

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



Comparação Cariotípica e Genômica em Mico-Leão (*Leontopithecus*, Platyrrhini, Primates)

Alice Alves do Espírito Santo

ORIENTADORA: Marta Svartman

Belo Horizonte

Maiο 2022

Alice Alves do Espírito Santo

**Comparação Cariotípica e Genômica em Mico-Leão
(*Leontopithecus*, Platyrrhini, Primates)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Genética, área de concentração “Genética Evolutiva e de Populações”.

Orientadora: Dra. Marta Svartman

Belo Horizonte

Maio 2022

043

Espírito Santo, Alice Alves do.

Comparação cariotípica e genômica em Mico-Leão (*Leontopithecus*,
Platyrrhini, Primates) [manuscrito] / Alice Alves do Espírito Santo. – 2022.
63 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Marta Svartman.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. *Leontopithecus*. 3. Bandeamento Cromossômico. 4.
Hibridização Genética. I. Svartman, Marta. II. Universidade Federal de Minas
Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 Instituto de Ciências Biológicas
 Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO	324/2022
Alice Alves do Espírito Santo	entrada
	2º/2019
	CPF: 077.537.986-77

Às quatorze horas do dia **30 de maio de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Comparação Cariotípica e Genômica em Mico-Leão (Leontopithecus, Platyrrhini, Primates)**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Marta Svartman**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Marta Svartman	UFMG	101.787.258-97	Aprovada
Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira	Instituto Evandro Chagas	318.888.012-04	Aprovada
Maria Bernadete Lovato	UFMG	965.561.378-04	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de maio de 2022.

Marta Svartman - Orientadora
 Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira
 Maria Bernadete Lovato

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Marta Svartman, Professora do Magistério Superior**, em 30/05/2022, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

31/05/2022 13:11

SEI/UFMG - 1483853 - Ata de defesa de Dissertação/Tese



Documento assinado eletronicamente por **Maria Bernadete Lovato, Professora do Magistério Superior**, em 31/05/2022, às 10:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edivaldo Herculano Correa de Oliveira, Usuário Externo**, em 31/05/2022, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1483853** e o código CRC **50E084F1**.

Referência: Processo nº 23072.230566/2022-30

SEI nº 1483853



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Comparação Cariotípica e Genômica em Mico-Leão (*Leontopithecus*, Platyrrhini, Primates)"

Alice Alves do Espírito Santo

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Marta Svartman - Orientadora
UFMG

Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira
Instituto Evandro Chagas

Maria Bernadete Lovato
UFMG

Belo Horizonte, 30 de maio de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Marta Svartman, Professora do Magistério Superior**, em 30/05/2022, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Bernadete Lovato, Professora do Magistério Superior**, em 31/05/2022, às 10:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edivaldo Herculano Correa de Oliveira, Usuário Externo**, em 31/05/2022, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1483983** e o código CRC **EC1B8629**.

Dedico este trabalho aos meus pais e minha avó Maria.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a existência deste trabalho:

À minha orientadora, Professora Dra. Marta Svartman por todos os ensinamentos, oportunidades, confiança, dedicação, compreensão, incentivos e pela imensa contribuição para meu desenvolvimento acadêmico e profissional durante nossos quase nove anos de convivência.

Ao Professor Dr. Gustavo Campos e Silva Kuhn pela disponibilidade, atenção, ensinamentos, convivência e contribuição para minha formação acadêmica e profissional.

À Naiara pelo carinho, amizade, ensinamentos e convivência.

À Mirela e à Radarane por todos os ensinamentos, carinho, dedicação, contribuições, companhia e risadas até mesmo durante os perrengues e experimentos que iam até tarde. Enfim, muito obrigada pela amizade dentro e fora do laboratório.

Aos atuais e ex-integrantes do Laboratório de Citogenômica Evolutiva pelo apoio, ensinamentos, convivência e amizade. Este é um grupo muito bom de se fazer parte.

A todos os laboratórios e suas equipes que sempre estiveram de portas abertas para ajudar em experimentos, dúvidas e muito mais: Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM), Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, Laboratório de Diversidade Genética Humana (LDGH), Laboratório de Genética de Microrganismos, Laboratório de Genética de Populações, Laboratório de Genética Experimental (LGEX), Laboratório de Genética Funcional e Laboratório de Tecnologia Genética (TecnoGen).

Ao técnico Daniel e às secretarias do programa de Pós Graduação em Genética, em especial a Raíssa Campos e a Daniela Pereira, por todo auxílio e carinho.

Ao Seu Jorge, à Eliana e a todos os outros micos-leões que contribuíram com sangue e pele para este projeto.

À Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica, em especial à Valéria e aos veterinários, pela colaboração e envio das amostras.

Aos meus amigos e amigas do colégio, da graduação, da pós-graduação e da vida, pelo carinho, apoio.

Aos amigos do “Trem Bão é Ciência” por embarcarmos juntos nessa loucura que é divulgação científica.

Ao meu namorado e amigo, Marcelo, pelo carinho, apoio, incentivo e suporte emocional.

Aos meus animais de estimação pelo suporte emocional e distração principalmente durante a pandemia.

À Dona Clara por todo amor, carinho e cuidado desde a infância.

Às minhas tias e tios, irmãos e irmãs, primas e primos, e minha avó por todo amor, apoio, incentivo, carinho e suporte emocional.

Aos meus pais Jussara e Sinval pelo imenso amor, carinho, auxílio, incentivo e suporte emocional, financeiro e em todas as áreas e etapas da vida.

Ao programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais.

À CAPES, pela bolsa de mestrado e à FAPEMIG e ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

Resumo

O gênero *Leontopithecus* é composto por quatro espécies, todas consideradas ameaçadas de extinção pela IUCN e endêmicas da Mata Atlântica. As quatro espécies do gênero possuem o número diploide $2n = 46$ e número fundamental de braços autossômicos $NF = 74$. *L. rosalia* e *L. chrysomelas* foram cariotipicamente mais bem estudadas do que *L. chrysopygus* e *L. caissara*. A fim de obter mais informações sobre este gênero, analisamos e comparamos os cariótipos de *L. chrysopygus*, *L. rosalia* e *L. chrysomelas* com base nos padrões de bandeamento GTG, CBG, Ag-RON, hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de sequências teloméricas e rDNA 18S, e hibridação *in situ* genômica (GISH). Nossos resultados mostraram que as três espécies possuem cariótipos muito similares, mas com algumas diferenças entre seus padrões de bandeamento CBG, Ag-RON e FISH com sonda de rDNA 18S. Os experimentos de GISH para comparar os cromossomos de *L. rosalia* e *L. chrysopygus* revelaram regiões heterocromáticas que parecem compostas por sequências espécie-específicas. Também investigamos dois DNAs satélites, o alfa e o CarB presentes no genoma de *L. rosalia*, que podem estar relacionados às diferenças cromossômicas observadas entre as espécies de *Leontopithecus*. Nossos dados sugerem que o estudo das regiões repetitivas deve resultar num melhor entendimento da evolução cromossômica do gênero *Leontopithecus*.

Palavras-chave: *Leontopithecus*, Padrões de Bandeamento, GISH

Abstract

The genus *Leontopithecus* is composed of four species, all considered endangered by the IUCN and endemic to the Atlantic Forest. The four species of the genus have the same diploid number $2n = 46$ and fundamental number of autosomal arms $FN = 74$. *L. rosalia* and *L. chrysomelas* have been karyotypically better studied than *L. chrysopygus* and *L. caissara*. In order to obtain more information about this endangered genus, we comparatively analyzed the karyotypes of *L. chrysopygus*, *L. rosalia*, and *L. chrysomelas* based on GTG-, CBG-banding, silver staining of the nucleolus organizer regions (Ag-NORs), fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with telomeric sequences and rDNA 18S as probes, and genomic *in situ* hybridization (GISH). Our results revealed very similar karyotypes, with some differences between the CBG banding patterns, Ag-NORs distribution and FISH with rDNA 18S probe. GISH experiments between *L. rosalia* and *L. chrysopygus* revealed some species-specific heterochromatic regions. We also investigated two satellite DNAs, the alpha and the CarB present in the genome of *L. rosalia*, which could be related to the chromosomal differences observed between the *Leontopithecus* species. Our results indicate that a more detailed analysis of the repetitive sequences shall provide a better understanding of the chromosome evolution in the genus *Leontopithecus*.

Keywords: *Leontopithecus*, Banding Patterns, GISH.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Árvore filogenética proposta para os gêneros atuais de platirrínios.	16
Figura 2. Mapa de distribuição das espécies do gênero <i>Leontopithecus</i>	18
Figura 3. Fotos de indivíduos do gênero <i>Leontopithecus</i>	19
Figura 4. Comparação dos cariótipos, após bandeamento GTG, de <i>Leontopithecus rosalia</i> (LRR), <i>L. chrysopygus</i> (LRP) e <i>L. chrysomelas</i> (LRM).	21
Figura 5. Representação esquemática dos principais tipos de sequências repetitivas de DNA. ...	23
Figura 6. Cariótipos de <i>Leontopithecus</i> após bandeamento GTG.	34
Figura 7. Cariótipos de <i>Leontopithecus</i> após bandeamento CBG.	35
Figura 8. Metáfases de <i>Leontopithecus</i> após coloração com nitrato de prata.	36
Figura 9. Metáfase de <i>Leontopithecus chrysopygus</i> após FISH com sonda de DNA ribossômico (rDNA 18S).	37
Figura 10. Metáfases de <i>Leontopithecus</i> após FISH com sondas teloméricas.	38
Figura 11. Controles dos experimentos de GISH.	39
Figura 12. GISH interespecífico entre <i>L. chrysopygus</i> (LCH) e <i>L. rosalia</i> (LRO).	40
Figura 13. Grafos dos clusters mais abundantes identificados pelo TAREAN.	41
Figura 14. Metáfases de <i>Leontopithecus</i> após FISH com sondas de DNA satélite alfa.	42
Figura 15. Alinhamento entre as sequências-consenso do cluster 4 e a do DNA satélite CarB. ...	43
Figura 16. Alinhamento entre as sequências-consenso do cluster 8 e a do DNA satélite CarB. ...	44
Figura 17. Alinhamento entre as sequências-consenso do cluster 4 e do cluster 8.	45

Lista de Tabelas

Tabela 1. Condições das sondas utilizadas nos experimentos de FISH	31
Tabela 2. Experimentos de GISH	32
Tabela 3. Comparação das marcações após bandeamento CBG nas espécies de <i>Leontopithecus</i>	33

Lista de Abreviaturas e Siglas

2n – Número diploide

Ag-RON – Marcação das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata

CBG – Padrões de bandeamento C, obtidos após tratamento com bário e coloração com Giemsa

DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilindole

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNAsat – DNA satélite

FISH – Hibridação *in situ* fluorescente

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GISH – Hibridação *in situ* Genômica

GTG – Padrões de bandeamento G obtidos após tratamento com tripsina e coloração com Giemsa

HOR – Higher order repeat

ITS – Sequências teloméricas intersticiais

IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza

LCH – *Leontopithecus chrysopygus*

LRO – *Leontopithecus rosalia*

LRM – *Leontopithecus chrysomelas*

LRP – *Leontopithecus chrysopygus*

LRR – *Leontopithecus rosalia*

NF – Número fundamental ou número de braços autossômicos

pb (bp) – Pares de base

PBS – Tampão fosfato-salino

PBT – Tampão fosfato-salino com Tween 20

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PNA – Ácido nucleico peptídico

rDNA – DNA ribossômico

RON – Região organizadora de nucléolo

SSC – Citrato de sódio salino

tRNA – RNA (Ácido ribonucleico) de transporte

Sumário

1. Introdução	16
1.1 Heterocromatina	22
1.2 DNAs Repetitivos	23
1.2.1 DNAs Satélites	25
1.3 Hibridação <i>in situ</i> Genômica (GISH)	26
2. Objetivo Geral	28
2.1 Objetivos Específicos	28
3. Metodologia	29
3.1 Amostras Biológicas e Bandeamento Cromossômico	29
3.2 Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)	30
3.3 DNAs Satélites	32
4. Resultados	33
4.1 Bandeamento Cromossômico	33
4.2 FISH	37
4.3 Hibridação <i>in situ</i> Genômica (GISH)	39
4.4 DNAs Satélites	41
5. Discussão	46
6. Conclusões	51
7. Perspectivas	52
8. Referências Bibliográficas	53
Anexo 1	58
Anexo 2	61

1. Introdução

Os primatas do Novo Mundo, parvordem Platyrrhini, são classificados em três famílias: Pitheciidae, Atelidae e Cebidae (Figura 1; Perelman *et al.*, 2011; Schneider e Sampaio, 2015). As duas primeiras famílias contêm, respectivamente, seis e quatro gêneros, enquanto a última possui dez gêneros (Schneider e Sampaio, 2015; Byrne *et al.*, 2016). Além disso, a família Cebidae é dividida em quatro subfamílias, Aotinae, Cebinae, Saimirinae e Callitrichinae (Figura 1).

A subfamília Callitrichinae abriga primatas de pequeno porte, que possuem garras modificadas no lugar de unhas, popularmente conhecidos como micos e saguis, que estão divididos em seis gêneros, são eles: *Saguinus*, *Callithrix*, *Cebuella*, *Mico*, *Callimico* e *Leontopithecus*, o objeto deste estudo (Schneider e Sampaio, 2015; Buckner *et al.*, 2015; Byrne *et al.*, 2016; Garbino e Martins-Junior, 2018). Estes seis gêneros estão amplamente distribuídos pela América do Sul e juntos possuem 48 espécies, fazendo da subfamília Callitrichinae uma das mais ricas em espécies e possivelmente uma das mais diversas em relação a morfologia dentro de Platyrrhini (Buckner *et al.*, 2015; Garbino e Martins-Junior, 2018).

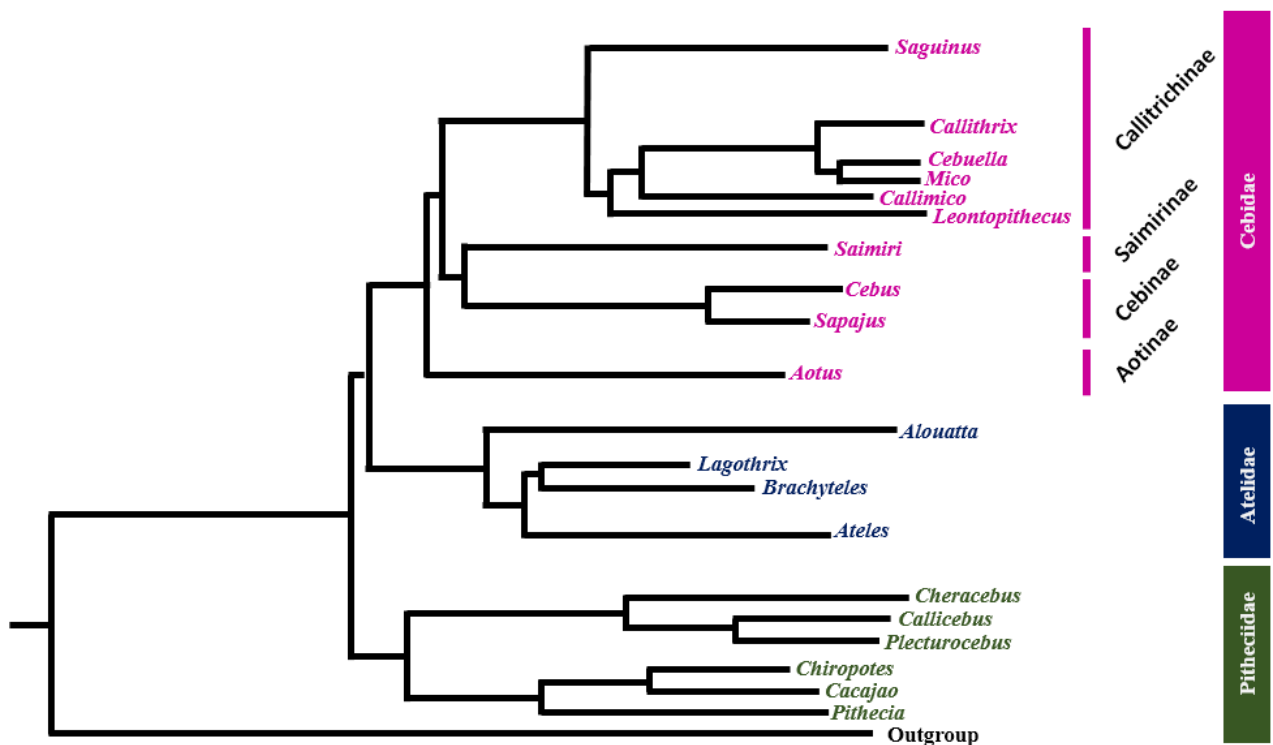


Figura 1. Árvore filogenética proposta para os gêneros atuais de platirrínios. Figura modificada de Schneider e Sampaio (2015).

O gênero *Leontopithecus* é composto por quatro espécies endêmicas da Mata Atlântica: *Leontopithecus rosalia* (mico-leão-dourado), *L. chrysopygus* (mico-leão-preto), *L. chrysomelas*

(mico-leão-da-cara-dourada) e *L. caissara* (mico-leão-da-cara-preta). Elas estão distribuídas em fragmentos distintos deste bioma: *L. rosalia* pode ser encontrado no estado do Rio de Janeiro, *L. chrysopygus* habita no estado de São Paulo, *L. chrysomelas* na Bahia e em Minas Gerais, e *L. caissara* em uma pequena região dos estados de São Paulo e Paraná (Figura 2) (Rosenberger e Coimbra-Filho, 1984; Rylands *et al.*, 1996; Perez-Sweeney *et al.*, 2008). As quatro espécies são classificadas pela IUCN como ameaçadas de extinção com suas populações em declínio (Rezende *et al.*, 2020; Ruiz-Miranda *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2021; Ludwig *et al.*, 2021). A existência de híbridos entre *L. rosalia* e *L. chrysomelas* em cativeiro já foi demonstrada e a hibridização entre elas foi considerada como um fator de risco para a conservação de *L. rosalia* pela IUCN (Coimbra-Filho, 1976; Ruiz-Miranda *et al.*, 2021). Vale ressaltar aqui o bem-sucedido “Programa de Conservação do Mico-Leão-Dourado”, iniciado na década de 1970, que criou campanhas de conservação, reintroduziu espécimes nascidos em cativeiro e resgatou grupos selvagens, levando ao aumento da população desta espécie. Este programa ajudou a transformar o mico-leão-dourado em símbolo da conservação (Kierulff *et al.*, 2012). Atualmente, as quatro espécies são contempladas no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Primatas da Mata Atlântica e da Preguiça-de-coleira (Brasil, 2018).

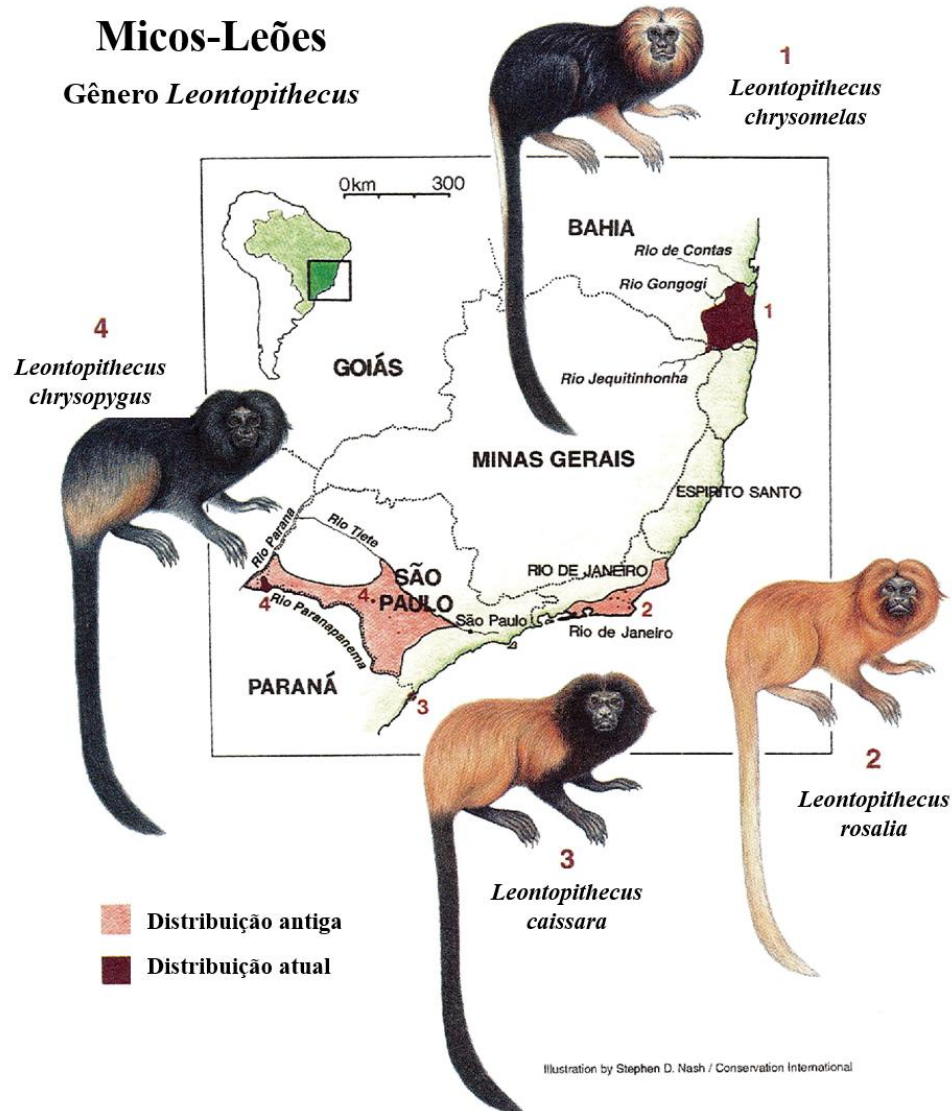


Figura 2. Mapa de distribuição das espécies do gênero *Leontopithecus*. Imagem adaptada de Neves *et al.* (2017).

As quatro espécies possuem uma juba que é uma das características mais marcantes do gênero e que contribui tanto para o nome científico do gênero, quanto para o nome popular destas espécies. As quatro espécies se distinguem em relação à coloração da pelagem (Figura 3). O mico-leão-dourado é caracterizado por sua pelagem densa completamente dourado-avermelhada. Já o mico-leão-preto possui pelagem densa e preta em todo o corpo, com exceção da base da cauda, coxas e parte posterior (“garupa”), que podem apresentar coloração dourada-avermelhada. O mico-leão-da-cara-dourada também tem sua coloração majoritariamente preta com pelos dourado-avermelhados na parte frontal da juba, na metade inferior dos membros anteriores e na porção proximal da superfície dorsal da cauda (Kleiman, 1981; Rosenberger e Coimbra-Filho, 1984). Por

fim, o mico-leão-da-cara-preta tem uma coloração dourada-alaranjada em todo corpo com exceção dos pelos da juba, dos membros e da cauda que são de cor preta (Montilha *et al.*, 2018).



Figura 3. Fotos de indivíduos do gênero *Leontopithecus*. 1- *Leontopithecus chrysomelas*, 2- *L. rosalia*, 3- *L. caissara*, e 4- *L. chrysopygus*. Fotos do site Arkive.org, feitas por Haroldo Palo Jr (1), Dave Watts (2) e Luiz Cláudio Marigo (3, 4).

As espécies de *Leontopithecus* são consideradas generalistas ou frugívoras-faunívoras, se alimentando de frutas, flores, néctar, exsudatos de plantas e pequenas presas, que podem incluir insetos, aranhas, anfíbios, lagartos e caramujos. Os micos-leões vivem em grupos pequenos de quatro a oito indivíduos de *L. rosalia* e *L. chrysomelas* e de 2-8 dois a oito indivíduos de *L. chrysopygus*. *L. caissara* teria uma estrutura parecida. Além disso, nestes grupos geralmente apenas uma fêmea reproduz a cada período de reprodução. O cuidado com a prole é cooperativo e dividido pelo grupo, com irmãos mais velhos ajudando a cuidar dos filhotes mais novos. (Martins *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2014; Rezende *et al.*, 2020; Ludwig *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2021; Ruiz-Miranda *et al.*, 2021).

O status taxonômico do gênero *Leontopithecus* já foi bastante discutido. Inicialmente *L. rosalia*, *L. chrysomelas* e *L. chrysopygus* eram consideradas três espécies distintas. Posteriormente, *L. chrysomelas* e *L. chrysopygus* passaram a ser consideradas subespécies de *L. rosalia*. No

entanto, Rosenberger e Coimbra-Filho (1984) atribuíram tal classificação a um certo conservadorismo e à ausência de características marcadamente distintas entre as três espécies por insuficiência de dados. Um exemplo disto é o trabalho de Seuánez *et al.* (1988) que, com base em dados citogenéticos, consideraram *L. chrysomelas* e *L. chrysopygus* subespécies de *L. rosalia*, já que os padrões de bandeamento GTG e CBG pareciam idênticos nas três espécies. Em 1990, *L. caissara* foi descrita como uma nova espécie, fazendo com que chegasse a quatro o número de espécies de *Leontopithecus* (Lorini e Persson, 1994), que é consenso atualmente (Rosenberger e Coimbra-Filho, 1984; Perez-Sweeney *et al.*, 2008; Buckner *et al.*, 2015; Garbino e Martins-Júnior, 2018).

Com relação à filogenia das espécies do gênero *Leontopithecus*, *L. chrysopygus* já foi considerada por alguns autores como sendo grupo-irmão de *L. rosalia* e por outros como mais proximamente relacionada a *L. chrysomelas*. Além disso, tanto *L. chrysopygus* quanto *L. chrysomelas* já foram apontadas, em trabalhos diferentes, como a espécie mais basal do gênero (Rosenberger e Coimbra-Filho, 1984; Mundy e Kelly, 2001; Perez-Sweeney *et al.*, 2008). Perez-Sweeney *et al.* (2008), utilizando análises filogenéticas de DNA mitocondrial e considerando dados morfológicos e ecológicos, propuseram que *L. chrysopygus* estaria mais próxima de *L. rosalia*; *L. chrysomelas* seria a espécie mais basal do gênero, e *L. caissara* não seria subespécie de *L. chrysopygus*.

As quatro espécies do gênero *Leontopithecus* possuem o mesmo número diploide $2n = 46$ e número fundamental de braços autossômicos $NF = 74$ (Figura 4) (Seuánez *et al.*, 1988; Nagamachi *et al.*, 1997). *L. rosalia* e *L. chrysomelas* são as espécies do gênero mais bem estudadas citogeneticamente e já tiveram seus cariótipos caracterizados por bandeamento GTG, CBG e marcação das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata (Ag-RON) (Seuánez *et al.*, 1988; Nagamachi *et al.*, 1997). Nagamachi *et al.* (1997) descreveram resultados similares em *L. rosalia* e *L. chrysomelas* após a aplicação dessas técnicas de bandeamento.

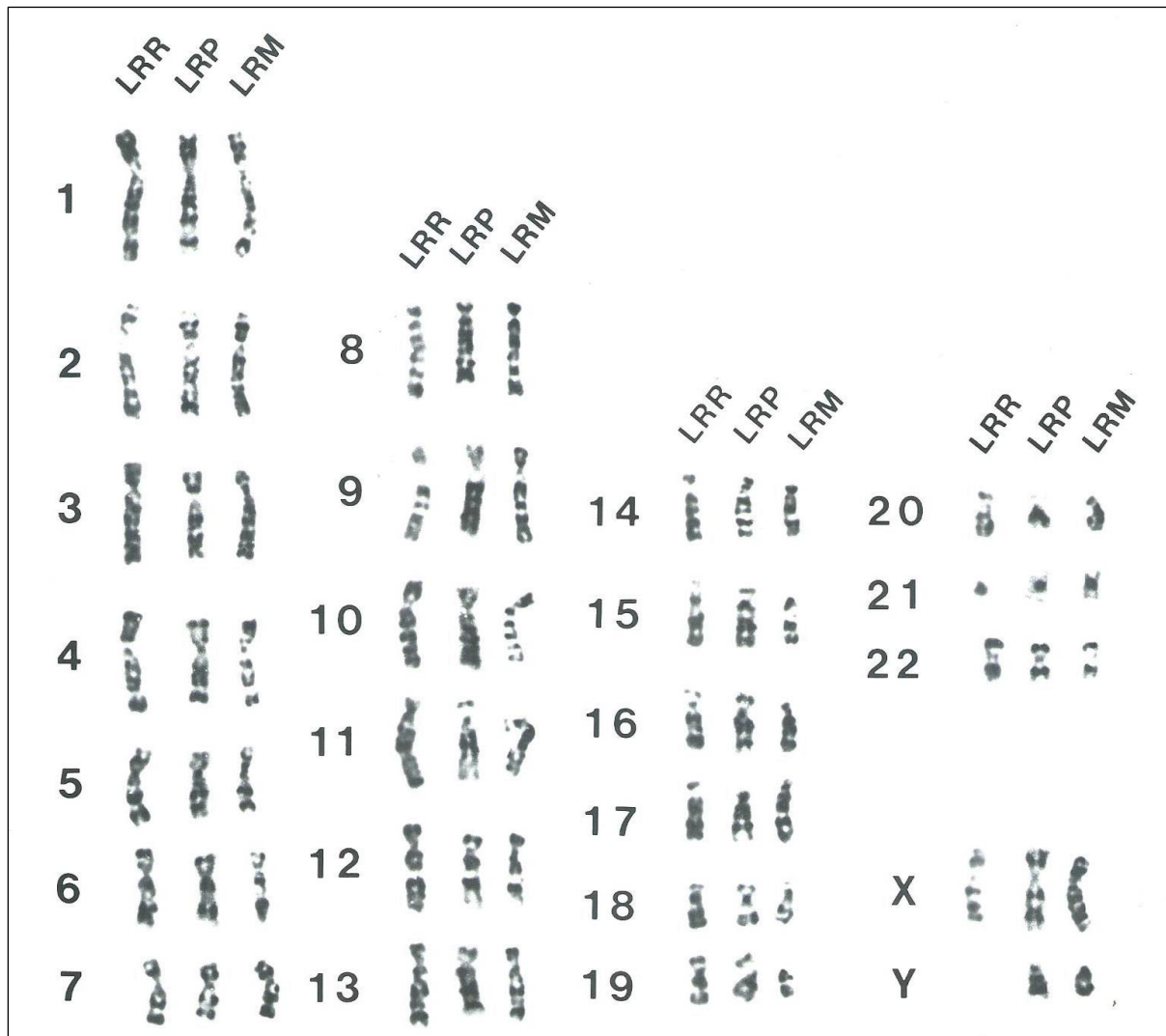


Figura 4. Comparação dos cariótipos, após bandeamento GTG, de *Leontopithecus rosalia* (LRR), *L. chrysopygus* (LRP) e *L. chrysomelas* (LRM). O Y de *L. rosalia* não está representado, pois apenas fêmeas foram analisadas. Imagem extraída de Seuánez *et al.*, 1988.

Dados disponíveis de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNA ribossômico foram obtidos em *L. rosalia* e *L. chrysomelas*, que apresentaram marcações nos pares 16, 17, 19-22 (Gerbault-Serreau *et al.*, 2004; Ceraulo *et al.*, 2021). Em *L. rosalia*, sondas teloméricas apresentaram marcações intersticiais que ocorriam com localização distinta entre as fêmeas, nos pares 1, 2 e 4, e no macho, nos pares 14 e 16, analisados (Ceraulo *et al.*, 2021). A pintura cromossômica com sondas de cromossomos humanos já foi realizada em *L. chrysomelas* e de forma parcial em *L. rosalia* (Gerbault-Serreau *et al.*, 2004; Stanyon *et al.*, 2018). Gerbault-Serreau *et al.* (2004) observaram, em *L. chrysomelas*, as sintenias HSA 3/21 e HSA 14/15, comuns a mamíferos em geral; HSA 5/7, HSA 2/16, HSA 10/16 e HSA 18/8, comuns aos Platyrrhini; HSA 2/15, típica de Callitrichinae e do gênero *Saimiri*; e HSA 9/22/13 e HSA 20/17/13, compartilhadas

pela maioria das espécies analisadas de Callitrichinae. Estes dados contribuíram para a dedução do provável cariótipo ancestral da subfamília Callitrichinae, com $2n=48$, pois foram comparados com outras espécies do grupo, utilizando como grupo externo *Cebus capucinus* (Gerbault-Serreau *et al.*, 2004).

Já para *L. chrysopygus* e *L. caissara* existem menos dados citogenéticos disponíveis. Apenas dados de padrões de bandeamento GTG e CBG foram descritos para *L. chrysopygus*, e apenas o bandeamento GTG teve fotos publicadas (Seuánez *et al.*, 1988). Os cariótipos bandeados foram considerados idênticos aos obtidos anteriormente para *L. rosalia* e *L. chrysomelas* (Figura 4). Apenas dados sobre os números diploide e fundamental foram reportados para *L. caissara* nos Anais do XIX Congresso Brasileiro de Zoologia (Sbalqueiro *et al.*, 1992) e só são acessíveis através de citações de terceiros (Nagamachi *et al.*, 1997).

1.1 Heterocromatina

Os cromossomos de eucariotos variam em sua densidade de compactação e organização estrutural. As regiões cromossômicas de eucariotos que estão menos condensadas e dispersas no núcleo após a divisão celular recebem o nome de eucromatina e podem ser replicadas durante toda a fase S da divisão celular. Já as regiões mais condensadas, que permanecem condensadas durante todo o ciclo celular, são denominadas de heterocromatina e se replicam apenas ao final da fase S (Eissenberg e Elgin, 2014).

A heterocromatina é classificada em heterocromatina constitutiva ou heterocromatina facultativa. A heterocromatina constitutiva é sempre encontrada condensada e inativa em todas as células do organismo. Já a heterocromatina facultativa pode ser vista descondensada e ativa em algumas células ou etapas do desenvolvimento, ou compactada e inativa em outras células e estágios (Larizza e Doneda, 2006; Liu *et al.*, 2020). O corpúsculo de Barr, forma como é denominado o cromossomo X inativo das fêmeas de mamíferos, é um exemplo de heterocromatina facultativa (Larizza e Doneda, 2006; Eissenberg e Elgin, 2014; Liu *et al.*, 2020).

A heterocromatina foi descrita pela primeira vez em 1928 por Heitz ao identificar regiões cromossômicas que permaneciam fortemente coradas durante o ciclo celular (Liu *et al.*, 2020). Nesta época, acreditava-se que a heterocromatina era inerte, desprovida de genes ou com poucos genes silenciados, enquanto a eucromatina abrigaria os genes codificantes e era transcricionalmente ativa (Liu *et al.*, 2020). Com base nessa ideia e no fato de que porções relativamente grandes de heterocromatina podem ser removidas sem uma perda de função óbvia a heterocromatina foi por muito tempo chamada de “junk DNA”. A percepção da heterocromatina

como DNA lixo tem mudado nas últimas décadas devido a estudos celulares, moleculares e genéticos que demonstraram suas várias funções (Warecki e Sullivan, 2022).

A heterocromatina facultativa, que contém genes e *enhancers*, atua na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento ao alternar entre os estados condensado e descondensado. Por sua vez, a heterocromatina constitutiva, composta por várias sequências repetitivas como elementos transponíveis, DNAs satélite, e DNA ribossômico, desempenha funções relacionadas à estabilidade genômica. Portanto, desempenharia funções como: proteção dos telômeros, supressão de elementos transponíveis, facilitação do reparo de sequências repetitivas, interações diretas e indiretas com o envelope nuclear durante a interfase, e pareamento das cromátides-irmãs, atuando junto os centrômeros (Liu *et al.*, 2020; Warecki e Sullivan, 2022).

1.2 DNAs Repetitivos

Os genomas dos eucariotos possuem sequências de cópia única e sequências repetitivas. Essas últimas ocupam grande parte dos genomas, contribuindo para sua variação de tamanho e podem representar mais da metade do conteúdo de DNA nuclear (Charlesworth *et al.*, 1994; Richard *et al.*, 2008; Biscotti *et al.*, 2015). Em humanos, por exemplo, DNAs repetitivos ocupam mais de 50% do genoma (Richard *et al.*, 2008). Estas sequências podem ser divididas entre sequências dispersas no genoma, como transposons, retrotransposons, genes de tRNA e genes parálogos, e sequências repetidas em tandem, que incluem sequências teloméricas, rDNAs e DNAs satélites (DNAsat) (Figura 5) (Richard *et al.*, 2008; Biscotti *et al.*, 2015).

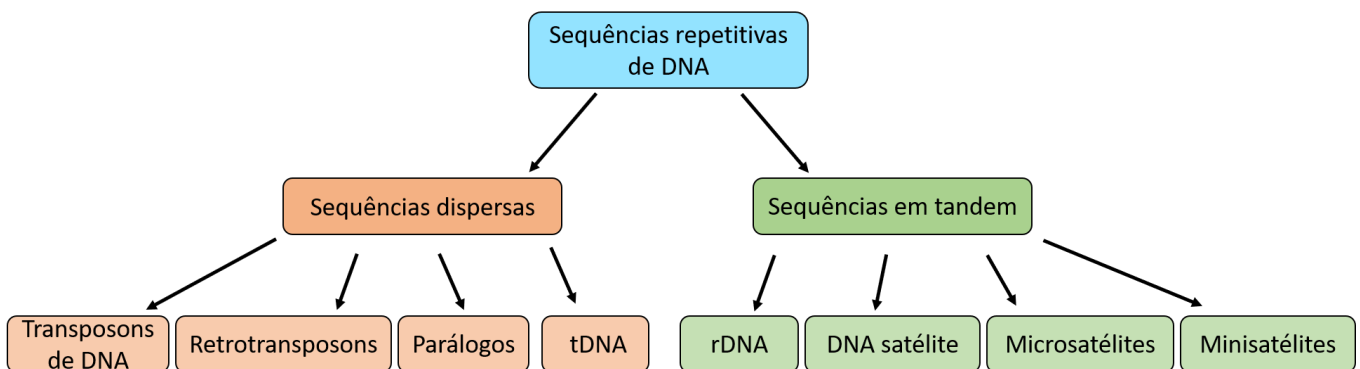


Figura 5. Representação esquemática dos principais tipos de sequências repetitivas de DNA. Imagem adaptada de Richard *et al.* (2008).

Os DNAs ribossômicos são um dos exemplos de família multigênica mais bem estudados e estão associados à transcrição e à tradução, visto que codificam o rRNA, principal elemento

estrutural e de função catalítica dos ribossomos (Richards *et al.*, 2008; López-Flores e Garrido-Ramos, 2012). Os rDNAs foram reconhecidos como componentes das regiões organizadoras de nucléolos (RON), onde estariam presentes em centenas a milhares de cópias. Em eucariotos, a unidade de repetição presente nestas cadeias possui o rDNA 45S, que contém as subunidades 28S, 18S, o gene 5,8S e os espaçadores gênicos ITS1 e ITS2. Enquanto os genes para rRNA 5S são encontrados em outros lugares do genoma nuclear (Richards *et al.*, 2008; López-Flores e Garrido-Ramos, 2012; Biscotti *et al.*, 2015).

As regiões organizadoras de nucléolos podem ser estudadas através da coloração pelo nitrato de prata (Ag-RON), que evidenciam as RONs que se encontravam ativas devido à interação do nitrato de prata com as proteínas envolvidas na formação dos nucléolos (Guerra, 2004; Biscotti *et al.*, 2015). As RONs também podem ser observadas pela coloração com o fluorocromo cromomicina A3, que marca regiões ricas em GC (Guerra, 2004; Biscotti *et al.*, 2015). A FISH utilizando sondas com diferentes subunidades ribossômicas é empregada nos estudos de localização de RONs. Neste caso, são marcadas RONs ativas e inativas, que possuem cadeias de rDNA (Guerra, 2004). A capacidade da FISH de detectar RONs inativas se dá porque nesta técnica o alvo é a sequência de DNA presente na região e não proteínas associadas. Assim, enquanto o número de marcações nos experimentos de Ag-RON varia entre metáfases, nos experimentos de FISH o número tende a permanecer o mesmo. Além disso, a FISH garante a composição da região marcada como sendo rDNA, enquanto a coloração com cromomicina A3 marca também regiões compostas por outras sequências ricas em GC (Guerra, 2004).

Os telômeros estão localizados nas pontas dos cromossomos e têm como função proteger os cromossomos de degradação e atividades de reparo, fusões ponta-ponta ou quebras de fita dupla acidentais, e evitar a perda de material genético durante a replicação (Garrido-Ramos, 2017; Aksenova e Mirkin, 2019). As regiões teloméricas são compostas por pequenas sequências repetitivas em tandem de 5-8 pb que geralmente podem ser classificadas como microssatélites (Aksenova e Mirkin, 2019; Thakur *et al.*, 2021). As sequências teloméricas em todos os eucariotos aparentam compartilhar uma sequência ancestral. Nos vertebrados, o motivo de repetição é 5'-TTAGGG-3', o motivo mais comum e difundido, que aparenta ser o motivo ancestral (Garrido-Ramos, 2017; Aksenova e Mirkin, 2019).

As sequências teloméricas também podem ser encontradas fora dos telômeros, quando são chamadas de sequências teloméricas intersticiais (ITSs). Estas podem ser classificadas em ITSs de heterocromatina, que são blocos grandes destas repetições e que geralmente estão presentes nas regiões centroméricas e pericentroméricas; e em ITSs curtas, que apresentam um número limitado

de repetições e estão distribuídas ao longo do cromossomo (Aksenova e Mirkin, 2019). Sequências teloméricas intersticiais já foram descritas em diversas espécies mamíferos, aves, répteis, anfíbios, peixes e em algumas plantas. A ocorrência de ITS já foi descrita em primatas do Novo Mundo, incluindo *Aotus azarae*, *Aotus lemurinus griseimembra*, *Aotus nancymae*, *Callithrix argentata*, *Cebus apella*, *Lagothrix lagotricha* e *Leontopithecus rosalia* (Mudry *et al.*, 2007; Dumas *et al.*, 2016; Ceraulo *et al.*, 2021).

Vários mecanismos diferentes podem estar envolvidos na amplificação de sequências teloméricas intersticiais, dentre eles: crossing-over desigual, conversão gênica, deslizamento da polimerase durante a replicação do DNA e replicação em círculo rolante de DNA extracromossômico circular, translocação durante a recombinação gênica, e transposição por elementos transponíveis (Aksenova e Mirkin, 2019). Além disso, as ITSs já foram associadas a processos de recombinação e amplificação das regiões terminais dos cromossomos; mecanismos de reparo de quebras de fita-dupla, regulação da expressão gênica e a elementos que podem fornecer indícios sobre a evolução cariotípica dos organismos que envolvam rearranjos cromossômicos, como fusão, fissão e inversão, e intercâmbio centrômero/telômero (Ruiz-Herrera *A et al.*, 2002; Dumas *et al.*, 2016; Aksenova e Mirkin, 2019).

1.2.1 DNAs Satélites

Os DNAs satélites foram inicialmente descobertos a partir de experimentos de gradiente de densidade por centrifugação com solução aquosa de cloreto de céσιο, que resultavam na visualização de bandas menores acima ou abaixo da banda principal contendo a maior parte do material genético. Os DNAs satélites foram isolados destas bandas menores chamadas de bandas satélites e por isso receberam este nome (Richards *et al.*, 2008; Plohl *et al.*, 2012; Thakur *et al.*, 2021).

Os DNAs satélites são sequências altamente repetitivas presentes no genoma de eucariotos e possuem duas características principais: formam longas cadeias de repetições em tandem e são o principal componente das regiões heterocromáticas. As sequências nucleotídicas, sua complexidade, a abundância no genoma, e o tamanho das unidades de repetição variam entre DNAs satélites (Plohl *et al.*, 2012). Os monômeros, que são as unidades de repetição dos DNAs satélites, podem conter de dezenas a centenas de pares de bases e formarem cadeias com centenas a milhares de cópias. Os monômeros dos DNA satélites podem se apresentar em uma organização em *higher order repeat* (HOR), na qual as unidades de repetição são compostas por dois ou mais monômeros divergentes. Essas unidades de repetição apresentam uma identidade alta entre si, que

é maior do que a identidade encontrada entre os monômeros que a compõem (Plohl *et al.*, 2012; Sujiwattanarat *et al.*, 2015). Os DNAs satélites podem ser distinguidos dos microssatélites e minissatélites pelo tamanho máximo das unidades de repetição, tamanhos das cadeias de repetição, localização genômica e pelos seus mecanismos de proliferação (López-Flores e Garrido-Ramos, 2012; Thakur *et al.*, 2021).

Os DNAs satélites podem ser classificados de acordo com a sua localização e função, podendo ser divididos em centroméricos, pericentroméricos, teloméricos e subteloméricos. Dentre os DNAs satélites mais estudados, está o DNA satélite alfa, um dos principais componentes dos centrômeros de primatas, que chega a constituir 10% do número total de repetições em genomas deste grupo (Thakur *et al.*, 2021). Em primatas do Velho Mundo, o DNAsat alfa é composto por monômeros de ~171 pb, enquanto na maioria das espécies de Platyrrhini é composto por monômeros de ~341 pb (Alves *et al.*, 1994; Alexandrov *et al.*, 2001). Em 2015, foi relatado que o DNAsat alfa pode estar organizado em HOR em macacos do Novo Mundo. Até então, acreditava-se que a organização em HOR do DNAsat alfa era restrita a hominoides (Sujiwattanarat *et al.*, 2015). A presença de um motivo de repetição de 17 pb, conhecido como *CENP-B box*, no DNAsat alfa de humanos e primatas do Velho Mundo era bastante conhecida e foi demonstrada mais recentemente em primatas do Novo Mundo (Sujiwattanarat *et al.*, 2015). A presença desta sequência no DNAsat alfa é importante porque interage com a proteína CENP-B, que está envolvida com a formação do cinetócoro (Suntronpong *et al.*, 2016; Kugou *et al.*, 2016).

Dois DNAs satélites foram descritos como exclusivos de Callitrichinae: o CarB e o MarmoSAT (Alves *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 2017). O DNAsat CarB é encontrado em *Callithrix* e *Mico*, enquanto o MarmoSAT foi registrado em *Callithrix*, *Mico*, *Callimico* e *Cebuella* (Araújo *et al.*, 2017). O DNAsat CarB possui monômeros de ~1.528 pb e está localizado em blocos teloméricos de heterocromatina, onde chega a ocupar cerca de metade de alguns cromossomos (Alves *et al.*, 1995). Já o MarmoSAT possui localização subtelomérica e monômero com aproximadamente 171 pb, sem relação com o DNAsat alfa, apesar do tamanho semelhante dos monômeros (Araújo *et al.*, 2017).

1.3 Hibridação *in situ* Genômica (GISH)

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) se baseia no princípio da complementariedade de bases e consiste em hibridar uma sequência marcada (sonda) com a sequência presente nos cromossomos do organismo objeto de estudo. O uso da fluorescência foi um avanço e tornou a

técnica de hibridação *in situ* mais segura, uma vez que, inicialmente, as moléculas utilizadas para marcar as sondas eram radioativas (Guerra, 2004).

As sequências utilizadas como sondas em experimentos de hibridação *in situ* podem ser sequências repetitivas dispersas ou em tandem, sequências de cópia única e até cromossomos inteiros (pintura cromossômica). A forma como essas sondas são obtidas varia de acordo com o tipo de sonda, por exemplo, sondas cromossômicas podem ser obtidas por citometria de fluxo ou microdissecção seguida por amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR). Enquanto sequências menores como genes de cópia única, DNA ribossômico ou telomérico, podem ser obtidas a partir de PCR com primers específicos. Uma limitação importante desta técnica é a dificuldade de detecção de sequências de cópia única muito curtas ou sequências repetitivas que tenham um baixo número de cópias, visto que a sensibilidade da FISH é limitada pelo tamanho do DNA-alvo (Guerra, 2004; Speicher, 2006).

A hibridação *in situ* genômica (GISH) é uma variação da FISH na qual se utiliza o DNA genômico total como sonda. As sondas genômicas possuem uma multitude de sequências únicas e repetitivas e, por causa da sua natureza, hibridam ao longo de todos os cromossomos. Sondas de DNA genômico total são mais facilmente obtidas do que sondas de cromossomos únicos (Guerra, 2004).

A GISH é muito utilizada na citogenética vegetal para a identificação dos cromossomos dos genitores em híbridos, em estudos evolutivos para detectar os genomas ancestrais em aloploidos e em melhoramento genético (Guerra, 2004; Silva e Souza, 2013). Em contrapartida, em animais seu uso é mais restrito e a quantidade de estudos que empregam esta técnica é bem mais reduzida. Ainda assim, em animais a GISH é utilizada na investigação de híbridos e em estudos evolutivos, permitindo a identificação de regiões cromossômicas que contêm sequências compartilhadas e regiões que contêm sequências espécie-específicas (Svartman e Vianna-Morgante, 1999; Guerra, 2004). Neusser *et al.* (2005), por exemplo, utilizaram GISH e pintura cromossômica para analisar híbridos de *Callithrix jacchus* e *Cebuella pygmaea*, e investigar a presença de desbalanceamentos genômicos. Svartman e Vianna-Morgante (1999) e Araújo *et al.* (2017) fizeram comparações interespecíficas entre cariótipos de marsupiais e roedores, respectivamente, por meio de experimentos de GISH, e observaram diferenças interespecíficas na composição das regiões heterocromáticas.

2. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é obter informações citogenômicas sobre o gênero *Leontopithecus*, visando disponibilizar um maior conjunto de dados cromossômicos e genômicos destas espécies e assim, possivelmente, auxiliar na compreensão de sua história evolutiva e, conseqüentemente, nos esforços de manejo e conservação.

2.1 Objetivos Específicos

Visando comparar os cariótipos e genomas de três espécies do gênero *Leontopithecus*, temos como objetivos:

1. Caracterizar os cariótipos de *L. rosalia*, *L. chrysopygus* e *L. chrysomelas* após a aplicação dos padrões de bandeamento GTG e CBG, e marcação das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata;
2. Realizar experimentos de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas teloméricas, ribossômicas (rDNA 18S) e de DNA satélite alfa em espécies do gênero;
3. Comparar os genomas de *L. chrysopygus* e *L. rosalia* através de experimentos de FISH interespecíficos, usando como sondas os DNAs genômicos totais de cada espécie (GISH);
4. Identificar os DNAs satélites presentes no genoma de *Leontopithecus rosalia*.

3. Metodologia

3.1 Amostras Biológicas e Bandeamento Cromossômico

Preparações cromossômicas e DNAs genômicos foram obtidos a partir de amostras de sangue e pele de sete micos-leões: quatro *L. rosalia* (três fêmeas: PRI 19, 20, 21 e um macho: PRI 79), dois *L. chrysopygus* (uma fêmea: PRI 54 e um macho: PRI 53) e um *L. chrysomelas* (uma fêmea: PRI 75), todos originários da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Preparações cromossômicas foram obtidas através de culturas de linfócitos a partir de sangue periférico (Small *et al.*, 1985) e de cultura de fibroblastos (Stanyon e Galleni, 1991). Os DNAs genômicos foram obtidos a partir de fibroblastos com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) e/ou extração com fenol:clorofórmio adaptada de Sambrook e Russel (2006). Os padrões de bandeamento GTG, CBG e Ag-RON foram obtidos para os sete espécimes de acordo com Seabright (1971), Sumner (1972) e Howell e Black (1980), respectivamente.

Nos experimentos de bandeamento GTG foram utilizadas preparações cromossômicas envelhecidas por 2-3 dias em estufa a 37°C que foram tratadas com uma solução de tripsina 20% (diluída em PBS, pH 7,2, temperatura ambiente) por 45 a 50 segundos. Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução Hanks BBS à temperatura ambiente por 15 segundos e coradas por 25 minutos com Giemsa 2% em tampão fosfato.

Já nos experimentos de bandeamento CBG, as preparações cromossômicas foram envelhecidas de 12-16 horas em estufa a 60°C e posteriormente incubadas nas seguintes soluções: 2xSSC a 60°C por 15 minutos; lavagem em água destilada; HCl 0,2 N à temperatura ambiente por 15 minutos; lavagem em água destilada; solução 5% Ba(OH)₂ a 60°C por 15 segundos; lavagem em água destilada; passagem rápida em HCl 1N a 60°C; lavagem em água destilada; 2xSSC a 60°C por 30 minutos; lavagem em água destilada. As lâminas secaram ao ar e foram coradas por 60 minutos com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato.

Na técnica Ag-RON, as preparações cromossômicas, envelhecidas por 2-3 dias em estufa a 37°C, foram colocadas em uma câmara úmida em banho-maria a 60°C, recobertas por uma gota de solução coloidal de gelatina 0,5% e duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50%. As preparações foram recobertas com lamínulas de vidro por 2 a 5 minutos até que a preparação apresentasse coloração amarelada/dourada. Por fim, a lâmina era lavada com água e corada por 30 segundos com Giemsa 2% diluído em tampão fosfato.

3.2 Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

Foram realizados experimentos de hibridação *in situ* fluorescente com sondas teloméricas em cromossomos de *L. rosalia* e *L. chrysopygus*; de DNA ribossômico em cromossomos de *L. chrysopygus*; e de DNA satélite alfa em cromossomos de *L. rosalia*, *L. chrysopygus* e *L. chrysomelas* (Tabela 1). A sonda telomérica consistia de (TTAGGG)⁴ com uma molécula de biotina na extremidade (Invitrogen). A sonda de DNA ribossômico (rDNA 18S) foi obtida por PCR a partir do DNA genômico de *L. chrysopygus* (Primers: NS1 - GTAGTCATATGCTTGTCTC e NS8 - TCCGCAGGTTACCTACGGA) e marcada com o kit Dig-Nick Translation Mix (Roche). O DNA satélite alfa foi amplificado por PCR a partir dos DNAs genômicos de *L. rosalia*, *L. chrysopygus* e *L. chrysomelas* (Primers: F' ACAGGGAAATATCTGCTTCTAAATC e R' GCTTACTGCTGTTTCTTCCATATG), o produto da PCR excisado do gel de agarose 1% e purificado com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). O DNA foi clonado em plasmídeos com o pGEM-T Easy vector (Promega) e utilizado na transformação de bactérias eletrocompetentes *E. coli* strain XL1-BLUE. Foi possível sequenciar três clones recombinantes de *L. rosalia*, cinco de *L. chrysopygus* e quatro de *L. chrysomelas* (Anexo 1). Os clones sequenciados foram marcados com o kit Dig-Nick Translation Mix (Roche) e usados como sonda para mapear o DNA satélite alfa nessas três espécies.

O protocolo de FISH seguido foi o de Araújo *et al.* (2014), seguindo os passos:

- 1) Incubar a lâmina em ácido acético 50% à temperatura ambiente por 10 min;
- 2) Desidratar as preparações cromossômicas em uma série alcóolica (70%, 90% e 100%) à temperatura ambiente, por 3 minutos em cada solução, deixar a lâmina secar ao ar;
- 3) Incubar a lâmina por 1 minuto e 40 segundos em solução de formamida 70 % a 75°C;
- 4) Imergir a lâmina em PBS gelado por 3 minutos;
- 5) Passar a lâmina em nova série alcoólica (70%, 90% e 100%) gelada, 3 minutos em cada solução;
- 6) Esperar a lâmina secar ao ar;
- 7) Aplicar a sonda (condições especificadas na tabela 1), cobrir com uma lamínula plástica e incubar em câmara úmida a 37°C por 48h;
- 8) Após a hibridação, lavar a lâmina com solução de 2xSSC a 37°C por 5 min;

- 9) Incubar em PBT (0,1 % de Tween 20 em PBS) por 5 min a 37°C;
- 10) Colocar 200 µl de anticorpo (1:200 em PBT) sobre a área de hibridação, cobrir com uma lamínula e incubar por 45 min a 37°C;
- 11) Incubar a lâmina em dois banhos de PBT a 37°C por 5 minutos cada;
- 12) Lavar a lâmina com jatos de PBS;
- 13) Montar a lâmina com 15-20 µl de DAPI (0,8 ng/µL) em Slowfade (Invitrogen) e cobrir com uma lamínula de vidro.
- 14) Guardar ao abrigo da luz.

Tabela 1. Condições das sondas utilizadas nos experimentos de FISH

Sonda	Obtenção da sonda	Marcação	Concentração sonda	Combinação de anticorpo/fluorocromo	Desnaturação
Telomérica	Sequências (TTAGGG) ₄ sintetizadas com uma molécula de biotina na extremidade (Invitrogen)	Biotina	1040 ng	Avidina conjugada com FITC	-
Satélite alfa	Clones sequenciados e marcados	DIG-Nick Translation (Roche)	100 ng	Anti-digoxigenina conjugada com rodamina	98°C, 10 minutos
rDNA	Fragmentsos de produto de PCR ¹ eluídos e marcados		54 ng		

¹ Primers: NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) e NS8 (TCCGCAGGTTCACCTACGGA)

Experimentos de hibridação *in situ* genômica (GISH) foram realizados para comparar os cromossomos de *L. rosalia* e *L. chrysopygus*, de acordo com Svartman e Vianna-Morgante (1999) e Araújo *et al.* (2017). Estes experimentos seguiram os mesmos passos descritos acima para FISH, mas com período de incubação de 72 horas no passo 7. Na Tabela 2 estão descritos os experimentos realizados.

Tabela 2. Experimentos de GISH

Cromossomos	Sonda (DNA marcado)	Supressão (DNA não marcado)
Controle da sonda		
LCH macho	LCH macho	-
LRO fêmea	LRO fêmea	-
Controle da supressão		
LCH macho	LCH macho	LCH macho
Segmentos comuns a ambas as espécies		
LCH macho	LRO macho	-
LRO fêmea	LCH macho	-
Segmentos espécie-específicos		
LCH macho	LCH macho	LRO macho
LRO fêmea	LRO macho	LCH fêmea

LCH - *L. chrysopygus*; LRO - *L. rosalia*

Os DNAs genômicos totais das duas espécies foram marcados utilizando o kit Biotin-Nick Translation Mix (Roche). DNAs genômicos totais não marcados foram usados para a supressão. Os experimentos sem supressão evidenciam os segmentos comuns a ambas as espécies. Os experimentos com supressão mostram as regiões com sequências espécie-específicas. Nos experimentos sem supressão, a mistura de hibridação era composta por 400 ng de sonda marcada em 50% formamida/2xSSC, a qual era desnaturada por 10 minutos a 98°C e adicionada à preparação cromossômica. Já nos experimentos com supressão, a mistura de hibridação, composta por DNA marcado e DNA não marcado (1:50), era incubada por 90 minutos a 37°C após a desnaturação e, então, aplicada à preparação cromossômica.

3.3 DNAs Satélites

O genoma sequenciado de *L. rosalia* disponível no NCBI e o software TAREAN foram usados para a identificação *de novo* dos DNAs satélites presentes na espécie. As *reads* brutas (SRR16086808) foram amostradas randomicamente pelo próprio TAREAN e um total de 832411 *reads* foram analisadas numa comparação baseada em grafo de todas contra todas. As *reads* são agrupadas juntas de acordo com sua similaridade e parcialmente montadas em *contigs*. Os possíveis DNAs satélites são classificados assim com alta e baixa confiança e em ambos os casos o TAREAN informa a sequência-consenso da repetição. O número de *reads* que compõem cada cluster indica a proporção que a repetição ocupa no genoma. As sequências-consenso de cada possível DNA satélite são usadas como *query* em buscas no RepBase e *nucleotide collection* (nr/nt) do NCBI para serem comparadas com sequências repetitivas já descritas.

4. Resultados

4.1 Bandeamento Cromossômico

Todos os espécimes analisados apresentaram um número diploide de $2n = 46$ e um número fundamental $NF = 74$. Os padrões de bandeamento GTG eram iguais nas três espécies (Figura 6), corroborando os dados de Seuáñez *et al.* (1988), Nagamachi *et al.* (1997) e Gerbault-Serreau *et al.* (2004). Os padrões de bandeamento CBG (Tabela 3 e Figura 7) revelaram a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, na porção distal do braço longo do cromossomo X, na porção distal dos braços curtos dos cromossomos 10 e 11, e nos braços curtos dos cromossomos 20 e 22 nas três espécies. Em contraste, os padrões de distribuição da heterocromatina fora da região pericentromérica diferiram entre as espécies. Em *L. rosalia*, a heterocromatina constitutiva estava presente na porção distal dos braços longos dos cromossomos 1, 6 e 16, na porção distal dos braços curtos dos cromossomos 12, 13, 15 e 19, e no braço curto dos cromossomos 16, 18 e 21. *L. chrysopygus* apresentou heterocromatina constitutiva na porção distal dos braços curtos dos cromossomos 6, 8 e 12-14, nos braços curtos dos cromossomos 16, 18 e 21, e em três regiões distintas ao longo do cromossomo Y. Já em *L. chrysomelas*, a heterocromatina constitutiva foi observada na porção distal dos braços longos dos cromossomos 1, 10, 13 e 17, na porção distal dos braços curtos dos cromossomos 6 e 7, nos braços curtos dos cromossomos 3, 14, 15 e 17, no meio dos braços longos do cromossomo 10 e ao longo do cromossomo 5.

Tabela 3. Comparação das marcações após bandeamento CBG nas espécies de *Leontopithecus*

Localização da marcação	<i>Leontopithecus rosalia</i>	<i>L. chrysopygus</i>	<i>L. chrysomelas</i>
Região pericentromérica	Todos os cromossomos	Todos os cromossomos	Todos os cromossomos
Porção distal do braço longo	1, 6, 16, X	X	1, 10, 13, 17, X
Porção distal do braço curto	10, 11, 12, 13, 15, 19	6, 8, 10, 11, 12, 13, 14	6, 7, 10, 11
Todo o braço curto	16, 18, 20, 21, 22	16, 18, 20, 21, 22	3, 14, 15, 17, 20, 22
Outras marcações		Y (três regiões distintas)	10 (meio dos braços longos) 5 (ao longo)

As cores indicam que a marcação é compartilhada pelas três espécies (rosa); por *L. rosalia* e *L. chrysomelas* (verde); por *L. rosalia* e *L. chrysopygus* (azul); e por *L. chrysopygus* e *L. chrysomelas* (laranja).

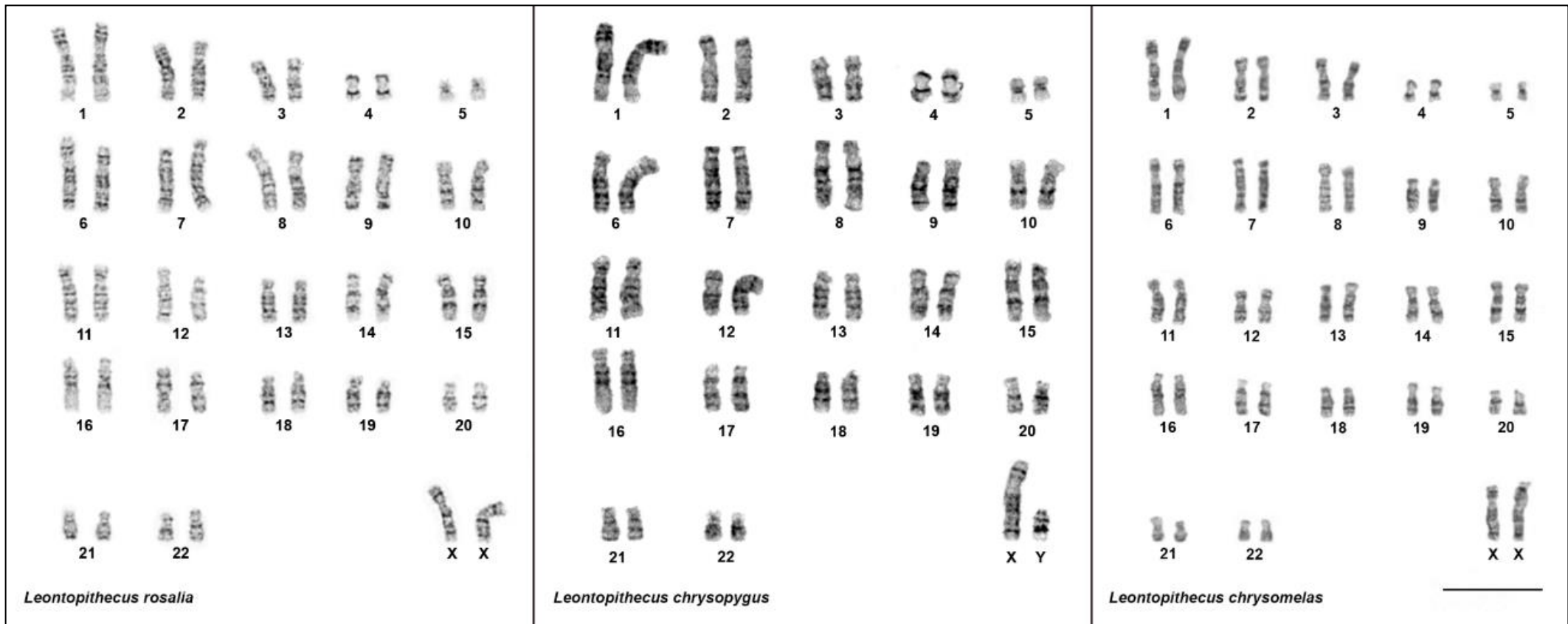


Figura 6. Cariótipos de *Leontopithecus* após bandeamento GTG. Barra = 10 μ m.

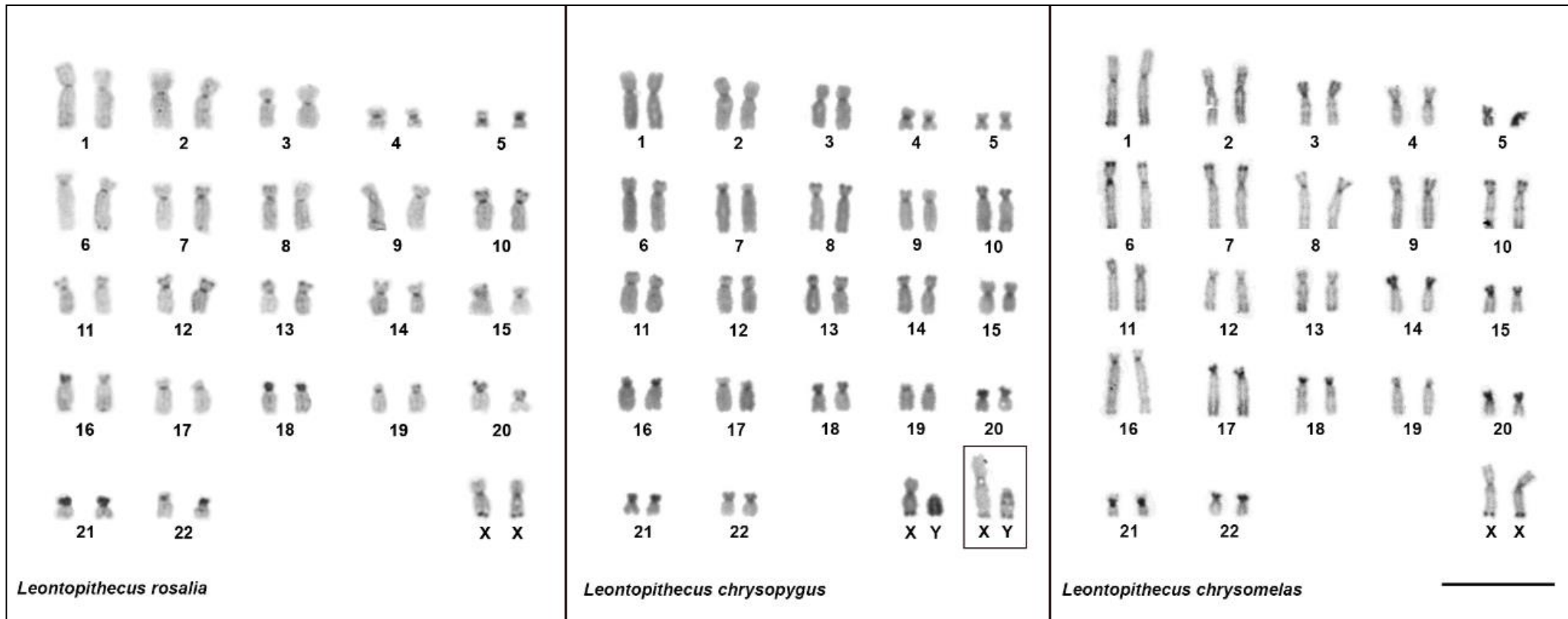


Figura 7. Cariótipos de *Leontopithecus* após bandeamento CBG. No destaque, os cromossomos sexuais de outra célula do mesmo indivíduo, em que as regiões heterocromáticas do cromossomo Y estão mais evidentes. Barra = 10 μ m.

A coloração com o nitrato de prata revelou padrões distintos de distribuição das Ag-RONs entre as três espécies (Figura 8). *L. rosalia* mostrou marcação nos pares 19-22, *L. chrysopygus* nos pares 16, 18, 20-22 e *L. chrysomelas* nos pares 15, 17, 19-22. Em *L. chrysomelas*, nenhuma metáfase apresentava todas as marcações e o número máximo de RONS observadas em uma única metáfase foi dez. Na Figura 8, uma metáfase não tem o par 22 marcado, enquanto na outra não há marcações no par 19. *L. rosalia* e *L. chrysomelas* compartilhavam a marcação no cromossomo 19. Já as marcações dos cromossomos 17 e 18 eram exclusivas de *L. chrysomelas* e *L. chrysopygus*, respectivamente. Nossos resultados de Ag-RON para *L. chrysopygus* mostraram uma marcação no braço curto do cromossomo 15 e ausência de marcação no cromossomo 16, diferindo dos resultados de Gerbault-Serreau *et al.* (2004), embora seis pares de autossomos tenham sido evidenciados em ambos os trabalhos.

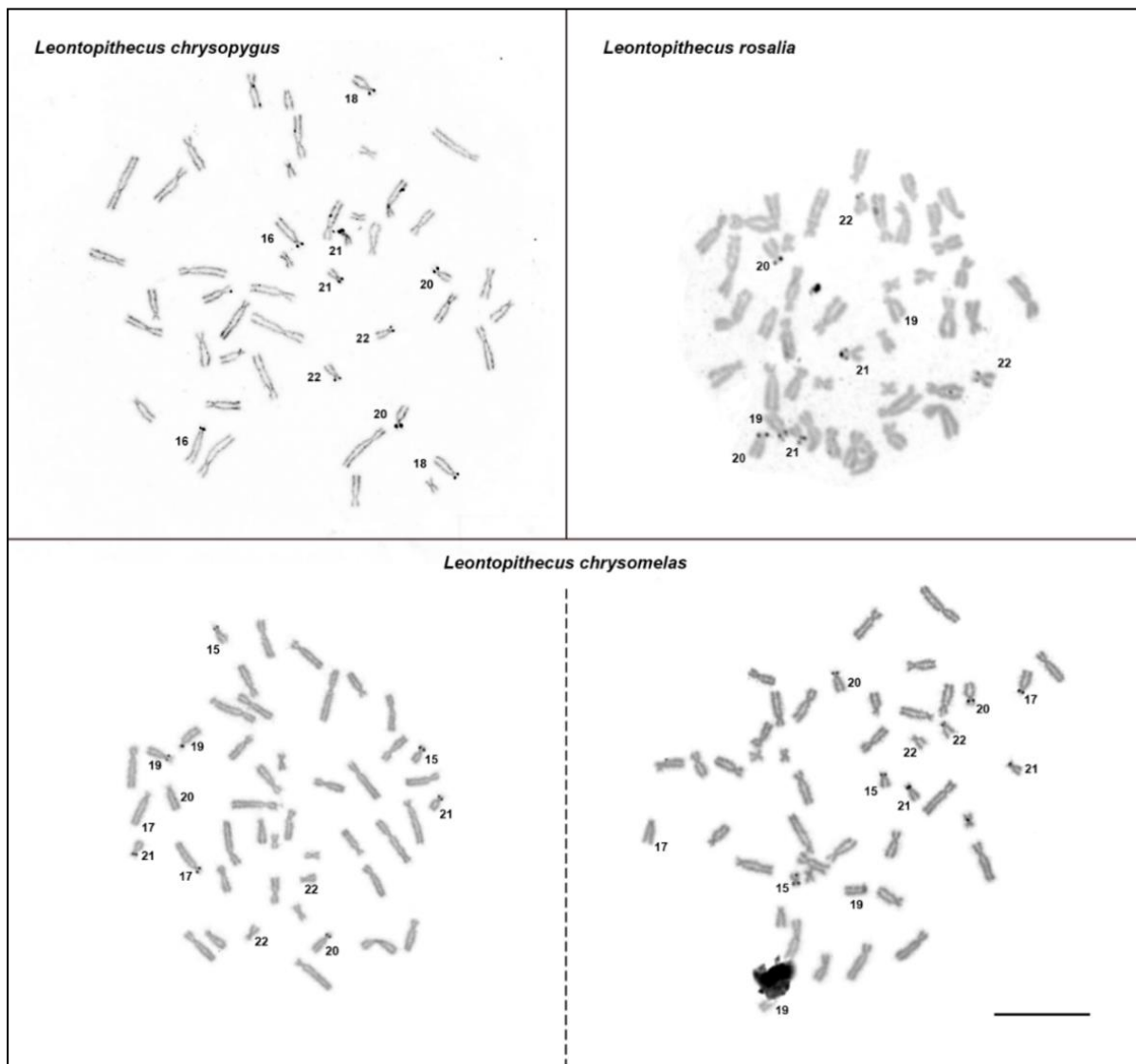


Figura 8. Metáfases de *Leontopithecus* após coloração com nitrato de prata. Os cromossomos indicados são portadores de Ag-RONs. Barra = 10 μ m.

4.2 FISH

A FISH com DNA ribossômico (rDNA 18S) em *L. chrysopygus* mostrou sinais de hibridação nos pares 16, 18, 20-22, que também foram marcados pela coloração com o nitrato de prata. Além disso, também é possível observar sinal em um dos homólogos do par 17 (Figura 9).

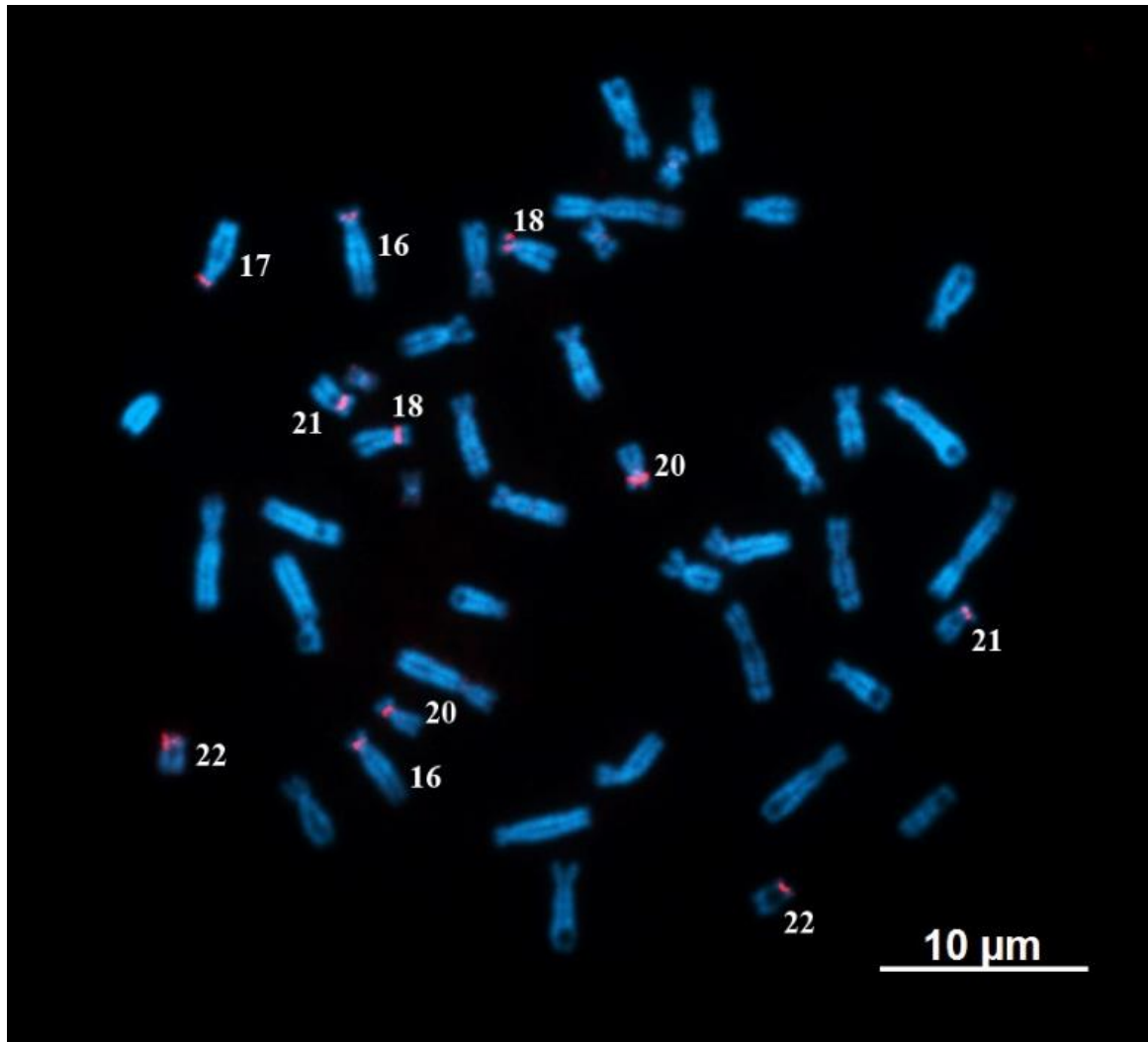


Figura 9. Metáfase de *Leontopithecus chrysopygus* após FISH com sonda de DNA ribossômico (rDNA 18S).

A FISH com sondas teloméricas evidenciou sinais apenas nas regiões terminais de todos os braços cromossômicos em *L. rosalia* e *L. chrysopygus* (Figura 10).

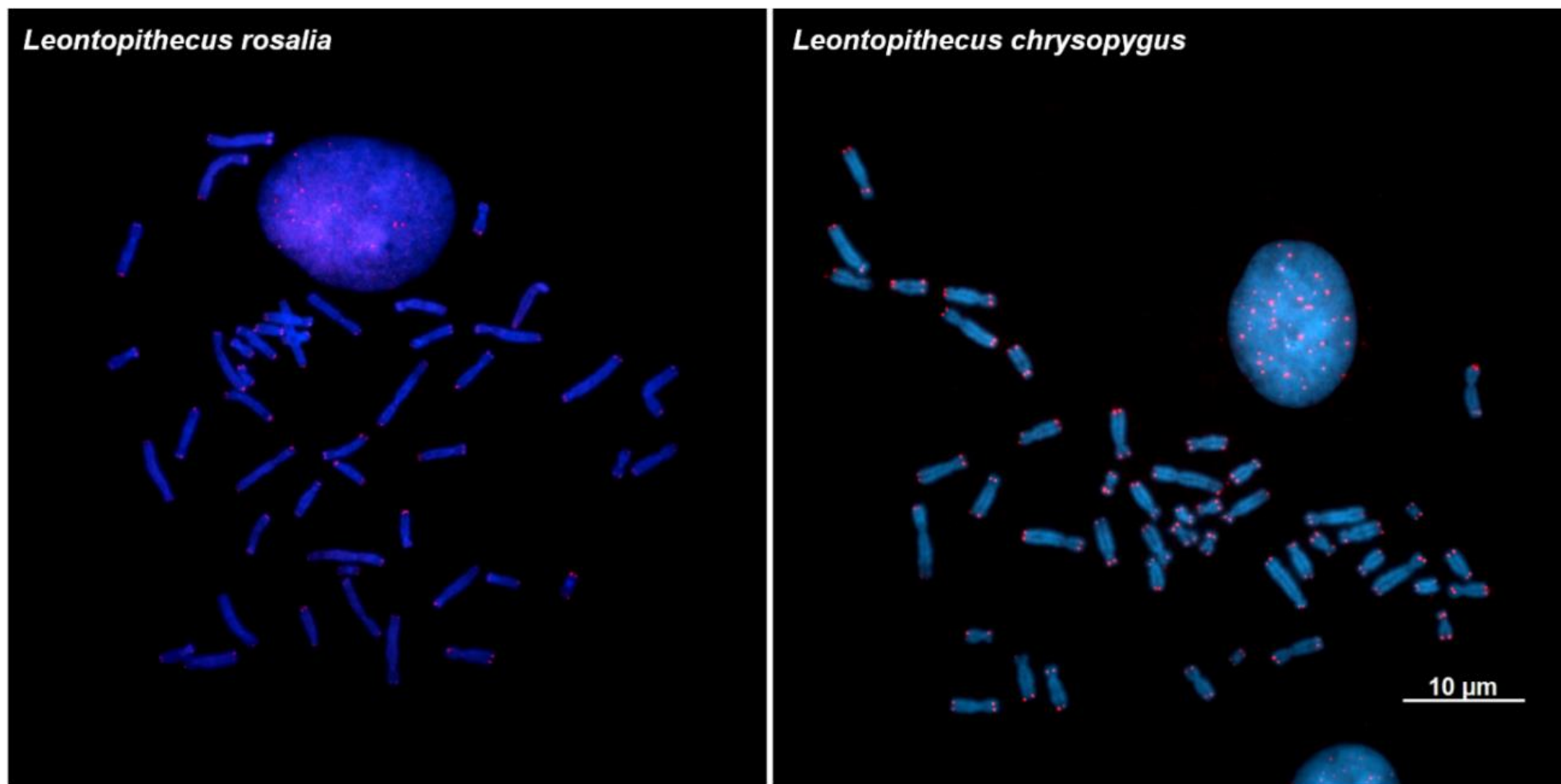


Figura 10. Metáfases de *Leontopithecus* após FISH com sondas teloméricas.

4.3 Hibridação *in situ* Genômica (GISH)

Os experimentos-controle das sondas (Figura 11 a-b), nos quais a sonda de DNA genômico total e os cromossomos eram da mesma espécie, resultou em marcações ao longo de todos os cromossomos, sendo estas mais intensas nas regiões heterocromáticas. O experimento de controle da supressão realizado em *L. chrysopygus* (Figura 11c), em que a sonda, o DNA genômico não marcado e os cromossomos pertenciam à mesma espécie, exibiu total falta de sinais.

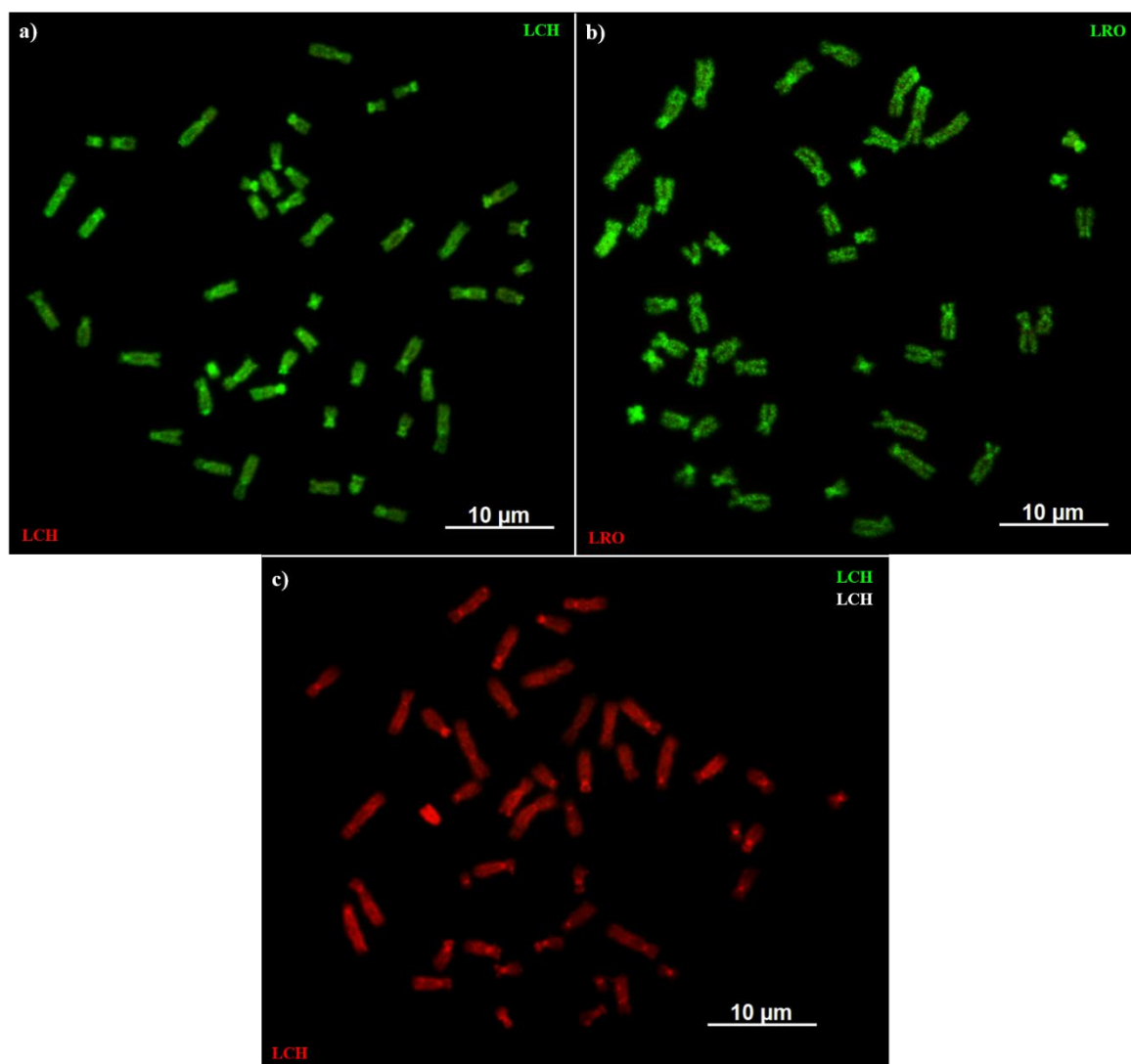


Figura 11. Controles dos experimentos de GISH: a-b) das sondas; c) da supressão. No canto inferior esquerdo estão indicados em vermelho a espécie cujos cromossomos foram utilizados. No canto superior direito, estão indicados em verde o DNA usado como sonda e em branco o DNA usado para a supressão. LRO = *Leontopithecus rosalia*; LCH = *L. chrysopygus*.

Os experimentos de GISH interespecífica (Figura 12a), que consistiam na hibridação do DNA genômico total de uma espécie aos cromossomos da outra espécie, demonstraram uma alta similaridade entre os cromossomos de *L. rosalia* e *L. chrysopygus*, com sinais cobrindo todas as

porções eucromáticas e heterocromáticas dos cromossomos nos experimentos sem supressão. A GISH também demonstrou a presença de sequências espécie-específicas nas regiões heterocromáticas dos cromossomos 4, 16 e 20 de *L. rosalia* e nos cromossomos 4, 16, 20-22 e Y em *L. chrysopygus*, que exibiram marcações nos experimentos com supressão (Figura 12 b-c).

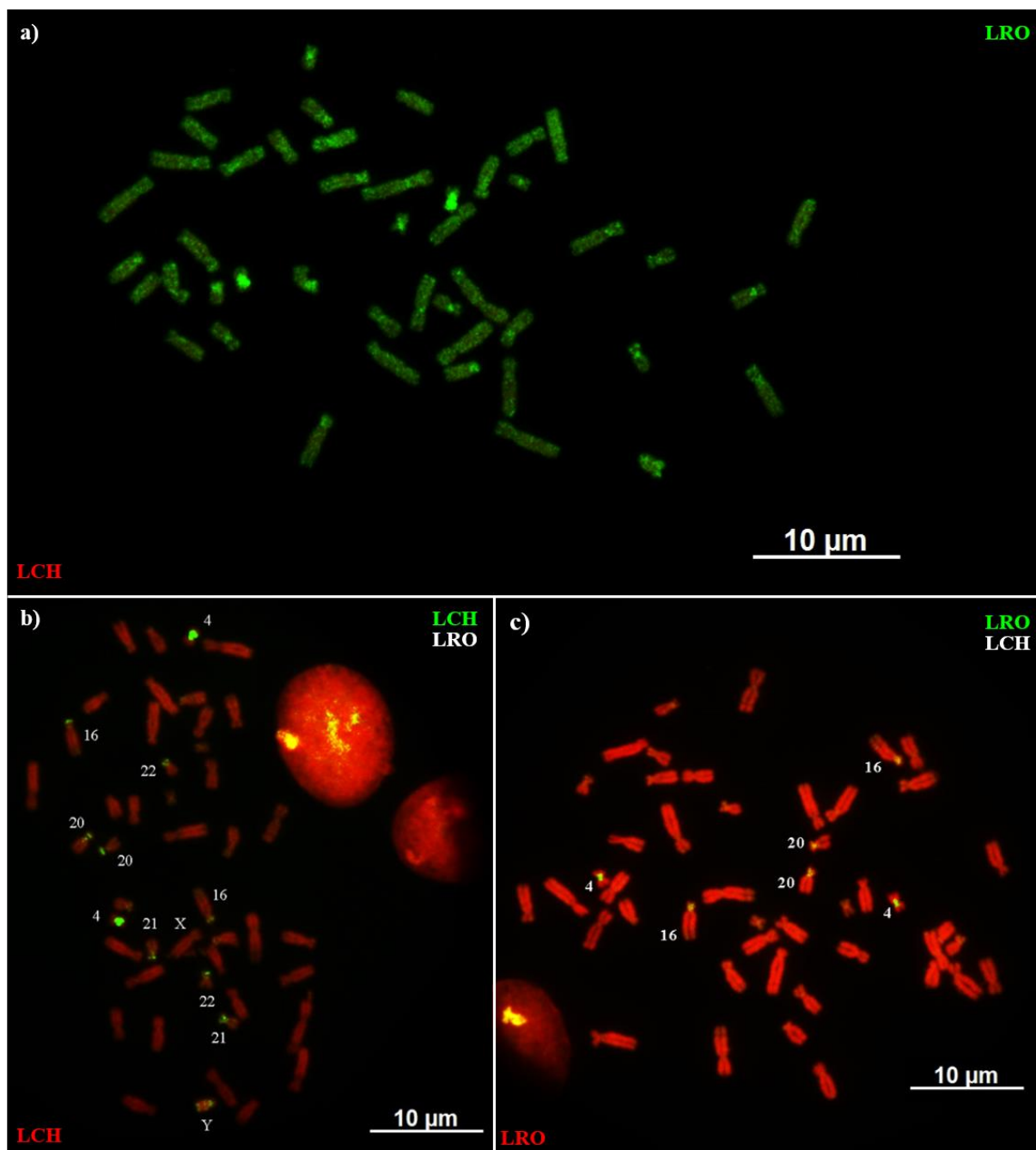


Figura 12. GISH interespecífico entre *L. chrysopygus* (LCH) e *L. rosalia* (LRO): a) sem supressão e b-c) com supressão. No canto inferior esquerdo estão indicados em vermelho a espécie cujos cromossomos foram utilizados. No canto superior direito, estão indicados em verde o DNA usado como sonda e em branco o DNA usado para supressão.

4.4 DNAs Satélites

Analisamos o genoma recém-disponibilizado de *L. rosalia* (número de acesso SRR16086808) em busca de DNAs satélites. Identificamos os três clusters mais abundantes indicados pelo TAREAN como possíveis DNAs satélites, os *clusters* 4, 7 e 8, todos indicados com alta confiança (Figura 13) (Anexo 2). O cluster 7 corresponde a 0,75% do genoma e possui sequência-consenso de 343 pb, homóloga ao DNA satélite alfa. O tamanho monomérico do alfa com ~340 pb foi confirmado por PCR em *L. rosalia*, *L. chrysopygus* e *L. chrysomelas*. Esse DNA satélite foi mapeado nas regiões centroméricas de todos os cromossomos em *L. rosalia*, *L. chrysopygus* e *L. chrysomelas*, com exceção do cromossomo Y nas duas primeiras espécies (Figura 14). Não foi possível verificar o cromossomo Y de *L. chrysomelas* porque a preparação cromossômica era de uma fêmea.

O cluster 4 apresentou sequência-consenso de 1.751 pb, e o cluster 8 de 1.949 pb, representando, respectivamente, 1,6% e 0,7% do genoma de *L. rosalia*. Apesar de serem reconhecidos pelo TAREAN como DNAs satélites diferentes, ambos apresentaram região homóloga ao DNA satélite CarB de 1.528 pb, descrito previamente em *Callithrix argentata* (Alves *et al.*, 1995). O consenso do cluster 4 apresentou 50,1% de identidade quando alinhado com o CarB (Figura 15), enquanto o consenso do cluster 8 apresentou 61,8% de identidade (Figura 16). Já a comparação das sequências-consenso do cluster 4 e do cluster 8 indicou 51,9% de identidade entre elas (Figura 17).

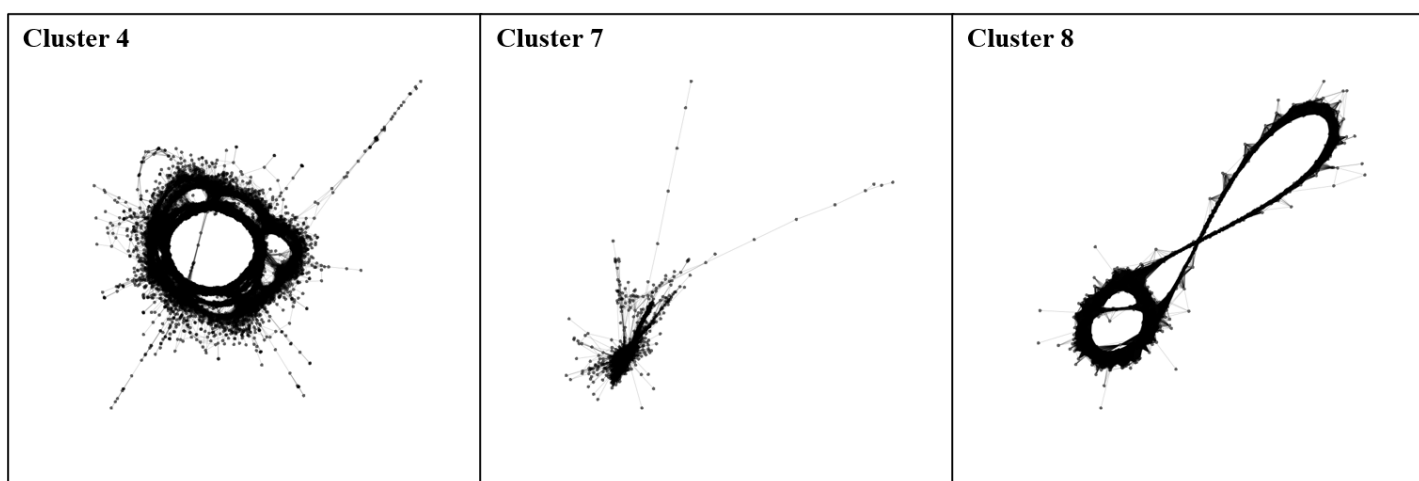


Figura 13. Grafos dos clusters mais abundantes identificados pelo TAREAN.

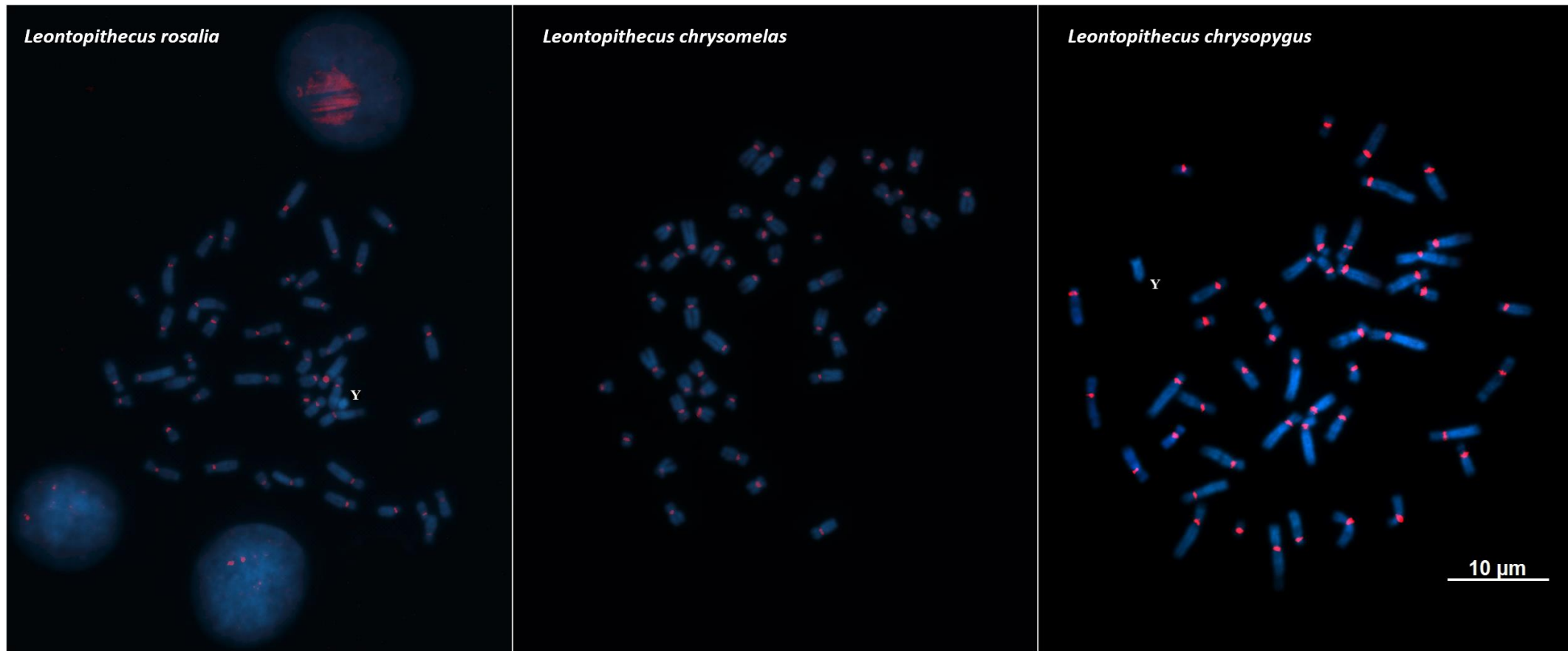


Figura 14. Metáfases de *Leontopithecus* após FISH com sondas de DNA satélite alfa.

5. Discussão

As análises comparativas entre os cariótipos de *Leontopithecus chrysopygus*, *L. rosalia* e *L. chrysomelas* após bandeamento GTG nos permitiram verificar o número diploide e o NF dos espécimes com os quais trabalhamos. O compartilhamento de um mesmo padrão de bandeamento GTG já havia sido descrito para estas espécies (Seuánez *et al.*, 1988; Nagamachi *et al.*, 1997) e, portanto, nosso estudo reforça estes achados. Além disso, nosso estudo traz o padrão de bandeamento GTG com uma resolução maior para *L. chrysopygus* e, possivelmente, de mais fácil acesso, visto que o único cariótipo com bandas GTG publicado desta espécie foi o de Seuánez *et al.* (1988) (Figura 4), que não se encontra disponível online.

As diferenças interespecíficas que encontramos nos padrões de bandeamento CBG entre as três espécies não corroboram os resultados descritos por Nagamachi *et al.* (1997) de que *L. rosalia* e *L. chrysomelas* teriam os mesmos padrões de bandeamento CBG. Algumas destas diferenças são a presença de marcação na porção distal do braço longo nos cromossomos 6 e 16 apenas em *L. rosalia*, e nos cromossomos 10, 13, 17 apenas em *L. chrysomelas*; na porção distal do braço curto nos cromossomos 15 e 19 apenas em *L. rosalia*, nos cromossomos 8 e 14, em *L. chrysopygus*, e no cromossomo 7 apenas em *L. chrysomelas*; a presença de marcação em todo o braço curto dos cromossomos 3, 14, 15, 17 apenas em *L. chrysomelas*. Além disso, *L. chrysomelas* foi a única espécie a apresentar marcação no meio dos braços longos do cromossomo 10 e ao longo de todo o cromossomo 5.

Algumas marcações são compartilhadas por duas das três espécies analisadas. As espécies *L. rosalia* e *L. chrysomelas* compartilham a marcação na porção distal do braço longo do cromossomo 1. Já *L. chrysomelas* e *L. chrysopygus* compartilham a marcação na porção distal do braço curto do cromossomo 6. Por fim, *L. rosalia* e *L. chrysopygus* compartilharam as marcações na porção distal do braço curto dos cromossomos 12, 13 e em todo o braço curto dos cromossomos 16, 18 e 21. O fato de que *L. rosalia* e *L. chrysopygus* compartilham mais marcações entre si do que com *L. chrysomelas* está de acordo com o esperado se considerarmos as filogenias do gênero propostas por Mundy e Kelly (2001) e Perez-Sweeney *et al.* (2008).

Também encontramos diferenças intraespecíficas ao compararmos nossos resultados de bandeamento CBG em *L. rosalia* e *L. chrysomelas* com os de Nagamachi *et al.* (1997) e os desta última espécie também com os dados de Gerbault-Serreau *et al.* (2004). Nossos resultados em *L. rosalia* diferiram dos obtidos por Nagamachi *et al.* (1997) devido à presença de marcação nos braços longos do cromossomo 6, nos braços curtos do cromossomo 13, e ausência de marcações na porção distal dos braços curtos dos cromossomos 6, 8, 9 e 17. Já os resultados obtidos em *L.*

chrysomelas eram distintos do padrão descrito por Nagamachi *et al.* (1997) por causa da presença de marcação no meio dos braços longos do cromossomo 10 e ao longo de todo o cromossomo 5, nos braços longos dos cromossomos 10, 13 e 17, a presença de marcação nos braços curtos do cromossomo 7 e ausência nos braços curtos dos cromossomos 8, 9 e 12; e ausência de marcação no braço curto dos cromossomos 16, 18 e 19. Com relação ao padrão descrito por Gerbault-Serreau *et al.* (2004) em *L. chrysomelas*, as diferenças foram em decorrência da presença de marcação no meio dos braços longos do cromossomo 10 e ao longo de todo o cromossomo 5, nos braços longos dos cromossomos 1, 10, 13 e 17, a presença de marcação nos braços curtos dos cromossomos 6 e 7 e ausência nos braços curtos dos cromossomos 8, 12; 14 e 15, e ausência de marcação no braço curto dos cromossomos 4, 16 e 19. As diferenças intraespecíficas observadas ao compararmos nossos resultados com os dados da literatura podem estar relacionadas a polimorfismos reais ou apenas a variações das técnicas de bandeamento CBG aplicadas. A existência de polimorfismos relacionados à heterocromatina constitutiva já foi relatada em diversos primatas, como por exemplo no gênero *Sapajus*, em *Lagothrix lagothricha cana*, *Cebus apella*, *Cebus capucinus*, *Cebus nigrivittatus*, *Cebuella pygmaea* e *Callithrix emiliae* (Garcia *et al.*, 1983; Nagamachi *et al.*, 1992; Ruiz-Herrera *et al.*, 2004; Penedo *et al.*, 2014). Para constatar quais diferenças seriam realmente decorrentes de polimorfismos, mais espécimes de cada espécie precisariam ser analisados.

Nossos resultados após a coloração com o nitrato de prata estão de acordo com os já descritos para *L. rosalia* (Nagamachi *et al.*, 1997; Ceraulo *et al.*, 2021) e *L. chrysomelas* (Gerbault-Serreau *et al.*, 2004), com exceção, nesta última espécie, dos pares 15 e 16 que diferem pela presença e ausência de marcação, respectivamente. O número de marcações identificadas para *L. chrysopygus* (cinco pares de cromossomos) está próximo aos números descritos, por nós e na literatura, para *L. rosalia* (quatro pares de cromossomos) e para *L. chrysomelas* (seis pares de cromossomos), o que reforça o resultado encontrado. Além disso, os pares marcados por Ag-RON são os mesmos evidenciados após FISH com DNA ribossômico (rDNA 18S). A existência de sinal em apenas um dos homólogos do par 17 em *L. chrysopygus* (Figura 9) pode ser devida a uma diferença entre o número de cópias destas sequências entre os homólogos deste par. Sendo assim, a ausência de sinal em um dos homólogos, decorre provavelmente do baixo número de cópias, não detectável por FISH. A presença de sinais nos experimentos de FISH com DNA ribossômico em cromossomos que não apresentavam marcação após a coloração pelo nitrato de prata também foi observada em *L. rosalia*, em que os cromossomos 16 e 17 apresentaram marcação apenas nos experimentos de FISH (Ceraulo *et al.*, 2021). Gerbault-Serreau *et al.* (2004) observaram sinais nos

cromossomos 16, 17, 19-22 nos experimentos de FISH com rDNA em *L. chrysomelas*. Somando os resultados aqui obtidos e os dados disponíveis na literatura, é possível perceber que *L. rosalia*, *L. chrysopygus* e *L. chrysomelas* possuem regiões de rDNA nos cromossomos 16, 17, 20-22, dado que compartilham marcações nestes cromossomos nos experimentos de FISH.

Os nossos resultados após FISH com sondas teloméricas não apresentaram diferenças entre espécies. No entanto, nosso resultado para *L. rosalia* diferiu dos publicados por Ceraulo *et al.* (2021), que descreveram sequências teloméricas intersticiais (ITS) nos cromossomos 14 e 16 de um macho e nos cromossomos 1, 2 e 4 de fêmeas. As diferenças entre nossos resultados e os resultados obtidos por Ceraulo *et al.* (2021) podem decorrer de diferenças na forma como os experimentos de FISH foram realizados. Nós utilizamos uma sonda de oligonucleotídeos ((TTAGGG)₄) sintetizada pela Invitrogen, enquanto Ceraulo *et al.* (2021) utilizaram uma sonda de PNA (ácido nucleico peptídico). De acordo com Bolzán (2012), experimentos de FISH utilizando PNA como sonda (PNA-FISH) teriam uma melhor eficiência na detecção de sequências teloméricas do que experimentos de FISH utilizando as sondas convencionais. Ainda assim, experimentos de FISH utilizando sondas de oligonucleotídeos sintetizados ((TTAGGG)_n) foram capazes de identificar sequências teloméricas intersticiais em *Macaca fascicularis* (Ruiz-Herrera *et al.*, 2002). Outra possível justificativa para estas diferenças seria a existência de polimorfismos, o que poderá ser confirmado através da análise de mais espécimes. Essa hipótese já foi levantada por Ceraulo *et al.* (2021) como uma possível explicação para a diferença encontrada em seus resultados entre as fêmeas e o macho analisados. Uma variação do número de ITSs entre indivíduos (2-8 sítios) foi reportada no marsupial sul-americano *Micoureus demerarae* (Pagnozzi *et al.*, 2000). Além disso, a existência de polimorfismos em relação a sequência e ao número de cópias já foi descrita para alguns loci de ITS em humanos e camundongos (Lin e Yan, 2008; Bolzán, 2017). Polimorfismos no número de cópias podem influenciar o resultado de experimentos de FISH, uma vez que a sensibilidade de detecção é influenciada pelo tamanho da sequência-alvo.

O DNA satélite centromérico alfa ocupa cerca de 0,75% do genoma de *L. rosalia* e apresenta monômeros de ~340 pb nas três espécies analisadas. Ele foi mapeado na região centromérica de todos os cromossomos em *L. chrysomelas* e em todos os cromossomos exceto o Y em *L. rosalia* e *L. chrysopygus* (Figura 14). A proporção genômica do alfa, tamanho dos monômeros e localização centromérica está de acordo com o que esperávamos observar a partir de trabalhos da literatura em primatas do Novo e do Velho Mundo, em especial outras espécies da família Cebidae (Alves *et al.*, 1994; Alexandrov *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2017; Valeri *et al.*, 2020). O inesperado foi a ausência de sinal no cromossomo Y de *L. rosalia* e *L. chrysopygus*. No

entanto, a ausência de sinal em um ou poucos cromossomos autossômicos já foi descrita em um espécime de *Saimiri* (Valeri *et al.*, 2020). Esta ausência de marcação nos cromossomos Y pode ser decorrente de um número de cópias da sequência do DNA satélite alfa abaixo do patamar detectável por FISH ou pela divergência dessa sequência nestes cromossomos. Esta última hipótese é baseada no fato de que a existência de sequências cromossomo-específicas do DNA satélite alfa já foi relatada em humanos e que em *Callithrix jacchus* foi observado que as sequências do DNA satélite alfa podiam ser agrupadas em sete clusters distintos que apresentavam diferenças nos padrões de hibridação, indicando que as sequências são divergentes entre si (Alexandrov *et al.*, 2001; Cellamare *et al.*, 2009).

Os resultados dos experimentos de hibridação *in situ* genômica entre *L. rosalia* e *L. chrysopygus* demonstraram uma grande conservação genômica entre as duas espécies, tanto nas porções eucromáticas quanto nas porções heterocromáticas dos cromossomos. Convém notar que os resultados obtidos nos experimentos de hibridação interespecíficos foram bastante semelhantes aos obtidos nos experimentos-controle, apenas diferindo quanto à intensidade da fluorescência. Isto porque, em algumas regiões dos cromossomos, o sinal é um pouco menos intenso nos experimentos de hibridação interespecíficos do que nos experimentos-controle. Isso pode ser resultante das divergências existentes entre as sequências compartilhadas entre os dois genomas.

Nos experimentos interespecíficos com supressão foi possível notar algumas regiões heterocromáticas com marcação, são elas: regiões pericentroméricas ou centroméricas dos cromossomos 4, 16 e 20 de *L. rosalia* e dos cromossomos 4, 16, 20-22 e regiões heterocromáticas do cromossomo Y em *L. chrysopygus* (Figura 12b-c). Essas são regiões que devem apresentar sequências espécie-específicas. Entretanto, essas mesmas regiões também se mostraram marcadas após as hibridações interespecíficas sem supressão (Figura 12a). Esses resultados sugerem que essas regiões devem ser povoadas tanto por sequências espécie-específicas, como por sequências comuns às espécies de mico-leão analisadas. Além disso, a presença de sequências espécie-específicas no cromossomo Y de *L. chrysopygus*, observada através dos sinais presentes nas regiões heterocromáticas do mesmo nos experimentos com supressão (figura 12b) corrobora a noção de que os cromossomos Y seriam espécie-específicos na maioria dos mamíferos (Wallis *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2017). No entanto, essa diferenciação não seria completa visto que o mesmo cromossomo Y se encontra completamente marcado nos experimentos sem supressão (Figura 12a).

As semelhanças e diferenças encontradas nas regiões heterocromáticas dos cromossomos de *Leontopithecus* provavelmente estão associadas a DNAs satélites, já que espécies próximas

geralmente compartilham uma mesma família de DNAs satélites, mas que podem apresentar sequências divergentes (Plohl *et al.*, 2012; Garrido-Ramos, 2017). No caso das regiões heterocromáticas não pericentroméricas dos cromossomos de *Leontopithecus*, uma das nossas hipóteses é que parte delas sejam povoadas pelo DNA satélite CarB, exclusivo de Callitrichinae, já que o TAREAN indicou dois clusters com regiões homólogas a esse DNA satélite, que juntos somam 2,3% de proporção do genoma de *L. rosalia*. Mas nossos resultados apontam que o CarB em *Leontopithecus* é bem divergente do encontrado em *C. argentata*, razão pela qual não teria sido detectado em *L. rosalia* pelo método de Southern Blot (Alves *et al.*, 1995). Ele também apresenta divergência entre sequências do mesmo genoma, evidenciado pelos dois clusters com consensos compartilhando apenas ~50% de identidade.

6. Conclusões

Em conclusão, observamos uma grande semelhança entre os cariótipos de *L. rosalia*, *L. chrysopygus* e *L. chrysomelas*, incluindo os padrões de bandeamento GTG. Por outro lado, encontramos diferenças entre as três espécies em relação aos padrões de bandeamento CBG e da marcação das Ag-RON e FISH com rDNA. Os experimentos de GISH indicaram uma grande conservação entre os genomas de *L. rosalia* e *L. chrysopygus*, com diferenças em algumas regiões heterocromáticas que parecem ser compostas por sequências espécie-específicas. Também investigamos dois DNAs satélites, o alfa e o CarB presentes no genoma de *L. rosalia*, que podem estar relacionados às diferenças cromossômicas observadas entre as espécies de *Leontopithecus*.

7. Perspectivas

Nossos resultados sugerem que o estudo mais aprofundado das sequências repetitivas nas espécies do gênero *Leontopithecus* deve trazer informações de interesse sobre a diferenciação destes cariótipos. Etapas futuras desse trabalho incluirão uma análise comparativa intraespecífica das sequências do alfa clonadas de *Leontopithecus*, bem como sua comparação com outros gêneros. Também planejamos analisar mais aprofundadamente as sequências de CarB do genoma de *L. rosalia*, verificar se há organização em HOR dos monômeros e expandir as análises usando amostras biológicas para realizar PCR, clonagem e mapeamento dessas sequências nos cromossomos. Analisaremos também os outros cinco clusters indicados pelo TAREAN como possíveis DNAs satélites no genoma de *L. rosalia*. Pretendemos realizar análises comparativas desses DNAs satélites em *Leontopithecus*, em Callitrichinae e nos Platyrrhini de modo geral. Assim, esperamos reunir informações sobre a história evolutiva não só das sequências desses DNAs satélites, como também sobre a evolução dos genomas dos primatas neotropicais. A análise mais aprofundada de sequências repetitivas em *Leontopithecus* pode contribuir para a identificação de marcadores espécie-específicos, que podem ser úteis para estudos evolutivos, taxonômicos, de manejo e de conservação desse gênero.

8. Referências Bibliográficas

- Aksenova AY, Mirkin SM. At the beginning of the end and in the middle of the beginning: structure and maintenance of telomeric DNA repeats and interstitial telomeric sequences. *Genes*, 10:118, 2019.
- Alexandrov I *et al.*. Alpha-satellite DNA of primates: old and new families. *Chromosoma* 110: 253-266, 2001.
- Alves G, Seuánez HN, Fanning T. Alpha satellite DNA in Neotropical primates (Platyrrhini). *Chromosoma* 103: 262-267, 1994.
- Alves G *et al.*. Recently amplified satellite DNA in *Callithrix argentata* (Primates, Platyrrhini). *Chromosome Res.* 3: 207-213, 1995.
- Araújo NP *et al.*. New karyotypes of Atlantic tree rats, genus *Phyllomys* (Rodentia: Echimyidae). *Genome* 57:1-8, 2014.
- Araújo NP *et al.*. Identification and characterization of a subtelomeric satellite DNA in Callitrichini monkeys. *DNA Research* 24: 377–385, 2017.
- Araújo NP *et al.*. Comparative genomic *in situ* hybridization and the possible role of retroelements in the karyotypic evolution of three Akodontini species. *Int. J. Genomics* 2017: 1-11, 2017.
- Biscotti MA *et al.*. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Res.* 23: 415-420, 2015.
- Bolzán AD. Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis* 27.1: 1–15 , 2012.
- Bolzán AD. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: origin, function, instability and evolution. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 773: 51-65, 2017.
- Brasil, Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Portaria nº 702, de 7 de agosto de 2018. Brasília, 2018.
- Buckner JC *et al.*. Biogeography of the marmosets and tamarins (Callitrichidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 82: 413-425, 2015.
- Cellamare A *et al.*. New Insights into centromere organization and evolution from the White-Cheeked Gibbon and Marmoset. *Mol. Biol. Evol.* 26:1889-1900, 2009.
- Ceraulo S *et al.*. Repetitive sequence distribution on *Saguinus*, *Leontocebus* and *Leontopithecus* tamarins (Platyrrhini, Primates) by mapping telomeric (TTAGGG) motifs and rDNA loci. *Biology* 10: 844, 2021.
- Charlesworth B, Sniegowski, P, Stephan, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215–220, 1994.

- Coimbra-Filho AF. Os Saguís do gênero *Leontopithecus* Lesson, 1840 (Callitricidae - Primates). Tese (Mestrado em Zoologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 73. 1976.
- Dumas F *et al.*. Mapping genomic rearrangements in titi monkeys by chromosome flow sorting and multidirectional in-situ hybridization. *Chromosome Res* 13: 85–96, 2005.
- Dumas F *et al.*. Chromosomal distribution of interstitial telomeric sequences in nine neotropical primates (Platyrrhini): possible implications in evolution and phylogeny. *J Zool Syst Evol Res* 54:3, 226-236, 2016.
- Dumas F, Mazzoleni S. Neotropical primate evolution and phylogenetic reconstruction using chromosomal data. *Eur. Zool. J.* 84.1: 1-18, 2017.
- Eissenberg JC, Elgin SCR. Heterochromatin and Euchromatin. *eLS*. 2014.
- Garbino GST, Martins-Junior AMG. Phenotypic evolution in marmoset and tamarin monkeys (Cebidae, Callitrichinae) and a revised genus-level classification. *Mol. Phylogenet. Evol.* 118: 156-171, 2018.
- Garcia *et al.*. Constitutive heterochromatin polymorphism in *Lagothrix lagothricha cana*, *Cebus apella*, and *Cebus capucinus*. *Am. J. Primatol.* 4:117-126, 1983.
- Gerbault-Serreau M *et al.*. Chromosome painting comparison of *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichine, Platyrrhini) with man and its phylogenetic position. *Chromosome Res.* 12: 691-701, 2004.
- Guerra M. FISH - Conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética. 2004.
- Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015, 1980.
- Kierulff MCM *et al.*. The golden lion tamarin *Leontopithecus rosalia*: a conservation success story. *Int. Zoo Yb.* 46: 36–45, 2012.
- Kugou K *et al.*. Formation of functional CENP-B boxes at diverse locations in repeat units of centromeric DNA in New World monkeys. *Sci. Rep.* 6: 27833, 2016.
- Larizza L, Doneda L. Heterochromatin: constitutive. *eLS*, 2006.
- Lin KW, Yan J. Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 658: 95-110, 2008.
- Liu J, Ali M, Zhou, Q. Establishment and evolution of heterochromatin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1476: 59–77, 2020.

- López-Flores I, Garrido-Ramos MA. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Repetitive DNA* 1-28; 2012.
- Lorini ML, Persson VG. Status of field research on *Leontopithecus caissara*: the black-faced lion tamarin project. *Neotrop. Primates* 2(suppl.) 52-55, 1994.
- Ludwig G *et al.*. *Leontopithecus caissara*. the IUCN red list of threatened species 2021: e.T11503A206547044. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-3.RLTS.T11503A206547044.en>. Acesso em: 11 de abril de 2021.
- Montilha E *et al.*. Guia de observação de primatas de São Paulo. Fundação Florestal. 2018.
- Mudry MD, Nieves M, Bolzán AD. Chromosomal localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in eight species of New World primates (Neotropical Primates, Platyrrhini). *Cytogenet. Genome Res.* 119: 221–224, 2007.
- Mundy NI, Kelly J. Phylogeny of lion tamarins (*Leontopithecus* spp) based on interphotoreceptor retinol binding protein intron sequences. *Am. J. Primatol.* 54: 33-40, 2001.
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Barros RMS. Karyotypic comparison among *Cebuella pygmaea*, *Callithrix jacchus* and *C. emiliae* (Callitrichidae, Primates) and its taxonomic implications. *Genetica* 85: 249-251, 1992.
- Nagamachi CY *et al.*. Chromosomal similarities and differences between tamarins, *Leontopithecus* and *Saguinus* (Platyrrhini, Primates). *Am. J. Primatol.* 43: 265-276, 1997.
- Neusser M *et al.*. Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* × *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and comparative genomic hybridization. *Cytogenet Genome Res* 108: 191–196, 2005.
- Neves JJA *et al.*. Survey of *Malassezia* sp and dermatophytes in the cutaneous microbiome of free-ranging golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*-Kuhl, 1820). *J. Med. Primatol.* 46.3: 65-69, 2017.
- Oliveira EHC, Neusser M, Müller S. Chromosome evolution in New World monkeys (Platyrrhini). *Cytogenet. Genome Res.* 137: 259–272, 2012.
- Oliveira LC *et al.*. *Leontopithecus chrysomelas*. the IUCN red list of threatened species 2021: e.T40643A192327573. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T40643A192327573.en>. Acesso em: 11 de abril de 2021.
- Pagnozzi JM, Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y. Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). *Chromosome Res.* 8: 585-591, 2000.

- Penedo *et al.*. C-banding patterns and phenotypic characteristics in individuals of *Sapajus* (Primates: Platyrrhini) and its application to management in captivity. *Caryologia* 67.4: 314-320, 2014.
- Perez-Sweeney BM *et al.*. Examination of the taxonomy and diversification of *Leontopithecus* using the mitochondrial control region. *Int. J. Primat.* 29: 245-263, 2008.
- Plohl M, Meštrović N, Mravinac B. Satellite DNA Evolution. *Repetitive DNA*. 126-52; 2012.
- Rezende G *et al.*. A. *Leontopithecus chrysopygus*. The IUCN red list of threatened species 2020: e.T11505A17935400. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T11505A17935400.en>. Acesso em: 11 de abril de 2021.
- Richard GF, Kerrest A, Dujon B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72: 686-727, 2008.
- Rosenberger AL, Coimbra-Filho AF. Morphology, taxonomic status and affinities of the lion tamarins, *Leontopithecus* (Callitrichinae, Cebidae). *Folia Primatol.* 42: 149-179, 1984.
- Ruiz-Herrera A *et al.*. Distribution of intrachromosomal telomeric sequences (ITS) on *Macaca fascicularis* (Primates) chromosomes and their implication for chromosome evolution. *Hum Genet* 110: 578-586, 2002.
- Ruiz-Herrera A *et al.*. New polymorphisms in a *Cebus* (Platyrrhini, Primates) species. The case of *Cebus nigrivittatus*. *Caryologia* 57.2: 206-209, 2004.
- Ruiz-Miranda CR *et al.*. *Leontopithecus rosalia*. the IUCN red list of threatened species 2021: e.T11506A192327291. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T11506A192327291.en>. Acesso em: 11 de abril de 2021.
- Rylands AB. Habitat and the evolution of social and reproductive behavior in Callitrichidae. *Am. J. Primatol.* 38: 5-18, 1996.
- Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc.* 1: 4455, 2006.
- Sbalqueiro IJ, Persson VG, Lorini ML. O cariótipo de *Leontopithecus caissara* (Callitrichidae, Primates). *Resumos do XIX Congresso Brasileiro de Zoologia*. Belém, Pará, Brasil, 1992.
- Seabright MA. Rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet* 298: 971-972, 1971.
- Seuánez HN, Forman L, Alves G. Comparative chromosome morphology in three Callitrichid genera: *Cebuella*, *Callithrix* and *Leontopithecus*. *J. Hered.* 79: 418-424, 1988.
- Silva GS, Souza MM. Genomic *in situ* hybridization in plants. *Genet. Mol. Res.* 12: 2953-2965, 2013.

- Small MF *et al.*. High-resolution chromosomes of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am. J. Primatol.* 9: 63-67, 1985.
- Speicher MR. Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) Techniques. *eLS*, 2006.
- Stanyon R, Galleni LA. Rapid fibroblast culture technique for high resolution karyotypes. *Boll. Zool.* 58: 81-83, 1991.
- Stanyon R, Stone G. Phylogenomic analysis by chromosome sorting and painting. *Phylogenomics* 13-29, 2008.
- Stanyon R *et al.*. Chromosome painting of the red-handed tamarin (*Saguinus midas*) compared to other Callitrichinae monkeys. *Genome* 61: 771-776, 2018.
- Sujiwattanarat P *et al.*. Higher-order repeat structure in alpha satellite DNA occurs in New World monkeys and is not confined to hominoids. *Sci. Rep.* 5: 10315, 2015.
- Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl. Cell Res.* 75: 304-306, 1972.
- Suntronpong A *et al.*. CENP-B box, a nucleotide motif involved in centromere formation, occurs in a New World monkey. *Biol. Lett.* 12: 20150817, 2016.
- Svartman M, Vianna-Morgante AM. Comparative genome analysis in American marsupials: Chromosome banding and *in-situ* hybridization. *Chromosome Res.* 7: 267-275, 1999.
- Thakur J, Packiaraj J, Henikoff S. Sequence, chromatin and evolution of satellite DNA. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 4309, 2021.
- Valeri *et al.*. Characterization of satellite DNAs in Squirrel Monkeys genus *Saimiri* (Cebidae, Platyrrhini). *Sci. Rep.* 10:7783, 2020.
- Wallis *et al.*. Sex determination in mammals - before and after the evolution of SRY. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 3182-3195, 2008.
- Warecki B, Sullivan W. The Cell biology of heterochromatin. *Cells.* 11: 1247, 2022.

Anexo 1. Sequência no formato fasta dos clones sequenciados do DNA satélite alfa das espécies*L. rosalia*, *L. chrysopygus* e *L. chrysomelas*.

>7_LCH

GGGAAATATCTGCTTCTAAATCCAAAACGGAGCAACCTAACAGAATGGTCTTCCTTG
 TGTGCGATCAACTTACAGAGCTAAAGTGGATTGTGTTTGCAGCAGTTTGTAAGCCCT
 TTCTGTAGAGAAGCAGAAATCTGCTATCTCCAGCTTAATCCAAGCATTGTAGAAACA
 GCGGTGAATCTCGCTCTAAAACACAGAAGAAACGTATGCTTCCAAGTCTGCTGT
 GTGTTTCGTTCCAGCCGGATTGTTGAATCTCCCTTTAGATTCAGAGAGTTAGAAACGC
 GTTGCTTCTGGGAAGTGCAGACTTGATATTCCAGAGTGAATGTGACCATAGGCTG

>8_LCH

GGGAAATATCTGCTTCTAAATCAAAAACGGAGCTATCTTTCAGAGTGGTTGTCAGTG
 TTTACGTTTAAATGACAGAGTTAAACTGATGTGTTTATGCAGCAGTTTGAAAACCCAC
 TTCTCTGGAGAATACAAAATAGACATTTCCAACAAAATATGCACTTATAACAAAC
 AGCAAAAAGACTGGGTCTAAAACACAGAAGAGACAAATCCTTCAAAGTCTGCTGT
 TGTTCAATTAAGTGAGTTGAATCTATCTTTACATTCAGGAGTTGGAAACACATTTCTT
 GTTAAAGCTGCATTTGGACATTCAGAGTGAATGGGAGCATAGGCTGTAATGGGAA
 ATATCTGGTTCTAAAACAAAACAGAGCTACCTAAACATTCCAGAGTGAATGTGAC
 CATAGGCTG

>9_LCH_Reverse

AGGGAAATATCTGCTTCTAAATCAAAAACGGAGCTATCTAGCAGATTGGTTGTCAA
 AGTGACATTCAACTTACAGAGTTAAACTGATCTAGGTATGAAGTGTTCAGAAACC
 CTTTATTTGGAGAGTCTAGAAATGGATGATTTTCAGCCGAATACTGCCATATGAGAAT
 TAGCAGTAAGACTGCGTTTTAAACACAGAGGAAACATTTCTCTCAAATTGCTCTACT
 GTGATTTTCGTTACCTTAGGAAGCTGCATCTATGTTTAGATTCAGTGAGTTAGTCAA
 ACGTTTCTTCTAAAATTCCGTTTTTTCATATTCCAGAGTGAATGTGACCATAGGCTG

>10_LCH_Reverse

GGGAAATATCTGCTTCTAAATCCAAAACGGAGCAACCTAACAGAATGGTGTTCAT
 GTGTGCGTTCAACTTACAGAGTTGAAGTGCAGTGCCTTGCAGCAGTTTGTAAGCCC
 TTTCTGTAGAGAAGCAGAAAACGGCTATTTGCAGCTAAATCCAGGCATTGAAGAAA
 CAGCGCTGAATCTCGCTCTAAAACACAGAAGAAACGTATGCTTCCAAGTCTGCTGT
 GTGTGTTCTTCCAGCCGGGTGTTGGATCTCCCTTTAGTTTCAGAGAGTTAGAAAC
 GCGTTGCTTCTGTTAGCTGCGACTTGATATTCCAGAGTGAATGTGACCATAGGCTG

>11_LCH_Reverse

GGGAAATATCTGCTTCTAAATCAAAAACGGAGCTATCTAGCAGATTGGTTGTCAA
 GTGTACATTCAACTTACAGAGTTAAACTGATCTAGGTATGAAGTGTTCAGAAACCC
 TTTATTTGGAGAGTCTAGAAATAGATGATTTTCAGCCGAATACTGCCATATGAGAATT
 AGCAGTAAGACTGCGTTTTAAACACAGAGGAAACATTTCTCTCAAATTGCTCTACTG
 TGATTTTCGTTACCTTAGGAAGCTGCATCTATGTTTAGATTCAGTGAGTTAGTCAA
 CGTTTCTTCTAAAAGCTGTGTTTGGATATTCCAGAGTGAATGTGACCATAGGCTG

>12_LCHR_REVERSE

GGGAAATATCTGCTTCTAAATCAAAAACGGAGCTATCTTTCAGAGTGGTTGTCAGTG
 TTTACGTTTAAATGACAGAGTTAAACTGATGTGTTTATGCAGCAGTTTGAAAACCAC
 TTCTCTGGAGAATACAAAATAGACATTTCCAACAAAATATGCACTTATAACAAAC
 AGCAAAAAGACTGGGTCTAAAACACAGAAGAGACAAATCCTTCAAACCTGCTCTGTT
 TGTTCAATTAAGTGAGTTGAATCTATCTTTACATTCAGGAGTTGGAAACACATTTCTT
 GTTAAAGCTGCATTTGGACATTCCAGAGTGAATGTGACCTTAGGCTG

>13_LCHR

GGGAAATATCTGCTTCTAAATCAAAATGGAGCTTTCTAACAGAATCGTTGTCAATGT
 GTGCATTCAACTTACAGAGTCAAACCTTATGTTTTTATGAACCATATTGGAAATGATT
 TCTGTGGAGAATCTAAAACAGATATTTTCAGCAAATACATGCATATACCAAATA
 GCAGTAAGACTGCCTCTAAAACACAGAAGAAACGTGTCCTCCAATCTGCTCTGTGCA
 CCATTCGTTCAACTGAGTGAGGTAATCTATCTTTAGATTCAGGAGTTAGAAACAGG
 TTTCTAGTAAAAGCTGCACTTGGATATTCCTGAGTGAATGTGACCATAGGCTG

>14_LCHR

GGGAAATATCTGCTTCTAAATCCAAAACGGAGCAACCTAACAGAATGGTCTTTCATG
 TGTGCGTTCAACTTACAGAGATAAAGTGGAGTGCCTTTGCAGCAGTTTGTAAGCCCT
 TTCTGTGGAGAAGCAGAAAACGGCTATTTGCAGCTAAATCCAAGCACTGAAGAAAC
 AGCGCTGAATCTCGCTTTAAAACACAGAAGAAACGTATGCTTCCAACCTGCTCTGCTG
 TGTGTTTCGTTCCAGCCGGGGAGTGTAATCTCCCTTTAGATTCAGAGAGTTAGAAACG
 CGTTCCTTCTGGGATCTGCGACTTGATATTCAGAGTGAATGTGACCATAGGCTG

>15_LCHR

GGGAAATATCTGCTTCTAAATCGAAATAAGAGCTACCAAACAGAGGGGTCTTCAAT
 GTGTGCATTGAACTTCCAGAGTTAAACTGATGAGTGTAAAGCAGTTTCCAACCC
 TTTCTGTAAAAAAGCAGAAAACGGATTTTTCAGCCAAATCCAAAAAATTAACAAA
 TAGCGCTAAATCTCCAGCTAAAACCCAGAAGAAACGTGTCCTTCAAACCTGCTCTGCT
 GTGTGTTCCCTTCAAATAAGGTAGTTGAATCTACGTTTAGATTCAGAAAGAAAGAAAC
 GCGTTTCTTCAAAGAGCTGCATTTTGATATTCAGAGTGAATGTGACCATAGGCTG

>10_LRO_Reverse

ACAGGGAAATATCTGCTTCTAAATCCAAAACGGAGCAACCTAACAGAATGGTGTTC
 CATGTGTGCGTTCAACTTACAGAGTTGAAGTGGAGTGCCTTTGCAGCAGTTTGTAAG
 CCCTTTCTGTAGAGAAGCAGAAAACGGCTATTTGCAGCTAAATCCAGGCATTGAAG
 AAACAGCGCTGAATCTCGCTCTAAAACACAGAAGAAACGTATGCTTCCAACCTGCTCT
 GCTGTGTGTTCTTTCCAGCCGGGGAGTTGGATCTCCCTTTAGTTTCAGAGAGTTAGA
 AACGCGTTGCTTCTGTTAGCTGCGACTTGATATTCAGAGTGAATGTGACCATAGGC
 TG

>11_LRO_Reverse

AGGGAAATATCTGCTTCTAAATCCAAAACGGAGCAAACCTAACAGAATGATCTTCCA
 TGTGTGCGTTCAACTTACAGAGCTAAAATGGAGTGCCTTTACAGCAGTTTGTAAGCC
 CTTTCTGTAGTGAAGCAGAAAACGTCTCTTTCCAGGCATATCCAAGCATTGAAGAAA
 CAGCGGTAAAACCTCGCTCTAAAACACAGATGAAACTTATGCTTCCAACCTGCTCTGCT

GTGAGTTCGTTCCAGCCGGGGAGTTGAATCACGCTTTAGATTCAGAGAGTTAGAAAC
GCGTTGCTTCTGGGAACTGCGACTTGATATTCCAGAGTGAATGTGACCATAGGCTG

>12_LRO

ACAGGGAAATATCTGCTTCTAAATCCAAAACGGACCAACCTAACGGAAAGGTCTTC
CATGTGTGCATTCAACGTACAGAGTTAAAGTGGAGTGCGTTTCCATCAGTTTGTAAG
CCCTTTCTGTACAGAAGCCGAAAGCGGCTATTTGCATCTAAACCCAAGAAATGAAG
AAACAGCGCTGAATCTCGCTCTAAAACACAGAAGAAACGTATGCTTCCAACCTGCTCT
TCTGTGTGTTTCGTTCCAGCCGGGGAGATGAATCTCCCTTTAGATTCAGAGAGTTTGA
AACGCGTTGCTTCTGGGAGCTGCGACTTGATATTCCAGAGTGAATGTGACCATAGGC
TG

Anexo 2. Sequências-consenso no formato fasta dos clusters 4, 7 e 8 indicados pelo TAREAN como possíveis DNAs satélites no genoma de *L. rosalia*.

>Cluster_4

```
AATATAATCATAAGCTGTACACTTATTGGGATATTACAATACAAGGTACAGAGTATG
TGCCATATGTACGTTGAGTGTGATGTACATACGTGTACACAATACCGAGGTACGATA
AAGGTACGTAATCTATACCATATGTACATGTACATGTATATGTATATGTACCATATA
CATATACCCTATGTACACGTTACATGTGCAATGTACATGTACAAATCTATACCATAT
GTACACGTTTTGTATATGTACATAACGTGTATAACAATAGGTATGTACATCATGTGTA
CAACATGTCCATTTATTGTGACGTCACAATGGTGTGTCATAATCACAACGTGTCATCA
CAATACGCATGTAATAGGTCATAGTAATACAAAGGCACATATTGCACACATGATGT
ACATTTACAGTTCACGGTGTATACAGTTACGTTACATGTACCACATGTACCCTCTGT
GTCCAGCTGTACAATATGTGCACATGTACATATGTGTGCACCTTATGCACATATGTA
CGCTGCGTACACGTACGTACCCAGACTGTAGGTAGGTACCTCCTGTACACGAATCCA
TAGTATACAAAATATGTACCTGTTTAAAGTATGTACACACATCGGTGTACACCACA
TTGGTACCCGCGTAATTTCTATCTGATATTTTGAAGCAATATTCCCGAATGGACT
CCTAATGTGTACATTTATTGGTGTCTTACAATAAATGTACAAAATATGTACAATCTG
GACATTTGCTGTGCAATATTTATGTGTACACAATACACAGGTAGGGAAAATATACGT
AATTTATTTTATACGTCCGTTTATAATTCTATAATGTGTACACAGGCAGAGGTACAT
AATGTGTTCACTATGCACATTTCTTCACATATCAGTGATAACATATTTATCATCATCA
TTATATATGTATATATCACGTGGTATCCCAAAAAGCATATATTGTACACGGTACGT
ACGTATTAAGTACGTATGTATCGTGCACATGTTATATACGTTTATATTTATCGTGATA
ATACCATATGTACACGTGTACAGATATTTGCCAACTATGTGAGCTATGTGCACATTG
TTGAAATAGGGGCCACCGAGTACCAATGCACGGCATGCTATACCCACAACGGCCA
CCAGAGGGCCCGTACCAGTTCACAGGTCCACCGTGACTGCTTAGGGACCCTCTGGAT
AGGTGGGCGTGACAGCAGCTACCTGGAATGGCTGTGATGTAACGACCTGTAATAT
GATACTGGCAACCGTATCAGACCGTAATGATAACGTTTTCTGGTTTTTATATATTA
GGCAATAGCTCCAGATACACCTCTGCGTTATTGACAAAAATGTATTCCTCAACCATT
TGATATTAGAATGAACAGCATGGGGGGTTCCACCCCTGGCAATGTTTAAATTTCAATTT
ACTTGTTGTGTTTTTTACCCTAGTGACCCTATCAGAGCCCGGTGGACACCTCCTGCAA
CTTTGCGGGTATTTCCCTCTGGGCAGCAACATTTCTTCTCCTTCTCTGAATATTAGA
AACAATATCTCGGGACAAGCCTACAGTTCCAATCACATCGTGAGTAATGTCCCTCTGT
GATCCCTTAGTTATTCGGAACAGTATGCTTTCACAGTGAGAGGAATACCTACTTAAT
ATATGATGGATAATATCAAAATGCACCCACGTGGTTGTGTACCCACTTTGACATTGA
TAATAATTTTTATATAATATACCTATAATCATATCCAGG
```

>Cluster_7

```
CAGCCAAATCCAAGCATTTTCAGCAATAGCGCTAAATCACGCTCTAAAACACAGAAG
AAACGTCTGCTTCAAACGTCTGCTGTGGGTTTCGTTCAACTAGGGGAGTTGAATCT
AGCTTTACATTCACGGAGTTAGAAACGCGTTTCTCCTGGGAGCTGCGTTTGGATATT
CCAGAGTGAATGGGAGTACACGCTGTATTGAGAAATATCTGCTCCTAACAGCAAAA
CGGAGCAACCTAACAGAATGGTCTTCAATGTGTGCGTTCAACTTACAGAGTTAAACT
GATGTGTGTTTGCAGCAGTTTCTCAGCGCTTCTGTGGAGAAGCAGAAAACGGCTTT
TTC
```

>Cluster_8

```
GCAATATACATACGTACTIONGATACGCGCGTACCGTGTACAGTATATGCCTTTCTGGG
ATATCATGTGATGTATTCCTATATTCTTGTGATGACACACATGTCATCACTGATTTTG
```

ACGAAATGTGACTAGGGTACATATTTTGTACCTTTCTTTGCGTGCACATCATAGACA
GAGACGTGTACGTATTAACATGTTACATATATGTTTTCTACATGTGTATTTGGTACA
CATATGTCCAGCAGAGCAAATGTACCGAGGGTACCCGTTTTACACATTTAGTGTAAT
AAACCAATAAATGTACACATAATCAGTACATTCGGGAATGTTGCTTTCAACATGTTA
CATAGAGATTACGGCGGGTACCGAAGCGGGTGTACACCGTTGTGCGTAAGTAGGTT
AAGAATGTACGGATTATGAGTCCATTCAGGAATATTGCTTTCAACACACGAAATAG
AAATCAGTGTGGGTCCCAAAGCGGGTGTCTCGCGATGTGTGTACATAGTTGAAGCAT
GTGCATGTGGTGCCTACTATGGGTTTTCGTACAGGAGGAACTTATCCATAGTCTGTG
TACGTAGGTGAACACAGCGCACGTATGTACATACTGTGCACACATATGTACACGAA
CATAATAGGACATCCGTAAACAATGGATACATAAAGGACGTGCGTACATGTCGTA
ATATCACGATAAATGTACATCCTGTGTGCAATGTGTACATTTCTATATCTACAATGA
CATGCGTGTGTGATGACACAGTTGCGATTATGACATCATTGTGATATCACAATCAA
TGTCGGTGTCCCTACACATTACTGAAAGACCTGTTATGTACATGTTTTGTACATAGAA
ATGTACACAAAGTACCGATGAGGTACCTTGATAGAACATGGGTATTGTGTACACAT
ATGTACGTCACGGTGAACGTACGTCAGGTACATGTTCTAAACGTGGTAATATCTTAT
TAGGTGTACAGCTTCTGAGTACATCCTTGGATATCCTTTTTTAGTATATTACATAAAAA
TTACGTCCAATGTCTATGTGGCTATAACAACACGCGTGTCCGTTTTCGTGATATGATCC
CTCATATTTTAAGACGGTATCCCTCTCACTGTGAAAGCAAGTGTAACACTGTGAAGTC
GTTCCACAATCACAGACAAAGTGCAACGTTTTCCGGGACGTAGACCTAACATTTTGG
AACAAAGCCTGTCTATACCCTGAATAGGGCAGGATGTGTACACCACCGCAGTCGTA
TTGATGCTAAGGCCGAAACACGGAAAGCAAATGACTTCAAATATCCCCGAAAGTGA
CCATCCCCCGGTGATACTGTACCTAATAACCAAGCGATCACCGAGGACCTTACTCAC
GATGTGATTGGAACCTGTCTGCCGGTTCTGTGATATTGTTTCTGATATCCGGAGAAGA
AAGAGACAATGTTGCCGCCATGGGGAAGTACTCTCAACACGGCAAGAGGCGTCCA
CCGTGATCTGATGTGGTCACTAACGTAAAAGAGAAAACAAGTAAATTGAATTAACC
GTTGCCACGCCTGAAACCGCCCTATGCTCTCCATTCTCATGTCAATGGGGTTCAGGA
TGACATTTTCGTCAATAGGTCAAAGCGTAAGTGGAGATATTGCGTCATATTTGAAA
ACCTGAGTAACGTTATCATTTTACATGATACAGTGGCCATTATCATAGGCCACGTC
ATTTTCACGATACCCAAGTTCCAGGAGATGTGGGCACAGGACCCAAGGCAGCGTCT
CGCTCAGAGGCCAGGCTGGGCACGGGGGGCTGCCATGCGCCCCCTGGTGGGGTCTT
TGGGTATAGCTTGCCGTTACAGGTAAGTCTGACACCTAATTCAACACGTGAGCA
TAGCTTACATACAGGGCAAATATCCTTACACGTGTGCATGGGGTTTATCGCGATAAA
CATTCGTACATATTACGC