



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

RICARDO NEVES PEDROSO

**“Estudo citogenético de espécies da subfamília
Paratelmatobiinae (Anura: Leptodactylidae), com foco na
evolução cromossômica do gênero *Crossodactylodes*”**

Campinas

2020

RICARDO NEVES PEDROSO

**“Estudo citogenético de espécies da subfamília
Paratelmatoibiinae (Anura: Leptodactylidae), com foco na
evolução cromossômica do gênero *Crossodactylodes*”**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do Título de Mestre em
Biologia Celular e Estrutural, na Área de
Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO RICARDO
NEVES PEDROSO E ORIENTADA PELA
Dra. LUCIANA BOLSONI LOURENÇO
MORANDINI.

Campinas

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

P343e Pedroso, Ricardo Neves, 1992-
"Estudo citogenético de espécies da subfamília Paratelmatobiinae (Anura: Leptodactylidae), com foco na evolução cromossômica do gênero *Crossodactylodes*" / Ricardo Neves Pedroso. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Luciana Bolsoni Lourenço Morandini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citogenética. 2. Cariótipos. 3. Heterocromatina. 4. DNA satélite. I. Lourenço, Luciana Bolsoni, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: "Cytogenetics of species of Paratelmatobiinae (Anura: Leptodactylidae), with focus on chromosomal evolution in the genus *Crossodactylodes*"

Palavras-chave em inglês:

Cytogenetics

Karyotypes

Heterochromatin

DNA, Satellite

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Kaleb Pretto Gatto

Stenio Eder Vittorazzi

Data de defesa: 18-09-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0616-552X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7106491533613447>

Campinas, 18 de setembro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Prof. Dr. Kaleb Pretto Gatto

Prof. Dr. Stenio Eder Vittorazzi

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa Biologia Celular e Estrutural da Unidade Instituto de Biologia.

Dedico essa dissertação aos meus pais, **João Fermiano Pedroso e Lourdes da Alexandria Neves Pedroso** (*in memoriam*), não há palavras para expressar o amor infinito que sinto por vocês. Agradeço infinitamente por toda dedicação dispensada a mim. Obrigado por acreditarem no meu potencial e estarem sempre juntos comigo. Vocês são os melhores pais que a vida poderia ter me concedido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder sabedoria e força para concluir mais uma etapa importante da minha vida.

À Professora, Dra. Luciana Bolsoni Lourenço, por ter me dado a oportunidade de realizar o mestrado no LabEsC. Sou muito grato por cada ensinamento, paciência e, principalmente, pela dedicação em me orientar com tanta maestria. Obrigado por me permitir crescer pessoalmente e profissionalmente nesse período, levarei seus ensinamentos para vida toda. Você é muito especial.

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP por me proporcionarem inúmeros ensinamentos, os quais me possibilitaram avançar no meu crescimento profissional e pessoal.

À Professora, Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, pelo suporte na realização de estágio no LabEsC.

Ao Dr. Marcus Thadeu Teixeira Santos, pela coleta dos espécimes de *Crossodactylodes*, pela disponibilização do cladograma utilizado no presente estudo e pelo suporte ao longo do desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. Paulo Christiano Anchieta Garcia, pela coleta dos exemplares de *Paratelmatoobius gaigeae*.

Aos meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP: Caio, Melina, Breno, Camila, Marcus e Natália. Obrigado pelos momentos incríveis, suporte e trocas de experiências durante a disciplina de Biologia Celular.

Aos meus amigos Maria Gabriela Ferreira Mulato e Tone Vander Marcilio pelos momentos de conversas, descontrações e companhias no dia a dia. Vocês são incríveis.

À minha amiga, Ana Carolina Carvalho, que esteve comigo desde o cursinho pré-vestibular. Obrigado por me incentivar e compartilhar bons momentos comigo.

Aos meus amigos da época da graduação Guilherme Secotte, Luiz Moraes, João Alencar, Ivan Herrmann, Manoela Macedo, Andrey Fiori, Felipe Santiago, Suraia El Didi, Amanda Pardini, Bruno Cidrão, Edivaldo Martins e em especial ao Matheus Fachine de Azevedo e a Raissa Fernanda Moraes da Silva pela amizade e companheirismo.

À técnica do LabEsC, Alessandra Ferreira da Costa, pelos inúmeros apoios no dia a dia do laboratório e momentos de descontração.

A todos os colegas de laboratório pelo convívio e aprendizado, Renata Oliveira Tenório, Marcos Manfrin, Vitor Oya, Giovanna Frezarine, e em especial a Karin Regina Seger e ao Kaleb Preto Gatto pela paciência em me ensinar e pelos momentos de descontração no laboratório.

Ao meu marido, Gustavo de Souza Almeida, por todos os momentos que esteve ao meu lado, me incentivando e sempre acreditando em mim. Obrigado por ser tão especial nessa fase tão importante.

Aos meus irmãos Édi Carlos Pedroso e Rogério Fernando Pedroso e, especialmente, a minha irmã Marieli Neves Pedroso, que sempre esteve comigo me apoiando e dando o suporte necessário para enfrentar minha jornada até aqui.

À minha sobrinha, Yasmim Neves Vieira, pelo carinho dispensado a mim.

Às professoras Maria Angélica Maciel Martinho Ferreira e Mônica Rosa Bertão, por me apresentarem a Biologia Celular de forma tão apaixonante durante os anos de graduação.

Ao Projeto Bromeligenous pela belíssima pesquisa desenvolvida e apoio durante a coleta de espécimes no Espírito Santo.

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

Resumo

O gênero *Crossodactylodes* pertence à família Leptodactylidae e encontra-se atualmente alocado na subfamília Paratelmatoibiinae, que inclui também os gêneros *Paratelmatobius*, *Rupirana* e *Scythrophrys*. No presente trabalho, análises citogenéticas comparativas mostraram que *C. izecksohni* ($2n=30$), *Crossodactylodes* sp. 3 ($2n=32$) e *C. itambe* ($2n=36$) variam em relação ao número diploide e seus cariótipos divergem daqueles das espécies de *Paratelmatobius* e *Scythrophrys*, as quais possuem cariótipos com 24 cromossomos. Os dados cromossômicos analisados à luz da hipótese filogenética permitiram inferir o aumento progressivo do número diploide ao longo da evolução do gênero *Crossodactylodes*. O mapeamento físico da sequência de DNA satélite PcP190 nos cariótipos de *Crossodactylodes* sp. 3 e *C. itambe* ofereceu evidências da ocorrência de um evento de fissão cêntrica. Blocos de heterocromatina constitutiva foram encontrados predominantemente em regiões centroméricas/pericentroméricas nas três espécies de *Crossodactylodes* analisadas. No entanto, em *Crossodactylodes* sp. 3 o braço curto do cromossomo 3 mostrou um grande bloco heterocromático, que se estendeu do centrômero até a NOR (região organizadora de nucléolo) e, adicionalmente, uma banda intersticial foi observada no braço curto do cromossomo 2. A coloração com o fluorocromo base-específico DAPI mostrou marcações brilhantes em todas as regiões reveladas pelo bandamento C nos cariótipos das três espécies. As NORs em *C. izecksohni* foram localizadas na região pericentromérica no braço curto dos cromossomos 14 e 15, enquanto em *Crossodactylodes* sp. 3, o par 3 apresentou uma NOR distal no braço curto e em *C. itambe*, o par 11 apresentou uma NOR na região pericentromérica no braço curto. Heteromorfismo de tamanho de NOR foi observado em *C. itambe* e em um dos exemplares dessa espécie apenas um dos cromossomos do par 11 é portador de NOR, enquanto seu homólogo exibiu extensa banda heterocromática CMA₃-positiva e DAPI-negativa no braço curto. Em *Crossodactylodes* sp. 3 e *C. itambe*, a hibridação *in situ* de sondas teloméricas detectou sítios nas regiões terminais de todos os cromossomos. O avanço dos estudos citogenéticos em espécies do gênero *Paratelmatobius* permitiu o reconhecimento do número diploide ($2n=24$) em *Pa. gaigeae*. No cariótipo dessa espécie, uma constrição secundária foi observada no braço curto de ambos os homólogos do par 8, coincidentes com as NORs reveladas pelo método Ag-NOR. Bandas de heterocromatina constitutiva foram reveladas flanqueando a NOR e também em todas as regiões centroméricas. Além disso, o braço curto do par de cromossomos 6 mostrou-se totalmente heterocromático. Os novos dados citogenéticos de *Pa. gaigeae* permitiram inferir que o cromossomo 8 portador de NOR é homeólogo ao

cromossomo 10 de *Pa. poecilogaster*, ao cromossomo 9 de *Pa. segallai*, ao cromossomo 7 de *Pa. cardosoi* e ao cromossomo 8 de *Paratelmatoobius* sp. 2 e *Paratelmatoobius* sp. 3. Além disso, foi possível inferir perda de heterocromatina associada a NOR na linhagem que deu origem a *Pa. poecilogaster*. Apesar do avanço no estudo citogenético da subfamília Paratelmatoobiinae, ainda não é possível inferir homeologias cromossômicas entre os cariótipos de *Crossodactylodes*, *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys*.

Abstract

The genus *Crossodactylodes* belongs to the Leptodactylidae family and is currently part of the subfamily Paratelmatoibiinae, which includes also the genera *Paratelmatoibius*, *Rupirana*, and *Scythrophrys*. In the present paper, comparative cytogenetic analysis has shown that *C. izecksohni* ($2n=30$), *Crossodactylodes* sp. 3 ($2n=32$), and *C. itambe* ($2n=36$) vary regarding the diploid number and their karyotypes diverge from those of the *Paratelmatoibius* and *Scythrophrys* species, which have karyotypes with 24 chromosomes. Chromosome data analyzed according to the interspecific phylogenetic relationships previously inferred for the subfamily Paratelmatoibiinae allowed to infer the progressive increase of the diploid number throughout the evolution of the genus *Crossodactylodes*. The physical mapping of the sequence of the satellite DNA PcP190 in the karyotypes of *Crossodactylodes* sp. 3 and *C. itambe* showed evidence of the occurrence of a centric fission event. Constitutive heterochromatin blocks were found predominantly in centromeric/pericentromeric regions in the three analyzed species of *Crossodactylodes*. However, on *Crossodactylodes* sp. 3 the short arm of the chromosome 3 showed a large heterochromatic block, which extended from the centromere to the NOR (nucleolus organizer region) and an interstitial band was observed in the short arm of chromosome 2. The base-specific fluorochrome DAPI showed bright markings in all regions revealed by C-banding on the karyotypes of the three species. The NORs in *C. izecksohni* were located in the pericentromeric region in the short arm of chromosomes 14 and 15. In *Crossodactylodes* sp. 3, chromosome pair 3 carries a distal NOR in the short arm, whereas in *C. itambe*, chromosome pair 11 showed a NOR pericentromerically in the short arm. NOR size heteromorphism was found in *C. itambe* and in one of the specimens of this species only one of the chromosomes of par 11 carried a NOR, while its homologue showed a large CMA₃-positive and DAPI-negative heterochromatic band in the short arm. In *Crossodactylodes* sp. 3 and *C. itambe*, in situ hybridization of telomeric probes detected sites in the terminal regions of all chromosomes. The advance of cytogenetic studies in species of the genus *Paratelmatoibius* allowed the recognition of the diploid number ($2n=24$) in *Pa. gaigeae*. In the karyotype of this species, a secondary constriction was observed in the short arm of both homologues of the pair 8, coinciding with the NORs revealed by the Ag-NOR method. Constitutive heterochromatin bands were revealed around the NOR and in all centromeric regions. In addition, the short arm of chromosome pair 6 proved to be totally heterochromic. The new cytogenetic data of *Pa. gaigeae* allowed inferring that the chromosome 8 which carries the NOR is homeologous to chromosome 10 of *Pa. poecilogaster*, chromosome 9 of *Pa. segallai*, chromosome 7 of *Pa.*

cardosoi and chromosome 8 of *Paratelmatoobius* sp. 2 and *Paratelmatoobius* sp. 3. In addition, it was possible to infer loss of heterochromatin associated to NOR in the lineage that gave origin to *Pa. poecilogaster*. Despite the progress in the cytogenetic study of the subfamily Paratelmatoobiinae, it is still not possible to infer chromosomal homeologies between the karyotypes of *Crossodactylodes*, *Paratelmatoobius* and *Scythrophrys*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. A subfamília Paratelmatoibiinae.....	14
1.2. O gênero <i>Paratelmatoibius</i>	17
1.3. O gênero <i>Crossodactylodes</i>	17
1.4. A citogenética de Paratelmatoibiinae.....	19
1.5. Sequências repetitivas nas comparações cariotípicas.....	21
1.5.1. Sequências teloméricas.....	24
1.5.2. O DNA satélite PcP190.....	25
1.6. Variação cromossômica numérica em anuros.....	28
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	32
2.1. Justificativa e Objetivo Geral do Estudo.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3. RESULTADOS	34
3.1. CAPÍTULO I - Variação cromossômica numérica em espécies do gênero <i>Crossodactylodes</i> (Anura: Leptodactylidae).....	35
3.2. CAPÍTULO II - Análise citogenética de <i>Paratelmatoibius gaigeae</i>	63
4. CONCLUSÕES	71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
6. ANEXOS	93
6.1. Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Bioética.....	94
6.2. Declaração de Direitos Autorais.....	95

1. INTRODUÇÃO

1.1. A subfamília Paratelmatoibiinae

A família Leptodactylidae Werner, 1896 compreende 220 espécies descritas, sendo alvo de diversos estudos que resultam em constante revisão taxonômica do grupo (HEYER, 1975; PYRON & WIENS, 2011; OHLER & DUBOIS, 2012; FOUQUET et al., 2013). Atualmente, essa família está composta por três subfamílias, sendo elas Leiuperinae, Leptodactylinae e Paratelmatoibiinae (ver referências em FROST, 2020).

A subfamília Paratelmatoibiinae foi originalmente reconhecida por PYRON & WIENS (2011) em estudo filogenético que incluiu mais de 2.800 espécies de anfíbios. E foi validada por OHLER & DUBOIS (2012). Atualmente, compreende 14 espécies, distribuídas em 4 gêneros, sendo eles, *Paratelmatoibius* Lutz & Carvalho, 1958, com 7 espécies, os gêneros monotípicos *Scythrophrys* Lynch, 1971 e *Rupirana* Heyer, 1999 e *Crossodactylodes* Cochran, 1938, com 5 espécies (ver referências em FROST, 2020).

Estudos filogenéticos conduzidos com base em sequências de DNA inferiram *Crossodactylodes* como táxon irmão de *Paratelmatoibius*, *Scythrophrys* como táxon irmão do clado composto por *Crossodactylodes* e *Paratelmatoibius*, enquanto *Rupirana* foi inferido como táxon irmão do clado *Crossodactylodes* + *Paratelmatoibius* + *Scythrophrys* (FOUQUET et al., 2013; SANTOS et al., 2020a) (Figura 1). Embora o monofiletismo de Paratelmatoibiinae tenha sido fortemente apoiado (FOUQUET et al., 2013; SANTOS et al., 2020a), suas relações filogenéticas com demais subfamílias de Leptodactylidae permanecem pouco esclarecidas. Leptodactylinae, composta por *Adenomera*, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus* e *Lithodytes* (ver referências em FROST, 2020), foi recuperada como irmã de Paratelmatoibiinae por SANTOS et al. (2020a) (Figura 2A). Alternativamente, Leiuperinae, que inclui *Edalorhina*, *Engystomops*, *Physalaemus*, *Pleurodema* e *Pseudopaludicola*, foi inferida como irmã de Paratelmatoibiinae por PYRON & WIENS (2011) (Figura 2B), enquanto na análise de FOUQUET et al. (2013), Paratelmatoibiinae foi recuperada como irmã Leiuperinae e Leptodactylinae (Figura 2C).

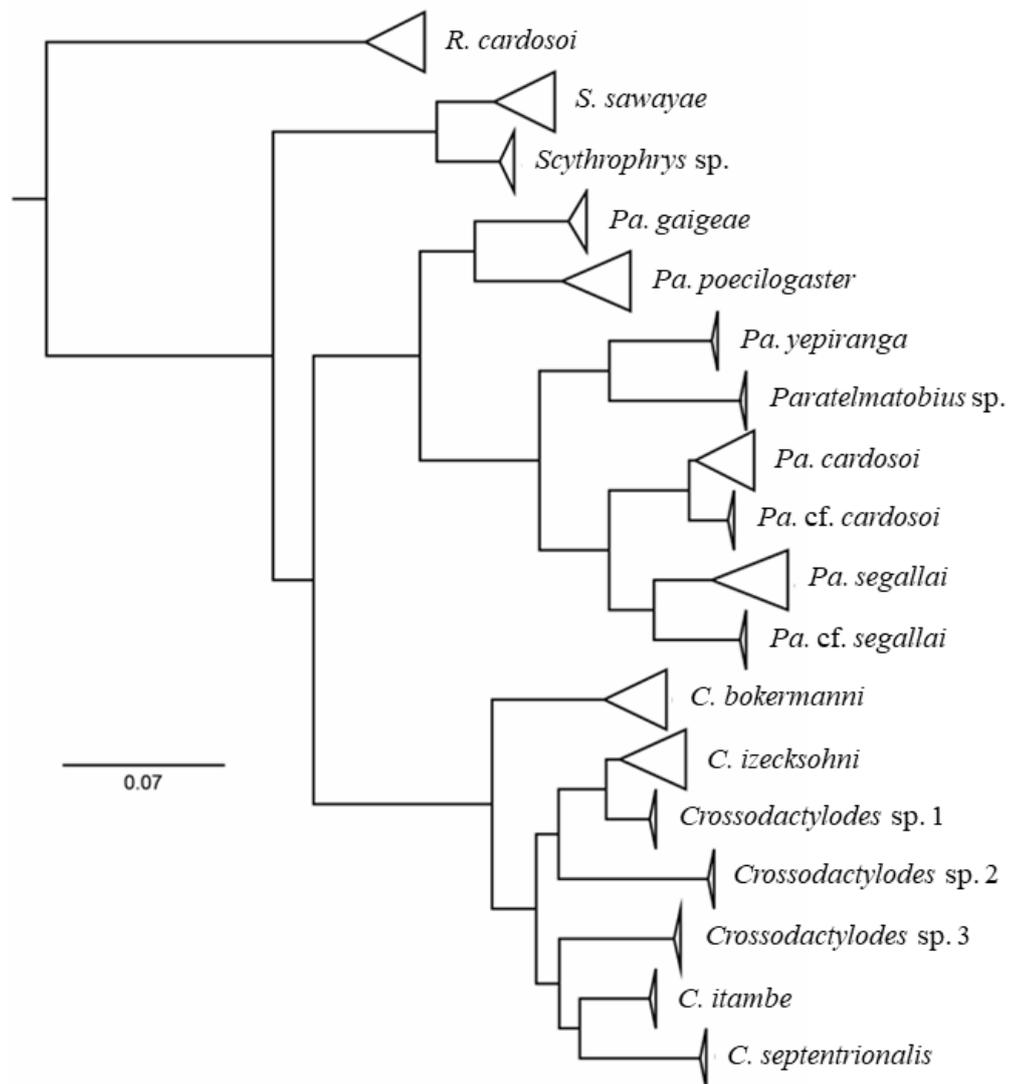


Figura 1: Relações de parentesco na subfamília Paratelmatoibiinae. Cladograma simplificado baseado no artigo de SANTOS et al. (2020a).

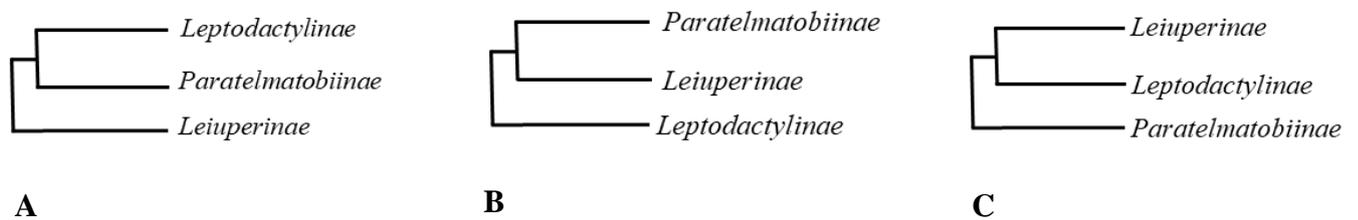


Figura 2: Relações filogenéticas inferidas entre as subfamílias de Leptodactylidae por SANTOS et al. (2020a) (A), PYRON & WIENS (2011) (B) e FOUQUET et al. (2013) (C).

Fundamentados em teste de delimitação de espécie baseado em cladograma gerado a partir de sequências de DNA, SANTOS et al. (2020a) inferiram a presença de 3 novas espécies em *Crossodactylodes*. Embora os autores mencionem que diferenças morfológicas possam ser observadas entre essas espécies candidatas e suas congêneres, tais possíveis espécies novas ainda não foram descritas e são referidas como *Crossodactylodes* sp. 1, *Crossodactylodes* sp. 2 e *Crossodactylodes* sp. 3 (Figura 1). As relações filogenéticas das espécies de *Crossodactylodes* proposta por SANTOS et al. (2020a) (Figura 1), reconheceram o clado composto por *Crossodactylodes* sp. 3 + *C. septentrionalis* + *C. itambe* como táxon irmão de *Crossodactylodes* sp. 2 + *Crossodactylodes* sp. 1 + *C. izecksohni* e, *C. bokermanni* é táxon irmão de ambos os cladros citados anteriormente.

No que diz respeito aos tempos de divergência em *Crossodactylodes*, SANTOS et al. (2020a) inferiram que os eventos de especiação ocorreram do Mioceno tardio até o Plioceno, quando ocorreu a separação entre *C. izecksohni* e *Crossodactylodes* sp. 1. É interessante destacar que a diversificação dentro de *Crossodactylodes* possivelmente tenha sido influenciada pela íntima associação desses anuros com bromélias em áreas montanhosas, de tal forma que as oscilações climáticas juntamente com as mudanças de umidade no espaço e no tempo podem ter interferido nessa história evolutiva (SANTOS et al., 2020a).

Espécies ainda não descritas já foram reconhecidas também para *Paratelmatobius* (SANTOS et al., 2020a) e *Scythrophrys* (LOURENÇO et al., 2003a; SANTOS et al., 2020a), elevando o número de espécies nesses gêneros para 8 e 2, respectivamente. As análises filogenéticas baseadas em sequências de DNA (LOURENÇO et al., 2008; SANTOS et al., 2019, 2020a) apoiam o reconhecimento dos dois grupos de espécies dentro de *Paratelmatobius* originalmente propostos com base em caracteres morfológicos por POMBAL & HADDAD (1999). O grupo *Pa. lutzii* inclui *Pa. lutzii*, *Pa. gaigeae* e *Pa. poecilogaster*. Já o grupo *Pa. cardosoi* é composto pelas espécies *Pa. cardosoi*, *Pa. mantiqueira*, *Pa. yepiranga*, *Pa. segallai* e a espécie candidata (*Paratelmatobius* sp. na Figura 1), inferida como irmã de *Pa. yepiranga*. Das espécies de *Paratelmatobius*, apenas *Pa. lutzii* e *Pa. mantiqueira* não foram incluídas em análises filogenéticas.

1.2. O gênero *Paratelmatobius*

O gênero *Paratelmatobius* Lutz & Carvalho, 1958, é composto por sete espécies de sapos de pequeno porte, além de uma espécie supostamente nova, reconhecida por SANTOS et al. (2020a). Estas espécies são endêmicas da região sudoeste da Mata Atlântica brasileira, presentes em áreas montanhosas da Serra da Bocaina, Serra do Mar e Serra da Mantiqueira (GIARETTA & MAGRINI, 2013). As espécies do gênero geralmente são raras devido a sua distribuição geográfica limitada, com exceção de *Pa. cardosoi* e *Pa. poecilogaster*, encontradas em simpatria por uma área mais extensa (DOMENICO et al., 2014). A espécie *Pa. mantiqueira* era conhecida apenas em sua localidade tipo, município Campos do Jordão, e após 52 anos uma fêmea foi descoberta na serrapilheira, no município de Resende, estado do Rio de Janeiro (VRCIBRADIC et al., 2010). A espécie *Pa. lutzii* permanece desaparecida desde 1978 (DOMENICO et al., 2014).

A espécie *Paratelmatobius gaigeae* é conhecida de duas localidades, localidade tipo, Fazenda Bonito, município de São José do Barreiro, e no município de Bananal, Estação Ecológica do Bananal, ambas localidades na fronteira com o estado do Rio de Janeiro (ZAHER et al., 2005; DOMENICO et al., 2014). A espécie permaneceu desaparecida durante 73 anos e foi redescoberta por ZAHER et al. (2005), município de Bananal, estado de São Paulo.

A descrição da história natural de *Pa. gaigeae* mostrou que a espécie foi encontrada somente em grandes altitudes (1.100 - 1.900 m). Os adultos ativos habitam pequenas poças de água temporárias próximas a riachos no interior de florestas, após fortes chuvas. Além disso, apresenta ovos aquáticos e desenvolvimento em águas lênticas. Os girinos desta espécie são exotróficos (isto é, obtém energia através da ingestão de alimentos do meio externo), habitam lagoas temporárias em florestas e normalmente são encontrados no fundo de pequenos lagos, alimentando-se de detritos das folhas raspando material orgânico, e possuem tamanho aproximado de (25,4 nm) (DOMENICO et al., 2014).

1.3. O gênero *Crossodactylodes*

O gênero *Crossodactylodes* é composto por sapos de pequeno porte e todas as etapas do ciclo de vida estão associadas às bromélias, denominados como bromelígenas (revisão em SANTOS et al., 2020b). Esse gênero apresenta distribuição restrita em áreas montanhosas da Mata Atlântica dos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de

Janeiro, Brasil, além de localização em campos rupestres, áreas em campos abertos cuja vegetação cresce em afloramentos rochosos, habitat conhecido para as espécies *C. itambe* e *Crossodactylodes* sp. 3 (SANTOS et al., 2017; BARATA et al., 2018; FERREIRA et al., 2019). Até o presente momento, são conhecidas cinco espécies do gênero *Crossodactylodes* (ver referências em FROST, 2020), sendo elas *Crossodactylodes pintoii* Cochran, 1938; *Crossodactylodes bokermanni* Peixoto, 1983; *Crossodactylodes izecksohni* Peixoto 1983 “1982”; *Crossodactylodes itambe* Barata, 2013 e *Crossodactylodes septentrionalis* Teixeira, 2013. SANTOS et al. (2020a) incluiu três espécies supostamente novas em seus estudos filogenéticos denominadas de *Crossodactylodes* sp. 1, *Crossodactylodes* sp. 2 e *Crossodactylodes* sp. 3, com localidades conhecidas para os municípios de Castelo-ES, Santa Maria de Jetibá-ES e Itamarandiba-MG, respectivamente.

Entre os vertebrados tetrápodes os anfíbios são conhecidos por serem animais que mais dependem da umidade ambiental e as histórias naturais das diversas espécies são fortemente influenciadas pela distribuição e abundância de água, normalmente na forma de chuva (MCDIARMID, 1994). PEIXOTO (1995) analisou múltiplas espécies de anfíbios anuros na região sudeste do Brasil que utilizam as bromeliáceas durante todo o ciclo de vida (bromelígenas). As bromeliáceas possuem ramos em rosetas produzindo um tanque central, que junto com as suas axilas concentram água e detritos orgânicos formando microambientes.

A família das Bromeliaceae é de extrema importância para manutenção da diversidade biológica (ROCHA et al., 2004). A complexidade da arquitetura das bromélias pode afetar a riqueza e a diversidade de espécies de um ecossistema. Através de uma maior complexidade estrutural do ambiente, ocorre um aumento da quantidade de microhabitats disponíveis (mesmo bromélias como microhabitats). Tais características ambientais permitem que um maior número de organismos encontre condições propícias para sobrevivência (ex. manutenção da umidade, recursos alimentares, refúgios de predadores, parceiros sexuais, entre outros) (LOPEZ et al., 2009).

Estudos sobre história natural são particularmente fundamental para entender as associações entre os organismos e seus ambientes, sendo útil para estudos filogenéticos e estratégias de conservação (GOMEZ-MESTRE et al., 2012; LANTYER-SILVA et al., 2014; SABAGH et al., 2017). Recentemente, numerosos estudos têm sido realizados para compreender a simbiose de anuros com bromélias (LANTYER-SILVA et al., 2014; FERREIRA et al., 2015, 2019; CUNHA & NAPOLI, 2016; MAGESKI et al., 2016; SABAGH et al., 2017). Neste último, foram identificadas 99 espécies de sapos bromelígenas, que utilizam

69 espécies de bromélias como locais de reprodução, entre elas, destacam-se aqueles dos gêneros *Ololygon*, *Phyllodytes*, *Crossodactylodes*, *Fritziana* e *Dendropsophus*. Por exemplo, todas as espécies do gênero *Phyllodytes* são bromelígenas, e a espécie *Phyllodytes luteolus*, utiliza bromélias durante todo seu ciclo de vida, para abrigo, forrageamento e reprodução (FERREIRA et al., 2012; MAGESKI et al., 2016).

As espécies de *Crossodactylodes* completam todo o seu ciclo de vida na água acumulada entre as folhas de bromélias (revisão em SANTOS et al., 2020b). Estudos envolvendo a história natural de espécies de *Crossodactylodes*, mostraram oviposição de fêmeas com pequena quantidade de ovos grandes presos às bromélias em diferentes axilas e os girinos completam seu desenvolvimento na água acumulada nas axilas das folhas (SANTOS et al., 2017; BARATA et al., 2018). Estes últimos estudos, apontam que tal estratégia reprodutiva pode estar relacionada a recursos limitados e baixos níveis de oxigênio presentes nesses microhabitats. A história natural de *Crossodactylodes izecksohni* (FERREIRA et al., 2019), revelou que a espécie apresenta adaptações morfológicas para sobrevivência em bromélias, pequeno porte e corpo comprido dorsoventralmente. A deposição de poucos ovos em bromélias também pode ser observada em espécies dos gêneros *Phyllodytes* e *Scinax*, garantindo as chances de sobrevivência de cada descendente, diminuição de competição por alimento e oxigênio dissolvido na água, além de diminuir a poluição do pequeno habitat aquático com resíduos larvais (ALVES-SILVA & SILVA, 2009; FERREIRA et al., 2012; MAGESKI et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

1.4. A citogenética de Paratelmatoibiinae

A família Leptodactylidae apresenta predominância de cariótipos com $2n=22$ (exemplos em BOGART, 1974; De LUCCA et al., 1974; SILVA et al., 1999, 2004, 2006; AMARO-GHILARDI et al., 2006; LOURENÇO et al., 2006; ARRUDA & MORIELLE-VERSUTE et al., 2008; RON et al., 2010; TARGUETA et al., 2010, 2012; GAZONI et al., 2012; CARDOZO et al., 2016; VITTORAZZI et al., 2016, entre outros). Em contrapartida, números diploides diferentes de 22 são encontrados em algumas espécies dessa família, estando entre elas as espécies de *Paratelmatobius* e *Scythrophrys* já cariotipadas, que apresentam $2n=24$ (LOURENÇO et al., 2000, 2003a, 2003b, 2008). Dentre os leptodactilídeos, o número diploide $2n = 24$ também já foi encontrado em *Adenomera marmorata* (BOGART, 1974; AMARO-GHILARDI et al., 2006) e *Leptodactylus silvanimbus* (AMARO-GHILARDI et al., 2006),

espécies da subfamília Leptodactylinae. Porém, o cariótipo de *A. marmorata* e *L. silvanimbus* diferem muito daqueles encontrados nos gêneros *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys* e a otimização do número diploide nas hipóteses filogenéticas que incluem grande número de espécies de leptodactilídeos (como a de PYRON & WIENS, 2011) sugere que o número diploide $2n=24$ presente em Leptodactylinae e em Paratelmatoobiinae sejam homoplásticos.

Estudos citogenéticos baseados em técnicas citogenéticas convencionais mostraram várias semelhanças entre os cariótipos de *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys* e permitiram o reconhecimento de homeologias entre os cromossomos de diferentes espécies e a inferência de algumas sinapomorfias cromossômicas (LOURENÇO et al., 2008 e referências aí citadas).

O uso da Ag-NOR como marcador cromossômico é bastante útil para o estudo comparativo dos cariótipos, principalmente para espécies que apresentam número diploide e morfologia dos cromossomos semelhantes, como é o caso dos cariótipos descritos para os gêneros *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys*. O cariótipo de *Pa. cardosoi* apresenta uma NOR no braço longo do par cromossômico 7 associada a um grande bloco de heterocromatina (LOURENÇO et al., 2000), enquanto o cariótipo de *Pa. poecilogaster* apresenta os pares 8 e 10 como portadores de NORs (LOURENÇO et al., 2000) e no cariótipo de *Pa. segallai*, espécie anteriormente denominada de *Paratelmatoobius* sp. (aff. *cardosoi*) por LOURENÇO et al. (2003b), a NOR está localizada no braço curto do par de cromossomos 9, adjacente a um bloco de heterocromatina. LOURENÇO et al. (2008) descreveram também o cariótipo de duas espécies possivelmente novas, referidas como *Paratelmatoobius* sp. 2 e *Paratelmatoobius* sp. 3. Em *Paratelmatoobius* sp. 2, uma NOR está presente na região terminal do braço longo do par de cromossomos 4, e outra, na região pericentromérica do braço curto do par 8, adjacente a um extenso bloco heterocromático. Já o cariótipo de *Paratelmatoobius* sp. 3, apresentou a NOR localizada na região pericentromérica do braço longo do par 8. Até o momento, o cariótipo de *Pa. luzzi*, descrito por De LUCCA et al. (1974), possui localização da NOR desconhecida.

No gênero *Scythrophrys*, o cariótipo de *S. sawayae* é distinto daquele apresentado pela espécie candidata *Scythrophrys* sp. (LOURENÇO et al., 2003a). O cariótipo de *S. sawayae* apresenta a NOR próxima ao centrômero do braço curto do par de cromossomos 5, enquanto o cariótipo de *Scythrophrys* sp. tem a NOR na região distal do braço curto do par 10.

A análise comparativa dos cromossomos portadores de NORs presentes nos cariótipos de *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys* à luz das relações filogenéticas interespecíficas permitiu inferir uma hipótese de homeologia entre os cromossomos 10 de *Pa. poecilogaster* e

Scythrophrys sp., o cromossomo 9 de *Pa. segallai*, o cromossomo 8 dos cariótipos de *Paratelmatoobius* sp. 2 e *Paratelmatoobius* sp. 3 e o cromossomo 7 de *Pa. cardosoi*. Segundo tal hipótese, ao longo da evolução desses gêneros, houve acúmulo gradativo de heterocromatina em região adjacente à NOR em questão (LOURENÇO et al., 2008). Também nesse estudo foi possível inferir o aumento gradativo de heterocromatina no cromossomo 1 ao longo da evolução desse grupo.

Até o momento os gêneros *Crossodactylodes* e *Rupirana* não foram analisados citogeneticamente. Diante disso, a análise citogenética de ambos os gêneros é de grande interesse para avaliar se o número diploide $2n=24$ é uma sinapomorfia de toda a subfamília Paratelmatoobiinae e também sobre os possíveis eventos envolvidos na diferenciação cariotípica nessa subfamília.

1.5. Sequências repetitivas nas comparações cariotípicas

O mapeamento cromossômico de famílias gênicas e outras sequências repetitivas tem fornecido valiosos marcadores cromossômicos para comparações citogenéticas. Dentre as famílias gênicas, destacam-se aquelas referentes aos genes ribossomais 45S (ou 40S), constituintes das NORs, e 5S, amplamente empregadas para análises da evolução cariotípica em diversos organismos, inclusive anuros (VITELLI et al., 1982; KING et al., 1990; VITTORAZZI et al., 2011, 2014; BRUSCHI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2015; COELHO et al., 2016; SCHMID et al., 2017).

Dentre os DNA repetitivos não codificadores, duas classes podem ser reconhecidas: aquela de repetições *in tandem* e a dos elementos transponíveis (revisão em RICHARD et al., 2008). As sequências de DNA repetitivas correspondem a uma fração significativa do genoma e muitas delas se encontram em regiões de heterocromatina (revisão em SLAMOVITS & ROSSI, 2002). Segundo alguns autores, a classe de sequências repetidas *in tandem* pode ainda ser subdividida em microssatélite, minissatélite e DNA satélite, de acordo com o comprimento e o número das unidades de repetição (revisão em SLAMOVITS & ROSSI, 2002). O tamanho das unidades de repetição dos microssatélites varia de 1 a 5 pares de base, enquanto no minissatélite a unidade repetitiva tem até 100 pares de base. Para os dois tipos, o número de repetições varia de 10 a 100 (revisão em SLAMOVITS & ROSSI, 2002). Na classe de DNA satélite (satDNA), o tamanho da unidade de repetição pode variar entre centenas a milhares de

pares de base e suas matrizes podem conter milhares de repetições. Os satDNA estão presentes em grande quantidade nos genomas dos eucariotos e essa quantidade varia muito nas diferentes espécies (revisão em GARRIDO-RAMOS, 2017). Em plantas, por exemplo, o DNA satélite pode ocupar entre 0,1 e 36% do genoma, e para o reino animal já foram reportados valores abaixo de 0,5% e até maiores de 50% (revisões em GARRIDO-RAMOS 2015, 2017).

No que diz respeito a evolução, as sequências repetitivas são altamente dinâmicas. Variações em relação ao número de repetições podem ocorrer por deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação, replicação de cópias extracromossômicas seguida de reinserção no genoma e recombinação desigual (CHARLESWORTH et al., 1994).

Em muitas famílias de satDNA, é observada alta homogeneidade intraespecífica das repetições, denotando que sua evolução ocorre de forma não independente. O processo pelo qual ocorre homogeneização e fixação de repetições *in tandem* é denominado “concerted evolution” (DOVER, 1986; revisão em PLOHL et al., 2012). As mutações são homogeneizadas entre membros de uma mesma família repetitiva e concomitantemente fixadas dentro de uma população por processos reprodutivos. Os mecanismos responsáveis por tal homogeneização de sequências são transferências não-recíprocas dentro ou entre cromossomos, como crossing-over desigual, conversão gênica, círculo rolante de replicação e transposição (DOVER, 1982, 1986; revisão em PLOHL et al., 2008).

Diferentes famílias de satDNA podem estar presentes em uma espécie e, geralmente, uma ou algumas famílias predominam em cada espécie. A família alfa-satélite é um exemplo interessante de DNA repetitivo *in tandem* encontrado em abundância na maioria das espécies de primatas estudadas (GREIG et al., 1993; SUJIWATTANARAT et al., 2015). Vale ressaltar que apesar de presentes em quase todos organismos eucariotos, as sequências de satDNA não são altamente conservadas, sendo frequentemente encontradas famílias de satDNA características espécie-específicas (revisão em PLOHL et al., 2008).

Os arranjos de satDNA de comprimentos longos formam blocos e são os principais componentes da heterocromatina encontrada em regiões dos centrômeros e telômeros (revisão em HARTLEY & O’ NEILL, 2019; ROULEUX-BONNIN et al., 1996).

O termo heterocromatina foi originalmente descrito por Emil Heitz para definir regiões do genoma que permanecem visivelmente condensadas durante todo o ciclo celular (transcricionalmente menos ativa), diferenciando-se, assim, da região de eucromatina (transcricionalmente ativa) (revisão em GREWAL & JIA, 2007). Mais tarde, estudos referentes

ao tema permitiram o reconhecimento de DNA repetitivo em regiões cromossômicas heterocromáticas, sendo considerado o componente principal da heterocromatina (GALL et al., 1971; LÓPES-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012). Estudos realizados nas últimas décadas apontaram que o conceito de heterocromatina é muito mais amplo, podendo ser a heterocromatina definida por domínios cromossômicos com estrutura de cromatina alterada, transcricionalmente menos ativos, com frequência de recombinação reduzida e localização em subdomínios específicos (próximos à periferia nuclear, por exemplo), que geralmente apresentam replicação tardia (no final da fase S do ciclo celular) e são ricos em elementos transponíveis e outras sequências repetitivas (revisão em BÜHLER & MOAZED, 2007).

É interessante destacar que a formação e manutenção da heterocromatina depende de alguns fatores, por exemplo, localização do segmento heterocromático no cromossomo e núcleo, além da presença e densidade de DNA repetitivo. Geralmente, há uma predominância de formação de heterocromatina em regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos, regiões denominadas de heterocromatina constitutiva, visto que permanecem compactadas ao longo do ciclo celular e em todas as linhagens celulares. Diferentemente, há regiões da cromatina em que o estado de compactação pode ser alterado em resposta a sinais celulares e atividade gênica. Tais regiões, quando altamente compactadas são conhecidas como regiões de heterocromatina facultativa (revisão em GREWAL & JIA, 2007). Estudos da estrutura e dinâmica da heterocromatina observaram que processos de metilação do DNA, modificações das histonas, repressores transcricionais e RNA de interferência (RNAi) são os principais componentes envolvidos no estabelecimento e manutenção da heterocromatina (revisão em CRAIG, 2004). Além disso, a heterocromatina possui papel fundamental na expressão gênica, e os mecanismos de silenciamento da cromatina estão envolvidos na regulação epigenética dos principais genes reguladores durante o desenvolvimento e diferenciação (revisão em BÜHLER & MOAZED, 2007).

A técnica de bandamento C, amplamente empregada na citogenética comparativa, permite a visualização das regiões de heterocromatina devido à coloração diferencial nos cromossomos, sendo possível determinar a quantidade, o tamanho e a distribuição de bandas heterocromáticas em cada cromossomo. Essas bandas heterocromáticas podem consistir, portanto, em valiosos marcadores citogenéticos, seja no estudo de cromossomos especiais como os cromossomos B (revisão em TARGUETA, 2018 - Capítulo 6; tabela 3), e os cromossomos sexuais (exemplos em ANANIAS et al., 2007; BUSIN et al., 2008; TARGUETA et al., 2010), ou para o reconhecimento de possíveis rearranjos cromossômicos (exemplos em BUSIN et al.,

2001; LOURENÇO et al., 2003b; CARVALHO et al., 2014) e para diferenciação de espécies intimamente relacionadas (exemplos em CATROLI et al., 2011; BALDO et al., 2012).

1.5.1. Sequências teloméricas

Os telômeros são funcionalmente conhecidos por seu papel na estabilidade dos cromossomos, protegendo-os de degradação e recombinação (BLACKBURN, 1991; ZIJLMANS et al., 1997; O’SULLIVAN & KARLSEDER, 2010; BAIRD, 2018). A sequência mais regularmente encontrada nas extremidades dos cromossomos é a sequência repetitiva *in tandem* (TTAGGG)_n. Tais sequências repetitivas são curtas e amplamente conservadas entre os vertebrados, tendo sido originalmente isolada dos cromossomos humanos (MOYZIS et al., 1988; MEYNE et al., 1990).

Durante a evolução cariotípica rearranjos cromossômicos estruturais do tipo fusão, fissão e inversões podem influenciar a estrutura e dinâmica dos telômeros (NANDA et al., 2008). Diversos trabalhos utilizando a técnica de hibridação *in situ* com sondas teloméricas relatam que tais sequências não estão presentes apenas em posições terminais dos cromossomos, mas também podem ser observadas em sítios intersticiais não teloméricos no genoma de algumas espécies (GARAGNA et al., 1997; NANDA et al., 2002; VENTURA et al., 2006; METCALFE et al., 2007; MUDRY et al., 2007; ROVATSOS et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2016, entre outros). Esses sítios de sequências teloméricas intersticiais são conhecidos como ITSs, *Interstitial Telomeric Sites*.

Inicialmente, dois tipos diferentes de ITSs foram reconhecidos por RUIZ-HERRERA et al. (2008), as ITSs heterocromáticas (het-ITSs), que são grandes blocos de sequências teloméricas localizadas principalmente nas regiões de centrômeros, e as ITSs curtas (s-ITSs), localizadas ao longo dos cromossomos. Acredita-se que a origem das het-ITSs seja associada a rearranjos cromossômicos estruturais, como fusão e inversão (FAGUNDES & YONENAGA-YASSUDA, 1998; PAÇO et al., 2013; SUÁREZ et al., 2013; SRIKULNATH et al., 2019). Já as ITSs curtas podem ter sua origem a partir da inserção de repetições teloméricas durante o reparo do DNA (AZZALIN et al., 2001; NERGADZE et al., 2004; BOLZÁN & BIANCHI, 2006). Mais recentemente, o trabalho de SCHMID & STEINLEIN (2016) propôs uma terceira categoria de ITSs, as chamadas ITSs eucromáticas (eu-ITSs), para diferenciar

grandes blocos ITSs que não estão presentes em regiões heterocromáticas e, sim nas regiões de eucromatina.

Diversos trabalhos apontam evidências para presença de repetições teloméricas localizadas em regiões não teloméricas nos cromossomos, e poderiam potencialmente aumentar as taxas de quebras cromossômicas. Tais repetições teloméricas (ITSs) seriam capazes de atuar como substratos favoráveis a quebras cromossômicas e instabilidade genômica (ver revisão de LYN & YAN, 2008). Por essa razão, as repetições teloméricas intersticiais são consideradas como “*hotspots*” para processos de recombinações cromossômicas, e alguns trabalhos já evidenciaram a co-localização de ITS com regiões de rearranjos cromossômicos (ASHLEY & WARD, 1993; DAY et al., 1998; OCALEWICZ, 2013).

O emprego de sonda telomérica e seu uso como marcador citogenético é, portanto, de grande importância no estudo dos cariótipos, visto que pode levar à identificação de rearranjos cromossômicos. O uso dessa sonda já identificou vários rearranjos cromossômicos em cariótipos de vertebrados que apresentaram variação no número diploide (LEE et al., 1993; VERMEESCH et al., 1996; FAGUNDES & YONENAGA-YASSUDA, 1998; SVARTMAN & VIANNA-MORGANTE, 1998; VENTURA et al., 2006; GRUBER et al., 2012b; SUÁREZ et al., 2013). O trabalho realizado por SUÁREZ et al. (2013), por exemplo, sugeriu que a presença de ITSs no par de cromossomos 3 no cariótipo de *Scarthyla goinorum* possa estar associada a eventos de rearranjos cromossômicos do tipo fusão que levaram à redução do número diploide de $2n=24$ para $2n=22$. Em contrapartida, em diversos casos em que variações numéricas estão presentes, as sondas teloméricas detectam apenas as regiões terminais dos cromossomos, (GRUBER et al., 2012; CARDOZO et al., 2016), visto que tais sequências podem ser perdidas depois dos rearranjos cromossômicos envolvendo telômeros terem ocorrido ou mesmo durante tais eventos.

1.5.2. O DNA satélite PcP190

Um satDNA que tem se mostrado muito útil em estudos citogenéticos de anuros é o PcP190 (revisão em TARGUETA et al., 2018). Esse satDNA, originalmente descrito por VITTORAZZI et al. (2011), é derivado do DNAr 5S e já foi encontrado em vários gêneros de anuros, como *Physalaemus*, *Engystomops*, *Pseudis*, *Lysapsus*, *Leptodactylus* e *Crossodactylus* (revisão em TARGUETA et al., 2018; VITTORAZZI et al., 2011, 2014, 2016; GATTO et al.,

2016, 2018, 2019). A sequência repetitiva do PcP190 apresenta cerca de 190 pb, e duas regiões distintas podem ser reconhecidas nas repetições de PcP190, uma denominada de conservada, que corresponde à região transcritora do gene para RNAr 5S, e uma região hipervariável (revisão em TARGUETA et al., 2018; GATTO et al., 2018).

O estudo da sequência nucleotídica do satDNA PcP190 de diferentes anuros permitiu observar grande variação, especialmente em relação à região denominada hipervariável, sendo possível o reconhecimento de diferentes classes de sequências de PcP190 (revisão em TARGUETA et al., 2018; VITTORAZZI et al., 2011, 2014, 2016; GATTO et al., 2016, 2018, 2019). A região hipervariável varia tanto em sequência nucleotídica quanto em tamanho, podendo, inclusive, estar ausente (como na sequência encontrada no gênero *Pseudis* classificada como PcP-7; GATTO et al., 2016, 2018). Enquanto em algumas espécies apenas um tipo de sequência PcP190 foi encontrada (como nas espécies de *Physalaemus*; VITTORAZZI et al., 2011, 2014, 2016.), em outras, como em espécies de *Pseudis*, várias classes de sequências estão presentes (GATTO et al., 2016, 2018). Em *Pseudis tocantis*, por exemplo, 7 classes de sequências PcP190 (sequências PcP-1 a PcP-7) foram reconhecidas, todas elas mapeadas por FISH na região heterocromática do braço longo do cromossomo W (GATTO et al., 2016).

O uso do satDNA PcP190 como marcador cromossômico tem sido muito utilizado no estudo dos cariótipos em anuros (revisão em TARGUETA et al., 2018; VITTORAZZI et al., 2011, 2014, 2016; GATTO et al., 2016, 2018, 2019). No gênero *Physalaemus*, *clusters* de PcP190 foram detectados no cariótipo de *Ph. cuvieri* nas regiões centroméricas dos cromossomos 1-5 (VITTORAZZI et al., 2011), enquanto em *Ph. albifrons* e *Ph. albonotatus* a sonda de PcP190 hibridou em regiões centroméricas/pericentroméricas do par de cromossomos 3 e em *Ph. centralis* revelou *clusters* de PcP190 em regiões centroméricas dos pares cromossômicos 1-5, 8 e 10 (VITTORAZZI et al., 2014). Em *Ph. ephippifer*, o mapeamento físico de PcP190 detectou, além de regiões centroméricas/pericentroméricas do par de cromossomos 3, *clusters* de PcP190 no braço longo dos cromossomos sexuais heteromórficos Z e W, mostrando fortes sinais desse DNA satélite na região pericentromérica do cromossomo W dessa espécie (VITTORAZZI et al., 2014). Os autores sugeriram que o acúmulo de PcP190 no cromossomo W de *Ph. ephippifer* pode ter contribuído para a diferenciação dos cromossomos sexuais nessa espécie.

Em estudos de espécies de *Pseudis*, análises do satDNA PcP190 contribuíram para melhor compreensão da evolução de cromossomos sexuais no gênero (GATTO et al., 2016,

2018, 2019). No cariótipo de *Ps. tocantins*, sondas de PcP190 (PcP-1 a PcP-7) detectaram *clusters* dessas sequências no bloco heterocromático no braço longo do cromossomo W e, devido ao acúmulo de PcP190 nesse cromossomo W, os autores levantaram a hipótese de que o satDNA PcP190 provavelmente estaria envolvido no processo de diferenciação desses cromossomos sexuais (GATTO et al., 2016). Além disso, o mapeamento cromossômico de PcP190 permitiu detectar estágios iniciais de heteromorfismo sexual cromossômico em *Ps. bolbodactyla* (GATTO et al., 2018) e *Pseudis* sp. (uma espécie ainda não descrita; GATTO et al., 2019), em que os cromossomos W diferiram dos cromossomos Z por apresentarem um *cluster* de PcP190 na região precentromérica do braço curto. Nenhum heteromorfismo sexual cromossômico foi encontrado nos cariótipos de *Ps. minuta* e *Ps. paradoxa* e *Ps. cardosoi* (GATTO et al., 2018). Com base nesses estudos, os autores inferiram a ocorrência de uma inversão paracêntrica envolvendo a NOR no ancestral comum das espécies *Ps. bolbodactyla*, *Ps. paradoxa*, *Ps. tocantins* e *Ps. fusca*, levando a NOR de um sítio distal para uma região mais próxima ao centrômero, visto que a localização da NOR em *Ps. minuta*, *Ps. cardosoi* e, quase todas as espécies do gênero *Lysapsus*, estão localizadas em região mais distal (GATTO et al., 2018). Além disso, foi também inferida uma inversão pericêntrica no ancestral comum de *Ps. tocantins*, *Ps. fusca* e *Pseudis* sp., responsável por posicionar a NOR e o *cluster* de PcP190 no mesmo braço cromossômico (GATTO et al., 2019).

No estudo do gênero *Engystomops*, o satDNA PcP190 também foi informativo (TARGUETA et al., 2018). Sondas desse satDNA detectaram uma região pericentromérica no braço curto do par de cromossomos 3 no cariótipo de *En. freibergi*, e dos pares 3 e 5 da espécie *En. petersi* (TARGUETA et al., 2018), corroborando hipóteses de homeologias entre esses cromossomos levantadas em estudos citogenéticos anteriores, realizados por RODRIGUES et al. (2012). Além disso, foi possível inferir homeologia desses cromossomos citados anteriormente com o par de cromossomo 3 de *En. montubio*, *En. randi*, *En. guayaco* e *En. pustulatus*, visto o mapeamento físico de *clusters* de PcP 190 em região pericentromérica no braço curto do par 3 nesses cariótipos. Interessante destacar que as espécies *En. freibergi* e *En. petersi* possuem cromossomos sexuais heteromórficos X e Y e, possivelmente, cromossomos heteromórficos Z e W ocorrem em *En. coloradurum*, porém não foram observados *clusters* de PcP190 nesses cromossomos. Tais resultados indicam que o satDNA PcP190 não desempenhou papel na diferenciação dos cromossomos sexuais nessas espécies de *Engystomops*.

Por fim, podemos destacar que o satDNA PcP190 tem sido encontrado não apenas por mapeamento cromossômico de sondas específicas, mas também na análise da fração de

DNA repetitivo encontrada em bibliotecas genômicas sequenciadas por NGS (next generation sequencing). SILVA et al. (2020) caracterizaram um total de 28 satDNAs no genoma da espécie *Proceratophrys boiei* e a sequência nucleotídica do satDNA denominado de PboSat3-189 é muito semelhante a sequências já caracterizadas anteriormente como pertencentes ao satDNA PcP190 (similaridade média variando de 84% a 90%).

1.6. Variação cromossômica numérica em anuros

Estudos comparativos com base no cariótipo de diferentes espécies se torna útil tanto para a análise de questões de ordem sistemática, como também para o estudo da evolução cromossômica, pois alterações cariotípicas podem revelar sinapomorfias que muito auxiliam na análise da evolução de espécies (exemplos em CAMPOS et al., 2009; TARGUETA et al., 2012; SUÁREZ et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2015; FERRO et al., 2018).

Apesar de diversos grupos de anuros apresentarem número diploide bastante conservado (exemplos em CATROLI et al., 2009, 2011; CARDOZO et al., 2011; BALDO et al., 2012; MEDEIROS et al., 2013), os cariótipos não são estruturas estáveis, sendo suscetíveis de sofrer ao longo do tempo transformações quanto ao número, tamanho e morfologia dos cromossomos. Tais variações cariotípicas, chamadas de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, podem resultar de diferentes eventos, como fusão cromossômica, fissão cromossômica, inversão paracêntrica ou pericêntrica, translocação, ganho ou perda de heterocromatina (exemplos em ANANIAS et al., 2004; GAZONI et al., 2012; MEZZASALMA et al., 2015).

Dentre os trabalhos presentes na literatura que relatam redução do número cromossômico em anuros, destacam-se aqueles dos gêneros *Pseudopaludicola*, *Aplastodiscus* e *Boana*. Em *Pseudopaludicola*, grande diversidade é encontrada em relação ao número diploide, que varia de 16 a 22 (DUARTE et al., 2010; TOLEDO et al., 2010; FÁVERO et al., 2011; VEIGA-MENONCELLO et al., 2014; CARDOZO et al., 2016). Progressiva redução do número diploide foi proposta por VEIGA-MENONCELLO et al. (2014), ao avaliar os dados cariotípicos à luz das relações filogenéticas inferidas para o gênero. Além disso, há evidências de ocorrência de redução múltipla e independente de $2n=22$ para $2n=20$ (CARDOZO et al., 2016). Os cariótipos de *P. boliviana*, *P. ameghini* e *P. ternetzi* apresentam $2n=20$, mas *P. boliviana* é filogeneticamente distante do clado *P. ameghini* + *P. ternetzi* (CARDOZO et al.,

2016). Diante disso, conclui-se que o cariótipo com $2n=20$ observado em *P. boliviana* não compartilha a mesma origem evolutiva daqueles de *P. ameghini* e *P. ternetzi*. As grandes diferenças na morfologia dos cromossomos e no padrão de bandas observadas entre os cariótipos de *P. ameghini* e os de *P. ternetzi* corroboram essa hipótese (CARDOZO et al., 2016).

No gênero *Aplastodiscus*, pertencente à tribo Cophomantini da subfamília Hyliinae (família Hyliidae), *A. perviridis* e *A. cochranae* possuem $2n=24$, enquanto *A. arildae*, *A. ehrhardti*, *A. augenioi* e *A. albofrenatus* possuem $2n=22$ (CARVALHO et al., 2009a, 2009b), *A. albosignatus* e *A. callipygius* apresentam $2n=20$ (CARVALHO et al., 2009b) e *A. leucopygius*, $2n=18$ (CARVALHO et al., 2009b). Com base na análise dos dados citogenéticos à luz das relações filogenéticas em Hyliinae GRUBER et al. (2012a) inferiram que a evolução cromossômica dentro do gênero *Aplastodiscus* ocorreu principalmente pela redução do número diploide a partir de um ancestral com $2n=24$ devido a fusões cromossômicas, confirmando suspeitas levantadas anteriormente por CARVALHO et al. (2009a, b) e GRUBER et al. (2007). GRUBER et al. (2012) também sugerem que dois processos de fusão de pequenos cromossomos (pares 7, 8, 9 e 10) originaram dois novos pares de tamanho grande (pares 6 e 7), como observado nos cariótipos com $2n=20$ de *A. callipygius* e com $2n=18$ de *A. leucopygius*. Sugerem também que tenha ocorrido uma fusão cromossômica envolvendo o pequeno par cromossômico 12 e o par cromossômico grande 3, dando origem ao par cromossômico grande 2, dos cariótipos com $2n=22$ encontrados em *A. arildae* e *A. augenioi*.

Embora a maioria das espécies do gênero *Boana* apresente $2n=24$ (ANANIAS et al., 2004; RABER et al., 2004; GRUBER et al., 2007; NUNES & FAGUNDES, 2008; CARVALHO et al., 2009b; CARVALHO et al., 2014; FERRO et al., 2018), *B. albopunctatus* e *B. lanciformis* apresentam $2n=22$, ocorrendo também indivíduos de *B. albopunctatus* com $2n=23$ devido à presença de cromossomo B (GRUBER et al., 2007; De MATTOS et al., 2014). Os dados citogenéticos abordados por GRUBER et al. (2007) indicam que a origem do cariótipo $2n=22$ presente em *B. albopunctatus* ocorreu através da redução do número diploide de $2n=24$, provavelmente devido a evento de fusão cromossômica, a partir de um cariótipo ancestral semelhante aos cariótipos encontrados em *B. raniceps* e *B. crepitans*. Os autores sugeriram que o cromossomo de tamanho pequeno ausente em *B. albopunctatus*, possivelmente o cromossomo 12 do ancestral, estaria fusionado com o cromossomo 11 portador da NOR levando à origem de um novo cromossomo, provavelmente o cromossomo 8 portador da NOR em *B. albopunctatus*. O padrão de bandas heterocromáticas também sugere homeologia entre o cromossomo 8 de *B. albopunctatus* e o cromossomo 11 das espécies com $2n=24$.

Alternativamente, a hipótese de fusão *in tandem* de pequenos cromossomos também foi levantada (GRUBER et al., 2007).

Embora exemplos de redução do número diploide sejam mais comuns, casos de aumento do número diploide também são encontrados em anuros. Exemplos de fissão cromossômica já foram encontrados em *Hyla*, *Rana*, *Eleutherodactylus*, *Cornufer* e *Pseudis* (COLE, 1974; MIURA et al., 1995; MAHONY et al., 1996; BUSIN et al., 2001; CAMPOS & KASAHARA, 2006). BOGART & HEDGES (1995) descreveram variações cromossômicas numéricas em algumas espécies endêmicas de *Eleutherodactylus* da Jamaica ($2n=24$, 26, 28, 30 e 32) e inferiram algumas homeologias cromossômicas e alguns eventos de fissão envolvidos no aumento do número diploide dentro do gênero. Inferiram, por exemplo, que um cariótipo similar ao de *El. pantoni* ($2n=26$) teria sofrido uma fissão do cromossomo 2, originando um cariótipo similar ao encontrado em *El. pentasyringos* ($2n=28$). Dessa forma, o cromossomo 2 de *El. pantoni* seria homeólogo aos cromossomos 5 e 6 ou aos cromossomos 5 e 8 de *El. pentasyringos*. Já o cromossomo 1 de *El. grabhami* ($2n=30$) foi inferido como homeólogo aos cromossomos 7 e 10 (ou 7 e 9) de *El. sisyphodemus* ($2n=32$), que teriam surgido por meio de um evento de fissão. Os autores enfatizaram, ainda, que as espécies com maior número de cromossomos apresentam grande número de cromossomos telocêntricos. Por exemplo, as espécies *El. nubicola*, *El. orcutti*, *El. griphus* e *El. andrewsi* apresentam número diploide $2n=32$ e possuem 14 pares de cromossomos telocêntricos e apenas 2 pares de cromossomos classificados como metacêntricos ou submetacêntrico. Já as espécies *El. cavernícola*, *El. glaucoreius* e *El. cundalli* possuem número diploide $2n=30$ e exibem 12 pares cromossômicos telocêntricos. Em contrapartida, *El. junori* tem $2n=24$ e possui apenas 5 pares telocêntricos, e *El. gossei* tem $2n=26$ e possui 7 pares de telocêntricos.

No caso do gênero *Pseudis*, os cariótipos descritos de *Ps. paradoxa*, *Ps. bolbodactyla*, *Ps. fusca*, *Ps. tocantins* e *Ps. minuta* possuem $2n=24$, enquanto *Ps. cardosoi* possui $2n=28$ (BUSIN et al., 2001, 2008). BUSIN et al. (2001) apontaram que devido ao fato da presença de 4 cromossomos telocêntricos encontrados no cariótipo de *Ps. cardosoi*, possivelmente eventos de fissão cêntrica estariam envolvidos na origem desse cariótipo. Esses autores sugerem que eventos de fissão cêntrica em pares cromossômicos similares aos pares 1 e 4 dos cariótipos com $2n=24$ deram origem aos pares cromossômicos telocêntricos 6, 7, 8 e 9 presentes no cariótipo $2n=28$.

Além dos casos de aumento do número diploide resultante de fissão cromossômica, também são observados em anuros casos em que o número de cromossomos é maior pela

presença de cromossomos B ou por poliploidização. Cromossomos B ou supranumerários já foram reportados para diversas espécies de anuros (revisão em TARGUETA, 2018 - Capítulo 6; tabela 3) e são, geralmente, menores e morfologicamente distintos dos cromossomos regulares e ricos em heterocromatina constitutiva (revisão em TARGUETA, 2018).

Relatos da ocorrência de variação cromossômica por processos de poliploidização já foram apresentados por diferentes autores e destacam-se aqueles dos gêneros *Odontophrynus*, *Ceratophrys*, *Pleurodema* e *Xenopus* (revisão em SCHMID et al., 2015 e referências aí citadas). Estudos dos cariótipos de *O. americanus* presentes em populações do Uruguai, Argentina e Brasil evidenciaram que a espécie possui cariótipos diploides $2n=22$ e tetraploides $4n=44$. É interessante destacar que *O. americanus* é considerado um complexo de espécies que contém espécies diploides e tetraploides, dificilmente diferenciadas por caracteres morfológicos (ROCHA et al., 2017). Dentre as espécies diploides são encontradas as espécies alopátricas *O. cordobae*, *O. lavillai*, *O. maisuma*, enquanto a espécie tetraploide *O. americanus* apresenta ampla distribuição geográfica (revisão em ROSSET et al., 2006). Segundo (ROSSET et al., 2006), possivelmente múltiplos eventos de poliploidização tenham ocorrido em *Odontophrynus*, o que torna o número de espécies poliploides nesse gênero uma questão ainda em aberto. No gênero *Ceratophrys*, foram encontradas espécies octaploides $8n=104$, sendo representadas por *C. aurita*, *C. ornata* e *C. joazeirensis* (BEÇAK et al., 1967; SCHMID et al., 1985; VIEIRA et al., 2006). Em *Pleurodema*, foram relatados cariótipos tanto tetraploides $4n=44$, por exemplo, nas espécies *Pl. kriegi* e *Pl. bibroni*, como octaploides $8n=88$ em *Pl. cordobae* (revisão em SCHMID et al., 2015; VALETTI et al., 2009). Diversos eventos de poliploidização ocorreram durante a evolução cromossômica em *Xenopus*, e uma diversidade de cariótipos poliploides foram caracterizados, desde cariótipos tetraploides com $4n=36$ e $4n=40$, por exemplo, presentes nas espécies *X. laevis* e *X. epitropicalis*, respectivamente, além de cariótipos octaploides $8n=72$ em *X. amieti*, e dodecaploides $12n=108$ na espécie *X. longipes* (revisões em KRYLOV & TEREZA, 2015; SCHMID et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1. Justificativa e Objetivo Geral do Estudo

Até o momento, informações citogenéticas estão disponíveis para dois dos quatro gêneros alocados na subfamília Paratelmatoibiinae. Embora interessante variação cariotípica tenha sido encontrada dentre as espécies de *Paratelmatoibius* e *Scythrophrys* (LOURENÇO et al., 2008 e referências aí citadas), todos os cariótipos já descritos para esses gêneros apresentaram $2n=24$, diferindo da grande maioria das espécies de Leptodactylidae, conforme destacado nos itens anteriores. Permanece desconhecido, no entanto, o número diploide em *Crossodactylodes*, gênero irmão de *Paratelmatoibius*, e em *Rupirana*, gênero irmão do clado que reúne os demais Paratelmatoibiinae.

Apesar da conservação no número diploide, as espécies de *Paratelmatoibius* apresentam interessantes diferenças relativas ao padrão de distribuição de heterocromatina e de NORs (LOURENÇO et al., 2008 e referências aí citadas). Dentre as espécies pertencentes ao grupo *Pa. cardosoi* já foram caracterizados 4 cariótipos distintos representados pelas espécies *Pa. cardosoi*, *Pa. segallai*, *Paratelmatoibius* sp. 2 e *Paratelmatoibius* sp. 3, enquanto para o grupo *Pa. lutzii* informações citogenéticas mais detalhadas estão disponíveis apenas para *Pa. poecilogaster*.

Nesse cenário, o objetivo deste estudo foi descrever cariótipos de espécies do gênero *Crossodactylodes* e avançar na caracterização de cariótipos do gênero *Paratelmatoibius*, buscando informações que possam contribuir para a análise da evolução cromossômica da subfamília Paratelmatoibiinae.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever os cariótipos de 3 espécies de *Crossodactylodes*, caracterizando morfologicamente os cromossomos e o padrão de distribuição de heterocromatina, de NORs, do satDNA PcP190 e repetições teloméricas nos cariótipos das espécies de *Crossodactylodes*.
- Descrever o cariótipo de *Paratelmatoibius gaigeae*, espécie pertencente ao grupo *Pa. lutzii*.
- Analisar os dados cariotípicos à luz de inferências filogenéticas disponíveis para a subfamília Paratelmatoibiinae.

3. RESULTADOS

As análises realizadas estão apresentadas a seguir, compondo dois capítulos. O **Capítulo I** se refere ao estudo citogenético de *Crossodactylodes* e o **Capítulo II**, ao estudo citogenético de *Paratelmatoobius gageae*.

3.1. CAPÍTULO I - Variação cromossômica numérica em espécies do gênero *Crossodactylodes* (Anura: Leptodactylidae).

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes

Foram analisados seis espécimes de *Crossodactylodes izeckshoni*, seis de *C. itambe* e oito exemplares de uma espécie de *Crossodactylodes* ainda não descrita (Figura 3), referida como *Crossodactylodes* sp. 3 em SANTOS et al. (2020a) (Tabela I). A captura e a identificação dos animais contaram com a colaboração do especialista Marcus Thadeu Santos. As coletas dos exemplares foram realizadas sob a autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (ICMBio/SISBIO) (processo # 32483).

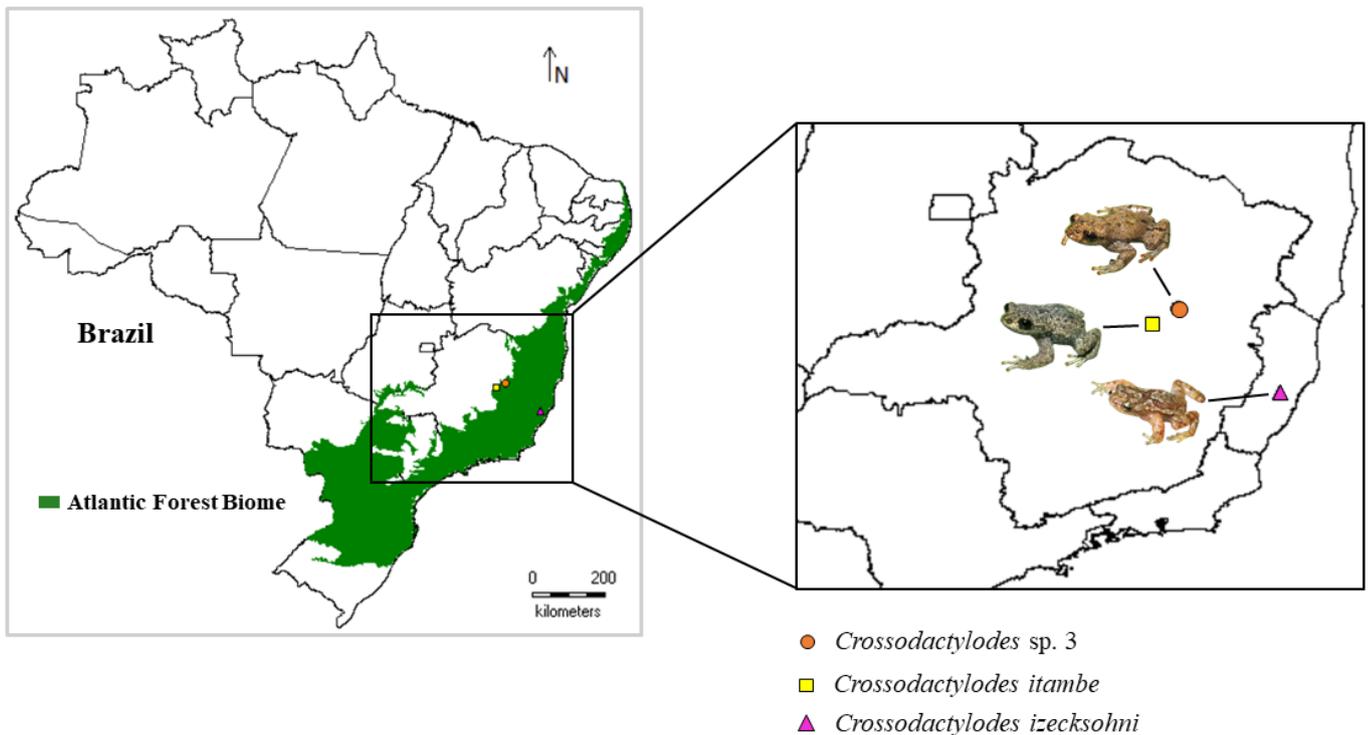


Figura 3: Distribuição geográfica das espécies cariotipadas de *Crossodactylodes* no presente estudo (com base em SANTOS et al., 2020a).

Obtenção das preparações cromossômicas

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de suspensões de células do intestino e do testículo de animais tratados com colchicina. O tratamento “in vivo” com colchicina foi efetuado através da injeção subcutânea de solução de colchicina a 2% (0,02 ml de solução por grama do animal), realizada no mínimo 4 horas antes da anestesia do animal para a remoção dos órgãos. Os animais foram anestesiados com lidocaína a 2% (50 mg/g de peso do animal – administração cutânea) e o intestino e os testículos foram removidos. A obtenção de preparações cromossômicas a partir de intestino seguiu o método descrito por KING & ROFE (1976), com as modificações de GATTO et al. (2018). Logo após a remoção, o intestino foi aberto com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, para a exposição do epitélio, e colocado em recipiente contendo citrato de sódio a 0,9%, onde permaneceu por 45 minutos. Em seguida, o intestino foi transferido para uma placa de Petri com metanol-ácido acético (3:1) e seu epitélio raspado. O material obtido foi desagregado com o auxílio de pipeta Pasteur e mantido no fixador por mais 5 minutos.

Os testículos removidos dos espécimes foram submersos em água gelada. Após aproximadamente 15 minutos, os testículos foram fixados em metanol-ácido acético (3:1). Nessa solução, os testículos foram recortados com auxílio de uma tesoura cirúrgica.

Tanto os materiais obtidos de intestino como os de testículo foram centrifugados a 800 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspendidos em metanol-ácido acético (3:1). Essa operação foi repetida duas vezes. As suspensões celulares foram gotejadas em lâminas limpas e armazenadas a uma temperatura de 4° C.

O protocolo descrito foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (protocolo # 5041-1/2018).

Tabela I. Identificação dos espécimes analisados. SMRP: Coleção citogenética e de tecidos “Shirlei Maria Recco Pimentel”, depositada no LabEsC da UNICAMP.

Identificação dos espécimes	Espécies	Sexo	Localização
SMRP 446.1	<i>Crossodactylodes izecksohni</i>	F	Santa Teresa/ES
SMRP 446.2	<i>C. izecksohni</i>	M	Santa Teresa/ES
SMRP 446.8	<i>C. izecksohni</i>	M	Santa Teresa/ES
SMRP 446.9	<i>C. izecksohni</i>	M	Santa Teresa/ES
SMRP 446.10	<i>C. izecksohni</i>	M	Santa Teresa/ES
SMRP446.11	<i>C. izecksohni</i>	M	Santa Teresa/ES
SMRP 447.11	<i>Crossodactylodes itambe</i>	F	P. E Pico do Itambé – Santo Antônio do Itambé/MG
SMRP 447.12	<i>C. itambe</i>	M	P. E Pico do Itambé – Santo Antônio do Itambé/MG
SMRP 447.13	<i>C. itambe</i>	F	P. E Pico do Itambé – Santo Antônio do Itambé/MG
SMRP 447.14	<i>C. itambe</i>	M	P. E Pico do Itambé – Santo Antônio do Itambé/MG
SMRP 447.15	<i>C. itambe</i>	J	P. E Pico do Itambé – Santo Antônio do Itambé/MG
SMRP 447.16	<i>C. itambe</i>	M	P. E Pico do Itambé – Santo Antônio do Itambé/MG
SMRP 533.1	<i>Crossodactylodes</i> sp. 3	M	P. E da Serra Negra – Itamarandiba/MG
SMRP 533.2	<i>Crossodactylodes</i> sp. 3	F	P. E da Serra Negra – Itamarandiba/MG
SMRP 533.3	<i>Crossodactylodes</i> sp. 3	F	P. E da Serra Negra – Itamarandiba/MG
SMRP 533.4	<i>Crossodactylodes</i> sp. 3	M	P. E da Serra Negra – Itamarandiba/MG
SMRP 533.5	<i>Crossodactylodes</i> sp. 3	F	P. E da Serra Negra – Itamarandiba/MG
SMRP 533.6	<i>Crossodactylodes</i> sp. 3	M	P. E da Serra Negra – Itamarandiba/MG
SMRP 533.7	<i>Crossodactylodes</i> sp. 3	J	P. E da Serra Negra – Itamarandiba/MG
SMRP 533.8	<i>Crossodactylodes</i> sp. 3	F	P. E da Serra Negra – Itamarandiba/MG

F: fêmea; M: macho; J: juvenil.

Colorações e bandamentos cromossômicos

As preparações cromossômicas foram submetidas sequencialmente a coloração convencional com Giemsa, bandamento C, coloração com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole), coloração com cromomicina A₃ (CMA₃) e impregnação por prata.

Para coloração convencional dos cromossomos, as preparações cromossômicas foram expostas a solução de Giemsa 10% por 10 minutos. Para a detecção das regiões heterocromáticas, as preparações cromossômicas foram submetidas à técnica de bandamento C descrita por SUMNER (1972), com as modificações de SIQUEIRA et al. (2008). O material foi tratado com ácido acético 50% por 10 minutos, incubado em ácido clorídrico (HCl) 0,2N à temperatura ambiente por 30 minutos, lavado com água destilada e posteriormente incubado por aproximadamente 28 segundos a 60° C em hidróxido de bário (Ba(OH)₂) a 5%. O tratamento com o hidróxido de bário foi interrompido com a imersão rápida das lâminas em solução de HCl 0,2 N à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas em solução de 2xSSC a 60° C por 45 minutos e, em seguida, lavadas em água destilada e coradas com Giemsa 10 %.

Preparações cromossômicas submetidas ao bandamento C foram coradas com os fluorocromos DAPI (0,5 µg/mL) e CMA₃ (0,5 mg/mL), por 15 e 60 minutos, respectivamente. As lâminas submetidas a coloração com fluorocromos foram analisadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX-60.

A impregnação por prata, realizada para detecção das NORs, seguiu o método Ag-NOR proposto por HOWELL e BLACK (1980).

Para a construção dos kariogramas, 6 metáfases de cada espécie foram medidas com o auxílio do *software* ImageJ 1.52a. A razão entre os braços longo/curto foi utilizada como critério para a classificação morfológica dos cromossomos, seguindo os parâmetros propostos por GREEN e SESSION (1991).

Isolamento e sequenciamento de DNA satélite PcP190

Sequências do satDNA PcP190 foram isoladas do exemplar SMRP 533.7 de *Crossodactylodes* sp. 3. Para tanto, amostras de DNA genômico foram obtidas de

fragmento de fígado removido do animal anestesiado com lidocaína (como descrito acima), seguindo o método com TNES utilizado por MEDEIROS et al. (2013). O fragmento de fígado foi macerado em solução tampão TNES 1X (50 mM de Tris-HCl pH 7,5; 400 mM de NaCl; 20 mM de EDTA; 0,5% de SDS). Posteriormente, foi adicionado proteinase K (100 µg/mL). Após incubação das amostras por aproximadamente 3 horas a 55° C, foi acrescentado NaCl 5 M. O DNA foi precipitado em álcool isopropílico, lavado em etanol (70%) e, por fim, ressuscitado em TE (10 mM Tris-HCl pH8,0; 1mM EDTA pH 8,0) e armazenado a -20° C. Para análise da integridade e quantidade do DNA genômico obtido, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 0,8% e espectrofotometria.

Para o isolamento de sequência da família de DNA satélite PcP190, foi realizada a técnica de PCR utilizando os primers P190F (AGACTGGCTGGGAATCCCAG) e P190R (AGCTGCTGCGATCTGACAAGG), descritos por VITTORAZZI et al. (2011). O programa de PCR utilizado iniciava-se com uma etapa de 10 minutos a 94° C, seguida por 39 ciclos compostos por uma etapa de 30 segundos a 94° C, uma etapa de 1 minuto a 58° C e uma de 1 minuto a 72° C, e finalizava com uma etapa de 6 minutos a 72° C. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% e, posteriormente, purificados utilizando o KIT Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega), conforme as recomendações do fabricante.

Os fragmentos de DNA purificados foram sequenciados pelo método de interrupção da replicação pela incorporação de ddNTP conjugados a fluorocromos. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador com o auxílio do Kit BigDye Terminator (Applied Biosystems), seguindo instruções do fabricante.

Os produtos gerados pela reação de sequenciamento foram purificados por meio de precipitação do DNA em etanol (80%), centrifugados a 15.000 rpm por 30 minutos e lavados em etanol 70%. Depois de secos, os precipitados foram enviados para o serviço de sequenciamento de DNA da empresa Myleus Facility em Belo Horizonte-MG. As sequências de DNA foram editadas através dos *softwares* Geneious v.8.1.3 e Bioedit e comparadas com sequências depositadas no *GenBank*.

Obtenção das sondas de DNAr 28S, DNA satélite PcP190 e teloméricas

Foi usada a sonda telomérica (CCCTAA)₃ - PNA-Peptid Nucleic Acid TelC-Cy3 - PNA Bio Inc, marcada diretamente com Cy3-dUTP, para localizar sequências teloméricas nos cromossomos das espécies de *Crossodactylodes* em estudo.

As sondas de DNAr 28S e de PcP190 foram geradas a partir de amplificação por PCR, na presença de dUTP-digoxigenina (Roche), de fragmentos de DNAr 28S previamente isolados de *Phyllomedusa hypochondrialis* (BRUSCHI et al., 2012) e de sequências PcP190 isoladas de *Crossodactylodes* conforme descrito no item anterior. Após essa reação, as sondas foram precipitadas na presença de DNA de esperma de salmão sonificado (10 mg/mL), acetato de sódio 3M, pH 5.4, e etanol (100%). O DNA isolado foi lavado em etanol 70% e ressuspendido em solução de hibridação (formamida 50%, 20xSSC e dextran sulfato 50%).

Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Para hibridação das sondas com os cromossomos e lavagem do excesso de sondas, seguimos o protocolo descrito por VIEGAS-PÉQUIGNOT (1992), brevemente descrito a seguir. As preparações cromossômicas foram incubadas em 150 µl de RNase (100 µg/ml) a 37° C por 1 hora em câmara úmida. Após passagem em três banhos consecutivos de três minutos cada em solução de 2xSSC, as preparações cromossômicas foram desidratadas em série alcoólica (etanol 50%, 75% e 100%) à temperatura ambiente. Para desnaturação do DNA cromossômico, as lâminas foram incubadas em formamida 70 % diluída em 2xSSC a 70° C, em torno de 2 minutos. Em seguida, foram desidratadas em série alcoólica gelada (etanol 50%, 75% e 100%), em banhos de cerca de 2 minutos cada.

Concomitantemente à etapa de desnaturação e desidratação das preparações cromossômicas, a sonda em meio de hibridação foi desnaturada a 96° C em banho-seco por 10 minutos (o volume final das sondas diluídas em meio de hibridação utilizado em cada lâmina foi de 10 µL). Após isso, a sonda foi aplicada sobre as preparações cromossômicas, cobertas com lamínulas de plástico e mantidas a 37° C, por cerca de 48 horas, em câmara úmida.

Transcorrido o tempo de hibridação, as lâminas foram submetidas a dois banhos sequenciais em solução de lavagem (formamida 50% em 2xSSC) a 37° C (cerca de 2 minutos em cada banho) e, em seguida, a dois banhos de 2xSSC a 37° C. Após essa etapa, as lâminas foram incubadas em dois banhos consecutivos de cinco minutos em PBT (PBS 1X pH 7.4 (NaCl 130 mM, Na₂HPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄ 3 mM); BSA 0,4% e Tween 20 0,1%).

Para a detecção das sondas marcadas com digoxigenina (sondas do DNAr 28S e do satDNA PcP190), foi adicionado o volume de 150 µl de anticorpo anti-digoxigenina acoplados a rodamina (Roche) sobre as preparações cromossômicas. Após 45 minutos, as lâminas foram lavadas em um banho de PBT, por 5 minutos, cobertas com solução de DAPI (0,5 µg/mL) em Vectashield (Vector), analisadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX-60. As imagens foram capturadas pelo software Q Capture v. 2.9.13, editadas com auxílio dos programas Image-Pro Plus v. 4.0 e ImageJ (versão 1.52a).

Inferência dos números diploides ancestrais em Paratelmatoibiinae

Para inferência dos números cromossômicos ancestrais na subfamília Paratelmatoibiinae, foi utilizado o *software* ChromoEvol (MAYROSE et al., 2010; GLICK & MAYROSE, 2014). Dois arquivos de entrada foram necessários para execução da análise, um contendo a árvore filogenética no formato Newick e outro contendo os números haploides para cada terminal presente na árvore filogenética de entrada. A árvore filogenética utilizada foi aquela inferida por SANTOS et al. (2020a), utilizando análise Bayesiana.

O modelo “BASE_NUM_DUPL” foi escolhido pelo *software* ChromEvol como o que melhor se adequa aos nossos dados. A árvore com a reconstrução de números cromossômicos foi editada no *software* FigTree.

RESULTADOS

Constituição cariotípica

As três espécies em estudo do gênero *Crossodactylodes* variam em relação ao número diploide. O cariótipo de *C. izecksohni* apresenta $2n=30$ (Figura 4), composto por três pares de cromossomos metacêntricos (pares 1, 6 e 8), dois pares de cromossomos submetacêntricos (pares 2 e 4), um par de cromossomos subtelo-cêntricos (par 15) e nove pares de telocêntricos (pares 3, 5, 7, 9-14).

O cariótipo de *Crossodactylodes* sp. 3 exibe $2n=32$ (Figura 5), sendo seis pares de cromossomos metacêntricos (pares 1, 3-6 e 16), um par submetacêntrico (par 2), oito pares de subtelo-cêntricos (pares 7-14) e um par de cromossomos telocêntricos (par 15).

Já o cariótipo de *C. itambe* apresenta $2n=36$ (Figura 6), contendo três pares de cromossomos metacêntricos (6, 8 e 11), dez pares de subtelo-cêntricos (pares 7, 9, 10, 12-18) e cinco pares de telocêntricos (pares 1-5).

O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva revelou diferenças entre as três espécies estudadas. Os cariótipos de *C. izecksohni*, *Crossodactylodes* sp. 3 e *C. itambe* revelaram bandas heterocromáticas preferencialmente nas regiões centroméricas e pericentroméricas dos cromossomos, com algumas exceções. No cariótipo de *C. izecksohni* foi evidenciado bandas heterocromáticas pericentroméricas bastante evidentes nos pares de cromossomos 3, 6 e 8 (Figura 4B). No cariótipo de *Crossodactylodes* sp. 3, uma banda pericentromérica foi evidenciada no braço curto do par de cromossomos 1 (Figura 5B). Além disso, uma banda intersticial no braço curto do par de cromossomos 2 e o braço curto do par de cromossomos 3 quase totalmente heterocromático (Figura 5B). Já em *C. itambe* o braço longo do par de cromossomos 7 revelou uma banda pericentromérica (Figura 6B). A coloração com DAPI, após o bandamento C em *C. izecksohni* revelou sinais brilhantes em regiões pericentroméricas nos pares cromossômicos 2-4, 6, 8 e 10, além das marcações centroméricas (Figura 4C). No cariótipo de *Crossodactylodes* sp. 3, o braço longo do par de cromossomos 11 mostrou-se positivo para o DAPI na região pericentromérica, além das bandas intersticiais presentes no braço curto do par de cromossomos 2 e o braço curto do par de

cromossomos 3 positivo para o DAPI (Figura 5C). Já o cariótipo de *C. itambe* não mostrou sinais adicionais de heterocromatina após coloração com DAPI (Figura 6C).

As NORs foram localizadas em sítios distintos nas três espécies em estudo. No cariótipo de *C. izecksohni* foi possível notar dois pares de NORs, localizadas no braço curto dos cromossomos telocêntricos do par 14 e dos cromossomos subtelocêntricos do par 15 (Figura 4A). Na espécie *Crossodactylodes* sp. 3, os cromossomos metacêntricos do par 3 são portadores de uma NOR terminal no braço curto, adjacente a um extenso bloco heterocromático presente nesse braço (Figura 5A). Já na espécie *C. itambe*, o par cromossômico metacêntrico 11 revelou uma NOR pericentromérica no braço curto (Figura 6A).

Análises das NORs permitiram inferir a presença de heteromorfismo de tamanho de NOR em *C. itambe* (Figura 7). Evidências mostraram heteromorfismo de tamanho entre as NORs homólogas em 5 espécimes dos 6 indivíduos estudados, não foi possível identificar NORs heteromórficas no indivíduo SMRP 447.14 devido ao baixo número de metáfases neste material.

Experimentos de hibridação *in situ* realizados para o mapeamento físico do gene DNAr 28S em *C. itambe*, identificaram sinais de hibridação na região pericentromérica no braço curto do par metacêntrico 11 (Figura 7), além de confirmar o resultado de NORs heteromórficas obtidas pelo método Ag-NOR, descrito anteriormente.

Interessante destacar que o espécime fêmea de *C. itambe* SMRP 447.11 é heteromórfico em relação ao par 11. Em todas as metáfases dessa fêmea, apenas um dos homólogos do par 11 é portador de NOR, como evidenciado pelo método Ag-NOR (Figura 8A – destaque). Essa NOR é visualizada como constrição secundária nas metáfases coradas com Giemsa (Figura 8A) ou com DAPI (Figura 8B – destaque) e não corada com CMA₃ (Figura 8B – destaque). No cromossomo homólogo ao cromossomo 11 portador de NOR, o braço curto é quase todo heterocromático, como evidenciado pelo bandamento C (Figura 8B). Essa banda heterocromática não se mostrou corada por DAPI e fortemente corada por CMA₃ (Figura 8B - destaque). Em contrapartida, a análise do cariótipo de uma fêmea de *C. itambe* SMRP 447.13 (Figura 9) não apresentou heteromorfismo em relação ao par de cromossomos 11. A técnica de impregnação por prata revelou nesta fêmea ambos os homólogos portadores de NOR em todas as metáfases, além de heteromorfismo de tamanho de NOR.

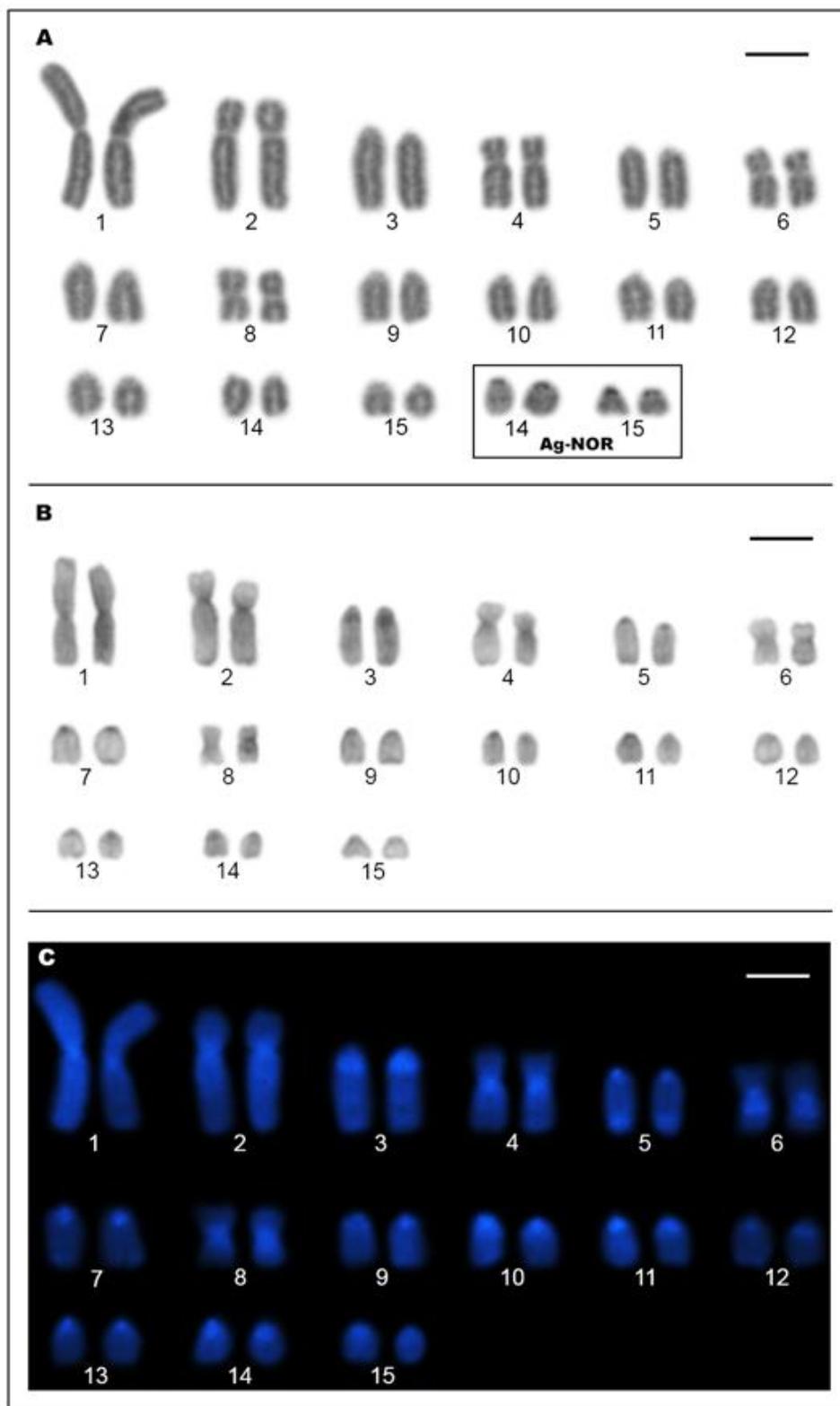


Figura 4: Cariótipo de *Crossodactylodes izecksohni* ($2n=30$) corado com Giemsa (A), submetido ao bandamento C (B) e corado com DAPI após bandamento C (C). Em destaque, os pares cromossômicos portadores de NOR, submetidos à técnica de impregnação por prata (Ag-NOR). Barras: 5 μm .

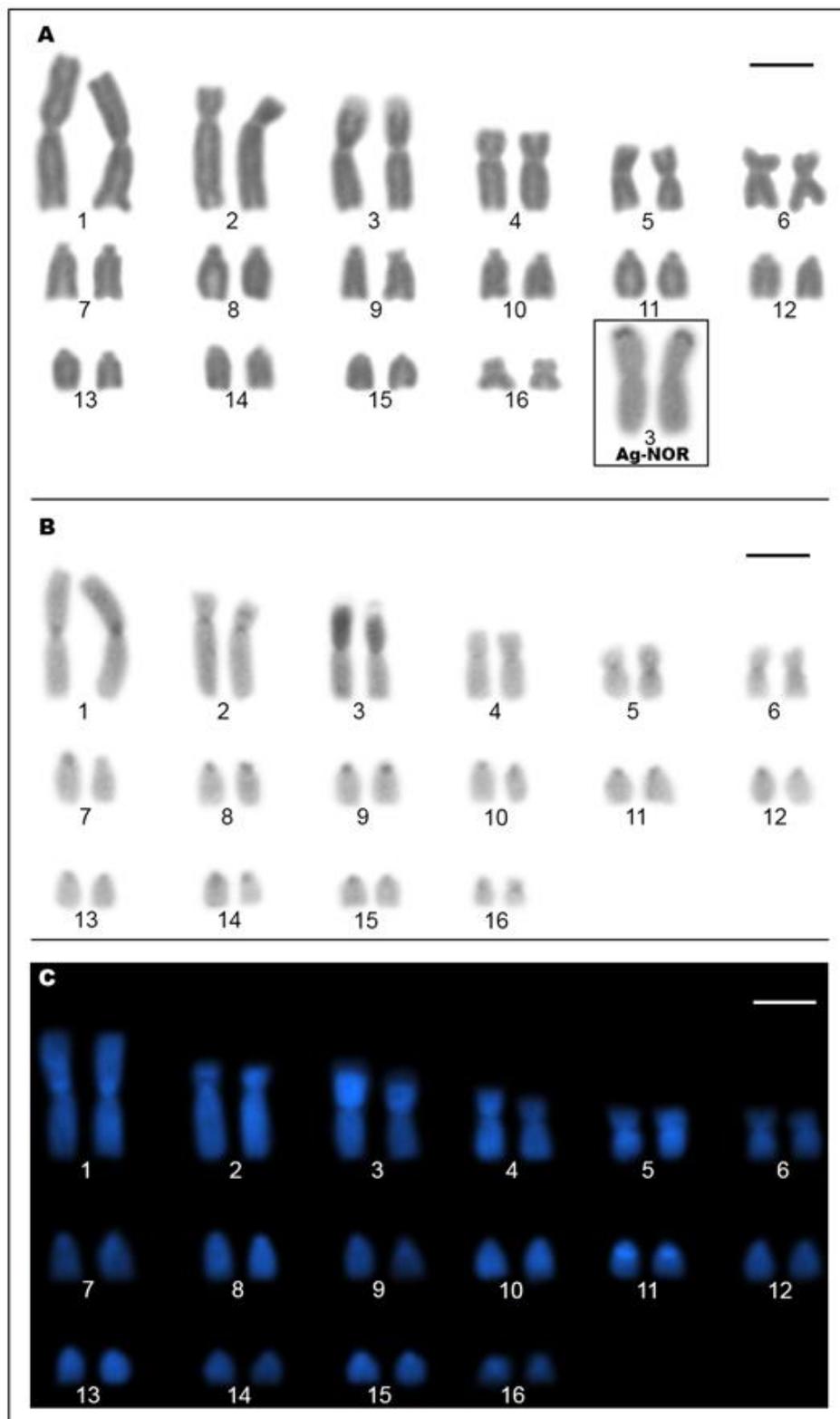


Figura 5: Cariótipo de *Crossodactylodes* sp. 3 ($2n=32$) corado com Giemsa (A), submetido ao bandamento C (B) e corado com DAPI após bandamento C (C). Em destaque, o par cromossômico portador de NOR, submetido à técnica de impregnação por prata (Ag-NOR). Barras: 5 μ m.

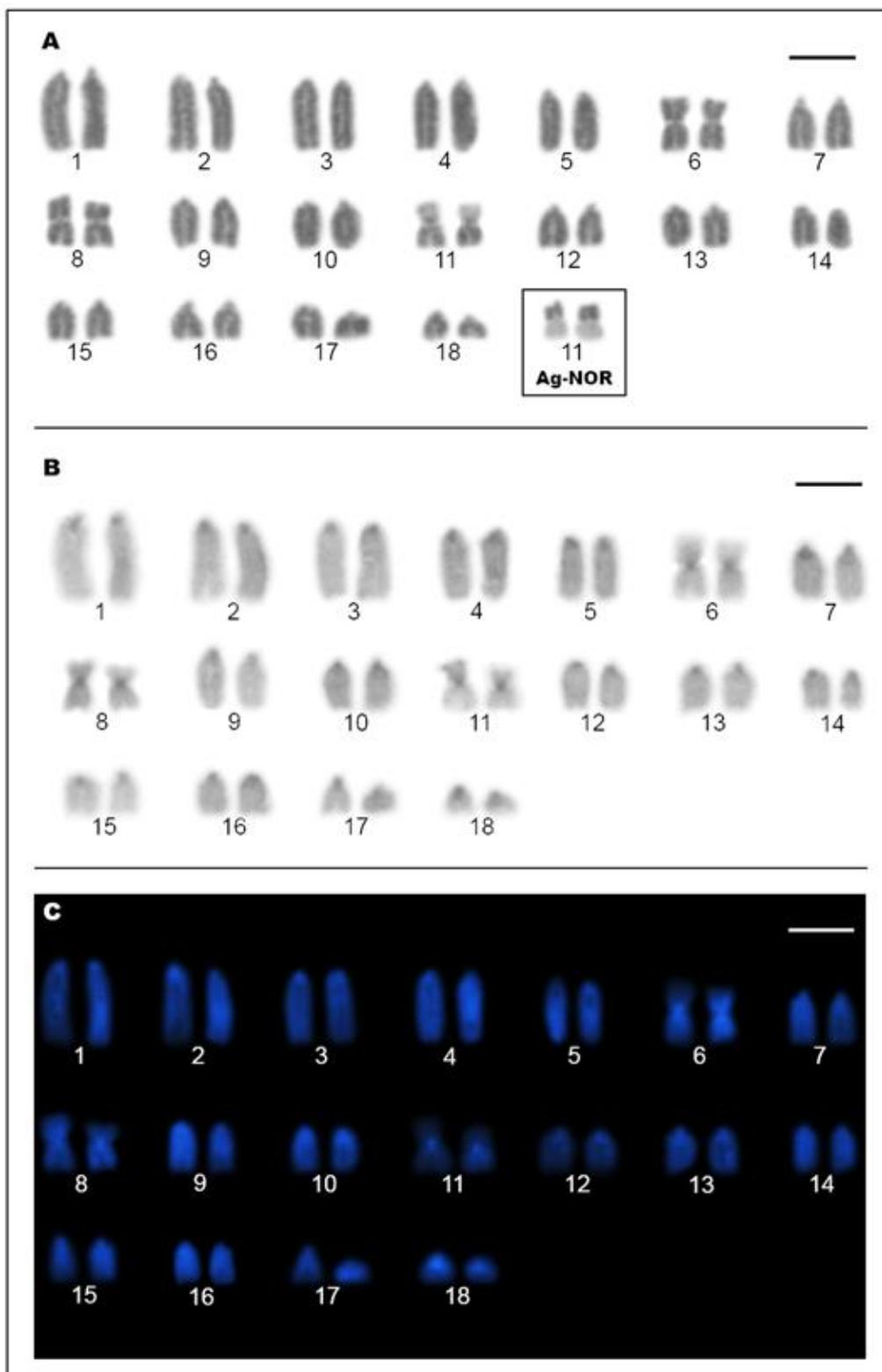


Figura 6: Cariótipo de *Crossodactylodes itambe* ($2n=36$) corado com Giemsa (A), submetido ao bandamento C (B) e corado com DAPI após bandamento C (C). Em destaque, o par cromossômico portador de NOR, submetido à técnica de impregnação por prata (Ag-NOR). Barras: 5 μ m.

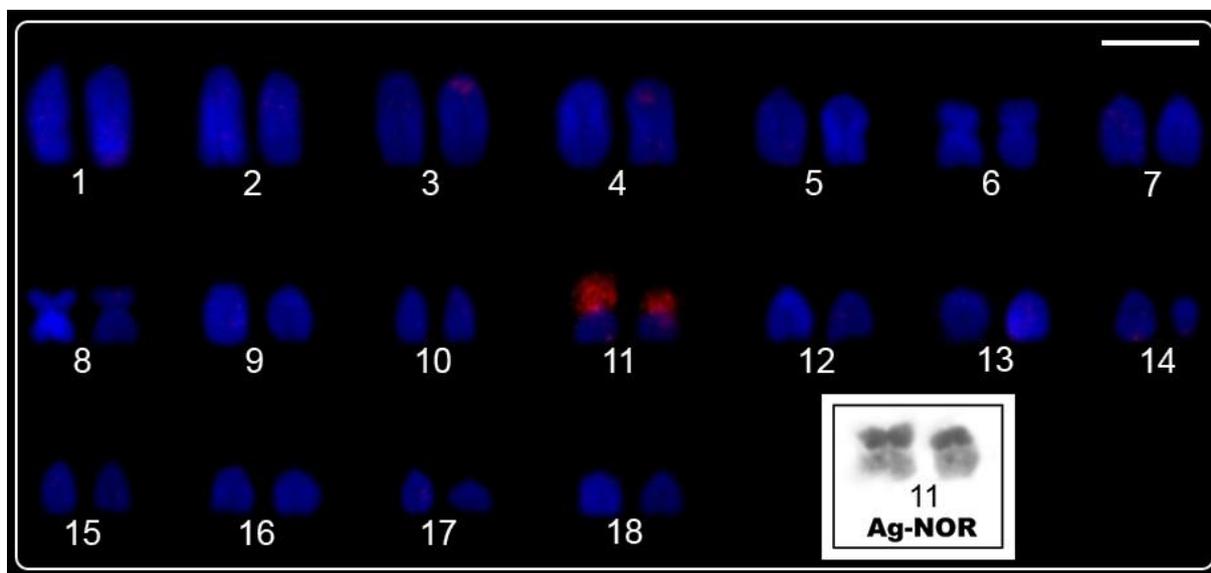


Figura 7: Hibridação *in situ* da sonda DNAr 28S no cariótipo de um macho de *C. itambe*.

Barra: 5 μ m.

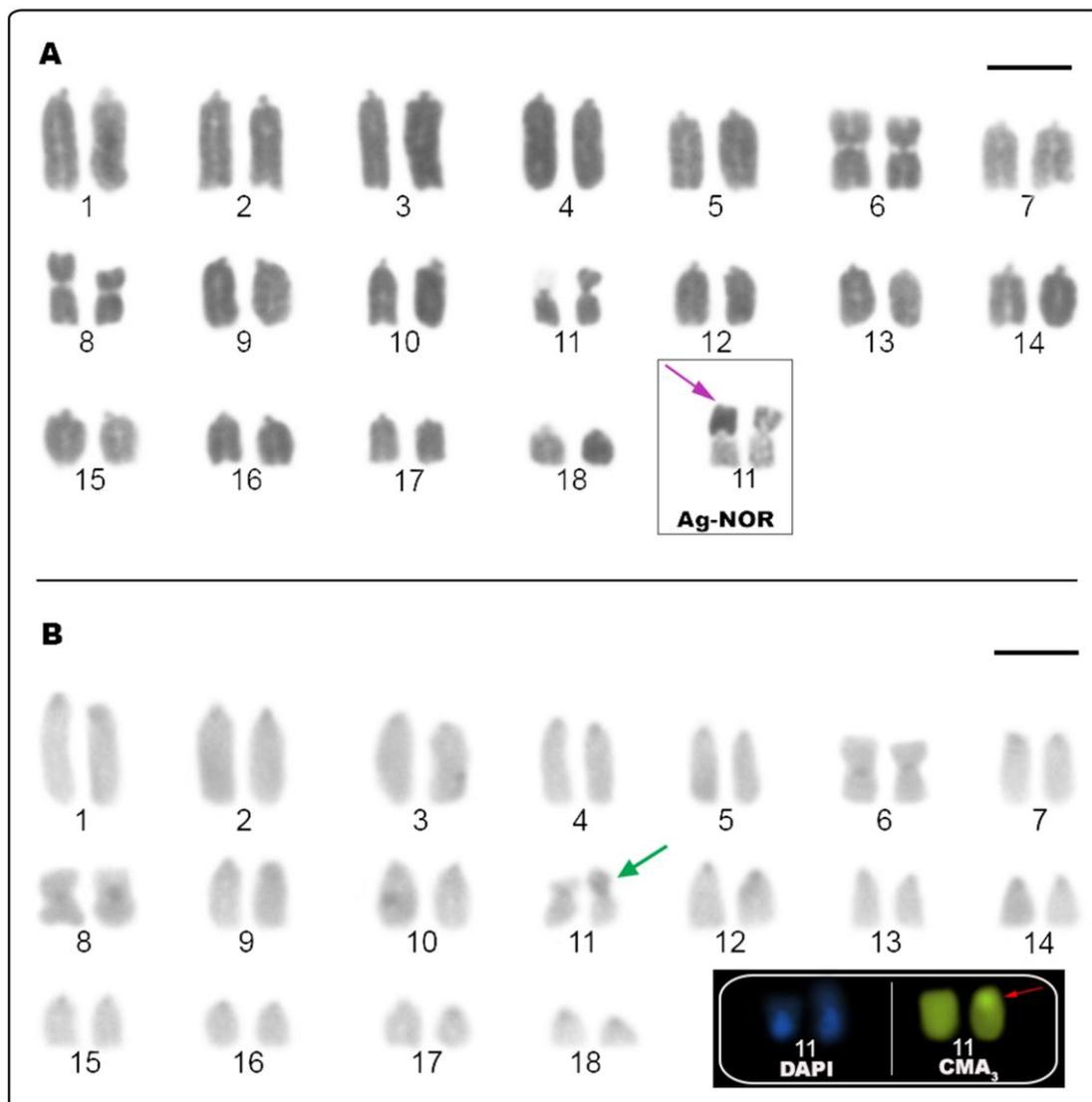


Figura 8: Cariótipo de uma fêmea SMRP 447.11 de *C. itambe* corado com Giemsa (A), submetido ao bandamento C (B). Em destaque, o par cromossômico submetido à técnica de impregnação por prata (Ag-NOR) (A). Em (B), o cariótipo de *C. itambe* submetido ao bandamento C. Inset do par de cromossomos 11 corado com DAPI e CMA₃, após bandamento C (B). Barras: 5 μ m.

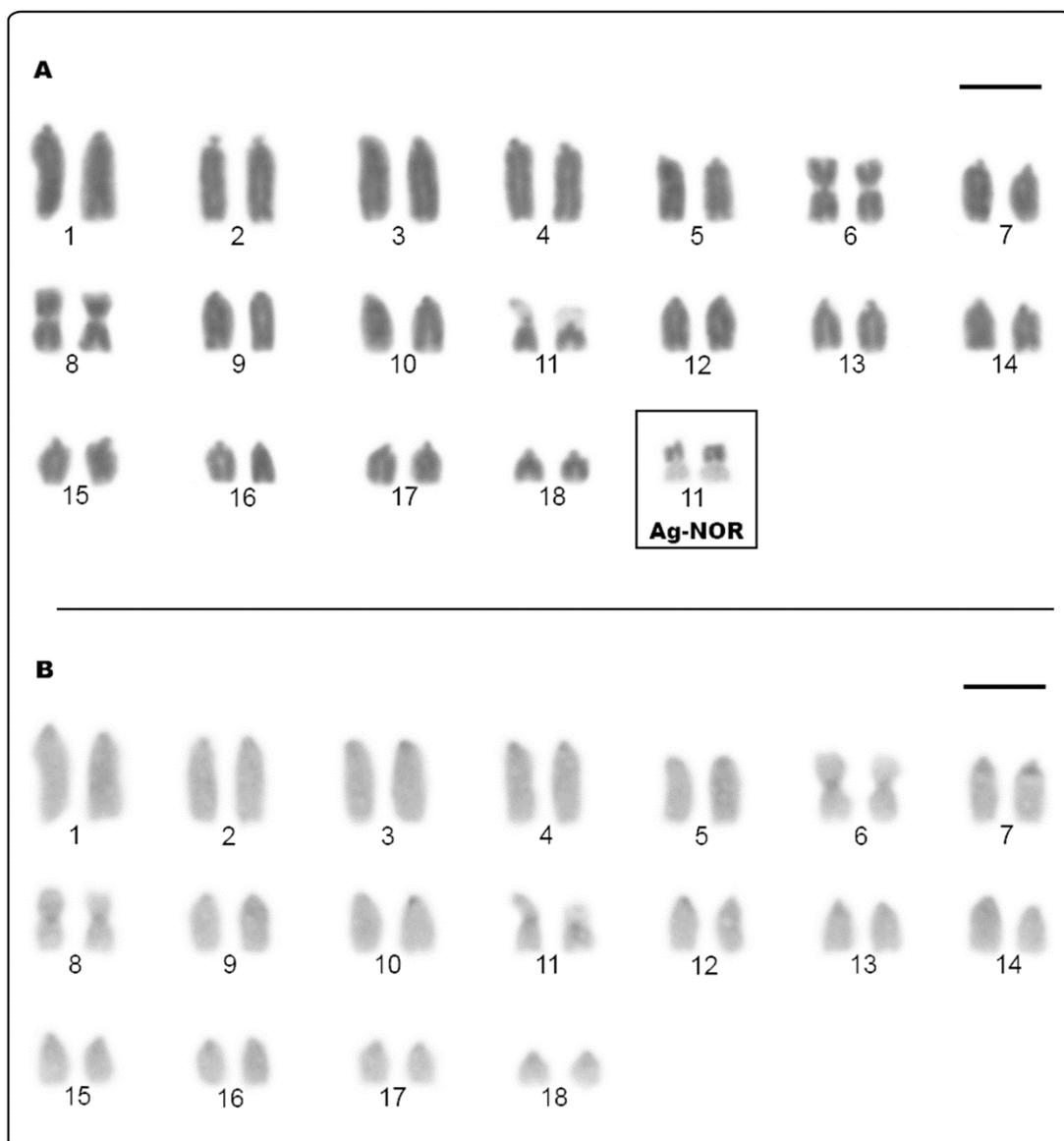


Figura 9: Cariótipo de uma fêmea SMRP 447.13 corado com Giemsa (A), submetido ao bandamento C (B). Em destaque, o par cromossômico portador de NOR, submetido à técnica de impregnação por prata (Ag-NOR). Barras: 5 μ m.

Inferência dos números cromossômicos diploides em Paratelmatoibiinae

No que diz respeito a hipótese de reconstrução dos números cromossômicos na subfamília Paratelmatoibiinae o *software* ChromoEvol inferiu que o número cromossômico (n) para o ancestral comum de *Rupirana* + *Scythrophrys* + *Paratelmatoibius* + *Crossodactylodes* foi de n=11. E, ambos os clados, formados por *Scythrophrys* + *Paratelmatoibius* + *Crossodactylodes* e o clado composto por *Paratelmatoibius* + *Crossodactylodes* teriam n=12 para o ancestral comum (Figura 10).

O número cromossômico estimado para a espécie *R. cardosoi*, possivelmente, seria n=11. Os resultados referentes ao clado formado por *S. sawayae* e *Scythrophrys* sp. indicam que o ancestral comum foi de n=12. E, todos os representantes do gênero *Paratelmatoibius* e *Scythrophrys*, incluindo aqueles com ausência de dados cromossômicos (*Pa. yepiranga* + *Paratelmatoibius* sp. + *Pa. cf. cardosoi* + *Pa. cf. segallai*), teriam número cromossômico n=12. Já o número estimado para o ancestral comum das espécies de *Crossodactylodes* seria n=15. E, o clado formado por *C. izecksohni* + *Crossodactylodes* sp. 1 e *Crossodactylodes* sp. 2, além da espécie *C. bokermanni* teria n=15 como número cromossômico. Diferentemente, o clado representado por *Crossodactylodes* sp. 3 + *C. itambe* + *C. septentrionalis* teria n=16 para o ancestral comum, assim como o clado representado por *C. itambe* e *C. septentrionalis* e, o número cromossômico seria n=16 para *C. septentrionalis*. Os dados cromossômicos do presente estudo mostram que *Crossodactylodes* sp. 3 exibe n=16 e *C. itambe* apresenta n=18.

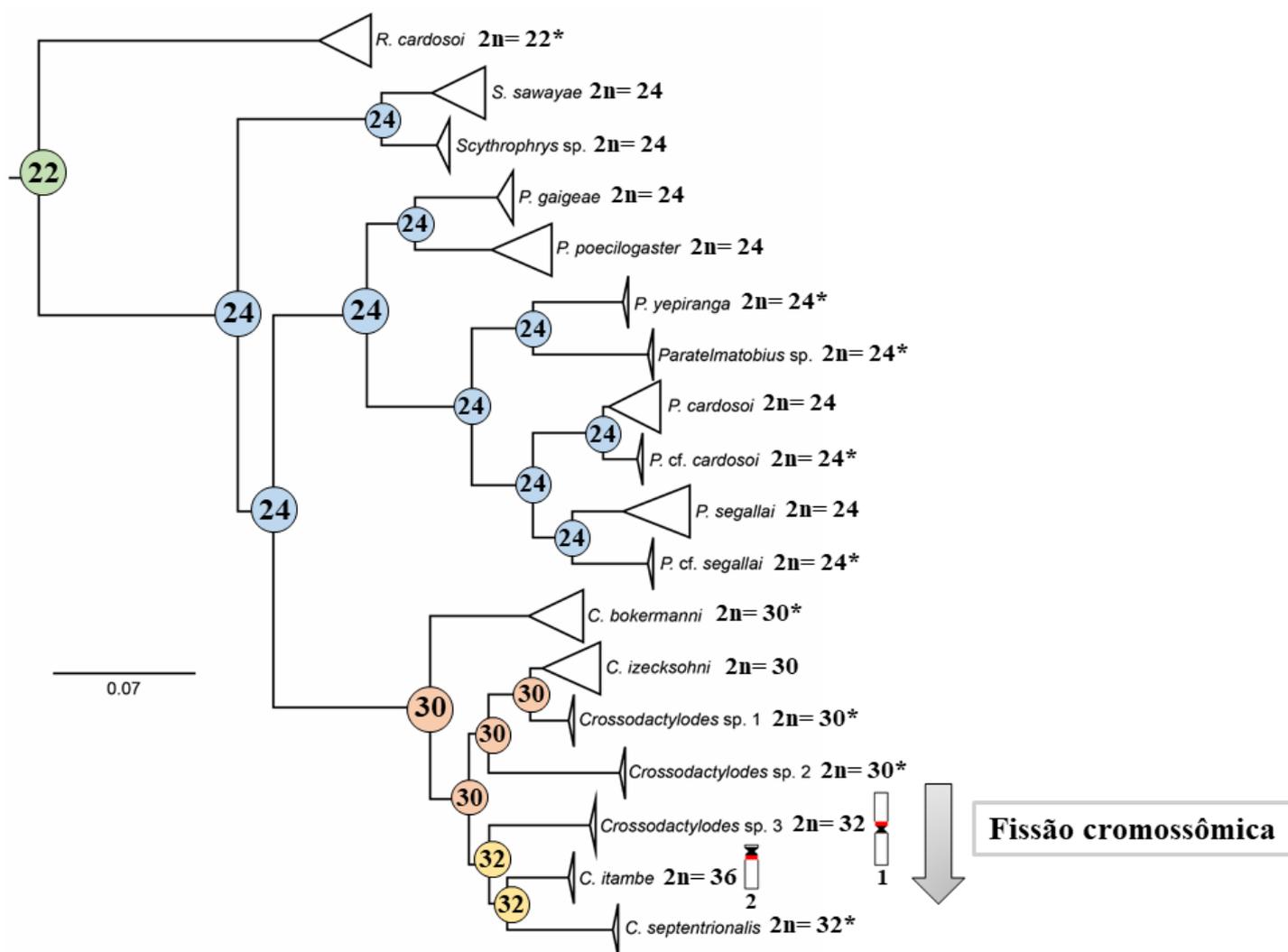


Figura 10: Hipótese de evolução cromossômica em Paratelmatobiinae, gerada pelo *software* ChromoEvol. Cladograma simplificado baseado na análise filogenética de SANTOS et al. (2020a). Em destaque, cromossomos marcados com sonda PcP190, após hibridação *in situ*. Os asteriscos (*) indicam inferência do número cromossômico (n) pelo *software* ChromoEvol.

Análise da sequência PcP190 isolada de *Crossodactylodes* sp. 3

A análise de sequências PcP190 isoladas de *Crossodactylodes* sp. 3 permitiu reconhecer um monômero completo desse DNA repetitivo, composto por uma região com 120 pb, correspondente à região conservada desse DNA satélite, e uma região com 70 pb, correspondente à sua região hipervariável (Figura 11). A região conservada da sequência PcP190 de *Crossodactylodes* sp. 3 mostrou-se altamente similar a outras sequências de satDNA PcP190 disponíveis no GenBank (Figura 13; Tabela II), tendo mostrado similaridade média variando de 86% (com sequências encontradas no gênero *Pseudis*) a 92% (com sequências de *Physalaemus* e *Lysapsus*). A similaridade encontrada entre a sequência isolada de *Crossodactylodes* e sequências nucleotídicas de DNAr 5S de outras espécies de anuro foi bem menor, tendo variado de 65% a 71% (Figura 14; Tabela III).

A análise da sequência correspondente à região variável do satDNA PcP190 mostrou similaridade com sequências já caracterizadas da espécie *Leptodactylus latrans* (Figura 12), após o alinhamento dessas sequências.

Mapeamento *in situ* de DNA satélite PcP190 e sequências teloméricas

Os experimentos de FISH usando a sequência de satDNA PcP190 de *Crossodactylodes* sp. 3 como sonda revelaram no cariótipo de *Crossodactylodes* sp. 3 forte sinal de hibridação da sonda em uma região pericentromérica dos cromossomos metacêntricos do par 1 (Figura 15B). Em contrapartida, no cariótipo de *C. itambe* a sequência de PcP190 foi mapeada em região pericentromérica de um par de cromossomos telocêntricos. Devido à grande similaridade morfológica entre os cromossomos telocêntricos 1-5, nós tentativamente identificamos o par portador do sítio PcP190 como par 2 (Figura 15D). Em razão ao baixo número de metáfases nas suspensões celulares de *C. izecksohni* não foi possível realizar o mapeamento físico do satDNA PcP190 nesse cariótipo.

A hibridação das sondas teloméricas (CCCTAA)₃ nos cariótipos de *Crossodactylodes* sp. 3 (Figura 15A) e *C. itambe* (Figura 15C) revelou marcações nas regiões terminais de todos os cromossomos e nenhuma ITS (*Interstitial Telomeric Sequence*) foi observada em ambos os cariótipos.

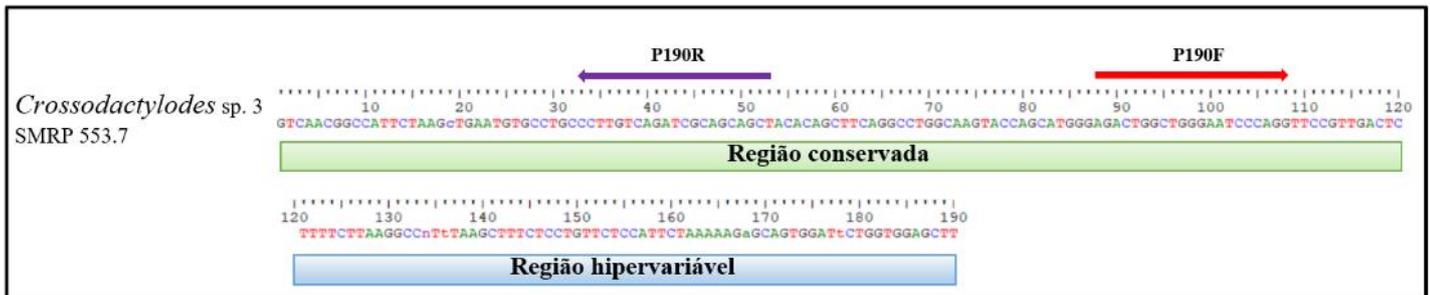


Figura 11: Sequência nucleotídica do DNA repetitivo PcP190 de um espécime juvenil de *Crossodactylodes* sp. 3. Os segmentos correspondentes à região conservada e à região hipervariável desse satDNA estão indicados. As setas indicam as regiões dos primers P190F e P190R.

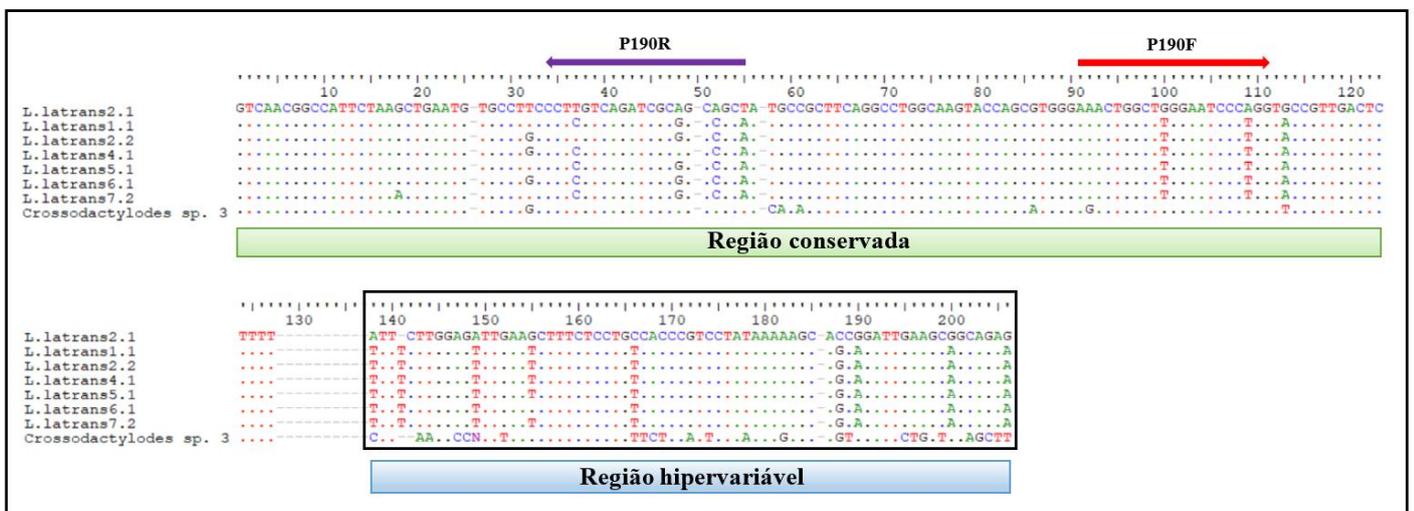


Figura 12: Alinhamento da sequência nucleotídica de uma unidade repetitiva de PcP190 de *Crossodactylodes* sp. 3 com sequências nucleotídicas encontradas na espécie *Leptodactylus latrans* (KM361718.1 - KM361724.1).



Figura 13: Alinhamento da região conservada das sequências de satDNA Pcp190, às regiões dos primers P190R (roxo) e P190F (vermelho). Números de acesso ao GenBank: *Physalaemus cuvieri* (KM361675.1 - KM361683.1 e JF281117.1, JF281119.1, JF281121.1, JF281124.1), *Physalaemus centralis* (KM361684.1 - KM361688.1), *Physalaemus albonotatus* (KM361689.1 - KM361693.1), *Physalaemus albifrons* (KM361694.1 - KM361698.1), *Physalaemus ephippifer* (KM361699.1 e KM361700.1), *Physalaemus marmoratus* (KM361701.1 - KM361706.1), *Leptodactylus latrans* (KM361718.1 - KM361724.1), *Crossodactylus gaudichaudii* (KM361725.1 e KM361726.1), *Pseudis tocantins* (KX170922.1- KX170924.1, KX170887.1, KX170931.1 e KX170892.1 - KX170898.1), *Pseudis minuta* (MH370440.1 e MH370442.1), *Pseudis bolbodactyla* (MH370391.1, MH370392.1, MH370395.1 e MH370402.1), *Pseudis paradoxa* (MH370405.1), *Pseudis fusca* (MH571142.1 e MH571149.1), *Lysapsus limellum* (MH370453.1), *Engystomops* (MK491531.1 e MK491533.1 - MK491535.1).



Figura 14: Alinhamento das regiões conservadas de satDNA PcP190 de *Crossodactyloides* sp. 3 e DNAr 5S de espécies de anuros.

Tabela II. Similaridade média (%) das regiões conservadas de PcP190, após alinhamento da região conservada de *Crossodactylodes* sp. 3 e sequências já disponíveis no GenBank.

Gêneros	Média de similaridade (%)
<i>Physalaemus</i>	92%
<i>Leptodactylus</i>	89%
<i>Crossodactylus</i>	91%
<i>Pseudis</i>	86%
<i>Lysapsus</i>	92%
<i>Engystomops</i>	87%

Tabela III. Similaridade média (%), a partir do alinhamento da região conservada de *Crossodactylodes* sp. 3 e às regiões conservadas de sequências de DNAr 5S já disponíveis no GenBank.

Gêneros	Média de similaridade (%)
<i>Xenopus</i>	71%
<i>Amolops</i>	71%
<i>Gastrotheca</i>	70%
<i>Pelophylax</i>	66%
<i>Lithobates</i>	70%
<i>Anaxyrus</i>	70%
<i>Engystomops</i>	65%

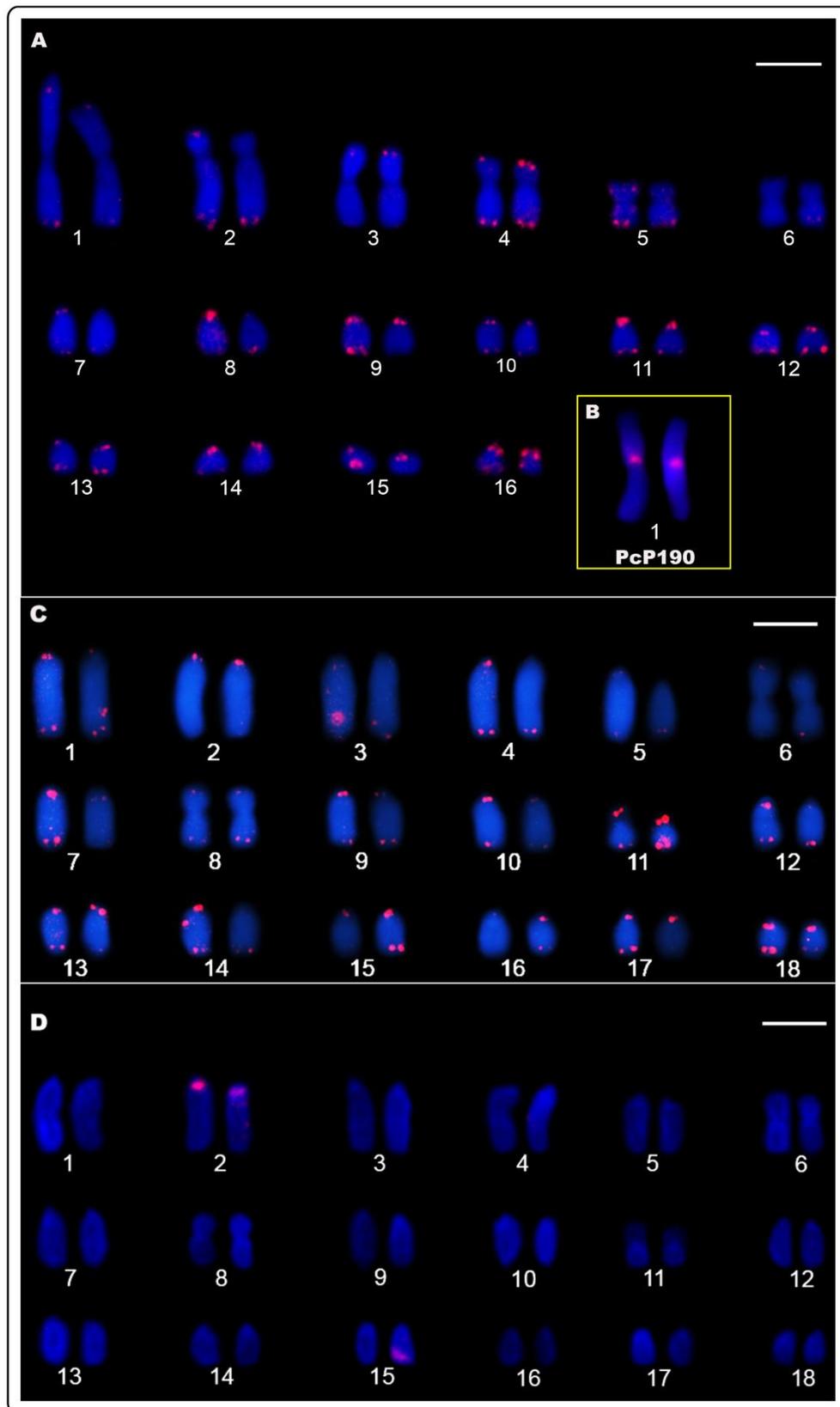


Figura 15: Hibridação *in situ* com sonda telomérica $(CCCTAA)_3$ (A, C) e sonda do DNA satélite PcP190 (B, D) em cromossomos de *Crossodactylodes* sp. 3 (A, B) e *C. itambe* (C, D). Barras: 5 μ m.

DISCUSSÃO

Até o momento, as espécies diploides da família Leptodactylidae já cariotipadas apresentaram de $2n=16$ (como observado em espécies de *Pseudopaludicola* -VEIGAMENONCELLO et al., 2014) a $2n=26$ (como observado em espécies de *Adenomera* -COELHO et al., 2016; ZARACHO & HERNANDO, 2011), sendo $2n=22$ o número diploide modal dentre os leptodactilídeos (BOGART, 1974; De LUCCA et al., 1974; SILVA et al., 1999, 2004, 2006; AMARO-GHILARDI et al., 2006; ARRUDA & MORIELLE-VERSUTE, 2008; RON et al., 2010; TARGUETA et al., 2010, 2012; GAZONI et al., 2012; CARDOZO et al., 2016, entre outros). Em contraste com esses dados, os cariótipos das três espécies do gênero *Crossodactylodes* analisadas no presente estudo apresentam $2n=30$ (*C. izecksohni*), $2n=32$ (*Crossodactylodes* sp. 3) e $2n=36$ (*C. itambe*). Vale ressaltar que há espécies poliploides dentre os leptodactilídeos que apresentam cariótipos com $4n=44$ e $8n=88$ (como observado em espécies de *Pleurodema* – revisão em SCHMID et al., 2015).

Os dados cromossômicos analisados à luz da hipótese filogenética proposta por SANTOS et al. (2020a) permitem inferir o aumento progressivo do número diploide ao longo da evolução do gênero *Crossodactylodes* (Figura 10). A reconstrução dos números cromossômicos ancestrais inferiu que o ancestral comum para as espécies de *Crossodactylodes* apresentasse $2n=30$, enquanto o número diploide inferido para o ancestral comum do clado composto por *Crossodactylodes* + *Paratelmatoebius* + *Scythrophrys* é de 24. Vale destacar que o número diploide de duas das espécies viventes de *Crossodactylodes* (*C. bokermanni* e *C. septentrionalis*) é ainda desconhecido e, portanto, é possível que o número diploide inferido para o ancestral do gênero sofra alteração dependendo do número diploide encontrado nessas espécies em estudos futuros. É possível que eventos de fissões cêntricas tenham contribuído para a grande diversidade numérica encontrada dentro de *Crossodactylodes*.

Os cariótipos de *Paratelmatoebius* e *Scythrophrys* são compostos majoritariamente por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (De LUCCA et al., 1974; LOURENÇO et al., 2000, 2003a, 2003b, 2008), enquanto os cariótipos das espécies de *Crossodactylodes* são caracterizados pela presença de vários cromossomos subteloicêntricos e telocêntricos. O cariótipo de *C. izecksohni*, com $2n=30$, apresenta 1 par de cromossomos subteloicêntricos e 9 pares telocêntricos, enquanto em *Crossodactylodes* sp. 3, que apresenta $2n=32$, há 8 pares cromossômicos subteloicêntricos e 1 par de cromossomos telocêntricos e em *C. itambe*, que apresenta o maior número diploide do gênero ($2n=36$), há 10 pares de cromossomos

subtelocêntricos e 5 pares telocêntricos. O grande número de cromossomos telocêntricos/subtelocêntricos nos cariótipos com maior número diploide sugere que eventos de fissão cêntrica possam ter ocorrido ao longo da evolução dos paratelmatozoides. A dificuldade no reconhecimento de homeologias cromossômicas interespecíficas, no entanto, prejudica a identificação precisa desses eventos.

Crossodactylodes itambe, espécie com o maior número diploide do gênero ($2n=36$), apresenta apenas 3 pares de cromossomos metacêntricos (pares 6, 8 e 11). Dois desses pares cromossômicos (pares 6 e 8) são semelhantes em tamanho e morfologia a cromossomos também encontrados em *C. izecksohni* (pares 6 e 8) e *Crossodactylodes* sp. 3 (pares 5 e 6). Já o par 11 de *C. itambe* é similar ao par 15 de *C. izecksohni*, pois ambos apresentam braço longo de tamanho correspondente e NOR ocupando praticamente todo o braço curto. Além dos pares metacêntricos 6 e 8 de *C. izecksohni* / 5 e 6 de *Crossodactylodes* sp. 3, essas duas espécies compartilham outros três pares de cromossomos metacêntricos/submetacêntricos (pares 1, 2 e 4), não encontrados em *C. itambe*. Considerando a relação filogenética dessas espécies (Figura 10), a análise dos dados cromossômicos nos permite levantar a hipótese de que esses três pares de cromossomos metacêntricos citados estejam também presentes no ancestral comum de *C. izecksohni*, *Crossodactylodes* sp. 1, *Crossodactylodes* sp. 2, *Crossodactylodes* sp. 3, *C. itambe* e *C. septentrionalis*. Nesse cenário, os cromossomos metacêntricos em questão teriam sofrido fissão cêntrica ao longo da evolução, resultando em 6 dos pares de cromossomos telocêntricos observados em *C. itambe*. O mapeamento físico da sequência PcP190 isolada de *Crossodactylodes* sp. 3 nos cariótipos dessa espécie e de *C. itambe* ofereceu evidências da ocorrência de um desses eventos de fissão cêntrica. A sonda PcP190 detectou a região pericentromérica dos cromossomos metacêntricos do par 1 no cariótipo de *Crossodactylodes* sp. 3, enquanto em *C. itambe* mapeou uma região pericentromérica do par de cromossomos telocêntricos 2. Embora estudos futuros sejam necessários para uma maior compreensão da evolução cromossômica no gênero, esses achados apoiam a hipótese de que fissões cromossômicas tenham sido eventos importantes para a origem da variação cromossômica numérica observada em *Crossodactylodes*.

Em contraste com as evidências apontadas acima, a diferenciação dos cariótipos de *C. izecksohni* ($2n=30$) e *Crossodactylodes* sp. 3 ($2n=32$) não pode ser explicada por simples evento de fissão cêntrica. *Crossodactylodes* sp. 3 apresenta dois pares de cromossomos metacêntricos (pares 3 e 16) que diferem de todos os cromossomos encontrados nas demais espécies do gênero. Dessa forma, *Crossodactylodes* sp. 3, com $2n=32$, apresenta maior número

de cromossomos metacêntricos/submetacêntricos do que *C. izecksohni*, cujo número diploide é 30. O mapeamento de sequências teloméricas no cariótipo de *Crossodactylodes* sp. 3, assim como no cariótipo de *C. itambe*, não detectou a presença de sequências teloméricas intersticiais (ITS). Dessa forma, os rearranjos que originaram o cariótipo de *Crossodactylodes* sp. 3 permanecem desconhecidos. O cromossomo 3 dessa espécie é particularmente peculiar, apresentando braço curto composto por extenso bloco heterocromático e uma NOR distal. A presença dessa NOR em uma posição terminal no braço curto do par de cromossomos 3, possivelmente, teve origem de um cromossomo pequeno através de rearranjos estruturais. A localização das NORs em regiões centroméricas nos cariótipos de *C. izecksohni* e *Crossodactylodes* sp. 3, indicam que provavelmente a NOR ocupava posições próximas ao centrômero no ancestral comum de *Crossodactylodes*. Futuros estudos que permitam melhor caracterização das sequências presentes nesse bloco heterocromático poderão auxiliar na investigação da origem evolutiva desse cromossomo e, conseqüentemente, na diferenciação do cariótipo dessa espécie.

A ocorrência de fissão cromossômica já foi levantada para outros anuros, não sendo um evento raro nessa classe de anfíbios. Por exemplo, o cariótipo com $2n=28$ encontrado em *Pseudis cardosoi* é considerado uma condição autapomórfica no gênero, resultante de eventos de fissão cêntrica ocorridos em um cariótipo ancestral com $2n=24$ (BUSIN et al., 2001). A análise citogenética comparativa de *Ps. cardosoi* e sua espécie irmã, *Ps. minuta*, que apresenta $2n=24$, permitiu inferir a homeologia entre os cromossomos metacêntricos 1 e 4 de *Ps. minuta* e os cromossomos telocêntricos 6, 7, 8 e 9 de *Ps. cardosoi*, e a ocorrência de dois eventos de fissão cêntrica durante a divergência dessas espécies (BUSIN et al., 2001; AGUIAR-Jr et al., 2007). Em espécies endêmicas de *Eleutherodactylus* da Jamaica, que apresentaram grande variação cromossômica numérica ($2n=24, 26, 28, 30$ e 32) (BOGART & HEDGES, 1995), também foi observada a relação entre maior número diploide e maior quantidade de cromossomos telocêntricos. O estudo dos cariótipos permitiu a inferência de hipóteses de homeologias cromossômicas e fissão cromossômica foi considerado o principal tipo de evento envolvido no aumento do número diploide no gênero (BOGART & HEDGES, 1995).

Estudos recentes sugerem que a subfamília Paratelmatobiinae possivelmente teve origem no período Eoceno e sofreu maior diversificação no Mioceno, embora alguns eventos de diversificação datem do Plioceno e Pleistoceno (SANTOS et al., 2020a). A diversificação no gênero *Crossodactylodes* foi intensa no final do Mioceno e atualmente as espécies desse gênero possuem distribuição alopátrica e estão intimamente associadas a bromélias presentes

em altitudes elevadas em montanhas úmidas (SANTOS et al., 2020a). O fato dessas espécies serem adaptadas a microhabitats de bromélias, isoladas em cumes montanhosos, certamente influenciou a história evolutiva desse grupo, pois o isolamento geográfico ao longo do tempo impediu a ocorrência de fluxo gênico entre as espécies de *Crossodactylodes* e, provavelmente, contribuiu para diversidade encontrada nesses cariótipos.

Heteromorfismo de NOR em *Crossodactylodes itambe*

Em *C. itambe*, a fêmea SMRP 447.11 apresentou apenas um dos cromossomos do par 11 como portador de NOR. O cromossomo homólogo ao portador de NOR exibiu o braço curto quase todo heterocromático, evidenciado pelo bandamento C. Enquanto a NOR ativa não foi corada por DAPI ou CMA₃, a região heterocromática correspondente a ela no cromossomo homólogo mostrou-se fortemente corada por CMA₃ e não corada por DAPI, sendo, portanto, uma região rica em G-C. Outra fêmea dessa espécie (SMRP 447.13) não apresentou esse mesmo heteromorfismo relacionado à NOR, o que descarta a hipótese de que o heteromorfismo encontrado seja relacionado a sexo.

Embora não tenha sido possível mapear sequências de DNAr nucleolar no cariótipo do indivíduo SMRP 447.11, é possível supor que o heteromorfismo relativo à NOR/à banda heterocromática tenha resultado de um fenômeno de heterocromatinização da NOR. Alternativamente, a substituição da NOR por um segmento heterocromático pode ter resultado de um evento de translocação. Caracterizações futuras do segmento heterocromático encontrado no braço curto do homólogo do par 11 não portador de NOR poderão auxiliar na avaliação dessas hipóteses.

O DNA satélite PcP190

No presente estudo, isolamos uma sequência do satDNA PcP190 a partir do DNA genômico de espécimes de *Crossodactylodes*. O fragmento isolado apresentou aproximadamente 190 pb, sendo 120 pb correspondentes à região conservada desse DNA satélite, que se mostrou muito semelhante (81% em média) à das sequências já caracterizadas para outras espécies de anuros (VITTORAZZI et al., 2011, 2014; GATTO et al., 2016, 2018). No que diz respeito ao alinhamento da sequência correspondente à região variável do satDNA

PcP190 isolado de *Crossodactylodes* sp. 3 com sequências de satDNA PcP190 disponíveis no Genbank, à região variável de *Crossodactylodes* sp. 3 não é considerada uma sequência nova, pois pode ser alinhada com à região variável de sequências já caracterizadas da espécie *Leptodactylus latrans*.

Devido ao fato da família de sequências PcP190 ter sua origem a partir de DNAr 5S (VITTORAZZI et al., 2011), avaliamos também a possibilidade de a sequência isolada de *Crossodactylodes* ser de DNAr 5S e não de PcP190. Embora nenhuma sequência de DNAr 5S de *Crossodactylodes* seja conhecida até o momento, a comparação da sequência que obtivemos de *Crossodactylodes* sp. 3 apresenta maior similaridade com as sequências de PcP190 do que com as sequências de DNAr 5S de outros anuros. A similaridade entre à região conservada do satDNA PcP190 de *Crossodactylodes* sp. 3 e a região transcritora do DNAr 5S de outros anuros variou de 65% a 71%. Vale ressaltar que devido à similaridade das sequências de satDNA PcP190 e do DNAr 5S, não descartamos a possibilidade de que a sonda de PcP190 tenha revelado nos cariótipos de *Crossodactylodes* sp. 3 e *C. itambe clusters* de DNAr 5S e não de PcP190. Estudos adicionais sobre as sequências repetitivas de satDNA PcP190 e DNAr 5S são ainda necessários para uma melhor avaliação dessa questão.

Os dados disponíveis na literatura mostram que o satDNA PcP190 é amplamente distribuído em anuros (revisão em TARGUETA et al., 2018; GATTO et al., 2018), estando presente nas famílias Leptodactylidae, Hylidae e Hylodidae. Em Leptodactylidae, o satDNA PcP190 já havia sido encontrado nas subfamílias Leptodactylinae e Leiuperinae (TARGUETA et al., 2018). No presente estudo, mostramos que o satDNA PcP190 também é encontrado na subfamília Paratelmatoibiinae, o que levanta a possibilidade de que o mapeamento cromossômico desse tipo de sequência possa ser ferramenta auxiliar na inferência de homeologias cromossômicas nesse grupo.

3.2. CAPÍTULO II - Análise citogenética de *Paratelmatobius gaigae*

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes

Foram analisados os cariótipos de 3 exemplares machos pertencentes à espécie *ParatelmatoBIus gaigEae*, coletados no município de São José do Barreiro, estado de São Paulo (SP), Brasil (Figura 1). Os espécimes analisados foram capturados e identificados por Paulo Christiano Anchieta Garcia.

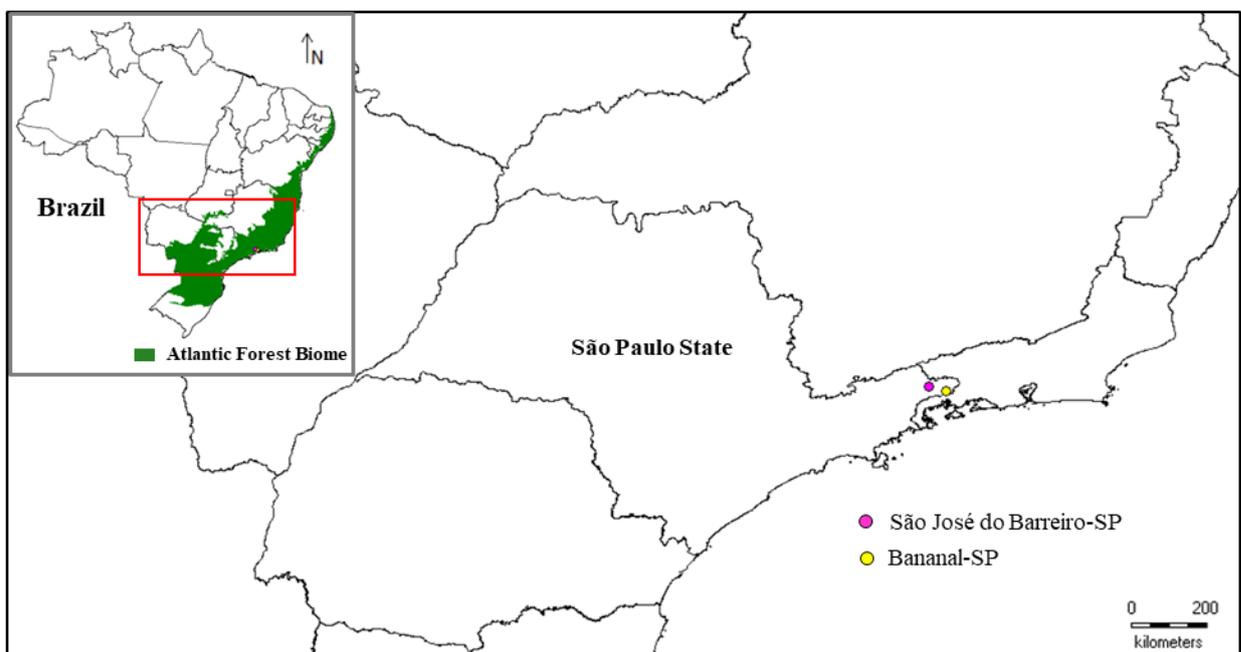


Figura 1: Distribuição geográfica da espécie *ParatelmatoBIus gaigEae*, com base em ZAHER et al. (2005) e GIARETTA & MAGRINI (2013).

Obtenção das preparações cromossômicas

Para obtenção das preparações cromossômicas os espécimes receberam injeção subcutânea com colchicina 2% (0,02 ml de solução por grama do animal), realizada no mínimo 4 horas antes da anestesia do animal para a remoção dos órgãos, utilizando métodos descritos por SCHMID (1978), com as modificações de GATTO et al. (2018). Os indivíduos foram anestesiados com lidocaína a 2% (50 mg/g de peso do animal – administração cutânea) e o intestino e os testículos foram removidos. Logo após a remoção, o intestino foi aberto com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, para a exposição do epitélio, e colocado em recipiente

contendo citrato de sódio a 0,9%, onde permaneceu por 45 minutos. Em seguida, o intestino foi transferido para uma placa de Petri com metanol-ácido acético (3:1) e seu epitélio raspado. O material obtido foi desagregado com o auxílio de pipeta Pasteur e mantido no fixador por mais 5 minutos.

Os testículos removidos foram submersos em água gelada, permaneceram por cerca de 15 minutos e fixados em metanol-ácido acético (3:1). Nessa solução, os testículos foram recortados com auxílio de uma tesoura cirúrgica.

Os materiais desagregados de intestino como os de testículos foram centrifugados a 800 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspendidos em metanol-ácido acético (3:1). Essa operação foi repetida duas vezes. As suspensões celulares foram gotejadas em lâminas limpas e armazenadas a uma temperatura de 4° C.

Coloração convencional e diferencial

As preparações cromossômicas foram coradas com uma solução de Giemsa 10% por aproximadamente 10 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar. Após isso, as preparações cromossômicas foram submetidas sequencialmente às técnicas de bandamento C e impregnação por prata.

Para localizar as regiões heterocromáticas, as preparações cromossômicas foram submetidas ao método de bandamento C, proposto por SUMNER (1972), com modificações de SIQUEIRA et al. (2008). As lâminas contendo o material cromossômico passaram por um tratamento prévio com ácido acético 50% por 10 minutos, incubadas em ácido clorídrico (HCl) 0,2N a temperatura ambiente por 30 minutos, lavadas com água destilada e, posteriormente incubadas por aproximadamente 30 segundos a 60° C em hidróxido de bário [Ba(OH)₂]. O tratamento com o hidróxido de bário foi interrompido com a imersão rápida das lâminas em solução de HCl 0,2 N a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas em solução de 2xSSC a 60° C por 45 minutos. Após a secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa 10 % por aproximadamente 10 minutos.

A técnica de impregnação por prata das NORs seguiu o método proposto por HOWELL & BLACK (1980). Foi gotejado sobre as preparações cromossômicas solução de nitrato de prata 50% (AgNO₃) e solução de gelatina 2% com ácido fórmico 1%, na proporção

1:2, respectivamente. As lâminas foram incubadas na estufa a 60° C com variações no tempo. Após isso, um jato de água Milli-Q foi utilizado para remoção das lamínulas e as lâminas secas ao ar.

RESULTADOS

Análise cromossômica

Os 3 exemplares de *Paratelmatoobius gaigeae* analisados no presente estudo apresentaram o número diploide de 24 cromossomos. O cariótipo de *Pa. gaigeae* consiste em cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Figura 2).

Uma constrição secundária foi observada no braço curto de ambos os homólogos do cromossomo 8 em metáfases coradas com Giemsa (Figura 2), que foram coincidentes com as NORs reveladas pelo método Ag-NOR (Figura 4). Além disso, a impregnação por prata identificou um heteromorfismo acentuado de tamanho entre as NORs homólogas, especialmente em um dos exemplares analisados (Figura 4).

O bandamento C detectou os centrômeros de todos os pares cromossômicos (Figura 3). Foi possível observar que os cromossomos do par 8 apresentaram, além da heterocromatina centromérica, notória banda heterocromática se estendendo da NOR até o telômero (Figura 3). Além disso, o braço curto do par de cromossomos 6 revelou-se totalmente heterocromático (Figura 3).

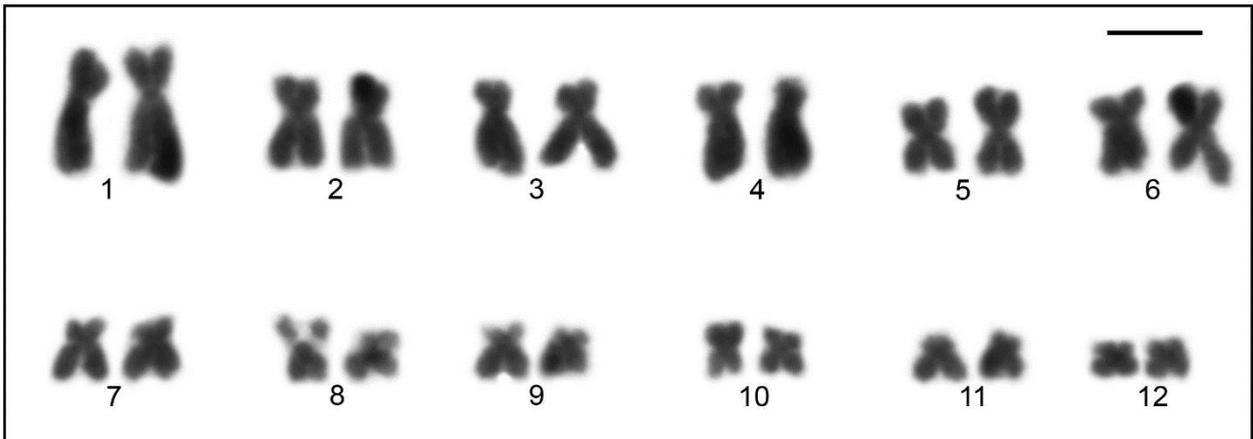


Figura 2: Cariótipo de *Paratelmatoebius gaigeae*. Note a constrição secundária do par 8. Barra: 5 μ m.

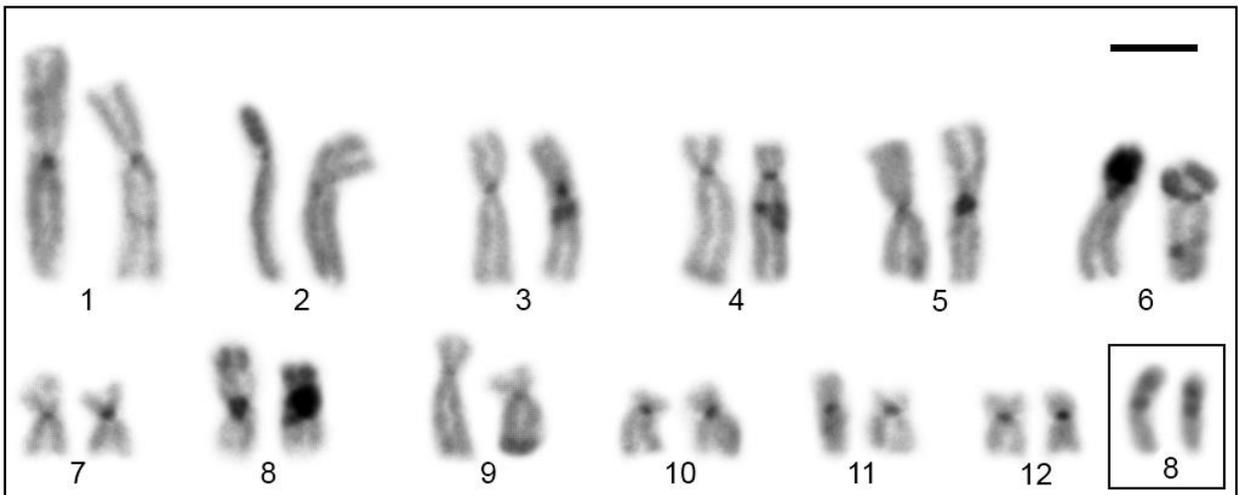


Figura 3: Cariótipo de *Paratelmatoebius gaigeae* (exemplar SMRP 505.5) submetido ao bandamento C. Em destaque, o par cromossômico 8 do exemplar SMRP 505.4, submetido ao bandamento C. Barra: 5 μ m.

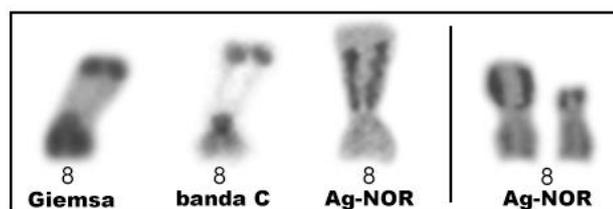


Figura 4: À esquerda, um dos homólogos do par cromossômico 8 do exemplar SMRP 505.5 de *Pa. gaigeae* corado com Giemsa e submetido sequencialmente as técnicas de bandamento C e impregnação por prata. À direita, o par cromossômico 8 desse exemplar submetido à técnica de Ag-NOR. Note o conspícuo heteromorfismo relativo ao tamanho da NOR no par 8.

DISCUSSÃO

O número diploide de *Paratelmatoobius gaigee* ($2n=24$) é o mesmo encontrado nas demais espécies do gênero [i.e., *Pa. lutzii* (De LUCCA et al., 1974), *Pa. poecilogaster* (LOURENÇO et al., 2000), *Pa. cardosoi* (LOURENÇO et al., 2000) e *Pa. segallai* (LOURENÇO et al., 2003b) e em *Scythrophrys* (LOURENÇO et al., 2003a, 2008). A caracterização do cariótipo de *Pa. gaigee* revelou que seu cariótipo é composto por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, assim como as demais espécies do gênero estudadas citogeneticamente (LOURENÇO et al., 2000, 2003a, 2003b, 2008).

Em todas as espécies de *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys* já cariotipadas até o momento (LOURENÇO et al., 2000, 2003a, 2003b, 2008), foi observada uma banda heterocromática intersticial no braço curto dos cromossomos do par 1. Em *Pa. gaigee*, no entanto, aparentemente essa banda heterocromática não está presente. Considerando que apenas poucas metáfases de boa qualidade, submetidas ao bandamento C foram obtidas de *Pa. gaigee*, sugerimos que novas análises sejam conduzidas para descartar a possibilidade da presença de uma pequena banda nesse par de cromossomos. Além da detecção de bandas heterocromáticas nas regiões centroméricas de todos os pares cromossômicos de *Pa. gaigee*, o braço curto do par de cromossomos 6 revelou-se completamente heterocromático, o que o torna similar ao cromossomo 6 de *Scythrophrys* sp. (LOURENÇO et al., 2003a).

Em *Pa. gaigee*, a NOR está presente na região pericentromérica do braço curto de um par de cromossomos de tamanho médio/pequeno, classificado como par 8. Esse cromossomo 8 se assemelha em morfologia e localização da NOR ao cromossomo 10 de *Pa. poecilogaster*, embora difira deste pela presença de um bloco de heterocromatina que se estende da NOR até a região telomérica. A presença de tal banda adjacente à NOR torna o cromossomo 8 de *Pa. gaigee* muito semelhante ao cromossomo 9 de *Pa. segallai* (LOURENÇO et al., 2003b). Tais características dão suporte à hipótese de que o cromossomo 8 de *Pa. gaigee* seja homeólogo ao cromossomo 9 de *Pa. segallai* e ao cromossomo 10 de *Pa. poecilogaster*, esses últimos já considerados homeólogos em análises anteriores (LOURENÇO et al., 2008 e referências aí citadas).

Com base na comparação entre os cromossomos portadores de NOR em *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys*, considerando as relações filogenéticas interespecíficas na família Paratelmatoobiinae, é possível supor que o ancestral comum das espécies de *Paratelmatoobius* já apresentava heterocromatina constitutiva associada a uma NOR

pericentromérica e esta foi perdida na linhagem que deu origem a *Pa. poecilogaster*. Os dados citogenéticos do presente estudo reforçam a hipótese de aumento da heterocromatina associada a NOR no grupo *Pa. cardosoi* (Figura 5). Conforme sugerido anteriormente (LOURENÇO et al., 2008 e referências aí citadas), esse ganho de heterocromatina está associado ao aumento do tamanho do braço cromossômico em questão, gerando diferenças na classificação dos cromossomos portadores de NOR, embora sejam cromossomos homeólogos.

Assim como as espécies *Pa. cardosoi* e *Pa. poecilogaster* (LOURENÇO et al., 2000), *Pa. gaigeae* também mostrou heteromorfismo de tamanho de NOR. A técnica Ag-NOR revelou nas metáfases de um exemplar uma diferença acentuada no tamanho da NOR entre os cromossomos homólogos. Possivelmente, o heteromorfismo de NOR em *Pa. gaigeae* ocorreu por amplificação de DNA ribossômico em um dos homólogos do cromossomo 8. Em anuros, o heteromorfismo de tamanho de NOR em cromossomos homólogos têm sido relatado em diversos trabalhos (SCHMID, 1978, 1982; LOURENÇO et al., 1998; BUSIN et al., 2001; ROSA et al., 2003; VEIGA-MENONCELLO et al., 2003; BARTH et al., 2009; BRUSCHI et al., 2012).

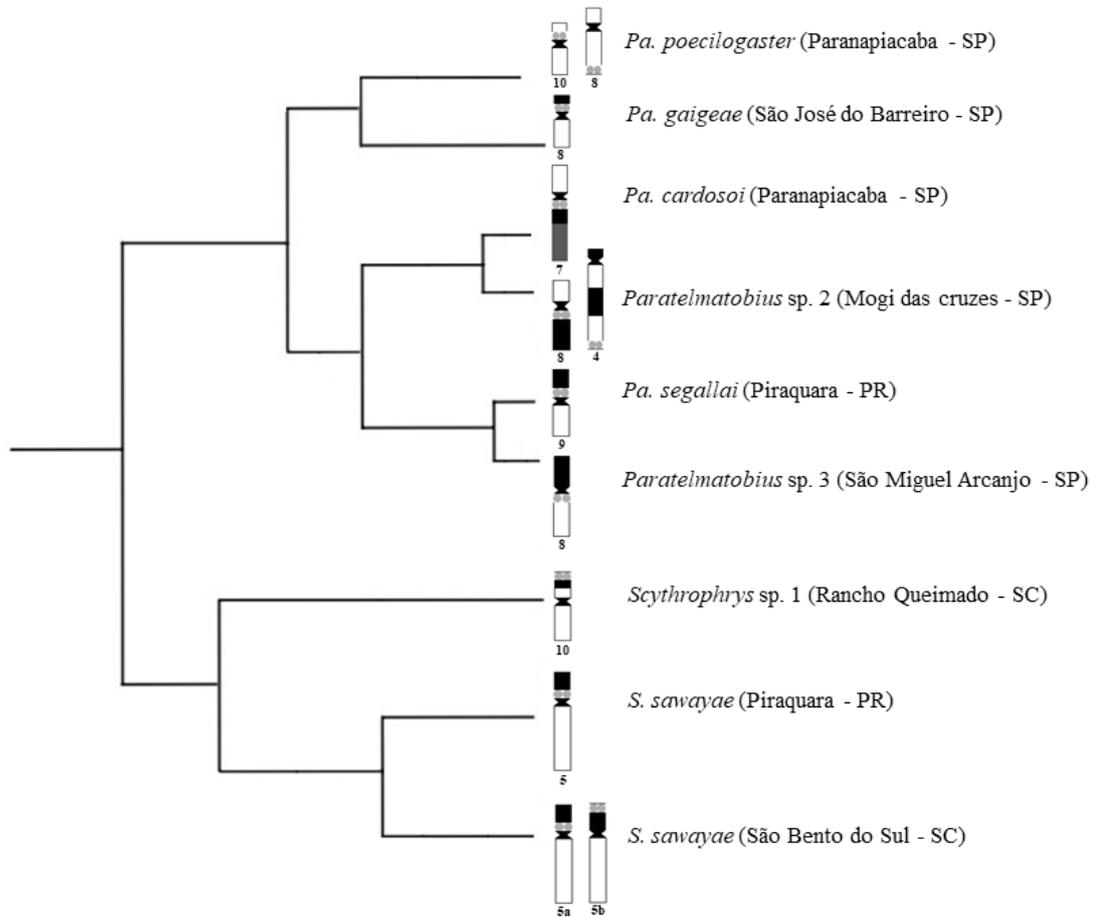


Figura 5: Cladograma simplificado evidenciando os cromossomos portadores de NOR/ distribuição de heterocromatina constitutiva dos clados *Paratelmatoebius* e *Scythrophrys* baseado no trabalho de LOURENÇO et al. (2008) com a inclusão do ideograma referente ao cromossomo portador de NOR em *Paratelmatoebius gaigeae*.

4. CONCLUSÕES

- Grande variação cromossômica numérica foi encontrada no gênero *Crossodactylodes*, tendo sido encontradas espécies com $2n=30$ (*C. izecksohni*), $2n=32$ (*Crossodactylodes* sp.) e $2n=36$ (*C. itambe*). Com base nas relações filogenéticas interespecíficas já inferidas para a subfamília Paratelmatoibiinae, foi possível inferir um aumento progressivo do número diploide ao longo da evolução do gênero *Crossodactylodes*.
- O satDNA PcP190 caracterizado em diversas espécies de anuros também está presente na subfamília Paratelmatoibiinae. O alinhamento da sequência nucleotídica isolada de *Crossodactylodes* sp. 3 permitiu reconhecer que tal sequência é muito similar quando comparada a outras já caracterizadas. Interessantemente a região variável do PcP190 de *Crossodactylodes* é muito semelhante à de sequências da espécie *Leptodactylus latrans*.
- A hibridação *in situ* com sonda de PcP190 revelou os cromossomos metacêntricos do par 1 no cariótipo de *Crossodactylodes* sp. 3, enquanto em *C. itambe* mapeou o par de cromossomos telocêntricos 2. Tais marcações apoiam a hipótese de que fissões cromossômicas tenham sido eventos importantes para a origem da variação cromossômica numérica encontrada em *Crossodactylodes*.
- Diferentemente das espécies de *Paratelmatoibius* já estudadas citogeneticamente, em *Pa. gaigeae* não foi revelada banda heterocromática intersticial nos cromossomos do par 1.
- A NOR pericentromérica flanqueada por heterocromatina constitutiva encontrada no par de cromossomos 8 de *Pa. gaigeae* está de acordo com a hipótese de que o ancestral comum de *Paratelmatoibius* já apresentava a NOR associada a regiões heterocromáticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR-Jr, O.; BACCI-Jr, M.; LIMA, A.P.; ROSSA-FERES, D.C.; HADDAD, C.F.B.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura: Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Cladistics**, 23: 455-463, 2007.
- ALMEIDA, A.P.; GASPARINI, J.L.; PELOSO, P.L.V. Frogs of the state of Espírito Santo, southeastern Brazil - The need for looking at the "coldspots". **Check List**, 7: 542-560, 2011.
- ALVES-SILVA, R. & Da SILVA, H.R. Life in bromeliads: reproductive behaviour and the monophyly of the *Scinax perpusillus* species group (Anura: Hylidae). **Journal of Natural History**, 43: 205-217, 2009.
- AMARO-GHILARDI, R.C.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal studies after differential staining and fluorescence *in situ* hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). **Caryologia**, 57: 53-65, 2004.
- AMARO-GHILARDI, R.C.; SILVA, M.J.J.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Genetica**, 134: 159-168, 2008.
- AMARO-GHILARDI, R.C.; SKUK, G.; De SÁ, R.O.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Karyotypes of eight species of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with a description of a new karyotype for the genus. **Phyllomedusa**, 5: 119-133, 2006.
- ANANIAS, F.; GARCIA, P.C.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Hereditas**, 140: 42-48, 2004.
- ANANIAS, F.; MODESTO, A.D.S.; MENDES, S.C.; NAPOLI, M.F. Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphism. **Hereditas**, 144: 206-212, 2007.
- ARRUDA, M.P. & MORIELLE-VERSUTE, E. Cytogenetic and random amplified polymorphic DNA analysis of *Leptodactylus* species from rural and urban environments (Anura, Amphibia). **Genetics and Molecular Research**, 7: 161-176, 2008.

- ASHLEY, T. & WARD, D.C. A “hot spot” of recombination coincides with an interstitial telomeric sequence in the Armenian hamster, **Cytogenetics and Cell Genetics**, 62: 169-171, 1993.
- AZZALIN, C.M.; NERGADZE, S.G.; GIULOTTO, E. Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. **Chromosoma**, 110: 75-82, 2001.
- BAIRD, D.M. Telomeres and genomic evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 373: 20160437, 2018.
- BALDO, D.; COTICHELLI, L.; PEREYRA, M.O.; BORTEIRO, C.; NETTO, F.; KOLENC, F.; BRUSQUETTI, F.; BIDAU, C. A cytotaxonomic survey of the genus *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 (Anura: Bufonidae). **Journal of Herpetology**, 46: 25-32, 2012.
- BARATA, I.M.; SANTOS, M.T.T.; LEITE, F.S.F.; GARCIA, P.C.A. A new species of *Crossodactylodes* (Anura: Leptodactylidae) from Minas Gerais, Brazil: first record of genus within the Espinhaço Mountain Range. **Zootaxa**, 3731: 552-560, 2013.
- BARATA, I.M.; SILVA, E.P.; GRIFFITHS, R.A. Predictors of abundance of a rare bromeliad-dwelling frog (*Crossodactylodes itambe*) in the Espinhaço Mountain Range of Brazil. **Journal of Herpetology**, 52: 321-326, 2018.
- BARTH, A.; SOLÉ, M.; COSTA, M.A. Chromosome polymorphism in *Phyllomedusa rohdei* populations (Anura: Hylidae). **Journal of Herpetology**, 43: 676-679, 2009.
- BARTH, A.; SOUZA, V.A.; SOLÉ, M.; COSTA, M.A. Molecular cytogenetics of nucleolar organizer regions in *Phyllomedusa* and *Phasmahyla* species (Hylidae, Phyllomedusinae): a cytotaxonomic contribution. **Genetics and Molecular Research**, 12: 2400-2408, 2013.
- BEÇAK, M.L.; BEÇAK, W.; RABELLO, M.N. Further studies on polyploid Amphibians (*Ceratophrydidae*). I. Mitotic and meiotic aspects. **Chromosoma**, 22: 192-201, 1967.
- BLACKBURN, E.H. Structure and function of telomeres. **Nature**, 350: 569-573, 1991.
- BOGART, J.P. & HEDGES, S.B. Rapid chromosome evolution in Jamaican frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). **Journal of Zoology (London)**, 235: 9-31, 1995.

- BOGART, J.P. A Karyosystematic study of frogs in the genus *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae). **Copeia**, 1974: 728-737, 1974.
- BOLZÁN, A.D. & BIANCHI, M.S. Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. **Mutation Research**, 612: 189-214, 2006.
- BRUSCHI, D.P, BUSIN, C.S, SIQUEIRA, S.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetic analysis of two species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Anura, Hylidae). **Hereditas**, 149: 34-40, 2012.
- BÜHLER, M. & MOAZED, D. Transcription and RNAi in heterochromatic gene silencing. **Nature Structural & Molecular Biology**, 14: 1041-1048, 2007.
- BUSIN, C.S.; ANDRADE, G.V.; BERTOLDO, J.; DEL GRANDE, M.L, UETANABARO, M.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. **Genetica**, 133: 119-127, 2008.
- BUSIN, C.S.; LIMA, A.P.; PRADO, C.P.A.; STRÜSSMANN, C.; JÚNIOR, S.S.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Chromosomal differentiation of populations of *Lysapsus limellus limellus*, *L. l. bolivianus*, and of *Lysapsus caraya* (Hylinae, Hylidae). **Micron**, 37: 355-362, 2006.
- BUSIN, C.S.; VINCIPROVA, G.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). **Genetica**, 110: 131-141, 2001.
- CAMPOS, J.R.C. & KASAHARA, S. Os cromossomos dos anfíbios anuros do gênero *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae: Eleutherodactylinae). **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, 12: 27-38, 2006.
- CAMPOS, J.R.C.; ANANIAS, F.; BRASILEIRO, C.A.; YAMAMOTO, M.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. **Hereditas**, 146: 104-111, 2009.

- CARDOZO, D.; BOERIS, J.M.; FERRO, J.M.; BORTEIRO, C.; KOLENC, F.; SUÁREZ, P.; NETTO, F.; BRUSQUETTI, F.; BALDO, D. Evidence for independent instances of chromosome number reduction in the genus *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae). **Salamandra**, 52: 11-22, 2016.
- CARDOZO, D.E.; LEME, D.M.; BORTOLETO, J.F.; CATROLI, G.F.; BALDO, D.; FAIVOVICH, J.; KOLENC, F.; SILVA, A.P.Z.; BORTEIRO, C.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia, Anura, Hylidae): diversity and informative variation. **Copeia**, 251-263, 2011.
- CARVALHO, K.A.; GARCIA, P.C.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). **Genetics and Molecular Research**, 8: 1498-1508, 2009b.
- CARVALHO, K.A.; GARCIA, P.C.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. NOR dispersion, telomeric sequence detection in centromeric regions and meiotic multivalent configurations in species of the *Aplastodiscus albofrenatus* group (Anura, Hylidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 126: 359-367, 2009a.
- CARVALHO, M.A.; RODRIGUES, M.T.; SIQUEIRA, S.; GARCIA, C. Dynamics of chromosomal evolution in the genus *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). **Genetics and Molecular Research**, 13: 7826-7838, 2014.
- CATROLI, G.F. & KASAHARA, S. Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, 15: 67-86, 2009.
- CATROLI, G.F.; FAIVOVICH, J.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Conserved karyotypes in Cophomantini: Cytogenetic analysis of 12 species from 3 species groups of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae). **Journal of Herpetology**, 45: 120-128, 2011.
- CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, 371: 215-220, 1994.
- COELHO, A.C.; De MATTOS, T.L.; VIANA, P.; TERCENIO, M.L.; SCHNEIDER, C.H.; MENIN, M.; GROSS, M.C. Intra-generic and interspecific karyotype patterns of *Leptodactylus* and *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae) with inclusion of five species from Central Amazonia. **Genetica**, 144: 37-46, 2016.

- COLE, J.C. Chromosome evolution in selected treefrogs, including casque-headed species (*Pternohyla*, *Triprion*, *Hyla*, and *Smilisca*). **American Museum Novitates**, 2541: 1-10, 1974.
- CRAIG, J. M. Heterochromatin - many flavours, common themes. **BioEssays**, 27: 17-28, 2004.
- CUNHA, M.S.; NAPOLI, M. F. Calling site selection by the bromeliad-dwelling treefrog *Phyllodytes melanomystax* (Amphibia: Anura: Hylidae) in a coastal sand dune habitat. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, 51: 144-151, 2016.
- DAY, J.P.; LIMOLI, C.L.; MORGAN, W.F. Recombination involving interstitial telomere repeat-like sequences promotes chromosomal instability in Chinese hamster cells. **Carcinogenesis**, 19: 259-265, 1998.
- De LUCCA, E.J.; JIM, J.; FORESTI, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. **Caryologia**, 27: 183-192, 1974.
- De MATTOS, T.L.; COELHO, A.C.; SCHNEIDER, C.H.; TELLES, D.O.C.; MENIN M.; GROSS. M.C. Karyotypic diversity in seven Amazonian anurans in the genus *Hypsiboas* (family Hylidae). **BMC Genetics**, 15: 43, 2014.
- DOMENICO, E.A.; HADDAD, C.F.B.; ZAHER, H. Natural history of *Paratelmatobius gaigeae* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): description of the tadpole and advertisement call. **Journal of Herpetology**, 48: 430-433, 2014.
- DOVER, G.A. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends in Genetics**, 122: 159-165, 1986.
- DOVER, G.A. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. **Nature**, 299: 111-117, 1982.
- DUARTE, T. C.; VEIGA-MENONCELLO, A. C. P.; LIMA, J.F.R., STRUSSMANN, C.; DEL-GRANDE, M. L.; GIARETTA, A. A.; PEREIRA, E. G.; ROSSA-FERES, D. C.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Chromosome analysis in *Pseudopaludicola* (Anura, Leiuperidae), with description of sex chromosomes XX/XY in *P. saltica*. **Hereditas**, 147: 43-52, 2010.

- FAGUNDES, V. & YONENAGA-YASSUDA, Y. Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, 52 Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. **Chromosome Research**, 6: 643-648, 1998.
- FÁVERO, E.R.; VEIGA-MENONCELLO, A.C.P.; ROSSA-FERES, D.C.; STRUSSMANN, C.; GIARETTA, A. A.; ANDRADE, G.V.; COLOMBO, P.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Intrageneric karyotypic variation in *Pseudopaludicola* (Anura, Leiuperidae), and its taxonomic relatedness. **Zoological Studies**, 50: 826-836, 2011.
- FERREIRA, R. B.; MÔNICO, A.T.; ZOOCA, C.Z.; SANTOS, M.T.T.; LÍRIO, F.C.F.; TONINI, J.F.R.; SABAGH, L.T.; CIPRIANO, R.S.; WAICHERT, C.; CRUMP, M.L.; BEARD, K.H.; TOLEDO, L.F.; DUCA, C. Uncovering the natural history of the bromeligenous frog *Crossodactylodes izecksohni* (Leptodactylidae, Paratelmatobiinae). **South American Journal of Herpetology**, 14: 136-145, 2019.
- FERREIRA, R.B.; FAIVOVICH, J.; BEARD, K.H.; POMBAL, J.P.Jr. The first bromeligenous species of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) from Brazil's Atlantic Forest. **PLoS ONE**, 10: e0142893, 2015.
- FERREIRA, R.B.; SCHINEIDER, J.A.P.; TEIXEIRA, R.L. Diet, fecundity, and use of bromeliads by *Phyllodytes luteolus* (Anura: Hylidae) in Southeastern Brazil. **Journal of Herpetology**, 46: 19-24, 2012.
- FERRO, J.M.; CARDOZO, D.E.; SUÁREZ, 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**, 13: e0192861, 2018.
- FOUQUET, A.; BLOTTO, B.I.; MARONNA, M.M.; VERDADE, V.K.; JUNCÁ, F.A.; De SÁ R.; RODRIGUES, M.T. Unexpected phylogenetic positions of the genera *Rupirana* and *Crossodactylodes* reveal insights into the biogeography and reproductive evolution of leptodactylid frogs. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 67: 445-457, 2013.

- FROST, D.R. Amphibian Species of the World: na Online Reference. Version 6.0 (17/08/2020). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. **American Museum of Natural History**, New York, USA, 2020.
- GALL, J.G.; COHEN, E.H.; POLAN, M.L. Repetitive DNA sequences in *Drosophila*. **Chromosoma**, 33: 319-344, 1971.
- GARAGNA, S.; RONCHETTI, E.; MASCHERETTI, S.; CROVELLA, S.; FORMENTI, D.; RUMPLER, Y.; ROMANINI, M.G.M. Non-telomeric chromosome localization of (TTAGGG)_n repeats in the genus *Eulemur*. **Chromosome Research**, 5: 487-491, 1997.
- GARCIA, P.C.A.; BERNECK, B.V.M.; COSTA, C.O.R. A new species of *Paratelmatobius* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from Atlantic Rain Forest of Southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, 4: 217-224, 2009.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An evolving topic. **Genes**, 8: 1-41, 2017.
- GARRIDO-RAMOS, M.A. Satellite DNA in plants: more than just rubbish. **Cytogenetic and Genome Research**, 146: 153-170, 2015.
- GATTO, K.P.; BUSIN, C.S.; LOURENÇO, L.B. Unraveling the sex chromosome heteromorphism of the paradoxical frog *Pseudis tocantins*. **PLoS One**, 11: e0156176, 2016.
- GATTO, K.P.; MATTOS, J.V.; SEGER, K.R.; LOURENÇO, L.B. Sex chromosome differentiation in the frog genus *Pseudis* involves satellite DNA and chromosome rearrangements. **Frontiers in Genetics**, 9: 301, 2018.
- GATTO, K.P.; SEGER, K.R.; GARCIA, P.C.A.; LOURENÇO, L.B. Satellite DNA mapping in *Pseudis fusca* (Hylidae, Pseudinae) provides new insights into sex chromosome evolution in paradoxical frogs. **Genes**, 10: 60, 2019.
- GAZONI, T.; GRUBER, S.L.; SILVA, A.P.Z.; ARAÚJO, O.G.S.; NARIMATSU, H.; STRUSSMANN, C.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Cytogenetic analyses of eight species in the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1843 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), including a new diploid number and a karyotype with multiple translocations. **BMC Genetics**, 13:109, 2012.
- GIARETTA, A. & MAGRINI, L. Calls of *Paratelmatobius gaigeae* (Cochran 1938) (Anura, Leptodactylidae). **Herpetology Notes**, 6: 171-176, 2013.

- GLICK, L. & MAYROSE, I. ChromEvol: assessing the pattern of chromosome number evolution and the inference of polyploidy along a phylogeny. **Molecular Biology and Evolution**, 31: 1914-1922, 2014.
- GOMEZ-MESTRE, I.; PYRON, R.A.; WIENS, J.J. Phylogenetic analyses reveal unexpected patterns in the evolution of reproductive modes in frogs. **Evolution**, 66: 3687-3700, 2012.
- GREEN, D. M. & SESSIONS, S.K. Nomenclature for chromosomes. In: Green, D. M. and Sessions, S. K. (eds), Amphibian cytogenetics and evolution. **Academic Press**, 431- 432, 1991.
- GREIG, G.M.; WARBURTON, P.E.; WILLARD, H.F. Organization and evolution of an alpha satellite DNA subset shared by human chromosomes 13 and 21. **Journal of Molecular Evolution**, 37: 464-475, 1993.
- GREWAL, S.I.S & JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nature Reviews Genetics**, 8: 35-46, 2007.
- GRUBER, S.L.; HADDAD, C.F.B.; 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**, 130: 281-291, 2007.
- GRUBER, S.L.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Karyotype analysis of seven species of the tribe Lophiohyliini (Hylinae, Hylidae, Anura), with conventional and molecular cytogenetic techniques. **Comparative Cytogenetics**, 6: 409-423, 2012b.
- GRUBER, S.L.; NARIMATSU, H.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hylinae, Hylidae). **BMC Genetics**, 13:28, 2012a.
- HARTLEY, G. & O'NEILL, R.J. Centromere repeats: hidden gems of the genome. **Genes**, 10: 223, 2019.
- HEYER, W.R. A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frogs family Leptodactylodae. **Smithsonian Contributions to Zoology**, 199: 1-55, 1975.
- HOWEL, W.M. & BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. **Experientia**, 36: 1014-1015, 1980.

- KING, M. & ROFE, R. Karyotypic variation in the Australian Gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). **Chromosoma** (Berl.), 54: 75-87, 1976.
- KING, M.; CONTRERAS, N.; HONEYCUTT, R.L. Variation within and between nucleolar organizer regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S + 28S *in-situ* hybridization. **Genetica**, 80: 17-29, 1990.
- KRYLOV, V. & TLAPAKOVA, T. *Xenopus* cytogenetics and chromosomal evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, 145:192-200, 2015.
- LANTYER-SILVA, A.S.F.; SOLÉ, M.; ZINA, J. Reproductive biology of a bromeligenous frog endemic to the Atlantic Forest: *Aparasphenodon arapapa* Pimenta, Napoli and Haddad, 2009 (Anura: Hylidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 86: 867-880, 2014.
- LEE, C.; SASI, R.; LIN, C.C. Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs. **Cytogenetic and Cell Genetics**, 63: 156-159, 1993.
- LÓPES-FLORES, I. & GARRIDO-RAMOS, M.A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Genome Dynamics**, 7: 1-28, 2012.
- LOPEZ, L.C.S.; DA NÓBREGA ALVES, R.R.; RIOS, R. I. Micro-environmental factors and the endemism of bromeliad aquatic fauna. **Hydrobiologia**, 625: 151-156, 2009.
- LOURENÇO, L.B.; BACCI-JÚNIOR, M.; MARTINS, V.G.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; HADDAD, C.FB. Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). **Genetica**, 132: 255-266, 2008.
- LOURENÇO, L.B.; GARCIA, P.C.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetics of a new species of *Paratelmatobius cardosoi* group (Anura: Leptodactylidae), with the description of an apparent case of pericentric inversion. **Amphibia-Reptilia**, 24: 47-55, 2003b.
- LOURENÇO, L.B.; GARCIA, P.C.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments. **Hereditas**, 133: 201-209, 2000.
- LOURENÇO, L.B.; GARCIA, P.C.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* and new insights into the relationship with *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae). **Italian Journal of Zoology**, 70: 183-190, 2003a.

- LOURENÇO, L.B.; NASCIMENTO, J.A.A.; ANDRADE, G.V.; ROSSA-FERES, D.C.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Chromosomal analysis of the leptodactylids *Pleurodema diploistris* and *Physalaemus nattereri* (Amphibia, Anura). **Amphibia-Reptilia**, 27: 481-489, 2006.
- LOURENÇO, L.B.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; CARDOSO, A.J. Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. **Chromosome Research**, 6: 621-628, 1998.
- MAGESKI, M.; SILVA-SOARES, T., FERREIRA, R.B. Hábito bromelígena de *Dendropsophus haddadi* (Anura : Hylidae) em ambiente de Mata Atlântica no sudeste do Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, 34: 97-100, 2014.
- MAGESKI, M.M.; FERREIRA, R.B.; BEARD, K.H, COSTA, L.C.; JESUS, P.R.; MEDEIROS, C.C.; FERREIRA, P.D. Bromeliad Selection by *Phyllodytes luteolus* (Anura, Hylidae): The Influence of Plant Structure and Water Quality Factors . **Journal of Herpetology**, 50: 108-112, 2016.
- MAHONY, M.J.; NORRIS, R.M.; DONNELLAN, S.C. Karyotypes of South-west Pacific Ranid Frogs (Anura: Ranidae). **Australian Journal of Zoology**, 44: 119-128, 1996.
- MAYROSE, I; BARKER, M.S; OTTO, S.P. Probabilistic models of chromosome number evolution and the inference of polyploidy. **Systematic Biology**, 59: 132-144, 2010.
- MCDIARMID, R. W. Amphibian diversity and natural history : an overview. **Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians**, 5-15, 1994.
- MEDEIROS, L.R.; LOURENÇO, L. B.; ROSSA-FERES, D.C.; LIMA, A.P.; ANDRADE, G.V.; GIARETTA, A.A.; EGITO, G.T.B.T.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Comparative cytogenetic analysis of some species of the *Dendropsophus microcephalus* group (Anura, Hylidae) in the light of phylogenetic inferences. **BMC Genetics**, 14:59, 2013.
- METCALFE, C.J.; ELDRIDGE, M.D.B.; JOHNSTON, P.G. Mapping the distribution of the telomeric sequence (T₂AG₃)_n in the Macropodoidea (Marsupialia) by fluorescence in situ hybridization. II. The ancestral 2n = 22 macropodid karyotype. **Cytogenetic and Genome Research**, 116: 212-217, 2007.

- MEYNE, J.; BAKER, R.J.; HOBART, H.H.; HSU, T.C.; RYDER, O.A.; WARD, O.G.; WILEY, J.E.; WURSTER-HILL, D.H.; YATES, T.L.; MOYZIS, R.K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, 99: 3-10, 1990.
- MEZZASALMA, M.; GLAW, F.; ODIERNA, G.; PETRACCIOLI, A.; GUARINO, F.M. Karyological analyses of *Pseudhymenochirus merlini* and *Hymenochirus boettgeri* provide new insights into the chromosome evolution in the anuran family Pipidae. **Zoologischer Anzeiger**, 258: 47-53, 2015.
- MIURA, I.; NISHIOKA, M.; BORKIN, L.J.; WU, Z. The origin of the brown frogs with 2n=24 chromosomes. **Experientia**, 51: 179-188, 1995.
- MOYZIS, R.K.; BUCKINGHAM, J.M.; CRAM, L.S.; DANI, M.; DEAVEN, L.L.; JONES, M.D.; MEYNE, J.; RATLIFF, R.L.; WU, J.R. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 85: 6622-6626, 1988.
- MUDRY, M.D.; NIEVES, M.; BOLZÁN, A.D. Chromosomal localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in eight species of New World primates (Neotropical Primates, Platyrrhini). **Cytogenetic and Genome Research**, 119: 221-224, 2007.
- NANDA, I.; FUGATE, M.; STEINLEIN, C.; SCHMID, M. Distribution of (TTAGGG)_n telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. **Cytogenetic and Genome Research**, 122: 396-400, 2008.
- NANDA, I.; SCHRAMA, D.; FEICHTINGER, W.; SCHARTL, T.H.M.; SCHMID, M. Distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in avian chromosomes. **Chromosoma**, 111: 215-227, 2002.
- NERGADZE, S.G.; ROCCHI, M.; AZZALIN, C.M.; MONDELLO, C.; GIULOTTO, E. Insertion of telomeric repeats at intrachromosomal break sites during primate evolution. **Genome Research**, 14: 1704-1710, 2004.
- NOGUEIRA, L.; PAIM, F.; DINIZ, D.; SOLÉ, M.; AFFONSO, P.; SIQUEIRA, S.; SAMPAIO, I. Cytogenetic analysis of *Scinax auratus* and *Scinax eurydice* (Anura, Hylidae) with emphasis on cytotaxonomy. **Comparative Cytogenetics**, 9: 227-236, 2015.

- NUNES, R.R.A. & FAGUNDES, V. Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, 23: 21-36, 2008.
- O'SULLIVAN, R. J. & KARLSEDER, J. Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 11: 171-181, 2010.
- OCALEWICZ, K. Telomeres in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, 141: 114-125, 2013.
- OHLER, A. & DUBOIS, A. Validation of two familial nomina nuda of Amphibia Anura. **Alytes**, 28: 162-167, 2012.
- PAÇO, A.; CHAVES, R.; VIEIRA-DA-SILVA, A.; ADEGA, F. The involvement of repetitive sequences in the remodelling of karyotypes: The *Phodopus* genomes (Rodentia, Cricetidae). **Micron**, 46: 27-34, 2013.
- PEIXOTO, O.L. Associação de anuros a Bromeliáceas na Mata Atlântica. **Revista da Universidade Rural Série Ciências da Vida**, 17: 75-83, 1995.
- PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MESTROVIC, N.; MANTOVANI, B. Satellites DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. **Gene**, 409: 72-82, 2008.
- PLOHL, M.; MESTROVIC, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA Evolution. In: Garrido Ramos, M.A. Repetitive DNA. **Genome Dyn**, 7:126-152., 2012.
- POMBAL Jr, J.P. & HADDAD, C.F.B. Frogs of the genus *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae) with descriptions of two new species. **Copeia**, (4): 1014-1026, 1999.
- PYRON, R.A. & WIENS, J.J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 61: 543-583, 2011.
- RABER, S.C.; CARVALHO, K.A.; GARCIA, P.C.A.; VINCIPROVA, G.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). **Phyllomedusa** 3: 43-49, 2004.

- RIBEIRO, L.F.; BORNSCHEIN, M.R.; BELMONTE-LOPES, R.; FIRKOWSKI, C.R.; MORATO, S.A.A.; PIE, M.R. Seven new microendemic species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from southern Brazil. **PeerJ**, 3: e1011, 2015.
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, 142: 1141-1153, 2009.
- RICHARD, G.F.; KERREST, A.; DUJON, B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 72: 686-727, 2008.
- ROCHA, C.F.D.; COGLIATTI-CARVALHO, L.; NUNES-FREITAS, A.F.; ROCHA-PESSÔA.; T.C.; DIAS, A.S.; ARIANI, C.V.; MORGADO, L.N. Conservando uma larga porção da diversidade biológica através da conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, 2: 52-72, 2004.
- ROCHA, P.C.; SENA, L.M.F.; PEZZUTI, T.L.; LEITE, F.S.F.; SVARTMAN, M.; ROSSET, S.D.; BALDO, D.; GARCIA, P.C.A. A new diploid species belonging to the *Odontophrynus americanus* species group (Anura: Odontophrynidae) from the Espinhaço range, Brazil. **Zootaxa**, 4329: 327-350, 2017.
- RODRIGUES, D.S.; RIVERA, M.; LOURENÇO, L.B. Molecular organization and chromosomal localization of 5S rDNA in Amazonian *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). **BMC Genetics**, 13:17, 2012.
- ROMERO, G.Q. NOMURA, F.; GONÇALVES, A.Z.; DIAS, N.YN.; MERCIER, H.; CONFORTO, E.C.; ROSSA-FERES, D.C. Nitrogen fluxes from treefrogs to tank epiphytic bromeliads: an isotopic and physiological approach. **Oecologia**, 162, 941-949, 2010.
- RON, S.R.; TORAL, E.; RIVERA, M.; TERÁN-VALDEZ, A. A new species of *Engystomops* (Anura: Leiuperidae) from southwestern Ecuador. **Zootaxa**, 2606: 25-49, 2010.
- ROSA, C.; AGUIAR-Jr, O.; GIARETTA, A.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Karyotypic variation in the genus *Megaelosia* (Anura, Hylodinae) with the first description of a B-chromosome in a Leptodactylid frog. **Copeia**, 1: 166-174, 2003.

- ROSSET, S.D.; Baldo, D.; LANZONE, C.; BASSO, N.G. Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). **Journal of Herpetology**, 40: 465-477, 2006.
- ROULEUX-BONNIN, F.; RENAULT, S.; BIGOT, Y.; PERIQUET, G. Transcription of four satellite DNA subfamilies in *Diprion pini* (hymenoptera, symphyta, diprionidae). **European Journal of Biochemistry**, 238: 752-759, 1996.
- ROVATSOS, M.; KRATOCHVÍL, L.; ALTMANOVÁ, M.; POKORNÁ, M.J. Interstitial telomeric motifs in squamate reptiles: when the exceptions outnumber the rule. **PLoS ONE**, 10: e0134985, 2015.
- RUIZ-HERRERA, A.; NERGADZE, S.G.; SANTAGOSTINO, M.; GIULOTTO, E. Telomeric repeats far from the ends: Mechanisms of origin and role in evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, 122, 219-228, 2008.
- SABAGH, L.T.; FERREIRA, R.B.; ROCHA, C.F.D. Host bromeliads and their associated frog species: Further considerations on the importance of species interactions for conservation. **Symbiosis**, 73: 201-211, 2017.
- SANTOS, M.T.T.; De MAGALHÃES, R.F.; LYRA, M.L.; SANTOS, F.R.; ZAHER, H.; GIASSON, L.O.M.; GARCIA, P.C.A.; CARNAVAL, A.C.; HADDAD, C.F.B. Multilocus phylogeny of Paratelmatoibiinae (Anura: Leptodactylidae) reveals strong spatial structure and previously unknown diversity in the Atlantic Forest hotspot. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 148: 106819, 2020a.
- SANTOS, M.T.T.; De OLIVEIRA, S.H.; De CARVALHO, T.R.; ZAIDAN, B.F.; Da SILVA, N.R.; BERNECK, B.V.M.; GARCIA, P.C.A. A new species of *Paratelmatoibius* (Anura: Leptodactylidae: Paratelmatoibiinae) from the Atlantic Forest of southern Brazil. **Zootaxa**, 4648: 473-493, 2019.
- SANTOS, M.T.T.; MAGALHÃES, R.F.; FERREIRA, R.B.; VITTORAZZI, S.E.; DIAS, I.R.; LEITE, F.S.F.; LOURENÇO, L.B.; SANTOS, F.R.; HADDAD, C.F.B.; GARCIA, P.C.A. Systematic revision of the rare bromeligenous genus *Crossodactylodes* Cochran 1938 (Anura: Leptodactylidae: Paratelmatoibiinae). **Herpetological Monographs**, 34: 1-38, 2020b.

- SANTOS, M.T.T.; PEZZUTI, T.L.; BARATA, I.M.; LEITE, F.S.F.; GARCIA, P.C.A. The tadpole of the microendemic, bromeligenous *Crossodactylodes itambe* (Anura, Leptodactylidae) from the endangered 'Campo Rupestre' of southeastern Brazil, with additional comments on natural history. **South American Journal of Herpetology**, 12: 14-23, 2017.
- SCHMID, M. & STEINLEIN, C. Chromosome banding in Amphibia. XXXIV. Intrachromosomal telomeric DNA sequences in Anura. **Cytogenetic and Genome Research**, 148: 211-226, 2016.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, 66: 361-388, 1978.
- SCHMID, M. Chromosome Banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in anura. **Chromosoma**, 87: 327-344, 1982.
- SCHMID, M.; EVANS, B.J.; BOGART, J.P. Polyploidy in Amphibia. **Cytogenetic and Genome Research**, 145: 315-330, 2015.
- SCHMID, M.; HAAF, T.; SCHEMPP, W. Chromosome banding in Amphibia. IX. The polyploid karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). **Chromosoma**, 91: 172-184, 1985.
- SCHMID, M.; OLERT, J.; KLETT, C. Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. **Chromosoma**, 71: 29-55, 1979.
- SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; FEICHTINGER, W.; NANDA, I. Chromosome Banding in Amphibia. XXXV. Highly mobile nucleolus organizing regions in *Craugastor fitzingeri* (Anura, Craugastoridae). **Cytogenetic and Genome Research**, 152: 180-193, 2017.
- SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. **Hereditas**, 131: 135-141, 1999.
- SILVA, A.P.Z.; GARCIA, P.C.A.; MARTINS, V.G.; BACCI, M.; KASAHARA, S. Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. gracilis delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. **Amphibia-Reptilia**, 25: 185-196, 2004.

- SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B.; GALASSI, G.G.; KASAHARA, S. Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. **Genetica**, 127: 35-44, 2006.
- SINGH, L.; PURDOM, I.F.; JONES, K.W. Sex Chromosome Associated Satellite DNA: Evolution and Conservation. **Chromosoma**, 79: 137-157, 1980.
- SIQUEIRA, S.; AGUIAR-Jr, O., STRÜSSMANN, C.; DEL-GRANDE, M.L.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Chromosomal analysis of three Brazilian “eleutherodactyline” frogs (Anura: Terrarana), with suggestion of a new species. **Zootaxa** 1860: 51-59, 2008.
- SLAMOVITS, C.H. & ROSSI, M.S. Satellite DNA: agent of chromosomal evolution in mammals. A review. **Journal of Neotropical Mammalian**, 9: 297-308, 2002.
- SLIJEPCEVIC, P. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chromosoma**, 107: 136-140, 1998.
- SRIKULNATH, K.; AZAD, B.; SINGCHAT, W.; EZAZ, T. Distribution and amplification of interstitial telomeric sequences (ITSs) in Australian dragon lizards support frequent chromosome fusions in Iguania. **PLoS ONE**, 14: e0212683, 2019.
- SUÁREZ, P.; CARDOZO, D.; BALDO, D.; PEREYRA, M.O.; FAIVOVICH, J.; ORRICO, V.G.D.; CATROLI, G.F.; GRABIELE, M.; BERNARDE, P.S.; NAGAMACHI, C.Y.; HADDAD, C.F.B.; PIECZARKA, J.C. Chromosome evolution in Dendropsophini (Amphibia, Anura, Hylinae). **Cytogenetic and Genome Research**, 141: 295-308, 2013.
- SUJIWATTANARAT, P.; THAPANA, W.; SRIKULNATH, K.; HIRAI, Y.; HIRAI, H.; KOGA, A. Higher-order repeat structure in alpha satellite DNA occurs in New World monkeys and is not confined to hominoids. **Scientific Reports**, 5: 10315, 2015.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 75: 304-306, 1972.
- SVARTMAN, M. & VIANNA-MORGANTE, A.M. Karyotype evolution of marsupials: from higher to lower diploid numbers. **Cytogenetic and Cell Genetics**, 82: 263-266, 1998.
- TARGUETA, C. P.; RIVERA, M.; Lourenço, L. B. Karyotypic differentiation via 2n reduction and a finding of a case of triploidy in anurans of the genus *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). **Genetica**, 139: 1339-1347, 2012.

- TARGUETA, C.P.; RIVERA, M.; SOUZA, M.B.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; LOURENÇO, L.B. Cytogenetic contributions for the study of the Amazonian *Engystomops* (Anura; Leiuperidae) assessed in the light of phylogenetic relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54: 709-725, 2010.
- TARGUETA, C.P.; VITTORAZZI, S.E.; GATTO, K.P.; BRUSCH, D.P.; VEIGA-MENONCELLO, A.C.P.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; LOURENÇO, L.B. Anuran cytogenetics: an overview. **In: Norris N, Miller C (Eds) An Essential Guide to Cytogenetics (Charper 1). Nova Science Publishers**, 1-64, 2018.
- TEIXEIRA, L.S.R.; SEGER, K.R.; TARGUETA, C.P.; ORRICO, V.G.D.; LOURENÇO, L.B. Comparative cytogenetics of tree frogs of the *Dendropsophus marmoratus* (Laurenti, 1768) group: Conserved karyotypes and interstitial telomeric sequences. **Comparative Cytogenetics**, 10: 753-767, 2016.
- TEIXEIRA, M.Jr.; RECODER, R.S.; AMARO, R.C.; DAMASCENO, R.P.; CASSIMIRO, J.; RODRIGUES, M.T. A new *Crossodactylodes* Cochran, 1938 (Anura: Leptodactylidae: Paratelmatobiinae) from the highlands of the Atlantic Forests of southern Bahia, Brazil. **Zootaxa**, 3702: 459-472, 2013.
- TOLEDO, L.F. Description of a new species of *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926 from the state of São Paulo, Southeastern Brazil (Anura, Leiuperidae). **Zootaxa**, 2681: 47-56, 2010.
- UGARKOVIC', D. & PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles - causes and effects. **The EMBO Journal**, 21: 5955-5959, 2002.
- VALETTI, J.A.; SALAS, N.E.; MARTINO, A.L. A new polyploid species of *Pleurodema* (Anura: Leiuperidae) from Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina and redescription of *Pleurodema kriegi* (Müller, 1926). **Zootaxa**, 2073: 1-21, 2009.
- VEIGA-MENONCELLO, A.C.P.; LIMA, A.P.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura – Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. **Hereditas**, 139: 189-198, 2003.
- VEIGA-MENONCELLO, A.C.P.; LOURENÇO, L.B.; STRUSSMANN, C.; ROSSA-FERES, D.C.; ANDRADE, G.V.; GIARETTA, A. A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. A phylogenetic analysis of *Pseudopaludicola* (Anura) providing evidence of progressive chromosome reduction. **Zoologica Scripta**, 43: 261-272, 2014.

- VENTURA, K.; SILVA, M.J.J.; FAGUNDES, V.; CHRISTOFF, A.U.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)_n arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). **Cytogenetic and Genome Research**, 115: 169-175, 2006.
- VERMEESCH, J.R.; De MEURICHY, W.; VAN DEN BERGHE, H.; MARYNEN, P.; PETIT, P. Differences in the distribution and nature of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in the chromosomes of the Giraffidae, okapi (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob(4; 26) fusion site. **Cytogenetic and Cell Genetics**, 72: 310-315, 1996.
- VIEGAS-PÉQUIGNOT, E. *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson D, editor. *In Situ Hybridization: A practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 137-158, 1992.
- VIEIRA, K.S.; SILVA, A.P.Z.; ARZABE, C. Cranial morphology and karyotypic analysis of *Ceratophrys joazeirensis* (Anura, Ceratophryidae, Ceratophryinae): taxonomic considerations. **Zootaxa**, 1320: 57-68, 2006.
- VITELLI, L.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F.; NARDI, I.; BARSACCHI-PILONE, G. Chromosomal Localization of 18S + 28S and 5S Ribosomal RNA Genes in Evolutionarily Diverse Anuran Amphibians. **Chromosoma**, 84: 475-491, 1982.
- VITTORAZZI, S.D.; LOURENÇO, L.B.; SOLÉ, M.; FARIA, R.G.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Chromosomal analysis of *Physalaemus kroyeri* and *Physalaemus cicada* (Anura, Leptodactylidae). **Comparative Cytogenetics**, 10: 311-323, 2016.
- VITTORAZZI, S.E.; LOURENÇO, L.B.; DEL-GRANDE, M.L.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Satellite DNA Derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 134: 101-107, 2011.
- VITTORAZZI, S.E.; LOURENÇO, L.B.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hyloidid frogs. **BMC Genetics**, 15: 111, 2014.
- VRCIBRADIC, D.; ARIANI, C.V.; VAN SLUYS, M.; ROCHA, C.F.D. Amphibia, Leptodactylidae, *Paratelmatobius mantiqueira*: Distribution extension. **Check List**, 6: 1-2, 2010.

ZAHER, H.; AGUIAR, E.; POMBAL Jr., J.P. *Paratelmatobius gaigeae* (Cochran, 1938) re-discovered (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional**, 63: 321-328, 2005.

ZARACHO, V.H. & HERNANDO, A.B. The karyotype of *Adenomera diptyx* (Boettger 1885) (Anura, Leptodactylidae) from northeastern Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, 34: 84-87, 2011.

ZIJLMANS, J.M.J.M.; MARTENS, U.M.; POON, S.S.S.; RAAP, A.K.; TANKE, H.J.; WARD, R.K.; LANSDORP, P.M. Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T₂AG₃ repeats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94: 7423-7428, 1997.

6. ANEXOS

6.1. Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Bioética



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Análise citogenética de espécies do gênero *Crossodactylodes* (Anura: *Leptodactylidae*)**, registrada com o nº **5041-1/2018**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini e Ricardo Neves Pedroso**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **22 de novembro de 2018**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/03/2018-31/03/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	22/11/2018-31/03/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Anfíbio / <i>Crossodactylodes</i>
No. de animais:	15
Idade/Peso:	01 ano / 10g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Anfíbio / <i>Crossodactylodes</i>
No. de animais:	15
Idade/Peso:	01 ano / 10g
Sexo:	fêmeas
Origem:	Espírito Santo, cidade de Santa Teresa e Castelo. Minas Gerais, cidades de Itamarandiba e Santo Antônio do Itambé.
Biotério onde serão mantidos os animais:	LaDiVert, DBA/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 22 de novembro de 2018.

Prof. Dr. Wagner José Fávares
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

6.2. Declaração de Direitos Autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada “**Estudo citogenético de espécies da subfamília Paratelmatobiinae (Anura: Leptodactylidae), com foco na evolução cromossômica do gênero Crossodactylodes**”, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 16 de novembro de 2020

Assinatura : Ricardo Neves Pedrosa

Nome do(a) autor(a): **Ricardo Neves Pedrosa**

RG n.º 48.983.685-9

Assinatura : Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Nome do(a) orientador(a): **Luciana Bolsoni Lourenço Morandini**

RG n.º 21.582.155-5