B se apresenta como metacêntrico, visto que, a presença e frequência deste cromossomo pode variar de forma intra ou interindividual, podendo estar restrita a um tecido e/ou órgão específico (CAMACHO *et al.*, 2000). Este padrão morfológico também pode ser observado nos estudos de (VENÂNCIO-NETO, 2019) e Ferro *et al* (2018) para *B. albopunctata*.

As espécies *B. faber*, *S. fuscovarius* e *T. dibernardoi* evidenciaram um cariótipo com $2n=24$ cromossomos, que como citado anteriormente, é o comum para a família Hylidae. Em *B. faber* os cromossomos apresentaram a seguinte morfologia: cinco pares de cromossomos metacêntricos (1, 2, 8, 10 e 12), cinco pares de submetacêntricos (3, 4, 5, 9 e 11) e dois pares subtelocêntricos (6 e 7) (Figura 9). Em *S. fuscovarius* oito pares cromossômicos se mostraram como metacêntricos (1, 2, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) e os demais pares como submetacêntricos (3, 4, 5 e 6) (Figura 9). Por fim, a espécie *T. dibernardoi* apresentou três classes diferentes de morfologia cromossômica, assim como *B. faber*, onde quatro são metacêntricos (pares 1, 2, 8 e 11), seis são submetacêntricos (pares 4, 5, 7, 9, 10 e 12) e dois são subtelocêntricos (pares 3 e 6) (Figura 9).

Em hilídeos comumente é encontrado o cariótipo com $2n=24$ cromossomos, considerado uma sinapomorfia dentro da família (DUELLMAN, 2001). No grupo *B. albopunctata*, algumas espécies apresentam $2n=24$ cromossomos e outras $2n=22$ cromossomos (FERRO *et al*, 2018). Este grupo é composto por nove espécies, onde *B. alfaroi*, *B. leucocheila*, *B. multifasciata* e *B. albopunctata* apresentam número diploide diferente das demais ($2n=22$ cromossomos). Neste sentido a redução do número diploide para 22 cromossomos não é uma característica geral do grupo (BOGART; BOGART, 1971; BOGART, 1973; FAIVOVICH 2005; FERRO *et al.*, 2018; GRUBER; HADDAD; KASAHARA, 2007).

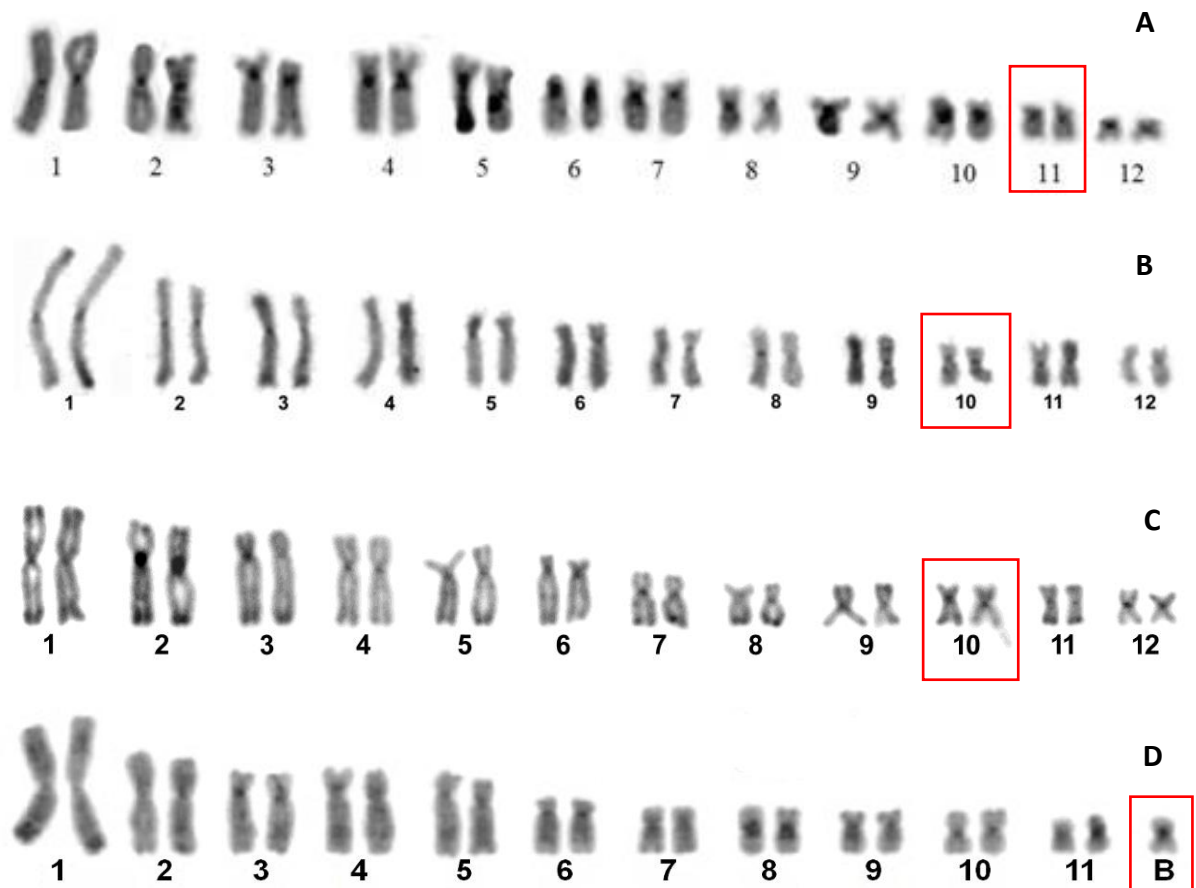
5.2 Heterocromatina constitutiva

Neste estudo, o bandejamento C evidenciou bandas heterocromáticas nos centrômeros, das quatro espécies (Figura 5), porém foi possível identificar padrões espécies específicos: em *B. albopunctata* foram observadas, além das bandas heterocromáticas centroméricas e teloméricas (pares 1 e 2), bandas intersticiais e blocos evidentes em regiões proximais (pares 8 e 9). No cromossomo B a heterocromatina é centromérica com uma extensão heterocromática no braço curto (Figura 5D). Neste sentido, o padrão de bandas de heterocromatina constitutiva deste cariótipo é heterogêneo. A região centromérica é o local de preferência da heterocromatina, uma vez que os centrômeros em sua grande parte são constituídos de heterocromatina (PIERCE, 2011; SCHMID *et al.*, 1990).

Em alguns casos a heterocromatina é um forte aliado na citotaxonomia, como para o gênero *Cycloramphus* (NOLETO *et al.*, 2011). Desta forma, pode vir a ser para o gênero *Boana* também, quando empregado em conjunto com marcadores moleculares. Alguns estudos (FERRO *et al.*, 2018) já utilizam fluorocromos como um marcador molecular interessante na diferenciação da microestrutura cariotípica em anuros. Em *B. faber* foram observadas bandas conspícuas restritas aos centrômeros (Figura 5A); em *S. fuscovarius* além de bandas centroméricas, foram observadas algumas teloméricas (pares 1 e 3) além de bandas intersticiais no par 10 (Figura 5B); já *T. dibernardoi* além de bandas centroméricas destacam-se heterocromatinas teloméricas amplamente distribuídas por alguns pares e bandas intersticiais nos pares 5 e 6 (Figura 5C).

As espécies estudadas aqui demonstraram um padrão considerado conservado de heterocromatina em regiões centroméricas e/ou pericentroméricas em quase todos os pares cromossômicos, além de bandas teloméricas intersticiais e associadas às RONS, características bastante conservadas para anuros hilídeos (ANANIAS; GARCIA; RECCO-PIMENTEL, 2004; CAMPOS *et al.* 2008; MEDEIROS; ROSSA-FERES; RECCO-PIMENTEL, 2003). Em hilídeos, o estado de maior diversidade na distribuição de heterocromatina é considerado um caráter derivado. O padrão heterocromático observado em *T. dibernardoi* pode ser considerado o mais rico do estudo, pela presença de bandas intersticiais e teloméricas, uma vez que a maioria das espécies cariotipadas até então, tem este componente genômico restrito aos centrômeros (MATTOS *et al.*, 2014). Ainda que muitos anfíbios compartilhem uma similaridade na morfologia e no número de cromossomos, pode ocorrer diferença na quantidade, localização e composição da heterocromatina (SCHMID, 1978; SCHMID *et al.*, 1990).

FIGURA 5 - Cariótipos das espécies submetidos à técnica de bandamento C, demonstrando os padrões de heterocromatina constitutiva. (A) *Boana faber*; (B) *Scinax fuscovarius*; (C) *Trachycephalus dibernardoi*; (D) *Boana albopunctata*.



Fonte: a autora

5.3 Fluorocromos base preferenciais

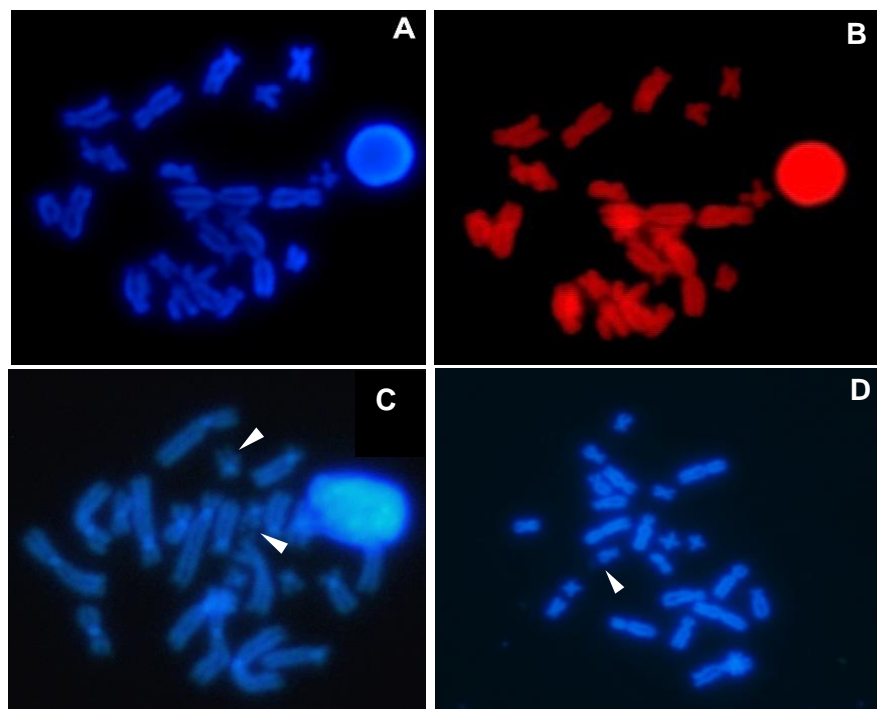
A dupla coloração com fluorocromos base preferenciais DAPI/IP foi resolutiva em evidenciar um padrão distinto de bandas fluorescentes relativo à certas bandas C nas espécies. Enquanto em *Scinax fuscovarius* (Figura 6A, B) não existe riqueza relativa em composição de bases AT/GC, em *Boana faber* (Figura 6C) uma maior compartimentalização da cromatina foi observada, todas as heterocromatinas centroméricas se apresentaram ricas em bases AT enquanto o *locus* das Regiões Organizadoras de Nucléolo (rDNA 45S) se mostrou rico em GC (região DAPI negativa). Em *Trachycephalus dibernardoi* (Figura 6D) apenas o *locus* do rDNA 45S (par 10) se mostrou compartimentalizado em composição GC.

Os genomas nucleares de vertebrados superiores são mosaicos isocóricos (sequências >100 kb homogêneas na sua composição). Por outro lado, genomas de peixes e anfíbios se apresentam desorganizados, geralmente não apresentando, ao longo dos cromossomos, uma riqueza localizada quanto a composição de bases (MEDRANO *et al.*, 1988). Análises com corantes fluorescentes como o Iodeto de Propídeo e o DAPI são capazes de detectar a composição de domínios específicos pela intensidade do sinal fluorescente. Análises fluorescentes com a dupla coloração DAPI/IP tornam-se mais resolutivas quanto a composição de domínios específicos, pois a intensidade do sinal fluorescente é otimizada devido a competição entre os fluorocromos por regiões adjacentes. Em nosso trabalho os fluorocromos (DAPI/IP) base-específicos em *S. fuscovarius*, *B. faber* e *T. dibernardoi* se mostraram interessantes na diferenciação das espécies: *S. fuscovarius* um padrão uniforme foi observado, enquanto que em *B. faber* os centrômeros se mostraram ricos em bases AT frente uma intensidade de sinal maior nestas regiões, assim como no *locus* do rDNA 45S para a composição GC. Este último padrão também foi observado em *T. dibernardoi*, pois o rDNA corresponde a genes *housekeeping*, conhecidos por possuírem constante expressão gênica e alto conteúdo GC flanqueando tais sequências. Fluorocromos base preferenciais como a Mitramicina, Cromomicina A₃ e Iodeto de propídeo são normalmente utilizados para detectar algumas regiões heterocromáticas ricas em GC, como também para evidenciar as RONS, pois estas regiões estão associadas a famílias de DNA ricas em GC na maioria das espécies de peixes (PENDÁS; MORÁN; GARCIA-VÁZQUEZ, 1993).

Não somente dados do presente estudo, mas inúmeros outros trabalhos indicam que grupos cromossômicos em uma dada espécie, geralmente tendem a acumular heterocromatinas com similar tamanho, composição e localização (JOHN *et al.*, 1985). Isto suporta o fato de que mudanças que afetam o conteúdo heterocromático de um genoma não somente atuam de forma equilocal, mas também são claramente não aleatórias. Porém nem todos domínios heterocromáticos que ocupam similar posição sobre cromossomos de uma espécie, concordam em tamanho e/ou composição. Conforme o modelo de Rabl (SCHWEIZER *et al.*, 1987) DNAs repetitivos dentro de uma dada banda C podem ser transferidos para outros sítios equilocais como consequência de uma específica disposição espacial de telômeros, centrômeros e braços cromossômicos no núcleo interfásico. Neste contexto, a partir de um segmento primário rico em AT, a dispersão destas sequências se deu conforme mecanismos de amplificação em concerto, incluindo conversão gênica, recombinação desigual e atividade de elementos de

transposição (DOVER, 2002). Este último pode ter sido o responsável no estabelecimento do padrão de domínios presentes no cariótipo de *Boana faber*.

FIGURA 6 - Colorações com iodeto de propídeo (vermelho) e DAPI (azul). Em *Scinax fuscovarius* (A, B) não existe riqueza relativa em composição de bases AT/GC, enquanto que em *Boana faber* (C) todas as heterocromatinas centroméricas se apresentam ricas em bases AT. As Regiões Organizadoras de Nucléolo são ricas em GC (setas). Em *Trachycephalus dibernardoii* (D) apenas o locus do rDNA 45S se mostrou compartimentalizado em composição GC (seta).



Fonte: a autora

5.4 Tc1-Mariner em *Boana albopunctata*.

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utilizando a sonda do TE *Tc1/Mariner* apresentou marcações dispersas pelos cromossomos e quantitativamente similares, mas os pares 1, 3, 4 e 6 em conjunto com o supranumerário (B) destacaram-se por possuírem quantidade significativa de sinais (Figura 7). A maioria dos TEs, em eucariotos, apresentam-se como cópias não autônomas resultantes de processos degenerativos, quando inativados acumulam mutações e perdem sua identidade. O desenvolvimento, propagação e manutenção de um TE se dá pela invasão do genoma hospedeiro, aumento do seu número de cópias, inativação e eliminação

(KIDWELL; LISCH, 2001), o que pode vir a justificar o padrão disperso observado no cariótipo da espécie em questão. O padrão do TE *Tc1/Mariner* neste estudo apresentou-se como espécie-específico, pois em comparação com o estudo de Venâncio Neto (2019), espécies como *B. faber* e *B. prasina* apresentam sinal reduzido deste elemento, bem como padrões diferentes de localização.

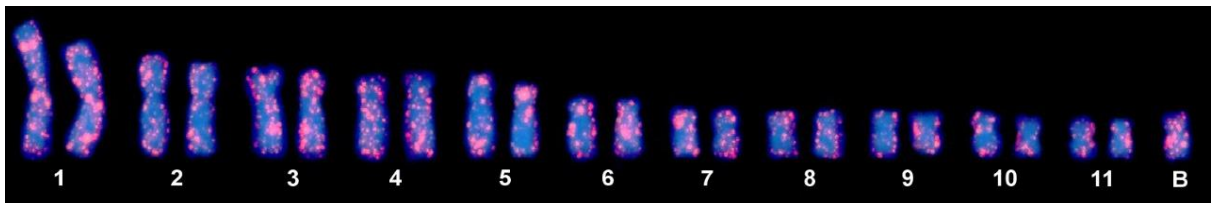
Além disso, algumas regiões apresentaram-se em colocalizadas com porções de heterocromatina constitutiva (Figura 8 e Figura 9). Segundo Lippman *et al* (2004), os TEs tendem a preferir regiões onde a pressão seletiva é menor, mas por outro lado, a inserção dos TEs em regiões de eucromatina favorece o surgimento de mutações, visto que as mesmas são ricas em genes (KIDWELL; LISCH 2000; HUA-VAN *et al.*, 2005). A heterocromatina também é vista como um local de “descanso final dos TEs” já sem função, visto que a frequência de recombinação nessas regiões é baixa ou nem ocorre, fazendo com que os TEs desempenhem um papel importante na estrutura das regiões de heterocromatina (ZATTERA; BRUSCHI, 2022). Isso explica o papel de TEs na evolução de um genoma, pois os mesmos possuem forte impacto na arquitetura genômica, desde mudanças mínimas e pequenas, até uma mudança de grande variação genômica estrutural, com deleções, duplicações, inversões e translocações (SOTERO-CAIO *et al.*, 2017). Ademais, são capazes de quebrar a dupla fita de DNA e conseqüentemente, por algum acaso, levar a rearranjos cromossômicos no momento da transposição (SOTERO-CAIO *et al.*, 2017).

Os elementos Transponíveis são encontrados em grande parte dos genomas eucarióticos e influenciam o mesmo por sua capacidade de mover-se e replicar-se; além disso, são classificados de acordo com o intermédio utilizado durante o processo de transposição: RNA (Classe I ou retrotransposon) e DNA (Classe II ou transposon) (WICKER *et al*, 2007). O TE *Tc1/Mariner* é uma superfamília da Classe II, possui estrutura simples, com duas repetições terminais invertidas (TIRs) e um quadro de leitura aberto da enzima transposase e move-se no genoma pelo mecanismo “corta e cola” (WICKER *et al*, 2007).

TEs podem ser induzidos pelo estresse (SERRATO-CAPUCHINHA; MATUTE, 2018) e mobilizados em respostas a desafios ambientais. Visto que a espécie *B. albopunctata* é comumente encontrada em áreas de bordas florestais, fragmentadas e perturbadas com elevada ação antrópica (LIMA *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2007; MENIN; WALDEZ; LIMA, 2008; TOVAR-RODRÍGUEZ; CHACÓN-ORTIZ; DURÁN, 2009), a transposição do TE pode auxiliar a espécie em se adaptar rapidamente, facilitando a diversidade genética quando

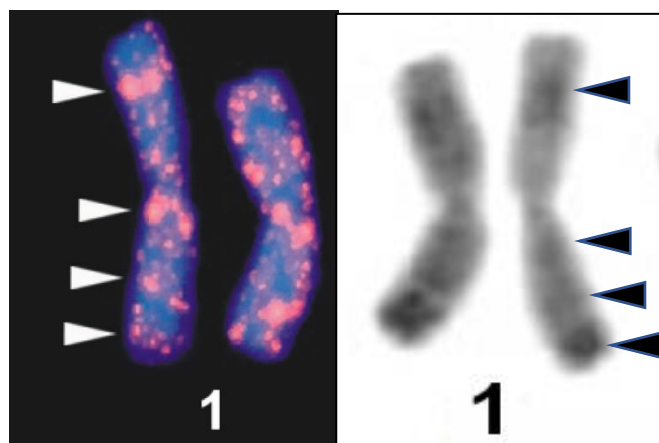
necessário (SERRATO-CAPUCHINHA; MATUTE, 2018). Essa hipótese tem sido apoiada por estudos com diferentes grupos taxonômicos, onde também surgem inferências que a fragmentação florestal ocasionada por ação humana ou catástrofes naturais, pode provocar diferenças cromossômicas numéricas e/ou estruturais em anuros (ZEH; ZEH; ISHIDA, 2009; TAPIA *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2008). As espécies de *B. albopunctata* utilizadas neste estudo, foram coletadas em uma região com elevada ação humana, bem próxima a lavouras em atividade de agricultura, o que pode vir a suportar a hipótese citada anteriormente. No entanto é necessário estudos com espécies de diferentes populações, que habitam ou não regiões com ação antrópica, a fim de evitar inferências erradas sobre o surgimento deste cromossomo.

FIGURA 7 - Cariótipo da espécie *Boana albopunctata* submetido a hibridização *in situ* fluorescente com sonda do TE *Tc1/Mariner*.



Fonte: a autora

FIGURA 8 - Regiões de colocalização entre heterocromatina constitutiva e o TE *Tc1/Mariner* em um dos cromossomos homólogos do par 1 em *Boana albopunctata*.



Fonte: a autora.

5.5 Cromossomo B em *Boana albopunctata*

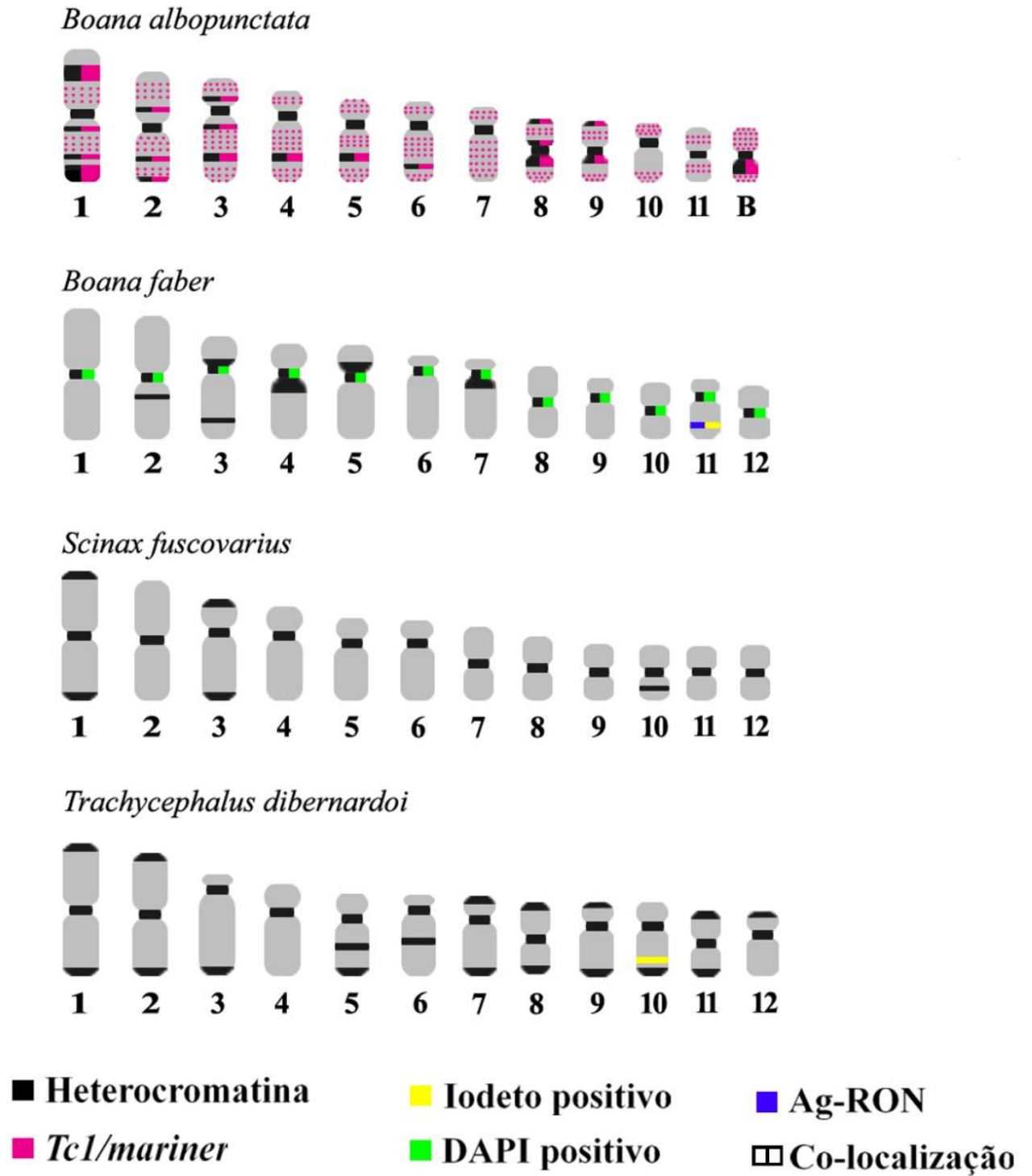
Algumas populações de *B. albopunctata* do Sul e Sudeste do Brasil apresentam em seu cariótipo a presença do cromossomo B, que é um elemento extra em relação ao conjunto cromossômico A (GRUBER; HADDAD; KASAHARA, 2007; GRUBER *et al.*, 2014). São encontrados em cerca de 15% dos eucariotos e foi observado pela primeira vez no milho (*Zea mays*).

Esses cromossomos não obedecem às leis mendelianas (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000) e são objeto de ampla discussão, visto que há diferentes hipóteses sobre seu surgimento em *B. albopunctata*. Em geral, a suposição mais consente sugere que os mesmos surgiram a partir de quebras cromossômicas do complemento A, colocando o cromossomo B como subproduto da evolução do cariótipo padrão (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Uma outra hipótese sugere que acasalamentos interespecíficos pelo processo de hibridização, seria o responsável pelo surgimento do cromossomo B (GRUBER *et al.*, 2014).

Além disso, apresentam comportamento desarmônico durante a divisão celular e natureza predominantemente heterocromática (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). No presente estudo, como já descrito anteriormente, tal cromossomo se demonstrou com heterocromatina centromérica e uma extensão no braço curto, além de quantitativamente superior em sinal do TE *Tc1/Mariner*. Em anfíbios, os cromossomos B são raros, sendo descritos em cerca de 2% do número total de espécies cariotipadas (SCHMID *et al.*, 2010).

Gruber *et al* 2014, realizaram microdissecção do cromossomo B de *B. albopunctata*, com posterior FISH (Hibridização Fluorescente *in situ*), como resultado não houve a homologia entre este cromossomo com os do complemento A. Neste sentido, o fato apoia a ideia de origem interespecífica frente a possível hibridização entre *B. albopunctata* e *B. raniceps*, visto que são espécies simpátricas. Por outro lado, os dados do presente estudo com o TE *Tc1-mariner*, mostram que o cromossomo B compartilha tais sequências com o complemento A, apoiando uma possível origem intraespecífica. Porém, dada a alta frequência deste TE em genomas eucarióticos, a sua presença também no genoma de outra espécie simpátrica, não descartaria a hipótese de origem interespecífica.

FIGURA 9 - Idiogramas mostrando a distribuição de marcadores clássicos e classes de DNA repetitivo nas espécies estudadas.



Fonte: a autora.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda que hilídeos apresentem um número diploide e morfologia de cromossomos conservados, o emprego de diferentes técnicas evidenciam uma composição molecular distinta entre táxons próximos. Além disso é subestimado o uso de somente um marcador cromossômico, uma vez que anuros/hilídeos possuem espécies morfologicamente semelhantes. No presente estudo, os marcadores se mostraram espécie-específico. Novos padrões citogenéticos tendem a emergir, principalmente quando envolvendo diferentes localidades e populações, trazendo evidências para interpretações inéditas a respeito da evolução do grupo. Assim, abordagens complementares envolvendo um maior número de espécies e/ou populações e o mapeamento de classes de DNAs repetitivos, representam novas frentes de pesquisa e darão subsídios para construir cenários mais consistentes da evolução cromossômica em anuros.

O cromossomo B ainda é uma incógnita em *B. albopunctata* e muito se discute sobre sua origem e função, no entanto ainda é necessário estudos adicionais como microdissecção cromossômica e sequenciamento específico do B. Além do uso de diferentes métodos, como GISH (Hibridização *in situ* Genômica), a fim de trazer mais dados que possam preencher lacunas na evolução e origem deste cromossomo. O emprego de fluorocromos base-preferenciais, para identificar a composição molecular das bandas heterocromáticas no cromossomo B, também podem se mostrar interessantes.

Há muito a se pesquisar ainda sobre o gênero *Boana*. Estudos adicionais com TEs em diferentes espécies da família Hylidae devem ser realizados, pois um número maior de espécies e diferentes técnicas citogenéticas, fornecerão um número maior de informações para o entendimento da evolução cromossômica no grupo, onde cada vez mais será contrariada a ideia de cariótipo conservado. Além disso, estudos com TEs, podem auxiliar na compreensão do surgimento do cromossomo B em *B. albopunctata*, já que os mesmos podem ser responsáveis pelo surgimento de variantes cromossômicas.

REFERÊNCIAS

- ANANIAS, F.; GARCIA, P. C.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Hereditas**, v. 140, p. 42-48, 2004.
- AGUIAR PASSOS, M. Herpetolife. São Paulo, 2014. Disponível em: <http://michelpassosherpetolife.blogspot.com/2014/09/scinax-fuscovarius-lutz-1925.html>. Acesso em: 23 fev. 2023
- ANDRAS, S. C. *et al.* Combined PI–DAPI staining (CPD) reveals NOR asymmetry and facilitates karyotyping of plant chromosomes. **Chromosome Research**, v. 8, n. 5, p. 387-391, jul. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1009258719052>. Acesso em: 5 set. 2021
- BALDISSERA JR, F. A; OLIVEIRA, P. S. L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with supernumerary chromosomes. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, n. 2, p. 335- 345, jun. 1993. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/35454>.
- BAGULEY, B. C. Nonintercalative DNA-binding antitumour compounds. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 167-181, apr. 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00223008>. Acesso em: 5 set. 2021.
- BOGART, J. P.; BOGART, J. E. Genetic compatibility experiments between some South American anuran amphibians. **Herpetologica**, v. 27, p. 229-235, 1971.
- BOGART, J. P. Evolution of anuran karyotypes. *Evolutionary Biology of Anurans*. **University of Missouri Press**, v. 3, p. 337-349, 1973.
- BUSIN, C. S. **Estudo citogenético comparativo de *Pseudis minuta* e de *P. aff. minuta* (Anura: Pseudidae)**. Orientadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel. 2000. Tese (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.
- BRUSCHI, P. D. *et al.* Interstitial Telomeric Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights into the karyotypical evolution of neotropical leaf frogs species (Phyllomedusa, Hylidae, Anura). **Mol Cytogenet**, v. 7, p. 1-12. 2014.
- CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **Phil. Trans. R. Soc.**, London, v. 355, p. 163-178. 2000
- CAMINER, M. A.; RON, S. R. Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. **Zookeys**, v. 370, p. 1-68, 2014.
- CAMPOS, J. R. C.; ANANIAS, F.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. Karyotypic similarity among *Barycholos ternetzi* and five species of the genus *Eleutherodactylus* from southeastern Brazil (Anura, Brachycephalidae). **Micron**, v. 39, p. 151-159, feb. 2008.

CARDOZO, D. *et al.* Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae): diversity and informative variation. **Copeia**, v. 2, p. 251-263. jun. 2011. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1643/CH-09-105>. Acesso em: 5 set. 2021.

CARVALHO, F. K.; FERNANDES, A.; BARTH, A.; CUSTÓDIO, R. J. **Tempo ou antropismo como fatores de alterações cromossômicas para uma população de *Hypsiboas raniceps* (Anura: Hylidae) (Cope, 1862)**. Anais do IV Congresso de Iniciação Científica, resumos Tangará da Serra, p. 1-4, 2008

CARVALHO, M. A. **Estudos citogenéticos dos gêneros *Phyllodytes* e *Hypsiboas* (amphibia, anura)**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Jequié – BA, 2012

CATROLI, G. F.; KASAHARA, S. Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives. **Publication UEPG: Biological and Health Science**, Ponta Grossa, v. 15, p. 67–86, 2009.

CAVIEDES-SOLIS, I. W.; KIM, N.; LEACHÉ, Adam D. Species IUCN threat status level increases with elevation: a phylogenetic approach for Neotropical tree frog conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 8, p. 2515-2537, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10531-020-01986-8>. Acesso em: 23 fev. 2023

CHIROL, A. A. COSTA, N. **Biogeografia**. Volume único – Rio de Janeiro: fundação Aciby, 2018.

DOVER, G. A. Molecular drive. **Trends Genet**, v. 18, p. 587-589, nov. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02789-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02789-0). Acesso em: 5 set. 2021

DUBOIS, A. The nomenclatural status of *Hysaplesia*, *Hylaplesia*, *Dendrobates* and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. **Bionomina**, v. 11, p. 1–48, mar. 2017.

DUELLMAN, W. E. Global distribution of amphibians: patterns, conservation and future challenges. In: DUELLMAN, W.E. (Ed.). Patterns of distribution of amphibians: a global perspective. **Baltimore: Johns Hopkins University Press**, v. 1, p. 1-30, 1999.

DUELLMAN, W. E. The hylid frogs of Middle America. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. **Ithaca**, v. 1, p. 1159, 2001.

DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). **Zootaxa**, v. 4140, p. 001-109, 2016.

ECOREGISTROS. 2023. *Trachycephalus dibernardoii* - Folha de espécies. Acedido de <http://www.ecoregistros.org> em 23/02/2023

FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to

Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 29, n. 294, p. 1-240, 2005.

FAIVOVICH, Julian et al. Phylogenetic relationships of the *Boana pulchella* group (Anura: Hylidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 155, p. 106981, 2021.

FERRO, J. M.; CARDOZO, D. E.; SUARÉZ, P.; BOERIS, J. M.; BLASCO-ZÚÑIGA, A.; BARBERO, G.; GOMES, A.; GAZONI, T.; COSTA, W.; NAGAMACHI, C. Y.; RIVERA, M.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; WILEY, J. E.; PIECZARKA, J. C.; HADDAD, C. F. B.; FAIVOVICH, J.; BALDO, D. Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). **Plos One**, v. 13, p. 1-29, 2018.

FOUQUET, A.; MARTINEZ, Q.; ZEIDLER, L.; COURTOIS, E. A.; GAUCHER, P.; BLANC, M. Cryptic diversity in the *Hypsiboas semilineatus* species group (Amphibia, Anura) with the description of a new species from the eastern Guiana Shield. **Zootaxa**, v. 4084, p. 79-104, 2016.

FROST, D.R. **Amphibian Species of the World: on online Reference**. Version 6. American Museum of Natural History, New York, USA, 2022. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/>. Acesso em: 12 set. 2022

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2019/2020, relatório técnico. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2021

GREEN D.M., SESSIONS S.K. Nomenclature for chromosomes. In: Green DM, Sessions SK (Eds) *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. **Academic Press**, San Diego, 431–432, 1991.

GRUBER, S. L.; HADDAD, C. F.; KASAHARA, S. Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to 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, 2007.

GRUBER, S. L.; DINIZ, D.; SOBRINHO-SCUDELER, P. E.; FORESTI, F.; HADDAD, C. F.; KASAHARA, S. Possible interspecific origin of the B chromosome of *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Anura, Hylidae), revealed by microdissection, chromosome painting, and reverse hybridization. **Comparative Cytogenetics**, v. 8, n. 3, p. 185-97, 2014.

HEITZ, E. Das heterochromatin der moose. *Jahrb. Wiss. Bot.*, 69, 762-818, 1928.

HUA-VAN, A.; LE ROUZIC, A.; MAISONHAUTE, C.; CAPY, P.; Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, p. 426-440, 2005.

JOHN, B.; KING, M.; SCHWEIZER, D.; MENDELAK, M. Equilocality of heterochromatin distribution and heterochromatin heterogeneity in acridid grasshoppers. **Chromosoma**, v. 91, p. 185-200, jan. 1985.

KASAHARA, S.; ZAMPIERI SILVA, A. P.; GRUBER, S. L.; HADDAD, C. F. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. **Cytogenetic Genome Research**, v. 103, p. 155-162, 2003

KASAHARA, S. Introdução a pesquisa em citogenética de vertebrados. 1. ed. Ribeirão Preto. S. P.: **Sociedade Brasileira de Genética** – SBG, 2009.

KIDWELL, M. G.; LISH, D. R. Transposable elements and host genome evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, p. 95-99, 2000.

KIDWELL, M. G.; LISH, D. R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution**, v. 55, p. 1-24, 2001.

KÖHLER, J.; KOSCINSKI, D.; PADIAL, J. M.; CHAPARRO, J. C.; HANDFORD, P.; LOUGHEED, S. C.; De la RIVA, I. Systematics of Andean gladiator frogs of the *Hypsiboas pulchellus* species group (Anura, Hylidae). **Zoologica Scripta**, v. 39, p. 572-590, 2010.

LIMA, A. P.; MAGNUSSON, W. E.; MENIN, M.; ERDTMANN, L. K.; RORIGUES, D. J.; KELLER, C.; HÖDL, W. Guia de sapos da reserva Adolpho Ducke. Amazônia Central. **Edição Attema**, v. 1, p. 1-14, 2006.

LIPPMAN, Z.; GENDREL, A. V.; BLACK, M.; VAUGHN, M. W.; DEDHIA, N.; MCCOMBIE, W. R.; LAVINE, K.; MITTAL, V.; MAY, B.; KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C.; DOERGE, R. W.; COLOT, V.; MARTIENSSEN, R. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. **Nature**, v. 430, p. 471-476, 2004.

MAFFEI, F. Anuros de Botucatu. In: **Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP**. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://anurosbtu.wixsite.com/anurosbtu/boana-albopunctata>. Acesso em: 23 fev. 2023

MATTOS, T. L. *et al.* Karyotypic diversity in seven Amazonian anurans in the genus *Hypsiboas* (Family Hylidae). **BMC Genetics**, v. 15, n. 43, p. 1-13. Apr. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-43>. Acesso em: 5 set. 2021.

MANZINI, G., *et al.* Interaction of diamidino-2-phenylindole (DAPI) with natural and synthetic nucleic acids. **Nucleic acids research**, v. 11, n. 24, p. 8861-8876, dec. 1983.

MEDEIROS, L. R.; ROSSA-FERES, D. C.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae), with description of NOR polymorphism in *H. nana*. **Journal of Heredity**, v. 94, n. 2, p. 149-154, mar. 2003.

MEDRANO, L. *et al.* Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. **Chromosoma**, v. 96, n. 2, p. 178-183, jan. 1988.

MENIN, M.; WALDEZ, F.; LIMA, A. P. Temporal variation in the abundance and number of species of frogs in 10.000ha of a forest in central Amazonia, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 3, p. 68-81, 2008.

MIRANDA, A. F. **Bandeamento cromossômico com enzimas de restrição e fluorocromos no gênero Melipona** (Hymenoptera: Apidae). 2004. Tese (Pós graduação em Genética e título de Magister Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/10470>>. Acesso em: 30 mai. 2021.

- MORAES, S.; KNOLL-GELLIDA, A.; ANDRÉ, M.; BARTHE, C.; BABIN, P. J. Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal acyl-CoA oxidase I in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish. **Physiology Genomics**, v. 28, p. 239-252, 2007
- NOLETO, R. B. **Cariótipo e mapeamento cromossômico de sequências repetitivas em peixes marinhos com ênfase em tetraodontiformes do litoral paranaense**. Orientador: Marta Margarete Cestari. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas área de concentração: Genética) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.
- NOLETO, R. B.; AMARO, R. C.; VERDADE, V. K.; CAMPOS, J.R.C.; GALLEGO, L. F. K.; LIMA, A. M. X.; RODRIGUES, M. T.; TOLEDO, L. F. Comparative cytogenetics of eight species of Cycloramphus (Anura, Cycloramphidae). **Zoologischer Anzeiger**, v. 250, p. 205-2014, 2011.
- NUNES, R. R. A.; FAGUNDES, V. Patterns of ribosomal DNA distribution in hylid frogs from the *Hypsiboas faber* and *H. semilineatus* species group. **Genetic Molecular Biology**, v. 31, p. 982-987, 2008.
- PAIVA, C. R. *et al.* Karyotypes and Ag-NORs in *Phyllomedusa camba* De La Riva, 1999 and *P. rhodei* Mertens, 1926 (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae): cytotaxonomic considerations. **Italian Journal of Zoology**, v. 77, p.116–121, 2010.
- PENDAS, A. M.; MORAN, P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 63, n. 2, p. 128-130, 1993.
- PIERCE, B.A. Genética Um Enfoque Conceitual. RJ: **Guanabara Koogan**, 2011.
- PINHEIRO, P. D. P.; KOK, P. J. R.; NOONAN, B. P.; MEANS, D. B.; HADDAD, C. F. B.; FAIVOVICH, J. A new genus of Cophomantini, with comments on the taxonomic status of *Boana liliae* (Anura: Hylidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, [S./ I.], v.185, n.1, p. 226–245, mar./abr. [2018 ou 2019].
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of national Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938. 1986.
- RABER, S. C.; CARVALHO, K. A.; GARCIA, P. C.; VINCIPROVA, G.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). **Phyllomedusa**, v. 3, p. 43-49, 2004.
- REIS, L. P. **Citogenética de espécies do gênero Scinax (Anura: Hylidae)**. Orientadora: Marta Svartman. 2016. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2016. Disponível em: < <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-B7TMCA> >. Acesso em: 03 jul. 2021.
- RIVA TONINI, J. F. **Filogeografia comparada dos anuros endêmicos da Mata Atlântica *Dendropsophus elegans* (Anura, Hylidae) e *Chiasmocleis* spp. (Anura, Microhylidae)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2010.

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

SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; NANDA, I.; EPPLIN, J. T. Chromosome banding in Amphibia. Birkhauser Verlag. **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**, v. 101, p. 21-45, 1990.

SCHMID, M.; BOGART, J. P.; HEDGES, S. B. The chromosomes of Terraranan frogs: Insights into vertebrate cytogenetics. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 1, p. 130-131, 2010

SCHEMBERGER, M. O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C. MOREIRA-FILHO, O.; CESTARI, M. M.; VICARI, M. R. Sequence analyses and chromosomal distribution of the Tc1/Mariner element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). **Gene**, v. 593, p. 308-314, 2016.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. **Chromosoma**. Today, v. 9, p. 61-74, 1987.

SERRATO-CAPUCHINA, Antonio; MATUTE, Daniel R. The role of transposable elements in speciation. **Genes**, v. 9, n. 5, p. 254, 2018.

SOTERO-CAIO, Cibele G. et al. Evolution and diversity of transposable elements in vertebrate genomes. **Genome biology and evolution**, v. 9, n. 1, p. 161-177, 2017.

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

SUMNER, A. T. Chromosome banding. **Unwin Hyman Ltd**, London, 1990.

TAPIA, G. *et al.* Involvement of ethylene in stress-induced expression of the TLC1. 1 retrotransposon from *Lycopersicon chilense* Dun. **Plant Physiology**, v. 138, n. 4, p. 2075-2086, 2005.

TEIXEIRA, L. S. R. *et al.* Comparative cytogenetics of tree frogs of the *Dendropsophus marmoratus* (Laurenti, 1768) group: conserved karyotypes and interstitial telomeric sequences. **Comp Cytogenet**, v. 10, n. 4, p. 753-767, dez. 2016.

TOVAR-RODRÍGUEZ, W. T.; CHACÓN-ORTIZ, A.; DURÁN, R. D. J. Abundancia, disposición espacial e historia natural de *Hypsiboas lanciformis* (Anura: Hylidae) al suroeste 58 de los Andes Venezuelanos. **Revista Académica Colombiana Científica**, v. 127, p. 193-200, 2009.

VENÂNCIO NETO, S. **Estudo cromossômico em espécies do gênero Boana (hylidae, anura): diversidade cariotípica e distribuição de DNAs repetitivos**. Orientador: Viviane Nogaroto Vicari. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas área de concentração: Biologia evolutiva) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2019.

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; SCHULMAN, A. H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 973-982, 2007.

ZATTERA, M.L.; BRUSCHI, D.P. Transposable Elements as a Source of Novel Repetitive DNA in the Eukaryote Genome. **Cells**, 11, 3373, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11213373>. Acesso em:

ZEH, David W.; ZEH, Jeanne A.; ISHIDA, Yoichi. Transposable elements and an epigenetic basis for punctuated equilibria. **Bioessays**, v. 31, n. 7, p. 715-726, 2009.