

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Genética, Ecologia e Evolução

Programa de Pós-Graduação em Genética



Nazaré Lúcio de Abreu

**OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA MITOCONDRIAL E DESENVOLVIMENTO DE
MARCADORES MOLECULARES DO TIPO MICROSSATÉLITES PARA DUAS
ESPÉCIES DE SERPENTES: *BOA CONSTRICTOR*
CONSTRICTOR E *EPICRATES CRASSUS***

Belo Horizonte

Setembro - 2022

Nazaré Lúcio de Abreu

**OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA MITOCONDRIAL E DESENVOLVIMENTO DE
MARCADORES MOLECULARES DO TIPO MICROSSATÉLITES PARA DUAS
ESPÉCIES DE SERPENTES: *BOA CONSTRICTOR*
CONSTRICTOR E *EPICRATES CRASSUS***

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Genética no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais com o requisito parcial para a obtenção de título de Doutora em Genética

Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

Belo Horizonte

Setembro - 2022

043

Abreu, Nazaré Lúcio de.

Obtenção da sequência mitocondrial e desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélites para duas espécies de serpentes: *Boa constrictor constrictor* e *Epicrates crassus* [manuscrito] / Nazaré Lúcio de Abreu. – 2022.

88 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Evanguedes Kalapothakis.

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

1. Genética. 2. Boidae. 3. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala. 4. Genoma Mitocondrial. 5. Paternidade. 6. Repetições de Microssatélites. I. Kalapothakis, Evanguedes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575.1



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

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE	162/2022 entrada
Nazaré Lúcio de Abreu	2º/2017 CPF: 055.919.626-10

Às nove horas do dia **01 de setembro de 2022**, reuniu-se, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Obtenção da sequência mitocondrial e desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélites para duas espécies de serpentes: *Boa constrictor constrictor* e *Epicrates crassus***", requisito para obtenção do grau de Doutora em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Evanguedes Kalapothakis**, 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
Evanguedes Kalapothakis	UFMG	494.307.426-04	APROVADA
Álvaro Cantini Nunes	UFMG	678.159.606-34	APROVADA
Valéria Rosalina Dias E Santos	Polícia Civil	942.735.706-10	APROVADA
Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira	FUNED	611.045.826-00	APROVADA
Sordaini Maria Caligiorne	Polícia Civil	581.292.006-00	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

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

Belo Horizonte, 01 de setembro de 2022.

Evanguedes Kalapothakis

Álvaro Cantini Nunes

Valéria Rosalina Dias E Santos

Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira

Sordaini Maria Caligiorne



Documento assinado eletronicamente por **Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira, Usuário Externo**, em 02/09/2022, às 20:20, 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 **Sordaini Maria Caligiorne, Usuária Externa**, em 03/09/2022, às 10:46, 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 **Alvaro Cantini Nunes, Professor do Magistério Superior**, em 05/09/2022, às 13:14, 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 **Evanguedes Kalapothakis, Membro**, em 05/09/2022, às 15:27, 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 **Valeria Rosalina Dias e Santos, Usuário Externo**, em 06/09/2022, às 12:02, 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 **1721998** e o código CRC **E694C357**.

Dedico esta tese aos meus pais Luiz Lúcio e Nelzita dos Santos Abreu. Eles não concluíram o ensino primário, mas me ensinaram os primeiros passos para a vida.

“Ensina a criança no caminho em que deve andar, e quando for velha, não se desviará dele. (Provérbios 22:6)”

Agradecimentos

Agradeço a Deus que me permite acordar todos os dias e poder desfrutar das lindas coisas Ele me oferece e por estar sempre comigo.

Ao querido orientador Professor Dr. Evanguedes Kalapothakis pela orientação e todo aprendizado e por toda paciência por me ensinar a ser um ser humano melhor.

Aos meus pais por me ensinarem os primeiros passos para a vida e mesmo distantes fisicamente, estão sempre presentes no meu coração.

À CAPES por me possibilitar cursar parte do doutorado como bolsista.

Ao departamento de Pós-graduação pelo suporte dado no momento oportuno, em especial à secretária Raíssa por responder os e-mails tão rápido (você realiza com muita excelência o seu trabalho, parabéns).

A querida Juliana por ter me recebido tão bem no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares pelos seus ensinamentos com as PCRs.

Um agradecimento especial a estas duas queridas: Carolina e Bárbara, pois o meu carinho e admiração por vocês é grandioso.

A Aline Chagas pela ajuda nos momentos de necessidade e pela parceria nos experimentos.

A linda e queridíssima Hortênsia obrigada pela companhia tão agradável até altas horas no laboratório.

Ao Bruno Diniz e Ana Luiza Queiroz pelas companhias em experimentos e pelas caronas.

À querida Adriana Heloísa por me ajudar com a montagem dos genomas mitocondriais.

À minha amiga Daniela Núñez que me possibilitou participar da minha primeira publicação. Dani você é ótima e tem um coração lindo! Gracias!

A queridíssima Ana Paula Martins por me ajudar nos momentos mais difíceis e pelas conversas tão sinceras e amigáveis. Você é de um valor inestimável na minha trajetória.

Á queridíssima Thais Soares por todo apoio e cuidado... Nos momentos mais difíceis ela estava sempre perto para uma conversa, uma mensagem de apoio e de solidariedade. Obrigada pelo carinho e dedicação para comigo! Você ocupa um lugar especial no meu coração.

Ao Biólogo Tiago Lima (proprietário do criatório Jibóias Brasil) que cedeu gentilmente as amostras para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço à Bióloga Giovanna responsável técnica e a aluna de doutorado Raíca do Laboratório de Herpetologia por me ajudarem com a fixação dos espécimes que foram depositados na coleção.

E por fim, mas não menos importante, ao meu querido esposo Rodrigo Borba por estar comigo, entender as minhas ausências e me auxiliar nos momentos mais difíceis.

Resumo

Conhecidas popularmente como jibóia arco-íris do cerrado (*Epicrates crassus*) e jibóia (*Boa constrictor constrictor*) são duas espécies bastante comercializadas como animais de estimação em todo Brasil devido à sua beleza e por serem dóceis e de fácil manuseio. Este trabalho teve como objetivo desenvolver marcadores moleculares baseado em regiões microssatélites e o sequenciamento do genoma mitocondrial das duas espécies para auxiliar as autoridades criminais na identificação destas espécies e desta forma, aplicar as penas cabíveis àqueles que comercializam estes animais de forma ilegal. O sequenciamento tanto do DNA genômico quanto do DNA mitocondrial foram realizados utilizando a tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Após a montagem dos *contigs* utilizando o Geneious, foram realizadas as buscas pelas regiões microssatélites utilizando o software SciRoKo. O desenho dos 53 pares de *primers* foi feito no Geneious seguido das sínteses pela empresa Integrated DNA Technologies. Após os testes de calibração, foram selecionados 15 pares de *primers* para cada uma das espécies que podem ser utilizados em testes posteriores com indivíduos das mesmas espécies e de espécies diferentes. A publicação do genoma mitocondrial também possibilitará a outros pesquisadores que estudem estas espécies ou outras do mesmo gênero com o desenho de marcadores mitocondriais.

Palavras-chave: jiboia; paternidade; DNA; microssatélite; mitocondrial; *primer*; sequenciamento.

Abstract

Popularly known as savannah python (*Epicrates crassus*) and python (*Boa constrictor constrictor*) are two species widely marketed as pets throughout Brazil due to their beauty and for being docile and easy to handle. This work aimed to develop molecular markers based on microsatellite regions and the sequencing of the mitochondrial genome of the two species to assist criminal authorities in the identification of these species and thus apply the penalties applicable to those who trade these animals illegally. The sequencing of both genomic and mitochondrial DNA was performed using Next Generation Sequencing (NGS) technology. After assembling the contigs using Geneious, searches for microsatellite regions were performed using the SciRoKo software. The company did Integrated DNA Technologies the design of the 53 pairs of primers in Geneious followed by the syntheses. After the calibration tests, 15 pairs of primers were selected for each of the species that can be used in later tests with individuals of the same species and of different species. The publication of the mitochondrial genome will also allow other researchers to study these species or others of the same genus with the design of mitochondrial markers.

Keywords: *Boa constrictor*; paternity; DNA; microsatellite; mitochondrial; primer; sequencing.

Lista de figuras

Figura 01: <i>Epicrates crassus</i> (Fonte: www.jiboiasbrasil.com.br)	20
Figura 02: <i>Boa constrictor constrictor</i> (Fonte: www.jiboiasbrasil.com.br)	21
Figura 03: Modelo de sequenciamento usado pela plataforma Illumina.....	26
Figura 04: Organizações gênicas de mtDNAs em vertebrados.....	28
Figura 05: Espécimes usados no desenvolvimento do trabalho.....	32
Figura 06: Processo inicial de extração de DNA pelo protocolo de fenol e clorofórmio.	34
Figura 07: DNA precipitado com Solução de Precipitação.....	35
Figura 08: Extração de DNA com o Kit GTS Phoneutria	36
Figura 09: Esquema mostrando a purificação inicial com Sephacryl.....	39
Figura 10: Esquema mostrando a purificação com Sephacryl.	40
Figura 11: Desenho esquemático do processo de construção da biblioteca genômica como o kit Nextera DNA Sample Preparation	45
Figura 12: DNA genômico extraído da <i>E. crassus</i> pelo protocolo de Fenol e Clorofórmio (A e B).....	49
Figura 13: Purificação do DNA da <i>E. crassus</i> com 200 µl de Sephacryl S-100, S-400 e S-1000 respectivamente.....	50
Figura 14: Extração de DNA genômico da <i>E. crassus</i> purificado com Sephacryl. ..	51
Figura 15: Extração de DNA pelo método fenol e clorofórmio para a espécie <i>B. c.</i> <i>constrictor</i> (A) e pelo método de purificação fenol e clorofórmio seguido de purificação com Sephacryl (B).....	52
Figura 16: Extração de DNA com o Kit GTS (Phoneutria) para a espécie <i>B. c.</i> <i>constrictor</i>	53
Figura 17: Extração de DNA com <i>Beads</i> magnéticas da espécie <i>B. c. constrictor</i>	54
Figura 18: Gráfico mostrando a qualidade das <i>reads</i> no sequenciamento de DNA genômico da <i>Epicrates crassus</i>	55
Figura 19: Genoma mitocondrial da <i>E. crassus</i> contendo 37 genes. ATPases.....	56
Figura 20: Resultado da amplificação inicial dos 53 pares de <i>primers</i> da <i>E. crassus</i>	62
Figura 21: Resultado da amplificação inicial dos 53 pares de <i>primers</i> da <i>E. crassus</i>	64
Figura 22: Resultado da amplificação final dos 53 pares de <i>primers</i> da <i>E. crassus</i> .	66

Figura 23: Resultado da amplificação inicial dos 53 pares de <i>primers</i> da <i>E. crassus</i> .	
Figura 24: Gráfico mostrando a qualidade das <i>reads</i> no sequenciamento de mtDNA de <i>B. c. constrictor</i>	69
Figura 25: Serpentes comercializadas de forma ilegal.....	71

Lista de tabelas

Tabela 01: Genomas Espécies de serpentes com genomas publicados.....	25
Tabela 02: Reagentes utilizados nas reações de PCR.....	47
Tabela 03: Regiões de microssatélites localizadas pelo programa SciRoKo 3.4 e número de pares de <i>primers</i> sintetizados para <i>E. crassus</i>	57
Tabela 04: Sequências dos microssatélites e motivos de repetição.....	58
Tabela 05: Sequências e repetições dos 53 pares de <i>primers</i> para <i>E. crassus</i>	60
Tabela 06: Regiões de microssatélites localizadas pelo programa SciRoKo e número de <i>primers</i> sintetizados para <i>B. c. constrictor</i>	72
Tabela 07: Sequências dos microssatélites e motivos de repetição da <i>B. c. constrictor</i>	73
Tabela 08: Sequências e repetições dos 53 pares de <i>primers</i> para <i>B. c. constrictor</i>	76

Lista de abreviaturas e siglas

Amplicon – fragmento de DNA molde resultante de uma amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de uma região do DNA.

B.c.constrictor – *Boa constrictor constrictor*

B.O.D. – Biochemical Oxygen Demand. Incubadora usada em diferentes experimentos laboratoriais.

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*.

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Contigs – trecho de *reads* contínuas geradas a partir do alinhamento de novo de *reads* menores sobrepostas.

CTF - Cadastro Técnico Federal

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico.

DNase - Desoxirribonucleases enzima capaz de quebrar ligações entre nucleotídeos.

E. crassus – *Epicrates crassus*

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético.

HCl – Ácido Clorídrico.

IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

LBMM – Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares da Universidade Federal de Minas Gerais.

M – Molar

Mg - Magnésio

mM – mili-Molar

µl- Microlitro

mtDNA – DNA mitocondrial

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio.

NCBI - National Center for Biotechnology Information.

NGS – *Next Generation Sequencing* ou Sequenciamento de Nova Geração.

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase.

ONU – Organização das Nações Unidas.

Overnight – termo usado para dizer que uma amostra permaneceu durante toda a noite sob determinada condição.

pH - potencial Hidrogeniônico (Ele é determinado pela concentração de íons de hidrogênio (H⁺) e serve para medir o grau de acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução).

Primer – sequência de 18 a 25 pares de bases nucleotídicas que pareia por complementaridade à fita de DNA molde e flanqueia a região-alvo para a polimerização de uma nova sequência de DNA ou RNA.

Proteinase K – enzima da família das serina proteases com capacidade de clivar peptídeos muito utilizada no processo de extração de DNA de tecidos.

qPCR – PCR quantitativa em tempo real

Reads – sequências fragmentadas de bases nucleotídicas que correspondem ao DNA da amostra (são geradas por NGS).

RENCTAS - Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres

RNA - ácido ribonucleico.

Rnase - Ribonuclease (abreviada como RNase) é um tipo de nuclease que catalisa a degradação do RNA.

rRNA – RNA ribossômico

SDS - DodecilSulfato de Sódio.

SSR - SimpleSequenceRepeats ou Repetições de Sequências Simples

STR - Repetição de Sequências em Tandem ou *Sequence Tandem Repeat*.

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TBE – solução tampão a base de Tris, Ácido Bórico e EDTA.

TE – Tris EDTA

TEN9 – Solução de Tris-HCl, EDTA, NaCl com pH 9.

tRNA – RNA transportador

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais.

Sumário

1. Introdução.....	19
1.1 <i>Epicrates crassus</i> (COPE 1862).....	19
1.2 <i>Boa constrictor constrictor</i> (Linnaeus 1758)	20
1.3 Criação de jiboias em cativeiro.....	21
1.4 Microssatélites	22
1.5 Sequenciamento de Nova Geração.....	23
1.6 DNA mitocondrial (mtDNA).....	27
2. Justificativa e relevância do projeto.....	29
3. Objetivos	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. Material e Métodos	31
4.1 Obtenção das amostras.....	31
4.2 Obtenção do DNA genômico	32
4.3 Protocolo de Fenol e Clorofórmio.....	33
4.4 Kit GTS (Phoneutria).....	36
4.5 Purificação com <i>Beads</i> magnéticas	37
4.6 Purificação com Sephacryl	38
4.7 Extração diferenciada do DNA mitocondrial (mtDNA).....	41
4.8 Extração do mtDNA.....	41
4.9 Construção da biblioteca genômica e sequenciamento no Miseq	42
4.10 Montagem dos contigs e anotação do mtDNA	46
4.11 Pesquisa por microssatélites.....	46
4.12 Desenho dos <i>primers</i>	46
4.13 Padronização dos <i>primers</i>	47
5.1 Obtenção do DNA genômico de <i>E. crassus</i>	49
5.2 Obtenção do DNA genômico de <i>Boa constrictor constrictor</i>	51
5.3 Resultados do sequenciamento do DNA total de <i>E. crassus</i>	55

5.4 Resultados das padronizações dos 53 pares de <i>primers</i> desenhados para a espécie <i>Epicrates crassus</i>	61
5.5 Resultados do sequenciamento do DNA total de <i>Boa constrictor constrictor</i>	68
5.6 Microssatélites <i>B. c. constrictor</i>	72
5.7 Resultados das padronizações dos 53 pares de <i>primers</i> de <i>Boa constrictor constrictor</i>	77
6.0 Conclusão.....	82
7. Referências Bibliográficas	83

1. Introdução

As serpentes representam mais de 3.500 espécies ao longo de todo planeta. São animais com corpo coberto por escamas incluídos na ordem Squamata (Reptile Database, 2019). As jiboias são serpentes constritoras que podem atingir até 4 metros e uma expectativa de vida de 20 a 30 anos quando criadas em cativeiro. Alimentam-se de aves, lagartos e pequenos mamíferos e caracterizam-se por hábitos diurnos e noturnos (Lima et al., 2019).

Os bóideos são répteis bastante primitivos, isso pode ser observado por vestígios como o par de esporões vestigiais (Scartozzoni & Molina, 2004). Atualmente a família Boidae compreende seis famílias distribuídas pelo mundo (Reynolds et al. 2014).

No Brasil, são encontradas aproximadamente 371 espécies de serpentes de 81 gêneros diferentes pertencentes a 10 famílias (Bento et al., 2019). A família Boidae é representada por cinco gêneros de serpentes: *Eunectes*, *Boa*, *Corallus*, *Epicrates* e *Chilabothrus* (Lima et al., 2019). Espécies da família Boidae apresentam uma diversidade de habitats podendo ser aquáticas, terrícolas, semi-arborícolas e arborícolas (Pizzatto, 2006) com ampla distribuição na América do Sul (Scartozzoni & Molina, 2004). A família Boidae é de grande interesse comercial, pois tratam-se de animais não peçonhentos, muito comercializados como *pets* e de elevado valor comercial (Bento et al., 2019) por serem animais belos e dóceis (Lima et al., 2019).

1.1 *Epicrates crassus* (COPE 1862)

Epicrates crassus ou jiboia arco-iris (**Figura 01**) é um gênero de Boa encontrada em porções continentais na América do Sul e central. Do gênero *Epicrates* são reconhecidas atualmente nove espécies: *Epicrates alvarezi*, *E. assisi*, *E. cenchria*, *E. crassus*, *E. maurus*, *E. barbouri*, *E. higrophilus*, *E. gaigei* e *E. polylepis* (Passos et al., 2008). *E. crassus* é a espécie mais terrestre e mais comumente comercializada como animal de estimação, sua alimentação é composta de pequenos mamíferos (Pizzatto et al., 2009). No Brasil a espécie ocorre no Cerrado nos estados do Pará,

Mato Grosso, Goiás, Rondônia, Tocantins, Minas Gerais, São Paulo, pradarias do Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Paraná (Passos et al., 2008).



Figura 01: *Epicrates crassus* (Fonte: www.jiboiasbrasil.com.br)

1.2 *Boa constrictor constrictor* (Linnaeus 1758)

Boa constrictor constrictor (**Figura 02**) é uma serpente da família Boidae em que são classificadas as maiores serpentes do mundo. Trata-se de uma subespécie de *Boa constrictor* muito encontrada em centros de pesquisa e criatórios especializados em serpentes, além de ser muito comercializada devido a sua beleza e agregado valor comercial. É bem distribuída na América do Sul e Central, ocorre nos Andes tanto a oeste quanto a leste, nas Antilhas e Ilhas Dominicanas (Garcia, 2012). A espécie apresenta variação nos padrões de coloração de acordo com o local onde ocorre e estes têm sido usados no reconhecimento de várias subespécies (Lima, 2016).

É um animal de hábito noturno podendo ser encontrado durante o dia e alimenta-se de pequenos mamíferos e aves (Garcia, 2012). O período reprodutivo ocorre entre novembro e fevereiro, a gestação tem duração de 4 a 8 meses e dependendo do porte do animal podem nascer até 50 filhotes (Garcia, 2012).



Figura 02: *Boa constrictor constrictor* (Fonte: www.jiboiasbrasil.com.br)

1.3 Criação de jiboias em cativeiro

No Brasil, existe uma legislação específica para o criatório de serpentes em cativeiro, trata-se da Portaria do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) nº118/97. O objetivo desta portaria é normalizar o funcionamento de criatórios de animais da fauna silvestre brasileira com fins econômicos e industriais. Considera-se como fauna silvestre todos aqueles animais que pertencem à fauna silvestre brasileira, reproduzidos ou não em cativeiro e que tenha parte do seu ciclo biológico ocorrendo dentro dos limites do território brasileiro. Excetuam-se nesta portaria: os peixes, invertebrados aquáticos, jacaré-do-pantanal – *Caiman crocodilus yacare*, tartaruga-da-amazônia – *Podocnemys expansa*, tracajá – *Podocnemys unifilis*, insetos da Ordem Lepdoptera e outras espécies da fauna silvestre brasileira que venham a ser tratados em Criatórios como Espécimes da Fauna Silvestre Brasileira e Exótica para fins Comerciais - Pessoa Jurídica (Portaria IBAMA 118 de 1997). Os animais comercializados são marcados com um chip que permite o controle e identificação tanto pelo proprietário quanto pelo IBAMA, o qual poderá fazer a fiscalização e controlar as espécies de serpentes legalizadas.

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), o tráfico de animais

silvestres é a terceira prática clandestina mais lucrativa no mundo perdendo apenas para o tráfico de drogas (www.biodiversidade.ciss.fiocruz.br). O comércio ilegal de animais silvestres abastece 60% do mercado interno e 40% do mercado externo. Dos ecossistemas brasileiros, são retirados 38 milhões de indivíduos de espécies faunísticas por ano e o tráfico de animais é a segunda maior causa de redução da abundância faunística seguido da diminuição de habitats (Renctas, 2007).

Em Minas Gerais, o criatório Jiboias Brasil é uma empresa especializada na criação, manejo e venda de serpentes da família Boidae. Localizada na rua Contagem, número 20B - bairro Parque Betim Industrial, Betim - MG, 32670-402, a empresa é registrada no IBAMA: Cadastro Técnico Federal (CTF) 5520052 e CNPJ 15.251.660/0001-12.

A empresa vem ampliando sua estrutura para atender o mercado nacional e internacional com espécies voltadas para o segmento doméstico e ornamental (www.jiboiasbrasil.com.br). Além da venda de animais, o site também disponibiliza o manual de criação, além de informações como tipo de dieta alimentar, onde adquirir os produtos e hospitais veterinários que atendem a estes animais.

1.4 Microssatélites

Os microssatélites ou STR (do inglês, *Short Tandem Repeats*) também chamados de SSR (Simple Sequence Repeats) são regiões do DNA compostas de pequenas unidades de repetição em tandem de 1 a 6 pares de bases e com ampla distribuição pelo genoma (Pimentel et al; 2018). Os microssatélites são uma ferramenta poderosa para estudos populacionais e para análises forenses de parentesco devido à sua natureza multialélica e alta taxa de mutação (Pimentel et al., 2018). Devido ao seu elevado grau de polimorfismo, os microssatélites são utilizados como marcadores moleculares na identificação de parentesco para estudos em genética e estão entre as sequências mais variáveis do genoma (Ellegren, 2004, Yazbeck e Kalapothakis, 2007). Estas variações podem ocorrer devido à variação dos elementos repetitivos que pode ser a consequência de alguma mutação, reparo da molécula de DNA ou erros da DNA polimerase durante os processos de replicação (Ellegren, 2004).

Semelhante a outros genomas eucarióticos, várias regiões do genoma de serpentes contêm regiões repetitivas de DNA. Outro aspecto interessante em genomas de escamados é a abundância das repetições ATAG e AATAG, mas ainda não foi esclarecido o porquê do acúmulo destas repetições. Essas sequências repetitivas são regiões altamente mutáveis e ao longo do tempo com o surgimento de novas gerações pode levar a uma variação no tamanho estrutura e função do genoma (Ahmad et al., 2021). A maioria dos genomas de serpentes varia entre 1,3 a 3,8 Gigabyte (Gb) e estas variações de tamanhos estão associadas à diferentes proporções de repetições que pode ocorrer dentro da mesma espécie ou dentro do mesmo gênero (Ahmad et al., 2021).

Os microssatélites também permitem uma análise eletroforética utilizando pequenas quantidades de DNA (Guichoux et al., 2011). Polimorfismos de repetições curtas em tandem têm se tornado marcadores genéticos padrão para análises de amostras forenses e desenvolvimento de banco de dados forenses (Bacher, et al., 1999).

Nos testes de paternidade os marcadores microssatélites possibilitam uma redução de custos tanto da análise quanto da visualização dos resultados, pois o suposto filho pode herdar as repetições tanto do pai quanto da mãe (Machado. A. P & Ehrhardt. A. 2018).

O uso do material genético é empregado em investigações forenses para identificar evidências por meio de amostras biológicas dos locais de crime (Machado. A. P & Ehrhardt. A. 2018). Estas amostras são usadas em testes de paternidade, reconhecimento de cadáveres, investigações de crimes sexuais e identificação de vítimas de acidentes em massa (Machado. A. P & Ehrhardt. A. 2018).

1.5 Sequenciamento de Nova Geração

Apesar dos avanços tecnológicos, até a década de 70 não era fácil obter uma sequência de nucleotídeos de um fragmento de DNA. Em 1977 com o surgimento de duas tecnologias para o sequenciamento de DNA, esse problema foi resolvido. Uma das tecnologias foi desenvolvida por Alan Maxam e Walter Gilbert (hidrólise química) e uma outra ainda muito usada atualmente desenvolvida por Frederick Sanger e Cols

(reações enzimáticas) que permitiram determinar sequências de nucleotídeos de fragmentos maiores de DNA. Essas metodologias proporcionaram uma revolução nas pesquisas científicas e atualmente o método desenvolvido por Sanger é a base da Genômica para as tecnologias atuais (Sanger et al., 1977).

Constantes avanços no sequenciamento de DNA a custos mais baixos estão gerando um grande impacto nas pesquisas em ecologia, genética de populações e evolução. Repetições de sequências simples como os microssatélites são de extrema importância para os estudos genéticos (Castoe et al., 2012).

O sequenciamento, seguido de uma boa montagem das sequências obtidas nos permite obter informações sobre expressão gênica diferencial, estrutura e função de genes, diversidade genética, presença de elementos móveis no genoma e relações evolutivas (Nierman et al., 2000).

A maioria dos genomas de serpentes foram publicados com a finalidade de explorar os tipos de venenos, estudo de genes e análises evolutivas, mas, 40% das sequências de DNA repetitivos das serpentes ainda não são compreendidas (Ahmad et al., 2021). Diversos dados genômicos de serpentes foram gerados ao longo dos anos e Ahmad e colaboradores publicaram um compilado destes dados conforme apresentados na **Tabela 01** abaixo:

Tabela 01: Genomas Espécies de serpentes com genomas publicados. Da esquerda para a direita são fornecidos os dados da espécie, nome popular, a identificação no banco de dados, o tipo de montagem do genoma. (Fonte: Ahmad et al., 2021).

Species	Common Name	Assembly ID	Assembly Level	Genome Size (Gbp)	Year of Release
<i>Crotalus horridus</i>	Timber rattlesnake	ASM162548v1	Contig	1.520	2016
<i>Crotalus pyrrhus</i>		CrotMitch1.0	Contig	1.127	2014
<i>Crotalus tigris</i>	Tiger rattlesnake	ASM1654583v1	Contig	1.612	2021
<i>Crotalus viridis viridis</i>	Prairie rattlesnake	UTA_CroVir_3.0	Chromosome	1.340	2019
<i>Emydocephalus ijimae</i>		Emylji_1.0	Scaffold	1.625	2019
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	Asian annulated sea snake	ASM402372v1	Scaffold	1.390	2019
<i>Hydrophis hardwickii</i>	Hardwick's sea snake	ASM402376v1	Scaffold	1.296	2019
<i>Hydrophis melanocephalus</i>		hydMel_1.0	Scaffold	1.403	2019
<i>Laticauda colubrina</i>	Yellow-lipped sea krait	latCor_2.0	Scaffold	2.039	2020
<i>Laticauda laticaudata</i>	Blue-ringed sea krait	latLat_1.0	Scaffold	1.559	2019
<i>Naja naja</i>	Indian cobra	Nana_v5	Chromosome	1.769	2019
<i>Notechis scutatus</i>	Mainland tiger snake	TS10Xv2-PRI	Scaffold	1.666	2018
<i>Ophiophagus hannah</i>	King cobra	OphHan1.0	Scaffold	1.594	2013
<i>Pantherophis guttatus</i>		UNIGE_PanGut_3.0	Scaffold	1.707	2020
<i>Pantherophis obsoletus</i>	Western rat snake	UNIGE_PanObs_1.0	Scaffold	1.692	2020
<i>Protobothrops flavoviridis</i>	Habu	HabAm_1.0	Scaffold	1.413	2018
<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	Chinese habu	P.Mucros_1.0	Scaffold	1.674	2016
<i>Pseudonaja textilis</i>	Eastern brown snake	EBS10Xv2-PRI	Scaffold	1.590	2018
<i>Ptyas mucosa</i>	Dhman	UNIGE_Pmuc_v1.0	Scaffold	1.721	2020
<i>Python bivittatus</i>	Burmese python	Python_molurus_bivittatus-5.0.	Scaffold	1.435	2013
<i>Thamnophis elegans</i>	Western terrestrial garter snake	rThaEle1.pri	Chromosome	1.672	2019
<i>Thamnophis sirtalis</i>		Thamnophis_sirtalis-6.0	Scaffold	1.425	2015
<i>Thermophis baileyi</i>		DSBC_Tbai_1.0	Scaffold	1.748	2018
<i>Vipera berus berus</i>	Common viper	Vber.be_1.0	Scaffold	1.532	2014

A primeira plataforma de Sequenciamento de Nova Geração foi introduzida no mercado no ano de 2005 pela Roche (454 Roche). A vantagem deste tipo de sequenciamento foi a ausência prévia de clonagem dos fragmentos de DNA em vetores de multiplicação (Turchetto-Zolet, Turchetto, Zanella, & Passaia, 2017).

O Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) permite obter de forma rápida uma grande quantidade de dados que podem ser usados para a montagem de genomas, *barcoding* e identificação de marcadores em larga escala (Vartia *et al.*, 2014; Chagas, 2015).

O Sequenciamento de Nova Geração (NGS), trouxe vantagem da identificação por microssatélites e a capacidade de se pesquisar *loci* (regiões individuais do genoma) possibilitando o desenho de *primers* (sequências que flanqueiam regiões específicas) e a diferenciação de alelos de tamanhos iguais com sequências nucleotídicas diferentes (Fernandez-Silva *et al.*, 2013; Pimentel *et al.*; 2018).

A **Figura 03** a seguir ilustra de forma resumida o princípio da técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) realizada na plataforma Illumina.

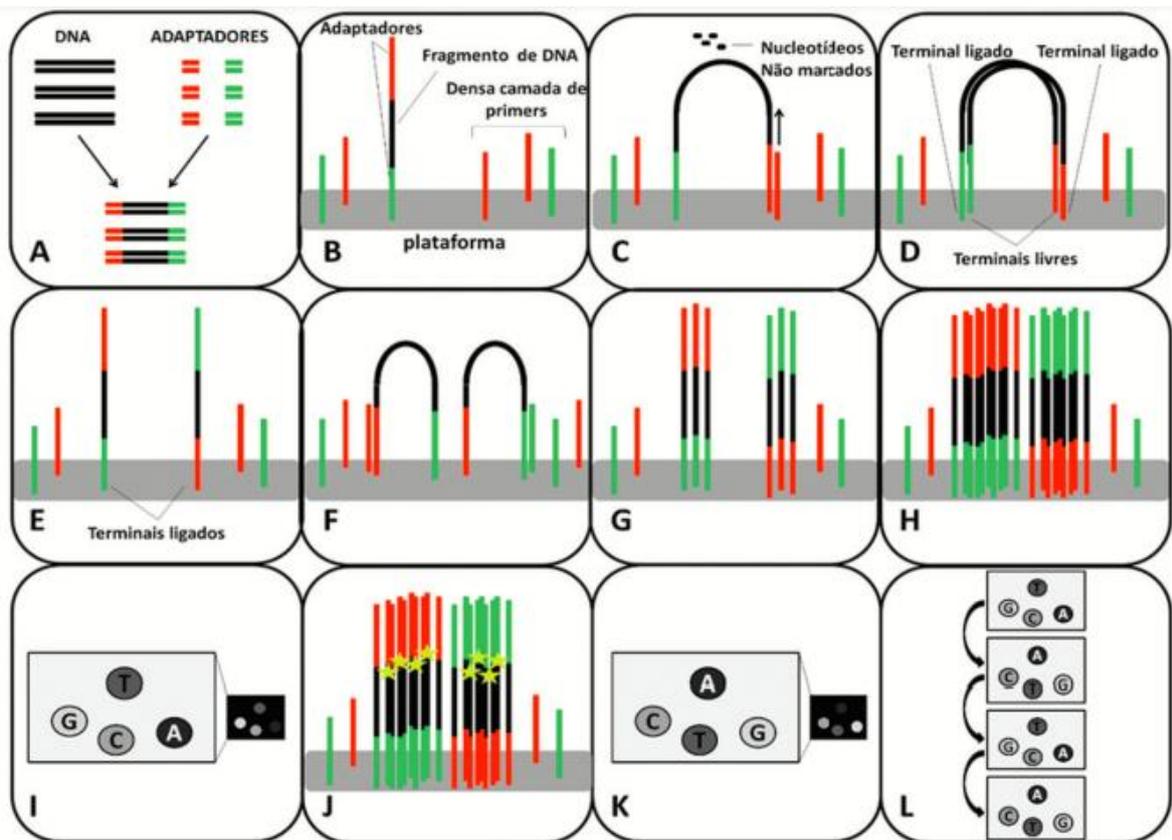


Figura 03: Modelo de sequenciamento usado pela plataforma Illumina. Em **(A)** ocorre a fragmentação do DNA e ligação de adaptadores nas extremidades. Em **(B)**, estes fragmentos são colocados em uma placa de vidro (flowcell) coberta por adaptadores complementares aos adaptadores contidos nas extremidades dos fragmentos que se ligam à placa. Em **(C)**, ocorre a incorporação de nucleotídeos não marcados com fluorescência até completa amplificação do fragmento. Em **(D)** ocorre a formação da amplificação em ponte evidenciando dois adaptadores presos a placa e outros dois livres. Em **(E)** ocorre a desnaturação do duplex. Em **(F)** os adaptadores livres se ligam a adaptadores complementares na placa, iniciando um novo ciclo. Em **(G)**, formação do cluster contendo milhões de cópias do mesmo fragmento. Em **(H)** adiciona-se os quatro tipos de didesoxinucleotídeos contendo fluoróforos, junto com a enzima DNA polimerase, que fará a incorporação do didesoxinucleotídeo apropriado. Em **(I)** ocorre o registro da imagem que corresponde a incorporação do primeiro didesoxinucleotídeo. **(J e K)** representam sucessivos ciclos de incorporação de didesoxinucleotídeos marcados. **(L)** representa as imagens registradas em cada ciclo (Fonte: Turchetto-Zolet, Turchetto, Zanella, & Passaia, 2017)

Uma metodologia de genotipagem de alto rendimento foi realizada por (Pimentel et al.; 2018) em que foram utilizados 08 *loci* de microssatélites e 384 amostras de indivíduos diferentes. Isso foi possível por meio de combinações de

indexes (que diferem cada uma das amostras) disponibilizados pelo fabricante (MiSeq® da Illumina).

1.6 DNA mitocondrial (mtDNA)

A mitocôndria possui o seu próprio DNA, é uma organela de membrana dupla além de ser responsável pela geração de cerca de 90% da energia celular na forma de Adenosina Trifosfato (ATP) (Yan et al., 2014). Em animais o mtDNA ao longo dos anos tem evoluído mais rápido que o DNA nuclear (Brown et al., 1979). A molécula de mtDNA, diferente do DNA nuclear não possui mecanismos eficientes de reparos, dessa forma, acumula um maior número de mutações e além deste acúmulo de mutações o mtDNA ocorre em um maior número de cópias por célula favorecendo ainda mais as mutações (Clayton et al., 1974).

Em eucariotos o genoma mitocondrial possui 37 genes, sendo que 22 deles codificam RNA de transferência (tRNA), dois são ribossômicos (rRNA) e outros 13 codificam proteínas relacionadas aos processos de respiração oxidativa (Linacre et al., 2011). Enquanto o DNA genômico possui apenas uma cópia dentro de cada célula, o DNA mitocondrial apresenta inúmeras cópias e é circular, esta característica o torna mais estável e mais resistente a degradação (Ballard et al., 2004).

Nas serpentes, o mtDNA tem as regiões D-loop ou regiões controle duplicadas com sequências muito parecidas quando comparadas a outros vertebrados como peixes por exemplo que possuem apenas uma região D-loop. De acordo com (Kumazawa, Ota, Nishida, & Ozawa, 1998) em um experimento de hibridização com indivíduos Akamata (*Dinodon semicarinatus* – serpente japonesa) eles perceberam que o estado duplicado da região de controle não é uma característica instável ou transitória, mas que ocorre de maneira estável em genomas mitocondriais da espécie.

Sugerem-se também que as sequências das regiões D-loop são duplicadas e estão presentes em locais distintos do mtDNA e que evoluíram de forma concertada, pois têm sequências de nucleotídeos quase idênticas dentro das espécies, mas que podem divergir entre as espécies (Dong & Kumazawa, 2005) conforme ilustra a **Figura 04** abaixo.

2. Justificativa e relevância do projeto

Considerando o elevado número de espécies de *Boa constrictor constrictor* e *Epicrates crassus* que são amplamente comercializadas tanto de forma legal quanto de forma clandestina, considera-se de suma importância o desenvolvimento de marcadores moleculares para a identificação destas espécies. O conhecimento do genoma mitocondrial também é de grande importância para a identificação das espécies, pois apenas alguns poucos genes de ambas foram publicados. Quando nos referimos ao gênero *Epicrates*, existem espécies que não têm nenhum gene publicado. A partir do genoma mitocondrial também é possível o desenvolvimento de marcadores para se estudar melhor estas espécies bem como outras do mesmo gênero e fazer análises de diversidade dos indivíduos que as compõem.

Segundo a Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres (Renctas, 2007), o comércio clandestino pode chegar a 38 milhões de animais silvestres capturados de seus habitats e exportados, principalmente, para países europeus e asiáticos o chamado tráfico doméstico. Os resultados obtidos neste trabalho irão auxiliar as autoridades criminais ou institutos de pesquisa por meio de uma reação de PCR na possível identificação das espécies para a solução de algum crime relacionado ao tráfico destes animais.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Montagem dos genomas mitocondriais e desenvolvimento de marcadores moleculares baseado em microssatélites para as espécies *Boa constrictor constrictor* e *Epicrates crassus*.

3.2 Objetivos específicos

1. Testar diferentes tipos de metodologias de extração e purificação de DNA para ambas as espécies;
2. Sequenciar e montar os genomas mitocondriais de *Epicrates crassus* e *Boa constrictor constrictor*;
3. Localizar diferentes regiões microssatélites a partir do resultado dos sequenciamentos dos genomas, sintetizar e padronizar *primers* para estas regiões;
4. Padronizar um número mínimo de 15 regiões de microssatélites para cada uma das espécies;

4. Material e Métodos

4.1 Obtenção das amostras

As amostras de músculos utilizadas para o sequenciamento de DNA total e mitocondrial e para o desenvolvimento dos marcadores moleculares das espécies *Boa constrictor constrictor* e *Epicrates crassus* foram cedidas gentilmente por Tiago Lima responsável pelo Criatório Jiboias Brasil - Registro IBAMA: CTF 5520052 e CNPJ 15.251.660/0001-12.

As amostras cedidas (um exemplar de cada espécie) pelo criatório foram de indivíduos que vieram a óbito. O exemplar de *Boa constrictor constrictor* estava identificado como BccM34 (macho 34) nascido em 08/04/2014 e que veio a óbito no dia 14/04/2018 com chip de identificação 985154000064396.

O exemplar de *Epicrates crassus* de identificação Ecr F52 (fêmea 52) que veio a óbito no dia 16/12/2017 e chip de número 963008000762930. Os espécimes são mostrados na **Figura 05** (A e B) abaixo. Os espécimes foram depositados no Centro de Coleções Taxonômicas (CCT-UFMG) UFMG) e números de tombo (UFMG – 3429 – *Boa constrictor constrictor* e UFMG – 3430 – *Epicrates crassus*). Foram também depositadas 03 alíquotas contendo um grama de músculo em cada uma (a, b, c) para ambas as espécies e número de tombo respectivamente: UFMG – 3429 e 3430. O projeto foi realizado de acordo com o Sistema de Autorização de Informação em Biodiversidade (SISBIO) 76926-1.

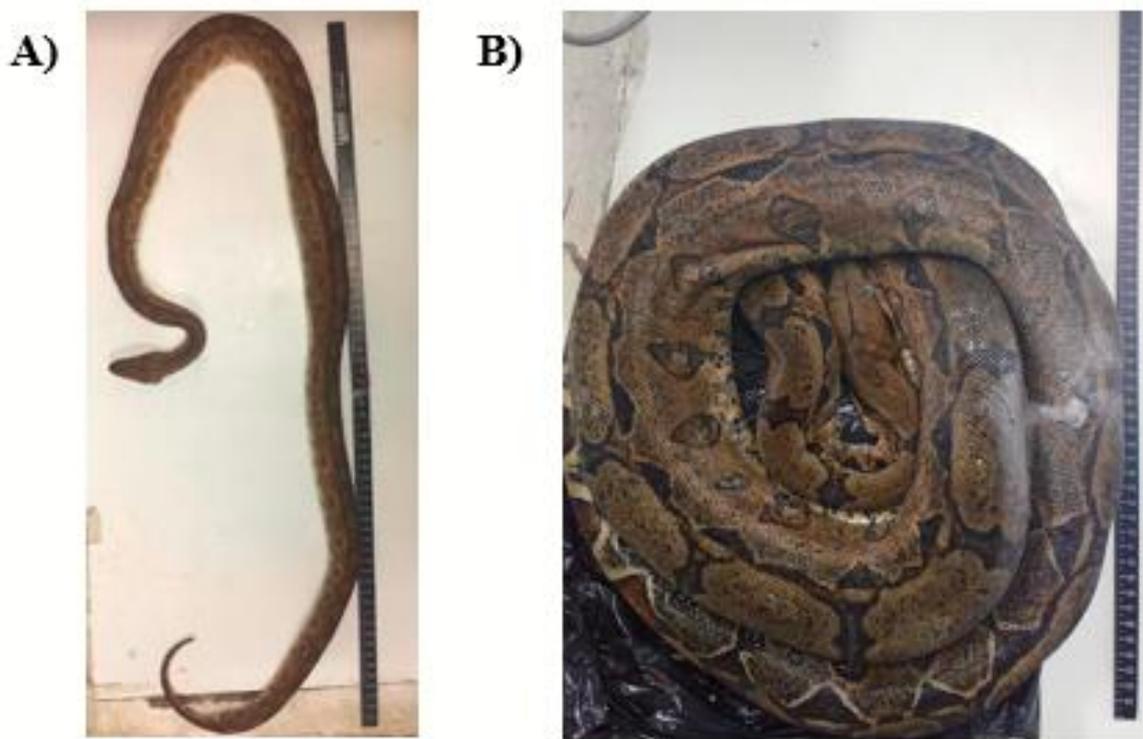


Figura 05: Espécimes usados no desenvolvimento do trabalho. Em (A) *Epicrates crassus* e (B) *Boa constrictor constrictor*.

Todos os testes foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares – LBMM localizado no Instituto de Ciências Biológicas – ICB – da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG e coordenados pelo professor Dr. Evanguedes Kalapothakis.

4.2 Obtenção do DNA genômico

Vários protocolos de extração e purificação de DNA genômico foram testados (Fenol e clorofórmio, Kit GTS (Phoneutria - Biotecnologia), *Beads* magnéticas e Sephacryl). Adaptações foram necessárias e feitas com o objetivo de obter amostras de DNA com boa qualidade.

A quantificação do DNA foi realizada no aparelho Qubit 2.0 (Thermo Fischer Scientific). A qualidade e a integridade das amostras foram verificadas em eletroforese com gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X (1.1 M Tris; 900 mM Borato; 25mM EDTA; pH 8.3) corados com Brometo de etídio e revelado em luz UV

além de serem testados também em gel de poliacrilamida 8% corado com Nitrato de Prata.

Os protocolos descritos a seguir foram realizados para ambas as espécies, exceto o protocolo de extração diferenciada de DNA mitocondrial que foi realizado apenas para a espécie *Boa constrictor constrictor*. Para facilitar a leitura, a espécie *Boa constrictor constrictor* foi abreviada para *B.c.constrictor* e a espécie *Epicrates crassus* abreviada para *E. crassus*.

4.3 Protocolo de Fenol e Clorofórmio

A extração e purificação do DNA genômico pelo método Fenol e Clorofórmio foi realizada de acordo com o método de proteinase K e fenol clorofórmio seguindo o protocolo adaptado pela equipe do LBMM de Hermann & Frischauf (1987). Ele consiste na digestão enzimática das células e tecidos com proteinase K, na presença de EDTA (Ácido Etilenodiamino tetra-acético) que inibe a ação das Dnases. O rompimento da membrana celular e a desnaturação das proteínas é feita pelo SDS (Dodecil sulfato de sódio) com ação detergente e a purificação dos ácidos nucleicos ocorre por solventes orgânicos (fenol tamponado (pH alcalino, Phoneutria e clorofórmio PA (J.T.Baker)).

Em um cadinho 1 g de tecido foi macerado com o auxílio de um pistilo com aproximadamente 100 g de gelo seco até formar um pó fino. Em seguida, o material foi transferido para um tubo para centrífuga de 15 ml em que foram adicionados: 1,5 ml de TEN 9 (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 200 mM NaCl, pH 9,0 - Phoneutria), seguido de suave homogeneização por inversão de 10 a 20 minutos ou até formar uma mistura homogênea. Foram adicionados ao tubo 150 µl de SDS 20% (proporcional a 1/10 do volume de TEN 9) seguido de uma suave homogeneização por inversão por mais 10 minutos conforme mostrado na **Figura 06** abaixo:

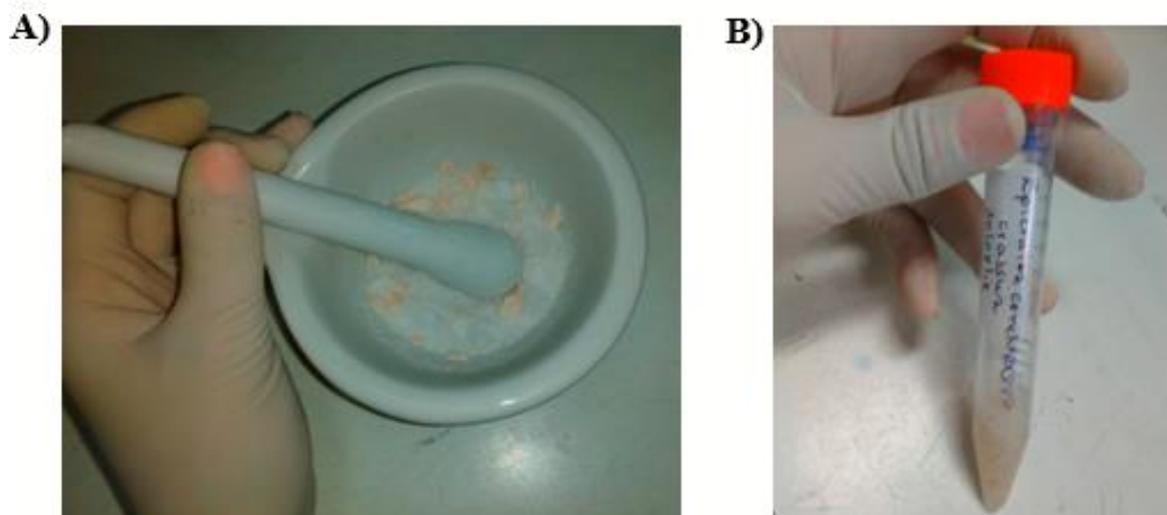


Figura 06: Processo inicial de extração de DNA pelo protocolo de fenol e clorofórmio. Em **(A)** maceração do tecido com gelo seco e **(B)** após adição de TEN 9 e SDS 20%.

Ao tubo foram adicionados 150 μ l de proteinase K (10 mg/ml) seguido de uma nova homogeneização suave por 5 minutos e incubação em banho maria na temperatura de 56°C por 24 horas. Após 24 horas um volume de 180 μ l de RNase (10 mg/ml) correspondendo a 1/10 do volume dos reagentes iniciais foi adicionado ao tubo que foi novamente incubado em banho maria a uma temperatura de 37°C por 40 minutos. A etapa seguinte foi a purificação do DNA extraído.

Na etapa de purificação, o volume total de todo o processo anterior foi fracionado em alíquotas de 500 μ l e distribuídas em microtubos de 2 ml. Em cada alíquota foram adicionados 500 μ l de Fenol Equilibrado pH 7,4 – 8,0 (Phoneutria), seguido da adição de 500 μ l de Clorofórmio (J.T.Baker). Posteriormente todas as alíquotas foram colocadas em um suporte para tubos seguidas de homogeneização por inversão por 2 minutos e centrifugação de 10 min a 8740 rpm. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo microtubo de 2 ml seguido da adição de mais 500 μ l de Clorofórmio e uma centrifugação de 7 minutos a 8740 rpm para completa remoção do fenol. O sobrenadante desta fase foi novamente transferido para um novo microtubo de 2 ml seguido da adição de 1 ml de solução de precipitação de DNA, (Phoneutria) conforme verificado abaixo na **Figura 07:**

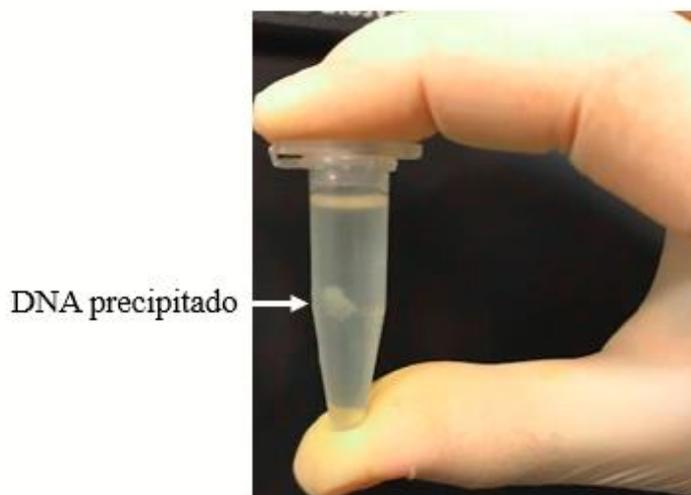


Figura 07: DNA precipitado com Solução de Precipitação

Os tubos foram homogeneizados por inversão por 10 minutos e centrifugados 10 minutos a 8740 rpm. Nesta etapa, o DNA precipitado (**Figura 07**) forma um *pellet* que pode ser visualizado no fundo de cada tubo. A fase aquosa foi descartada e o DNA de cada tubo foi lavado com 1 ml de Etanol 70% (para lavagem dos *pellets*) seguido de centrifugação a 8740 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos permaneceram à temperatura ambiente até que cada *pellet* estivesse completamente seco (esta etapa leva cerca de 1 hora).

Na etapa seguinte, cada alíquota purificada de DNA foi eluída em 50 μ l de tampão TE (Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM de EDTA - Phoneutria) e um volume de 5 μ l foi aplicado em gel de agarose 0,7% colocado em uma cuba de eletroforese com tampão TAE 0,5X corado com brometo de etídeo por 45 minutos. Para melhor compreensão das etapas de purificação, foi selecionada uma alíquota de 6 μ l antes da adição de RNase, outros 6 μ l após a adição da RNase e após a purificação com fenol e clorofórmio. Os volumes de 6 μ l tanto antes quanto após a adição da RNase foram aplicados da seguinte forma no gel: 01 canaleta com o volume de 2 μ l e outra com volume de 4 μ l. Dessa forma, caso ocorresse algum tipo de degradação do DNA em algumas das etapas, seria possível identificar em qual etapa do processo de extração do DNA ela ocorreu.

4.4 Kit GTS (Phoneutria)

Para a extração de DNA com o Kit GTS, 0,5 g de músculo foi colocado em um cadinho e com o auxílio de um pistilo foi macerado juntamente com 150 ml de Nitrogênio líquido até formar um pó fino. Foi adicionado ao pó fino 2 ml de solução de *lise* e homogeneizado de forma bem suave sem o auxílio do pistilo. A seguir a mistura foi vertida em um tubo para centrífuga de 50 ml para garantir que todo o resultado da maceração fosse removido do cadinho, foram adicionados a ele mais 2 ml de solução de *lise* para promover a retirada do material que costuma ficar encrustado às bordas dele e a seguir vertido no tubo de 50 ml conforme ilustra a **Figura 08** abaixo:

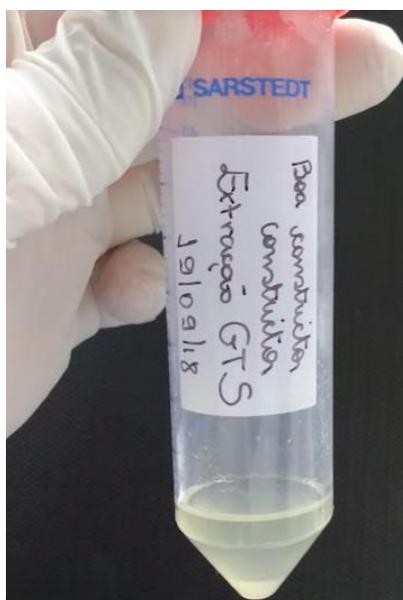


Figura 08: Extração de DNA com o Kit GTS Phoneutria

O tubo foi homogeneizado por inversão de maneira suave e o próximo passo foi a separação de duas alíquotas de 100 μ l em dois tubos de 2 ml cada um e adicionar mais 100 μ l de solução de *lise* em cada uma das alíquotas seguido de incubação em banho-maria a 55°C por 10 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 13400 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml e foram adicionados 60 μ l de solução de sílica em cada tubo seguido de uma centrifugação a 1000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 200 μ l de solução de lavagem A (contida no kit GTS) adicionada suavemente com a ponteira de forma a lavar as bordas do tubo e

centrifugado a 1000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi novamente descartado e foram adicionados ao *pellet* 200 µl de solução de lavagem B novamente lavando toda a borda do tubo seguido de homogeneização suave com a ponteira e centrifugação de 1000 rpm por 1 min. O *pellet* foi lavado com 200 µl de Acetona PA (Synth) lavando toda a borda do tubo e centrifugado a 1000 rpm por 2 min. A Acetona foi descartada e o tubo permaneceu aberto para secagem por 30 minutos em estufa Biologic Oxygen Demand (BOD) por 30 min a 37°C. Após a secagem foram adicionados em cada tubo 30 µl de água ultrapura para que o DNA fosse ressuscitado seguido de incubação por 10 minutos no banho maria a 55°C e de centrifugação por 13400 rpm por 2 min. Um volume de 20 µl foi aplicado em um gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo seguido de eletroforese em cuba com tampão TAE 0,5X (Phoneutria) por 40 minutos.

4.5 Purificação com *Beads* magnéticas

No protocolo de purificação de DNA com *Beads* magnéticas 0,5 g de amostra de músculo da espécie *B.c. constrictor* foi colocada em um cadinho e com o auxílio de um pistilo e 150 ml de Nitrogênio líquido foi triturada até formar um pó bem fino. Após a maceração foram adicionados 4 ml de Solução de coleta (*Lise* kit GTS) ainda no cadinho de forma a umedecer toda a região do cadinho em que foi macerado o músculo com a solução. Feito isso, foi realizada a homogeneização de forma circular sem o auxílio do pistilo para que toda a mistura fosse transferida sem muitas perdas para um tubo de 50 ml. Foi adicionada ao cadinho mais 1 ml da solução de *lise* para lavá-lo e desta forma garantir que toda a amostra fosse transferida para o tubo de 50 ml que a seguir foi incubado em banho maria a 55°C por 30 min. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante foi retirada e adicionada em um microtubo de 1,5 ml seguida da adição de 100 µl de *Beads* magnéticas (Agencourt AMPure XP® Beckman Coulter) e de homogeneização 10X de forma bem suave com a própria ponteira de dispersão. A amostra foi incubada por 5 min à temperatura ambiente (aproximadamente 28°C) a seguir foi colocada em uma placa magnética para tubos e incubada por mais 5 min. em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi lavado por 3 vezes com 200 µl de Etanol 70% em cada uma delas (o Etanol foi adicionado de forma a lavar a borda interna do tubo). Após a retirada de todo o Etanol, a amostra permaneceu 10 min na bancada com o tubo

aberto até que o *pellet* formado pelas *beads* ficasse completamente seco e foi adicionado um volume de 30 µl de TE (Tris EDTA pH 8,0 Phoneutria). O *pellet* foi ressuspensionado com o auxílio de uma ponteira com lavagens bem suaves de forma a não quebrar o DNA e o tubo foi incubado novamente na placa magnética por aproximadamente 5 min à temperatura ambiente até que o sobrenadante ficasse completamente límpido. A seguir o sobrenadante (cerca de 25 µl) foi transferido para um novo tubo de 0,2 ml e 5 µl deste volume foram aplicados em um gel de agarose de 0,7% corado com brometo de etídeo seguido de eletroforese em cuba com tampão TAE 0,5X (Phoneutria) por 40 minutos.

4.6 Purificação com Sephacryl

Nesta etapa, 1g de tecido de músculo colocado em um cadinho, foram adicionados 150 ml de Nitrogênio líquido para o congelamento da amostra e com o auxílio de um pistilo a amostra foi macerada até forma um pó bem fino e transferida com o auxílio de uma espátula para um tubo para centrífuga de 15 ml. Em seguida foi adicionado 1,5 ml de TEN9 (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 200 mM NaCl, pH 9) ao cadinho seguido de homogeneização de maneira suave sem auxílio do pistilo de forma que todo o resíduo de músculo triturado entrasse em contato com o tampão TEN9, seguido da transferência para o tubo que também foi homogeneizado por inversão por 10 minutos até formar uma mistura homogênea. Ao tubo foram adicionados 150 µl de SDS 20% (proporcional a 1/10 do volume de TEN 9) seguido nova homogeneização por inversão por mais 10 minutos devagar para evitar quebras da molécula do DNA. Ao tubo também foram adicionados 150 µl de proteinase K (10mg/ml) seguido novamente de homogeneização por inversão bem devagar por mais 5 minutos e incubação em banho maria na temperatura de 56°C por 24 horas. Passadas as 24 horas, 180µl de RNase (10mg/ml) equivalente a 1/10 do volume dos reagentes iniciais foram adicionados ao tubo seguido de uma nova incubação em banho maria a 37°C por 40 minutos. A etapa seguinte foi a de purificação com Sephacryl. Foram preparadas 3 colunas usadas em purificação com Sephacryl que foram inseridas em tubos de 1,5 ml. Em cada uma delas foram adicionados 200 µl de resina de Sephacryl S-100, S-400 e S-1000 (GE Healthcare) respectivamente. Após a adição da resina, cada tubo com a coluna foi centrifugado a 2,2 rpm por 1 min. Foram adicionados 100 µl de água ultrapura de maneira circular para que cada

borda da coluna fosse lavada e centrifugadas novamente a 2,2 rpm por 1 min. Os tubos usados de suporte para cada coluna foram descartados e novos tubos foram colocados como suporte para as colunas. Foram adicionados 100µl de amostra em cada tubo seguido de centrifugação por 1 min a 2,6 rpm. De cada amostra foram retirados volumes equivalentes a 1 µl e 4 µl e aplicados em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo seguido de eletroforese em cuba com tampão TAE 0,5X (Phoneutria) por 40 minutos. A **Figura 09** ilustra em forma de esquema o procedimento descrito anteriormente.

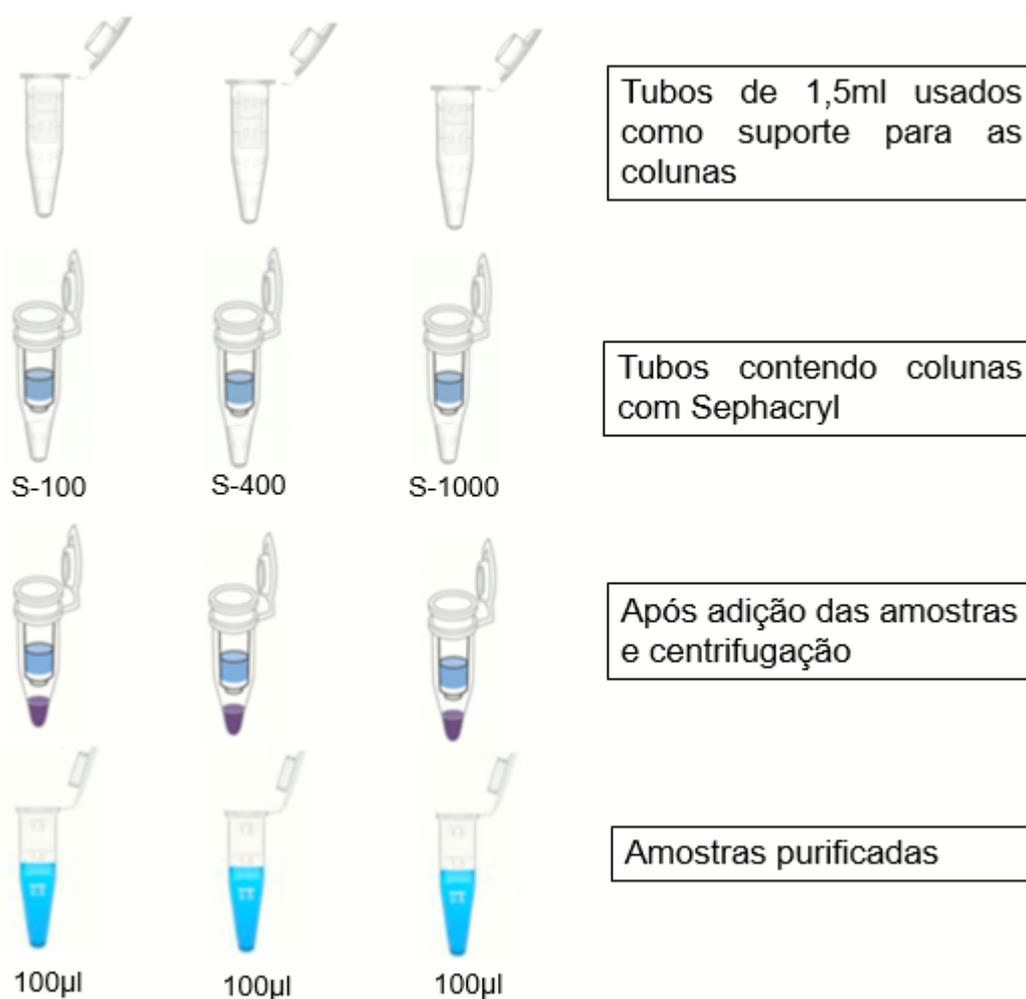


Figura 09: Esquema mostrando a purificação inicial com Sphacryl. Os três tubos iniciais foram usados de suporte para as colunas de purificação. A segunda fileira são os tubos contendo as colunas de purificação com Sphacryl S-100, S-400 e S-1000. A terceira fileira são as colunas após adição das amostras e a última são as amostras purificadas.

Em razão de um resultado não satisfatório, pois o fragmento observado no gel não estava completamente limpo, foi feito um *pool* com as 3 amostras purificadas

anteriormente, e deste pool foi retirada uma alíquota de 20 μl foi novamente purificada apenas com Sephacryl S-1000. A purificação foi dividida em 05 colunas com volumes diferentes de Sephacryl S-1000 em cada uma delas. Os volumes de 100 μl , 200 μl , 400 μl , 600 μl e 1000 μl referem-se ao volume de resina de Sephacryl S-1000 utilizado em cada coluna durante o processo de purificação. A **Figura 10** ilustra de uma forma esquemática como foi realizada esta etapa.

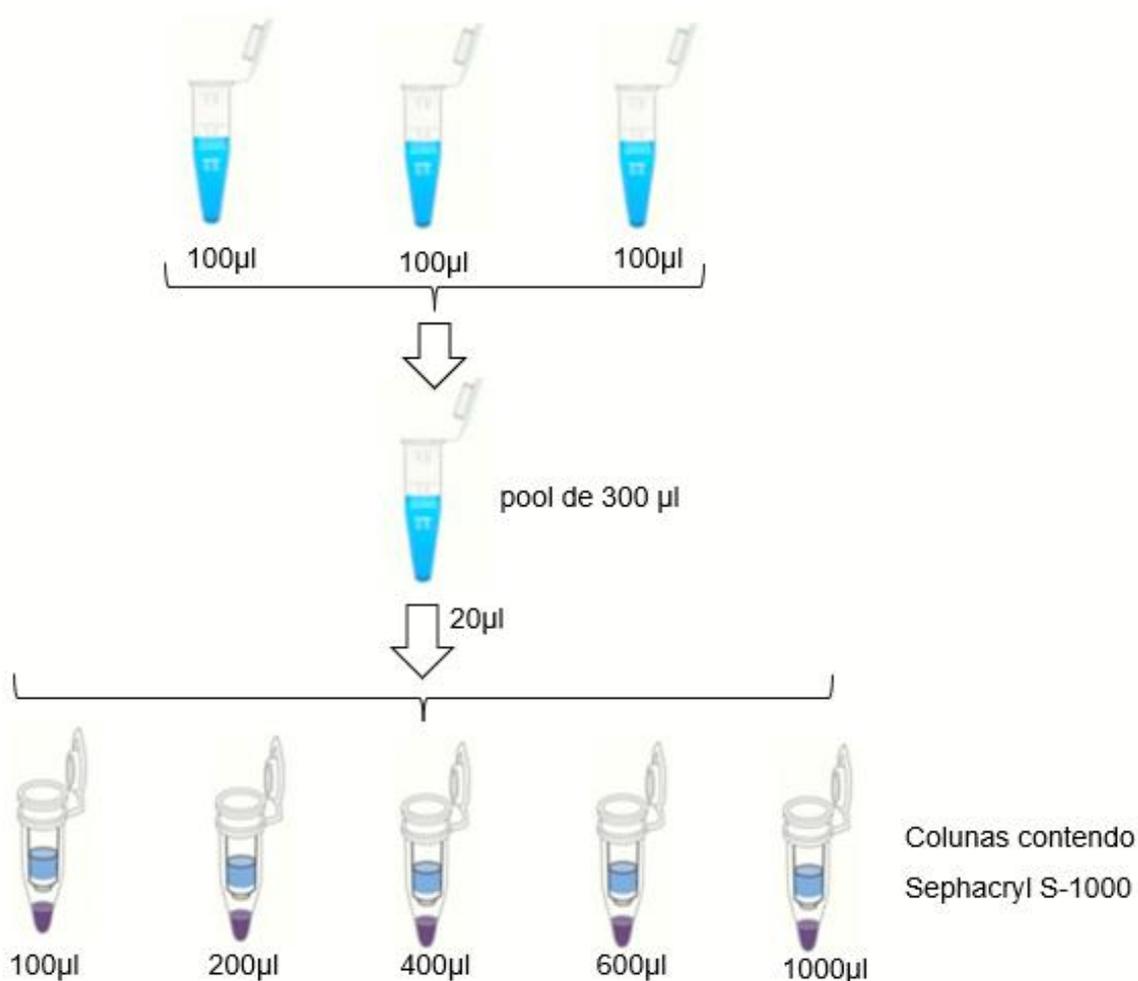


Figura 10: Esquema mostrando a purificação com Sephacryl. Os três tubos da primeira fileira referem-se as três primeiras purificações feitas com Sephacryl S-100, S-400 e S-1000 (foram retirados 100 μl de cada purificação e feito um pool (01 tubo da segunda fileira)). A purificação foi dividida em 05 colunas com os volumes de 100 μl , 200 μl , 400 μl , 600 μl e 1000 μl de Sephacryl S-1000. Em cada coluna foram purificados 20 μl de amostra retirada do pool de 300 μl .

4.7 Extração diferenciada do DNA mitocondrial (mtDNA)

4.7.1 Isolamento das mitocôndrias

O isolamento do mtDNA foi realizado utilizando músculo da espécie *B. c. constrictor* baseado no protocolo (Frezza, Cipolat, & Scorrano, 2007). Inicialmente 0,5 g de tecido muscular foi colocado em um tubo de 15 ml e com o auxílio de uma pipeta lavado com 5 ml de solução gelada de PBS 1X (Phosphate buffered saline) suplementada com de EDTA 10 mM por 10 min. Com o auxílio de uma pipeta a solução de PBS foi descartada e a seguir o tecido foi ressuspensionado com 5 ml de solução de PBS 1X gelada suplementada com EDTA 10 mM e 0,05% de Tripsina por 30 min. seguido de centrifugação a 200 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em solução gelada de IBM1 (6,7 ml de Sucrose 1 M, 5 ml de Tris/HCl 1 M, 5 ml de KCl 1 M, 1 ml de EDTA 1 M e 2 ml de BSA 10% com pH ajustado para 7,4). A proporção da solução IBM1 foi de 5 volumes de solução para 1 volume de *pellet*). O tecido foi colocado em um triturador de tecidos tipo Potter-Elvehjem também gelado e homogeneizado por 10X. O material foi transferido para um tubo de 15 ml e centrifugado a 700 g por 10 minutos à uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 15 ml e centrifugado a 8000 g por 10 min novamente à uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e posteriormente o *pellet* foi ressuspensionado em 5 ml de solução gelada de IBM2 (25 ml de sucrose 1 M, 3 ml de Tris EDTA 0,1 M e 1 ml de TrisHCl 1 M, o pH foi ajustado para 7.4) e centrifugado a 8000 g por 10 min na temperatura de 4°C. O pellet formado durante o processo contém milhares de mitocôndrias.

4.8 Extração do mtDNA

A extração de mtDNA modificado foi realizado de acordo com o protocolo descrito por (Françoso, Gomes, & Arias, 2016). O *pellet* obtido do isolamento das mitocôndrias (protocolo anterior) foi ressuspensionado em 100 µl de TEN 9 seguido da adição de 1 µl de enzima Dnase I (1000U) e 1 µl de tampão contendo Magnésio (Mg) que vem junto da Dnase I. O tubo foi incubado por 1 hora em banho maria na temperatura de 37°C e após esse período é necessário que a enzima DNase I seja inativada com 2 µl de Proteinase K (20 mg/ml) seguido de nova incubação por 1

hora em banho maria a 55°C seguido de centrifugação a 12.000 rpm a uma temperatura de 4° C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µl de solução de *lise* (10 mM Tris/HCL, pH 8,0, 150 mM NaCl, 20mM EDTA, 1% SDS e proteinase K 0,2 mg/ml) seguido de incubação por mais 1 hora em banho maria a 55°C.

4.8.1 Purificação do mtDNA

Após a incubação em banho maria foram adicionados ao tubo 50 µl de Fenol equilibrado (Phoneutria) seguido da adição de 50 µl de clorofórmio PA (Synth) e de homogeneização por inversão de forma lenta por 2 min e centrifugação a 12000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionados 50 µl de clorofórmio seguido de homogeneização por inversão devagar por 2 min. e centrifugação a 12000 rpm por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo e adicionado 2 volumes de solução de precipitação de DNA (200 µl, Phoneutria) e 0,75 µl de glicogênio (20 mg/ml) seguido de incubação no gelo por 10 minutos e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 50 µl de etanol 70% por 2X e centrifugado a 12000 rpm por 5 min em cada uma das lavagens. O tubo aberto foi colocado em estufa BOD a 37°C para secagem por 30 min. O mtDNA foi ressuspensionado em 12 µl de água ultrapura, quantificado no Qubit seguido de eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo por 40 minutos.

4.9 Construção da biblioteca genômica e sequenciamento no Miseq

O DNA total extraído da *E. crassus* pelo protocolo de fenol e clorofórmio seguido pelo protocolo de purificação com Sephacryl foi sequenciado utilizando a estratégia *paired-end* com o cartucho V3 600 ciclos (301/301) (Illumina) e protocolo *Nextera DNA Sample Preparation*. Conforme recomendado pelo fabricante, foram utilizados 50 ng de DNA (20 µl de DNA a 2,5 ng/µl, a diluição foi feita com água ultrapura em um tubo de 0,6 ml e quantificado no Qubit com o buffer High Sensitive). Na etapa de tagmentação do DNA foram adicionados ao tubo contendo os 50 ng de DNA a 2,5 ng/µl, 25µl de TD Buffer (Tagment DNA Buffer – Illumina – Referência 15027866 que foi homogeneizado em vórtex seguido de um spin em centrífuga para

garantir que todo produto estaria no fundo do tubo) e 5 µl de TDE1 (Tagment DNA Enzyme 1 Ref. 15027865) seguido de homogeneização com a pipeta por 10 vezes. O tubo foi aquecido em um termociclador a 55°C por 5 min e *hold* a 10°C.

4.9.1 Purificação da amostra com o Kit Qiagen

A amostra foi purificada utilizando o kit Qiagen (*QIAquick PCR Purification kit* – Cat No 28106). Nesta etapa ao tubo de 0,6 ml que foi retirado do termociclador (etapa anterior contendo o volume de 50 µl), foram adicionados 250 µl de *Buffer PB* e 1 µl do indicador de pH. O volume total foi transferido para uma coluna (*QIA quick PCR Purification*) e centrifugado por 1 min a 13000 rpm. O líquido foi descartado e foram adicionados à coluna 750 µl de *Buffer PE* (tampão de lavagem) seguido de centrifugação por 1 min a 13000 rpm. A coluna foi colocada em novo tubo e foram adicionados 25 µl de RSB (Ressuspension Buffer- Illumina – Ref. 15027913), incubando por 2 min a temperatura ambiente (em torno de 28°C). A seguir a amostra foi centrifugada por 2 min a 16000 g e a coluna foi retirada do tubo e descartada.

4.9.2 PCR index

Para a realização da PCR index, em um tubo de 0,2 ml foram adicionados: 5 µl de cada index, 15 µl de NPM (Nextera PCR Master Mix – Illumina – Ref. 15027873), 5 µl de PPC (*PCR Primer Cocktail* Illumina – Ref. 15026786) e 20 µl de DNA purificado com o kit Qiagen. A PCR foi realizada com 5 ciclos de 72°C por 3 min, 98°C por 30 seg. 98°C por 10 seg, 63°C por 30 seg e extensão final de 72°C por 3 min.

A purificação da PCR foi feita usando um tubo de 0,6 ml (todo o produto da PCR da etapa anterior foi dado um spin (centrifugação rápida de 15 segundos) do tubo em uma centrífuga e todo o produto da PCR foi transferido para um tubo de 0,6 ml para a etapa de purificação.

Ao tubo de 0,6 ml foram adicionados 30 µl de *beads* magnéticas (AMPure XP – Beckman Coulter – Ref. A63881) e homogeneizadas 10 vezes de forma bem suave com a pipeta. Incubar à temperatura ambiente por 5 min. seguido de incubação na placa magnética por 2 min. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 200 µl de etanol 80% fresco por 2 vezes e um tempo de

secagem do pellet ainda na placa magnética de 15 min. Após este tempo, o tubo foi retirado da placa magnética e o pellet foi ressuscitado com 27,5 µl de RSB (Ressuspension Buffer- Illumina). O tubo foi colocado novamente na placa magnética por 2 min e a seguir o volume de 25 µl do DNA foi coletado e colocado em um novo tubo para a etapa seguinte. Uma quantificação foi realizada no Qubit com o buffer High Sensitive e o valor obtido normalizado para nM. (Caso não seja possível realizar as etapas seguintes, neste ponto é possível congelar a amostra em - 20°C ou a - 80°C e continuar no dia seguinte).

4.9.3 qPCR

A próxima etapa foi a realização de uma qPCR (esta etapa foi preparada em Cabine de segurança Biológica classe II B2) em placa 96 poços: MicroAmp Fast 96-well reaction Plate (0,1ml) PCR compatible, DNA/RNA/ RNase Free - Applied biosystems. REF: 4346907. Película para placa: MicroAmp Optical Adhesive Film. PCR compatible. DNA/RNA/RNase Free - Applied biosystems. REF: 4311971. Foram usados: 12 µl de KAPA SYBR qPCR Master Mix containing *primer* pré- mix, 6 µl de água ultrapura e 2 µl de DNA. Foram colocados em cada poço da placa 8 µl do mix e 2 µl de DNA ou standards (a reação incluindo o controle negativo foi realizada em duplicata). A qPCR foi realizada à temperatura de 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 45 seg e extensão final de 4°C em o termociclador (Step One Plus e programa StepOne Software- Life Technologies- versão 2.3).

4.9.4 Sequenciamento massivo de DNA

O volume de 50 µl de biblioteca foi diluída em Tris 10 mM pH 8,5 e 0,1% de Polisorbato 20 (Tween 20) para 4 nM (segundo o protocolo do fabricante, Illumina) seguida da adição de 5 µl de NaOH 1 N e 990 µl de HYB Buffer (Hybridization buffer). O material foi sequenciado sob a concentração de 20 pM e foi adicionado a corrida um controle positivo Phix Control V3-Illumina conforme recomendações do fabricante.

De acordo com o manual do fabricante (Illumina, 2013) a plataforma Illumina realiza o sequenciamento via *flowcell* que contém fragmentos de DNA fita simples ligados à sua superfície e que são complementares aos adaptadores Illumina inseridos no processo de construção da biblioteca. A primeira etapa do sequenciamento é o momento em que os adaptadores se ligam à sequência molde e o sequenciamento se inicia. A segunda etapa é o sequenciamento propriamente dito. Abaixo segue uma figura que resume as etapas anteriormente citadas:

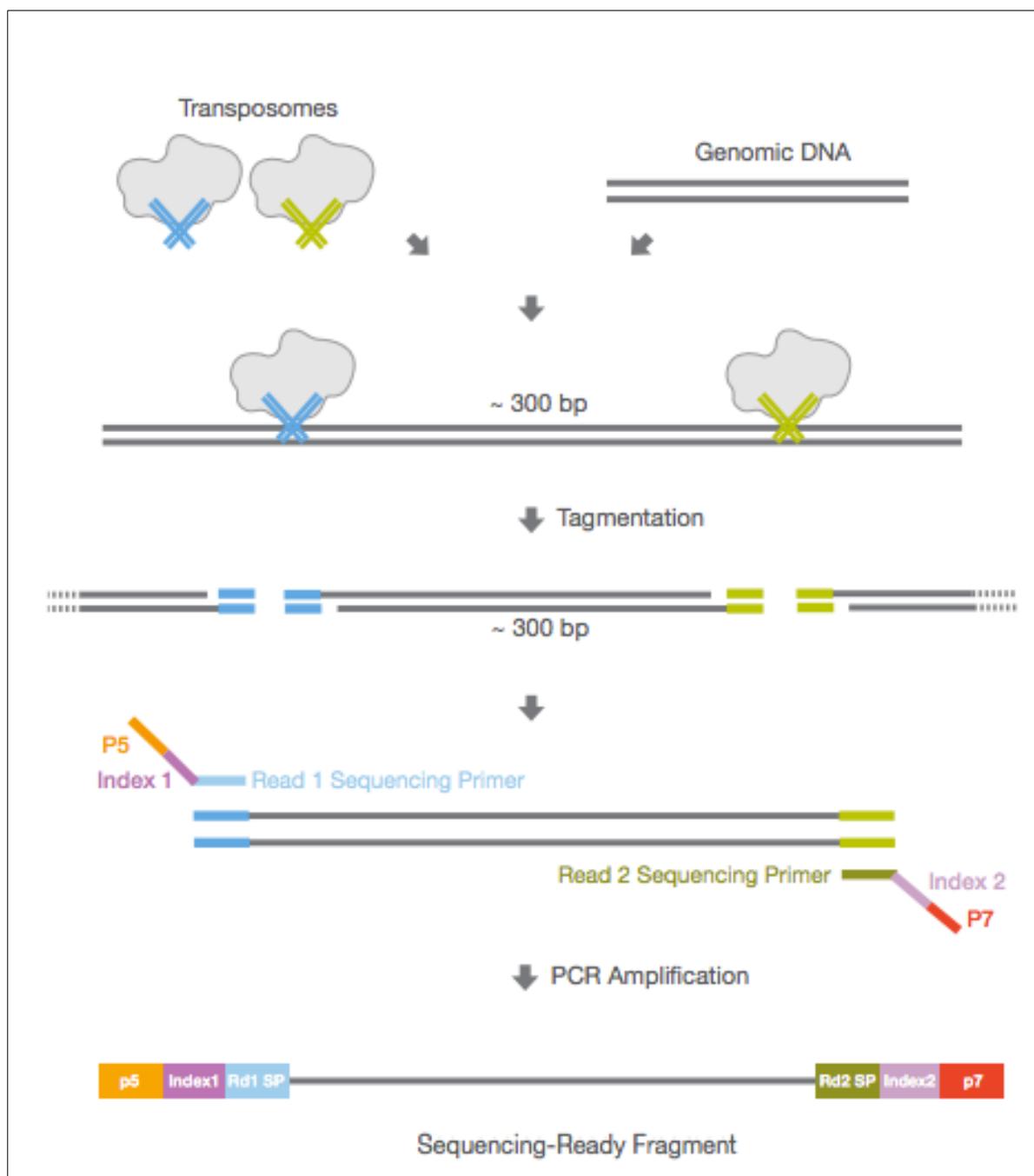


Figura 11: Desenho esquemático do processo de construção da biblioteca genômica como o kit Nextera DNA Sample Preparation (Illumina). Fonte: Illumina (2016).

4.10 Montagem dos contigs e anotação do mtDNA

A montagem dos contigs foi realizada pelo programa Geneious 11.1.15. A anotação foi realizada usando o programa MITOS Web Server (Bernt et al. 2013) para identificação dos genes, códons de início e parada. Os genes também foram conferidos manualmente usando o GenBank pela ferramenta ExPASy Translate (Gasteiger, 2003).

4.11 Pesquisa por microssatélites

Após a montagem dos contigs utilizando o programa Geneious, estes foram submetidos ao programa SciRoKo 3.4 (Kofler, Schlötterer, & Lelley, 2007) para a busca por microssatélites. Os *primers* foram desenhados com os programas Geneious e *Primer Blast* (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990). O tamanho escolhido da sequência de cada *primer* foi de 18 pb a 23 pb, conteúdo GC de 30% a 60%, temperatura de anelamento entre 57°C e 63°C e uma diferença de temperatura entre *Foward* e *Reverse* de 3°C.

4.12 Desenho dos *primers*

Foram desenhados 53 pares de *primers* para cada uma das espécies com repetições hexa, penta, tetra, tri e dinucleotídeos. Para a espécie *Boa constrictor constrictor* os *primers* foram identificados como Bcc seguido do número de 01 a 53 (por exemplo: o *primer* de número 01 foi identificado como Bcc 01 e assim por diante até o de número 53). Para a espécie *Epicrates crassus* os *primers* foram identificados como *E.crassus* seguido do número de 01 a 53 (*E. crassus* 01 e assim por diante até o de número 53). Os *primers* foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, EUA) e diluídos em tampão Tris EDTA pH 8,0 (Phoneutria) para a concentração de 200 pmol/μl (solução estoque). A solução de uso foi diluída em tampão Tris EDTA pH 8,0 para a concentração de 5 pmol/μl.

4.13 Padronização dos *primers*

A **Tabela 02** mostra os reagentes e volumes usados na padronização das reações de PCRs.

Tabela 02: Reagentes utilizados nas reações de PCR

Reagente	Volume por reação (µl)
Água ultrapura	9,5
Pré-mix IVB 2X (Phoneutria)	12,5
<i>Primer Foward</i> (5 pmol/µl)	1
<i>Primer reverse</i> (5 pmol/µl)	1
DNA (10 ng/µl)	1
Volume final	25

O volume de água foi alterado em algumas condições e reações quando foi adicionado à reação Dimetilsulfóxido PA - Synth (DMSO). Nas reações em que foi utilizado o DMSO, a concentração calculada para cada amostra foi de 5% baseada no volume final de 25 µl de reação. O DMSO é um agente desnaturante, e atua auxiliando a separação das fitas de DNA, melhorando a especificidade da reação e consequentemente a amplificação da região desejada (Hiller, 1996).

As amplificações para a padronização dos 106 pares de *primers* utilizados no trabalho foram realizadas em Termociclador modelo VERITI 96-well Thermal Cycler 0,2 ml Applied Biosystems®. As reações de PCRs foram realizadas nas condições: 94°C por 5 min, seguidos por 35 ciclos de 92°C por 20 seg temperatura de anelamento variando entre 56°C e 62°C por 45 seg, 72°C por 45 seg e extensão final de 72°C por 10 min. Um volume de 10 µl de *amplicon* foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 0,5X (1.1 M Tris, 900 mM Borato, 25 mM EDTA, pH 8,3 - Phoneutria) corado com brometo de etídio seguido de aplicação de 5 µl de *amplicon* no gel de poliacrilamida 8%, eletroforese com tampão TBE 0,5 X e corado com Nitrato de Prata que permite uma melhor resolução das amplificações.

A primeira reação de PCR foi realizada com 35 ciclos e a aplicação em gel de agarose ocorreu da seguinte forma: 0,5 µl de *amplicon* foram aplicados no gel

seguido de uma eletroforese por 15 min e posteriormente foi aplicado o volume de 10 µl seguido de eletroforese por 30 min. A partir da segunda reação o número de ciclagem foi reduzido para 30 seguido da adição de 5% de DMSO para aquelas amostras que estavam gerando mais de um fragmento no gel ou quando o fragmento gerava dúvidas no que diz respeito a ser ou não tamanho correto quanto ao desenho da sequência do *primer*. O critério para escolha dos *primers* para as reações seguintes foram aqueles que apresentavam uma amplificação mais específica (bandas mais limpas no gel). Após os testes de padronização, foram selecionados 15 pares de *primers* para cada espécie.

5. Resultados e discussão

5.1 Obtenção do DNA genômico de *E. crassus*

Para a obtenção do DNA genômico da espécie *E. crassus* foram testados dois protocolos diferentes de extração e purificação de DNA: Fenol e Clorofórmio e purificação com Sephacryl. No protocolo de Fenol e Clorofórmio (**Figura 12 (A e B)**), apesar da quantificação no Qubit ter demonstrado um bom rendimento 366 ng/ μ l para a etapa de sequenciamento, o DNA de acordo com o resultado mostrado não era de boa qualidade.

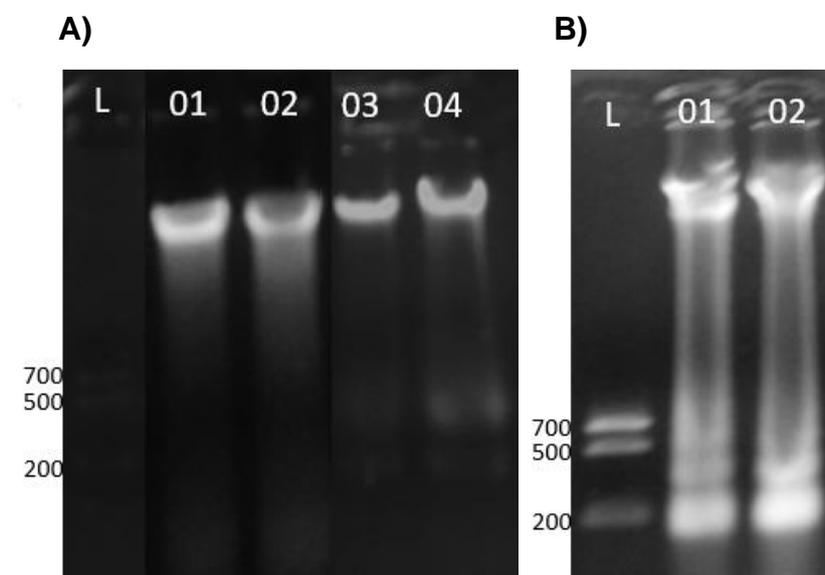


Figura 12: DNA genômico extraído da *E. crassus* pelo protocolo de Fenol e Clorofórmio (A e B). Eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV. **L:** Padrão de peso molecular (700, 500 e 200 pb Phoneutria). **A) 01 e 02:** Aplicação de 2 μ l e 4 μ l de amostra antes da adição de RNase (10 mg/ml). **3 e 4 –** Aplicação de 2 μ l e 4 μ l de amostra após a adição de RNase (10 mg/ml) seguido de 30 min. em banho maria a 50°C. **B) 01 e 02:** Aplicação de 2 μ l e 4 μ l de amostra após purificação com fenol e clorofórmio.

A primeira tentativa de purificação com Sephacryl foi feita a partir de um *pool* de amostras purificadas anteriormente com fenol e clorofórmio conforme ilustrado na **Figura 12**. Foram preparadas 3 colunas e em cada uma delas foram adicionados 200 μ l de Sephacryl S-100, S-400 e S-1000, respectivamente. Após a adição da

resina, cada coluna foi centrifugada a 2,2 rpm por 1 min. Foram adicionados 100 μ l de água ultrapura em cada coluna para lavar a resina e centrifugadas novamente a 2,2 rpm por 1 min. Os tubos usados de suporte para cada coluna foram trocados por tubos novos e foram adicionados em cada coluna 200 μ l de amostra seguido de centrifugação por 1 min a 2,6 rpm. Um volume de 1 μ l e 4 μ l correspondente a cada coluna foram aplicados em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo conforme ilustra a **Figura 13** abaixo:

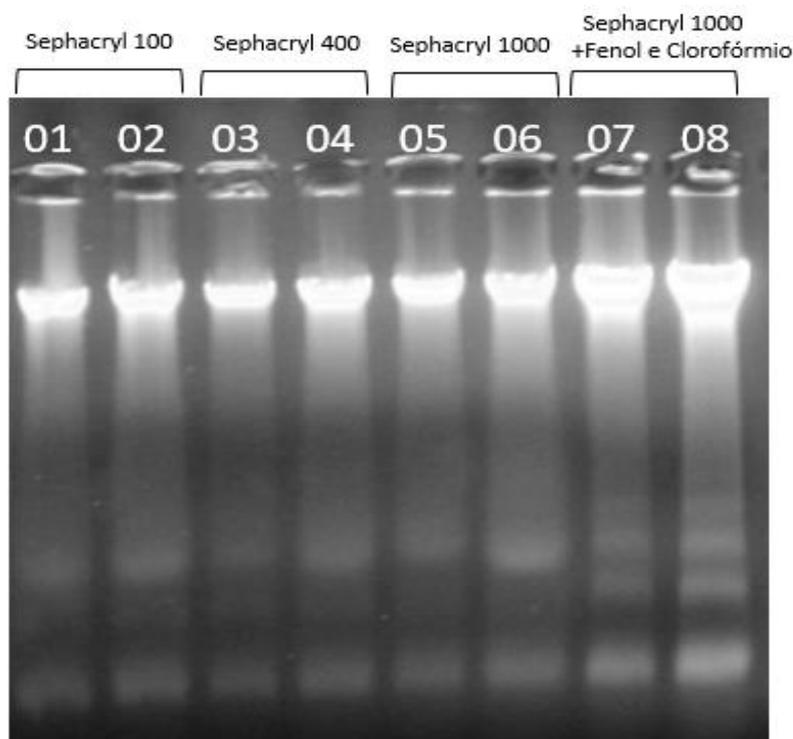


Figura 13: Purificação do DNA da *E. crassus* com 200 μ l de Sephadex S-100, S-400 e S-1000 respectivamente. Eletroforese com tempo de duração de 60 min em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV. **01 e 02:** 2 μ l e 4 μ l de amostra purificada com Sephadex S-100. **03 e 04:** 2 μ l e 4 μ l de amostras purificadas com Sephadex S-400. **05 e 06:** 2 μ l e 4 μ l de amostras purificadas com Sephadex S-1000. **07 e 08:** 2 μ l e 4 μ l de amostras purificadas com 200 μ l de Sephadex S-1000 purificadas anteriormente com fenol e clorofórmio

Com o objetivo de melhorar a integridade do DNA, foi feito um novo *pool* com os 3 volumes de amostras purificadas anteriormente. Deste novo *pool* foram retirados 20 μ l que foram novamente purificados apenas com Sephadex S-1000. A **Figura 14** a seguir ilustra os resultados das purificações com Sephadex S-1000 em diferentes volumes.

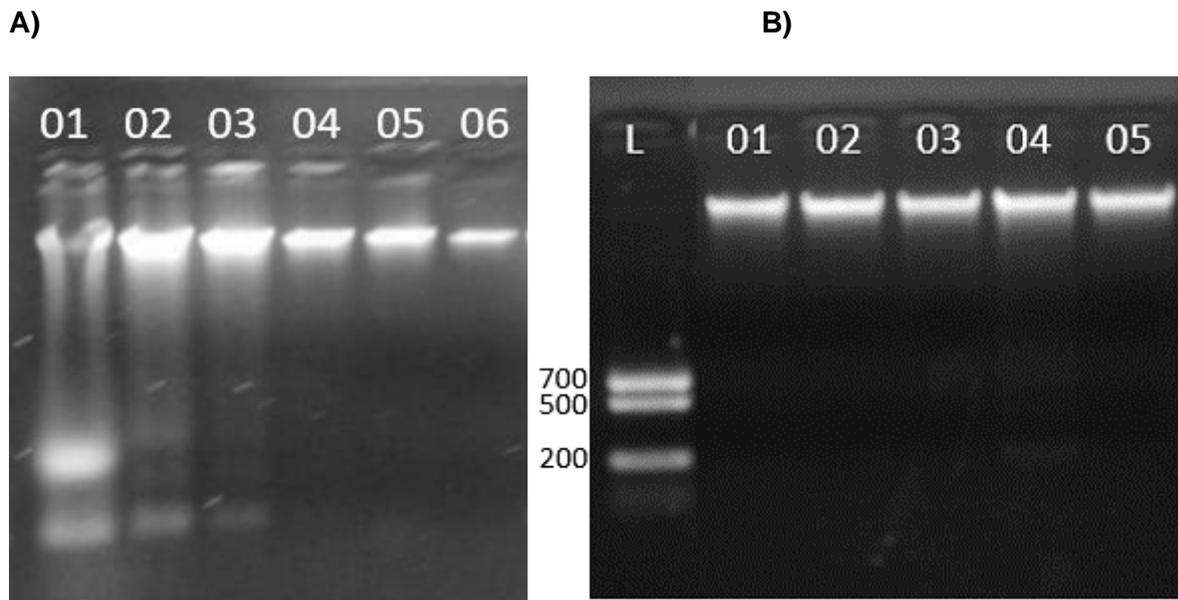


Figura 14: Extração de DNA genômico da *E. crassus* purificado com Sphacryl. Eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV mostrando resultado de purificação de DNA genômico com Sphacryl. **A)** Amostras purificadas com Sphacryl S-1000 e centrifugadas a 2,6 rpm por 2 min. **01:** Amostra controle antes da purificação com Sphacryl S-1000. **Volumes de Sphacryl S- 1000 usados por amostra: 02:** 100 µl; **03:** 200 µl, **04:** 400 µl; **05:** 600 µl. **06:** 1000 µl. **B)** L: Leadder 752 (700, 500 e 200 pb - Phoneutria). **01 a 5:** 4 µl de amostra em cada canaleta purificadas com Sphacryl S-1000 usando 600 µl de resina e 20 µl de cada amostra retirada do pool amostra **1(A)**.

Desta forma ficou estabelecido que a purificação com Sphacryl S-1000 no volume de 600 µl de resina utilizando 20 µl de amostra sendo a mais eficiente para a espécie *E. crassus*.

5.2 Obtenção do DNA genômico de *Boa constrictor constrictor*

Para a espécie *B.c.constrictor* foi realizada uma tentativa de extração de DNA e purificação com fenol e clorofórmio conforme ilustrado na **Figura 15 (A)** sem muito sucesso. Da amostra purificada com fenol e clorofórmio foi feita uma nova purificação com resina de Sphacryl S-1000 utilizando um volume de 600 µl de resina de Sphacryl e 20 µl de amostra mostrado na **Figura 15 (B)**.

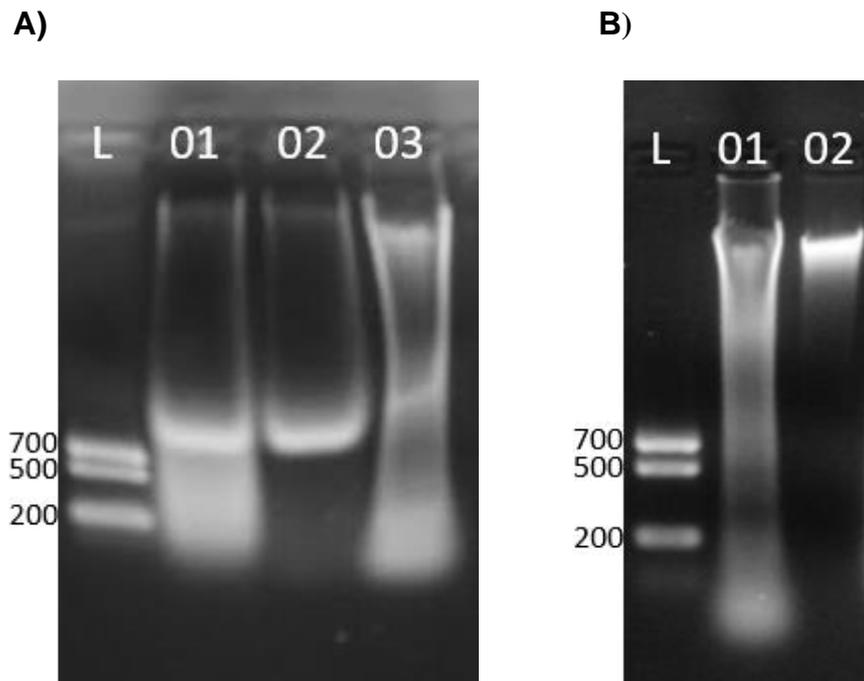


Figura 15: Extração de DNA pelo método fenol e clorofórmio para a espécie *B. c. constrictor* (A) e pelo método de purificação fenol e clorofórmio seguido de purificação com Sephacryl (B). L: Leader 752 (700, 500 e 200 pb Phoneutria). **01:** 4 μ l amostra antes da adição de RNase **02:** 4 μ l amostra 40 min após adição da RNase 10 mg/ml seguido de incubação a 37°C. **03:** 4 μ l amostra após purificação com Fenol/Clorofórmio (500 μ l de amostra purificada e o pellet ressuspendido em 50 μ l de TE. **B) L:** Leader 752 (700, 500 e 200 pb Phoneutria). **01:** 4 μ l de amostra purificada com fenol/clorofórmio (quantificação Qubit: 444 ng/ μ l). **02:** 4 μ l de amostra purificada com fenol/clorofórmio seguido de purificação com Sephacryl S-1000 (600 μ l de resina + 20 μ l de amostra purificada na coluna).

A **Figura 16** mostra o resultado de extração e purificação de DNA de *B. c. constrictor* utilizando o Kit GTS (Phoneutria). Este protocolo não foi utilizado para testes posteriores, pois de acordo com a visualização em gel de agarose, os fragmentos observados no gel não estavam muito nítidos denotando uma eficiência não muito boa para este protocolo quando comparado com os demais testados, mas este não deixa de ser um protocolo que pode ser usado em outros tipos de amostras, pois se mostrou muito eficiente e com bom rendimento.

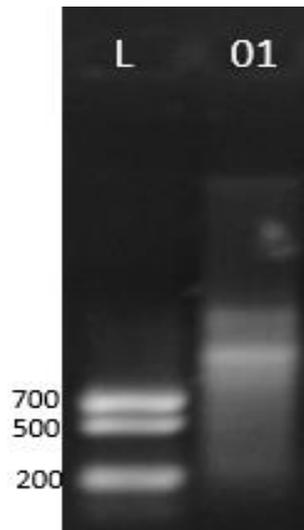


Figura 16: Extração de DNA com o Kit GTS (Phoneutria) para a espécie *B. c. constrictor*. Eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV mostrando resultado de purificação de DNA genômico com Kit GTS. **L:** Leadder 752 (700, 500 e 200 pb Phoneutria). **01:** aplicação de 20 μ l de amostra seguida de eletroforese por 40 minutos.

O resultado da extração de DNA da *B. c. constrictor* com *Beads* magnéticas (**Figura 17**) se mostrou bastante eficiente, porém após alguns testes foi observado que o rendimento ficava sempre em torno de 10 ng/ μ l, valor considerado um pouco baixo quando comparado a uma extração de DNA com fenol e clorofórmio que rendia dependendo da quantidade de amostra utilizada aproximadamente 500 ng/ μ l de DNA. Um outro fator que deve ser considerado na extração de DNA com *Beads* magnéticas é o custo do reagente e o volume usado por amostra (em torno de 100 μ l).

Desta forma, optou-se por o protocolo de purificação do DNA com Sephacryl para ambas espécies, visto que foi o que apresentou melhores resultados e rendimento em torno de 40 a 60 ng/ μ l após a purificação, valores bastante satisfatórios para futuras análises.

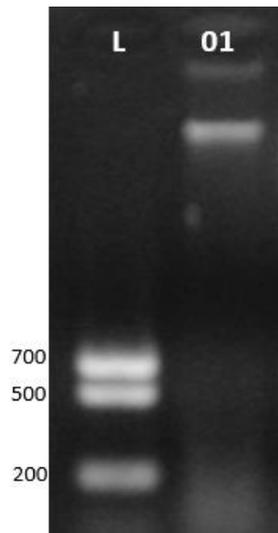


Figura 17: Extração de DNA com *Beads* magnéticas da espécie *B. c. constrictor*. Eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV mostrando resultado da extração e purificação de DNA genômico com *Beads* magnéticas. **L:** Leader 752 (700, 500 e 200 pb Phoneutria). **01:** aplicação de 4 µl de amostra seguida de eletroforese por 40 minutos.

A extração e a purificação de DNA seja ele genômico ou mitocondrial advindo de tecidos vegetais ou animais fungos ou bactérias é uma etapa primordial para se obter bons rendimentos em protocolos de sequenciamento ou de PCR. O sucesso de um resultado não depende apenas de um bom protocolo, mas também de bons reagentes e de uma boa execução. As amostras que são perecíveis precisam serem bem acondicionadas (-20°C a -80°C) até o momento de execução do protocolo. Para a execução dos protocolos citados durante todo o trabalho, as amostras foram acondicionadas a -20°C e de cada espécime foram retiradas alíquotas de aproximadamente um grama para que eles não precisassem passar por novas etapas de descongelamento.

Conforme apresentado nos resultados, o método de extração de DNA com fenol e clorofórmio adaptado de Hermann & Frischauf (1987) seguido da purificação em Sephacryl se mostrou mais eficiente tanto em se tratando de resultados qualitativos e quantitativos. O uso de fenol e clorofórmio permite que as proteínas sejam desnaturadas e migrem para a fase orgânica enquanto o DNA permaneça na fase aquosa facilitando a sua coleta e posterior melhoria no rendimento (Sambrook et al.1989).

5.3 Resultados do sequenciamento do DNA total de *E. crassus*

Inicialmente foi realizado a construção da biblioteca genômica da *E. crassus*, seguido do sequenciamento massivo de DNA conforme ilustrado na **Figura 18**. O sequenciamento genômico gerou 7.94 Gb de dados e 19.617.188 *reads* (R1 e R2)

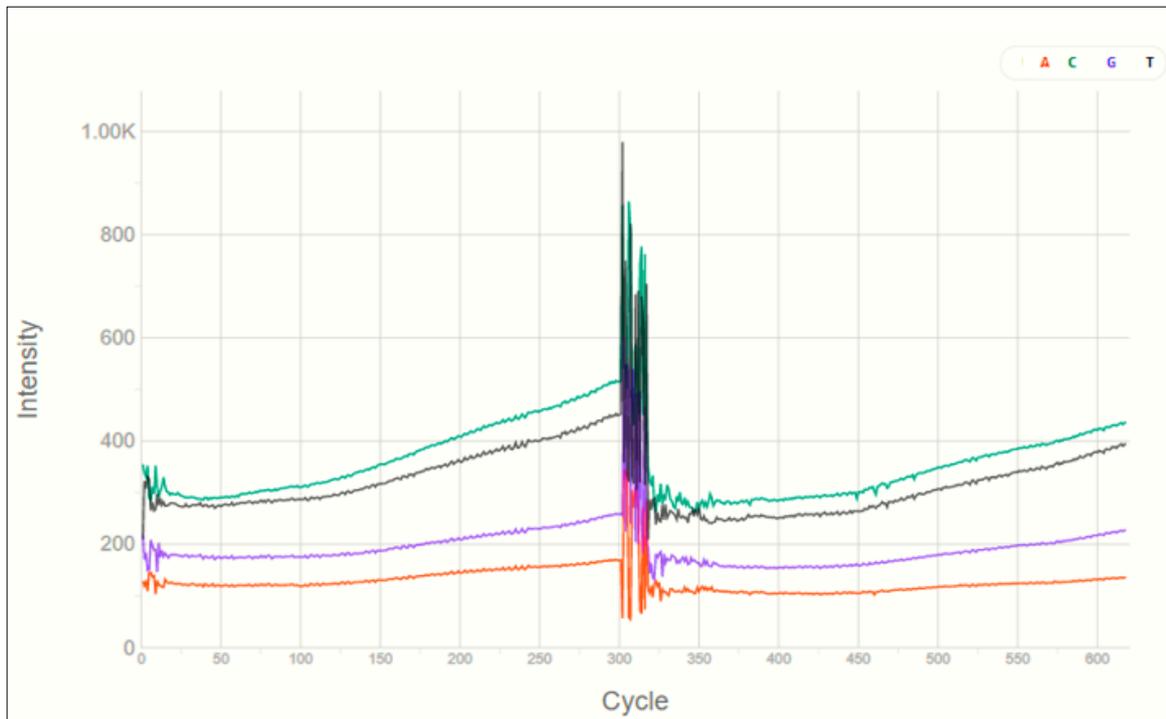


Figura 18: Gráfico mostrando a qualidade das *reads* no sequenciamento de DNA genômico da *Epicrates crassus*. Cada linha colorida representa um tipo de base nitrogenada: vermelho (Adenina), verde (Citosina), roxo (Guanina) e preto (Timina).

A montagem do genoma mitocondrial da *E. crassus* foi feita no software Geneious 11.1.15. A anotação foi realizada usando o programa MITOS Web Server (Bernt et al. 2013) para identificação dos genes, códons de início e parada. Os genes também foram conferidos manualmente usando o GenBank pela ferramenta ExPASy Translate (Gasteiger, 2003). O genoma de referência foi a sequência completa do mitogenoma de *Boa constrictor* disponível no banco de dados do NCBI, pois não consta na literatura nenhum genoma completo publicado para outras espécies do mesmo gênero *Epicrates*. Seu mitogenoma tem um total de 18.868 pb sendo 23 genes de tRNA, 2 genes de rRNA, 13 genes codificadores de proteínas e duas regiões controle ou D-loop conforme representado na **Figura 19**.

amplicons com tamanhos esperados entre 100 pb e 200 pb. A **Tabela 03** ilustra o número de regiões microssatélites localizadas pelo programa SciRoKo e o número de pares de *primers* sintetizados distribuídos entre os motivos de repetição di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos.

Tabela 03: Regiões de microssatélites localizadas pelo programa SciRoKo 3.4 e número de pares de *primers* sintetizados para *E. crassus*

Tipos de repetições	Microssatélites encontrados pelo SciRoKo	Pares de <i>primers</i> sintetizados
Dinucleotídeos	18156	15
Trinucleotídeos	15979	15
Tetranucleotídeos	51850	15
Pentanucleotídeos	18032	3
Hexanucleotídeos	18156	5
Total	116211	53

Após a localização das regiões de microssatélites, as sequências foram submetidas ao software Geneious 11.1.15 para o desenho dos *primers*.

A **Tabela 04** mostra as sequências dos microssatélites, motivos de repetição e se as repetições são perfeitas ou imperfeitas.

A **Tabela 05** ilustra as sequências Forward e Reverse dos *primers* bem como os tipos de repetições e tamanho do fragmento esperado para a espécie *E. crassus*. As temperaturas de anelamento ficaram em torno de 57°C a 63°C conforme verificado no *Primer Blast* onde as sequências dos *primers* foram avaliadas com base na sua capacidade de amplificação, tamanho esperado do fragmento e conteúdo GC entre 30 e 60% para as duas espécies.

Tabela 05: Sequências e repetições dos 53 pares de *primers* para *E. crassus*

Nome do primer	Motif	Foward	Reverse	Tam. Fragmento (pb)
<i>E. crassus</i> 01	TTG TTC	GCAGTGGCTAAAAACAAAAGCTG	TCTCATTAGTGTGAATTATGCCA	191
<i>E. crassus</i> 02	AATGGA	TGCTAGAATGGGCAACGGTT	CAGATGTGCCAGCTCTCCAA	159
<i>E. crassus</i> 03	TACACA	ACTTTCTCTTCTTCTCTGAGTTAGT	CAGAAGAACTGCTGCACAAG	193
<i>E. crassus</i> 04	TATATG	TCTGATACAGCCCACTTCTGG	TGTGTGTGTATGTAGTGTGTG	158
<i>E. crassus</i> 05	AAAGGT	GACGGTTCATGGCCTTTATTGA	TCGGACACGACTGGACTTAA	100
<i>E. crassus</i> 06	TACAA	GGTGGGATTAGTGAAGCC	GCAATTGATCACACATCTTGGG	187
<i>E. crassus</i> 07	GA CTA	ACTTGAGGGGGTCTTGTCT	CTGCCACCATGGTCTTCAT	186
<i>E. crassus</i> 08	TGAAA	AGGTGAACCAGTCTACACT	GTCCAGTGGAGCTTACTCCC	166
<i>E. crassus</i> 09	CCGT	CCAACCTCAGTCTCGGCTAT	TTGAGCCCAATCCAGCCT	177
<i>E. crassus</i> 10	TGGA	AGGATCTGTCAAGTCAGCACA	ATGAAATGAATCAGATCTGTTTGGGA	172
<i>E. crassus</i> 11	AGGA	TACAAAGGGAGGGAGGGAGG	CCCAGTTTTACCAAGGTGG	170
<i>E. crassus</i> 12	AATC	ACAGTGGTGATGAACGCACT	TGCTTTCTGGACTGACAACT	199
<i>E. crassus</i> 13	TCAT	TCCTTCCCATGTCTCCA CT	GGGGGAGATGGGTGGTGATA	198
<i>E. crassus</i> 14	GAAA	TGAGGACGTGAAGATGGAGA	TGTGAAC TACAGAAGGAACGGA	176
<i>E. crassus</i> 15	GAAA	AGACATCTTTGTGATAGCTACAGT	AGTGAAGGAAATGCCACTTCC	197
<i>E. crassus</i> 16	GAAA	ACGTGCTTATGAGAAAAGACATCT	TGCCTTCAA TAGAACTGGGAGT	177
<i>E. crassus</i> 17	TATC	TGAGCCAGCAGATTCCATG	GGCTGGTTACAAAGGCTGG	156
<i>E. crassus</i> 18	ATTC	GCAGTCTATTCAGTTGCTTCAGC	GGAGGAGATAGGCAGTGACA	102
<i>E. crassus</i> 19	CATC	GCTGGGACTCTTCTATCTGTGC	TCCGTTT CATGTAATATGGCATGT	100
<i>E. crassus</i> 20	AGAT	TGTAAGCATACTCTACAGGT	TCAATTCTGTTATGGCTTCTTGG	187
<i>E. crassus</i> 21	AACA	AGCTAAGAGTCGATGGTCTGAG	AAGGGAAGGGATGAGAGAGCT	100
<i>E. crassus</i> 22	TATG	AGTGCTTCTGTTAATGGATGC	CCTAAACTTGGAGAGAGGAAGAT	181
<i>E. crassus</i> 23	GATA	GATGGGCAGTGATAAAAGTTTGA	GTCACAGTCAGAGTTACACCTC	107
<i>E. crassus</i> 24	GAG	CCCTTGACCTTGGACATCTTC	TTCTGGCTTTCATCGTCTC	182
<i>E. crassus</i> 25	AAT	CCAGGCAGCCTCTGAGAATC	GGAACTCAGAAGCCCCTTGA	154
<i>E. crassus</i> 26	ATG	AGGGTGGTTGTGGGAAAAT	TGGAGGGAGAAGCAGAAGGA	200
<i>E. crassus</i> 27	CCA	GGGTCCTGTTGGAGTGAGTG	TGTCCACCTAGCGAGTCCTT	135
<i>E. crassus</i> 28	TGA	AGGTGGTGTGGAACTTGCA	GAGGCAAAACCACACTGCAG	193
<i>E. crassus</i> 29	AGG	CCAGTCGCCGATTCTCTGT	AATCAAAGCTCCTCCCCTGT	104
<i>E. crassus</i> 30	CAA	AAGCTGGGGTGACAACTCG	GGAGGCAGCAGGGACTTAAA	103
<i>E. crassus</i> 31	GGC	CTGCTGCCCAAGAAGAGGAA	GCCTTTGTCTTCGCCTTTCG	198
<i>E. crassus</i> 32	GTA	TGTGTCTTTCTGGCACATGA	TGCACCATTGGAAGACTGA	189
<i>E. crassus</i> 33	GAT	TCAGTCCAGCTGTCTCCTG	AAACATCTGGCTGACTGGGC	146
<i>E. crassus</i> 34	CAA	CCCAGGAACATCCACACACA	CCCCTTAAGCCTTCAAGTCCC	100
<i>E. crassus</i> 35	TAC	TGAGAGTCAGGTGGCATA CA	GCTTGGCTGCTGTTTCATGC	110
<i>E. crassus</i> 36	ACT	GGCATCAACAGATCAACAGCA	AGAAGATCCCATACAGCTCTCT	108
<i>E. crassus</i> 37	ATC	AAGGAGGACACCAATGCAGAC	GCAGCAGATGGTGTATTTCCC	196
<i>E. crassus</i> 38	AAC	TCGGACACGACTGAACGAC	GCACCATTGGACATGGGCT	146
<i>E. crassus</i> 39	AC	CCCTTGACCTTGGACATCTTC	TGAAATGTACTGGGCATGGTC	209
<i>E. crassus</i> 40	AG	ACACACAACACACGCACATC	ATTCTGTTCCCTGGAAGCCG	140
<i>E. crassus</i> 41	TG	ACTGTTATCAAGCCTGACATAGA	ACCATTGCTTTGCCACA ACT	182
<i>E. crassus</i> 42	AC	AATACAGGAGGCAGGGGGAG	CCAGAATCCCCAGCCAGTT	187
<i>E. crassus</i> 43	TC	GGCCTTTGTTGGAAGCTGGA	TTGCAAAGAAGGACCCCTCC	189
<i>E. crassus</i> 44	CA	AGGACCACCATACAAAGCAGA	GGCTTCAGAAATGGAGAACGTC	196
<i>E. crassus</i> 45	GA	ATTCAACAGGACAGCCACCC	GTGAGCCTCAGTGGTCAAGG	161
<i>E. crassus</i> 46	AC	GGGCGGAGGAAACAAATTGC	CTCCGTCTCTCCGATGCTC	185
<i>E. crassus</i> 47	GA	CCACTTCTGGCTTGTCCC	TTGCAATGCCTACCCCTTGT	169
<i>E. crassus</i> 48	CA	ACTTGTGCGAGCTGTCTTGA	GCAGCGCTCTAACC ACTACA	111
<i>E. crassus</i> 49	AC	GGGCTTCAGAGAATGGCTTGA	GATTCTGACATTGGACCGCC	179
<i>E. crassus</i> 50	AC	GGCAGGCATACTGTTTCCA	GTGAGCTGGACACGTTCTCTT	135
<i>E. crassus</i> 51	TC	ACCATGAGATCAAAGCTGCCA	AGACTGCTGTGTGCGATGTA	186
<i>E. crassus</i> 52	CA	ATGTTTGTGCCAGAGAGACAGA	GGGCAAATGAGGGGCAAGA	176
<i>E. crassus</i> 53	CA	CACTGCCATGCTGTGAAAGIT	GCTCATTAGTTCCTGGTTGCT	135

5.4 Resultados das padronizações dos 53 pares de *primers* desenhados para a espécie *Epicrates crassus*

O primeiro teste de amplificação com os 53 pares de *primers* para a *E. crassus* bem como todos os demais foram realizados com pré-mix IVB (Phoneutria), 10 ng de DNA, 5 pmol de cada *primer*, temperatura de anelamento de 56°C e 30 ciclos. A **Figura 20** ilustra o resultado de amplificação dos 53 pares de *primers* seguido de eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 0,5X, corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV.

Inicialmente foi realizada uma eletroforese com 0,5 µl de *amplicon* para verificar se seria possível a visualização de algum fragmento da reação no gel, seguido de eletroforese de 15 min. Em seguida foram aplicados 10 µl seguido novamente de uma eletroforese de 30 min.

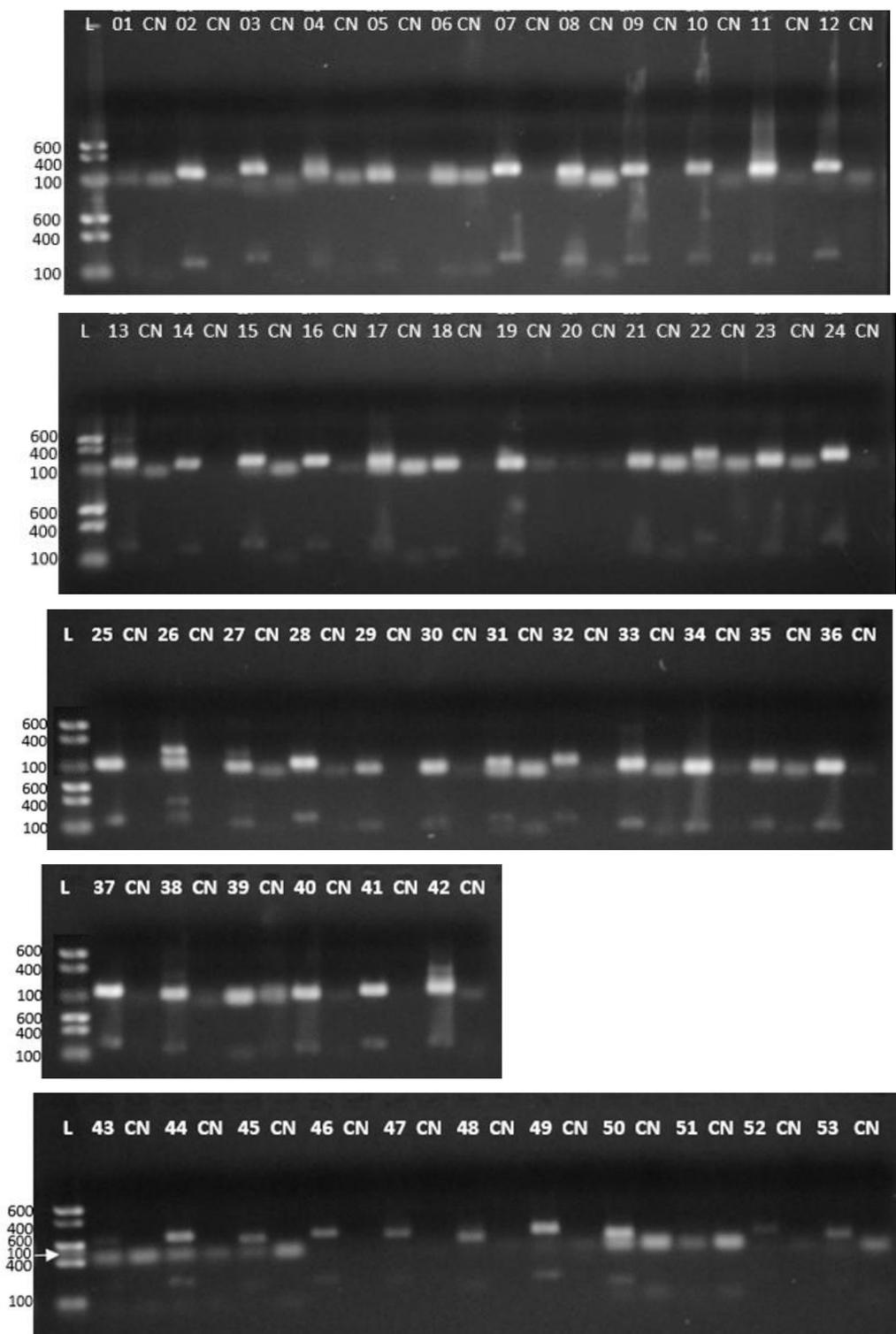


Figura 20: Resultado da amplificação inicial dos 53 pares de *primers* da *E. crassus*. Gel de agarose 1,5% com TBE 0,5X corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV. As bandas inferiores referem-se ao volume de 0,5 μ l de amostra seguido de uma eletroforese de 15 min e em seguida foram aplicados 10 μ l seguidos de eletroforese por 30 min. As reações foram feitas com pré mix IVB 2X, temperatura de anelamento de 56°C, 10 ng de DNA, 5 pmol de cada *primer* e 35 ciclos. **L:** Padrão de peso molecular (600, 400, 100 pb Phoneutria). **01 a 53:** *Primers* da *E. crassus*. **CN:** Controle negativo de cada reação.

As mesmas amostras aplicadas nos géis de agarose mostradas anteriormente também foram aplicados um volume de 5 µl de *amplicons* em gel de poliacrilamida 8% seguido de eletroforese de 1 hora em tampão TBE 1X e os géis foram corados com nitrato de prata conforme mostra a **Figura 21**.

Entre as reações de PCR iniciais e as finais para a padronização dos 53 pares de *primers* foram testadas variações nas temperaturas de anelamento, concentração de DMSO e número de ciclagem. Para cada teste realizado, os *primers* que não geravam amplificações eram retirados das reações posteriores.

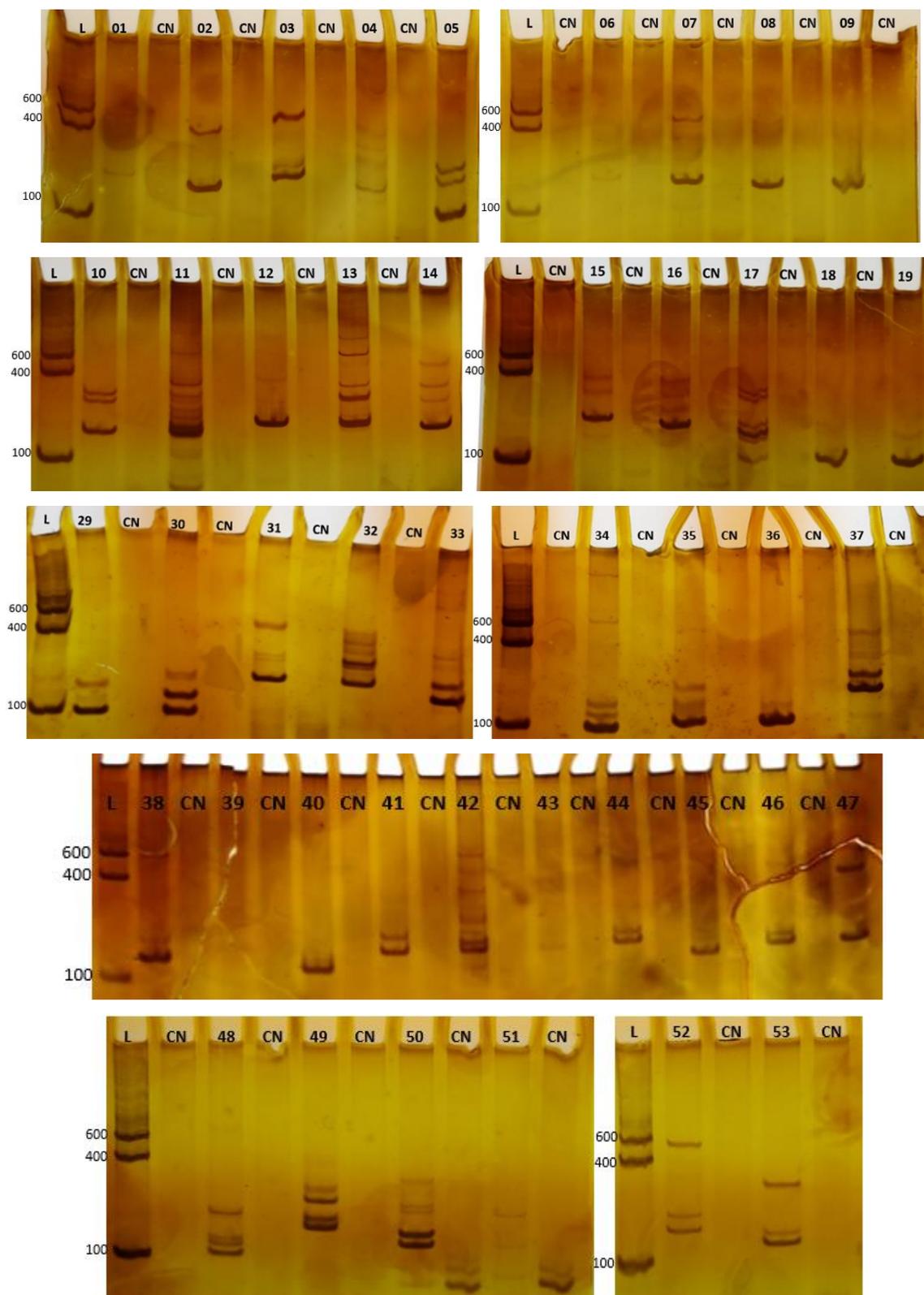


Figura 21: Resultado da amplificação inicial dos 53 pares de *primers* da *E. crassus*. Gel de poliácridamida 8% corado com nitrato de prata. As reações foram feitas com pré mix IVB 2X, temperatura de anelamento de 56°C, 10 ng de DNA, 5 pmol de cada *primer* e 35 ciclos. **L:** Padrão de peso molecular (600, 400, 100 pb (Phoneutria)). **01 a 53:** *Primers E. crassus*. **CN:** Controle negativo de cada reação. O volume aplicado ao gel para cada reação foi de 5 µl.

Todos os testes foram conduzidos utilizando apenas um tipo de pré-mix (IVB - Phoneutria), pois conforme outros trabalhos realizados no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (LBMM) - UFMG, este se mostrou muito eficiente e desta forma a produção fica otimizada e com redução de custos com reagentes. O último teste de amplificação para *E. crassus* foi realizado com pré-mix IVB, 10 ng de DNA, 5 pmol de cada *primer*, temperatura de anelamento de 62°C e 30 ciclos. O uso de uma temperatura mais elevada teve como objetivo aumentar a especificidade da reação sem o uso de DMSO conforme mostrado na **Figura 22** abaixo:

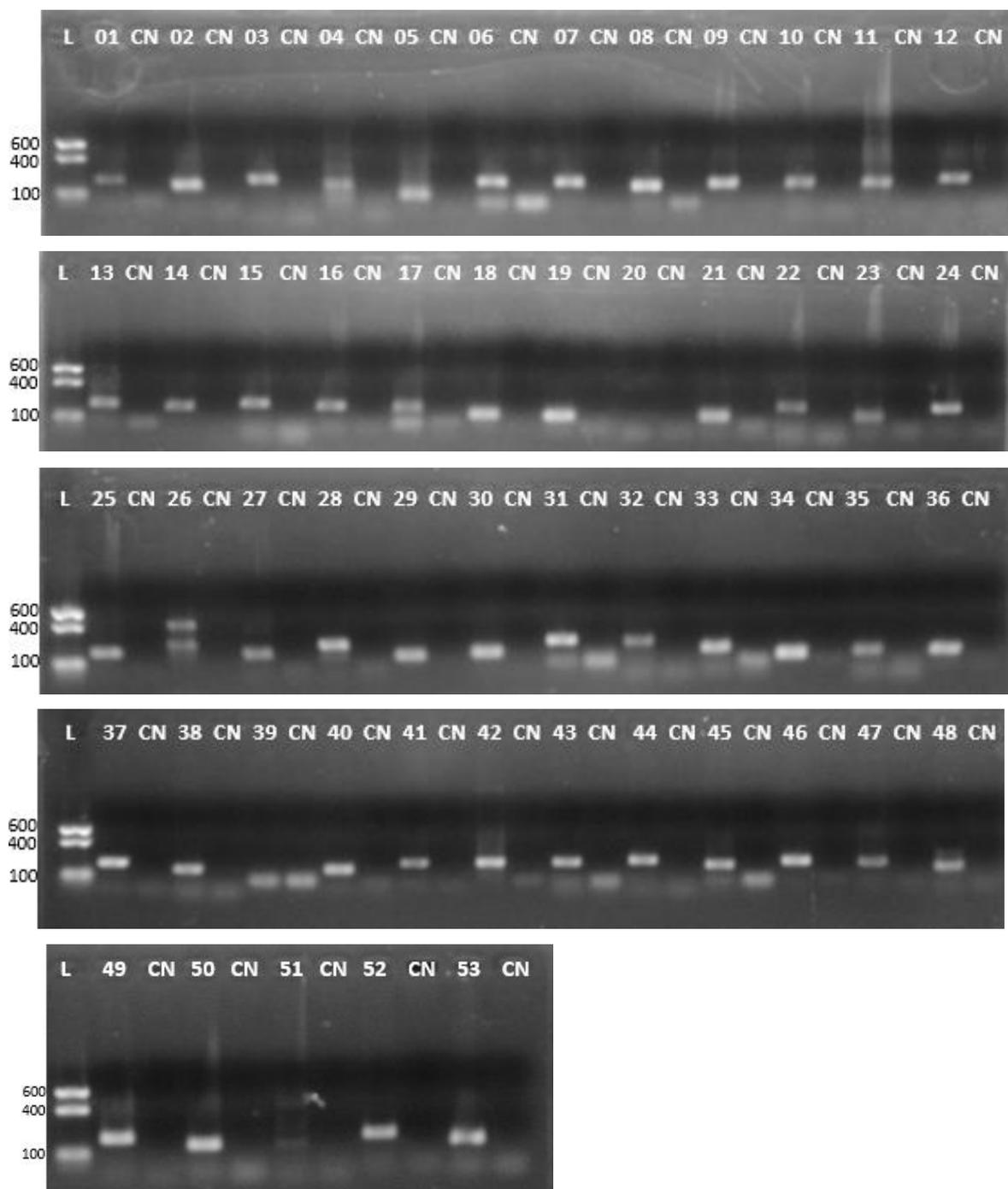


Figura 22: Resultado da amplificação final dos 53 pares de *primers* da *E. crassus*. Gel de agarose 1,5% com TBE 0,5X corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV. As reações foram feitas com pré mix IVB 2X, temperatura de anelamento de 62°C, 10 ng de DNA, 5 pmol de cada *primer* e 30 ciclos. Foram aplicados 10 µl de *amplicons* seguidos de eletroforese por 30 min. **L:** Padrão de peso molecular (600, 400, 100 pb (Phoneutria)). **01 a 53:** *Primers* da *E. crassus*. **CN:** Controle negativo de cada reação.

A seguir são ilustrados na **Figura 23** as mesmas amostras mostradas anteriormente no gel de agarose, mas desta vez as amplificações são visualizadas em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata.

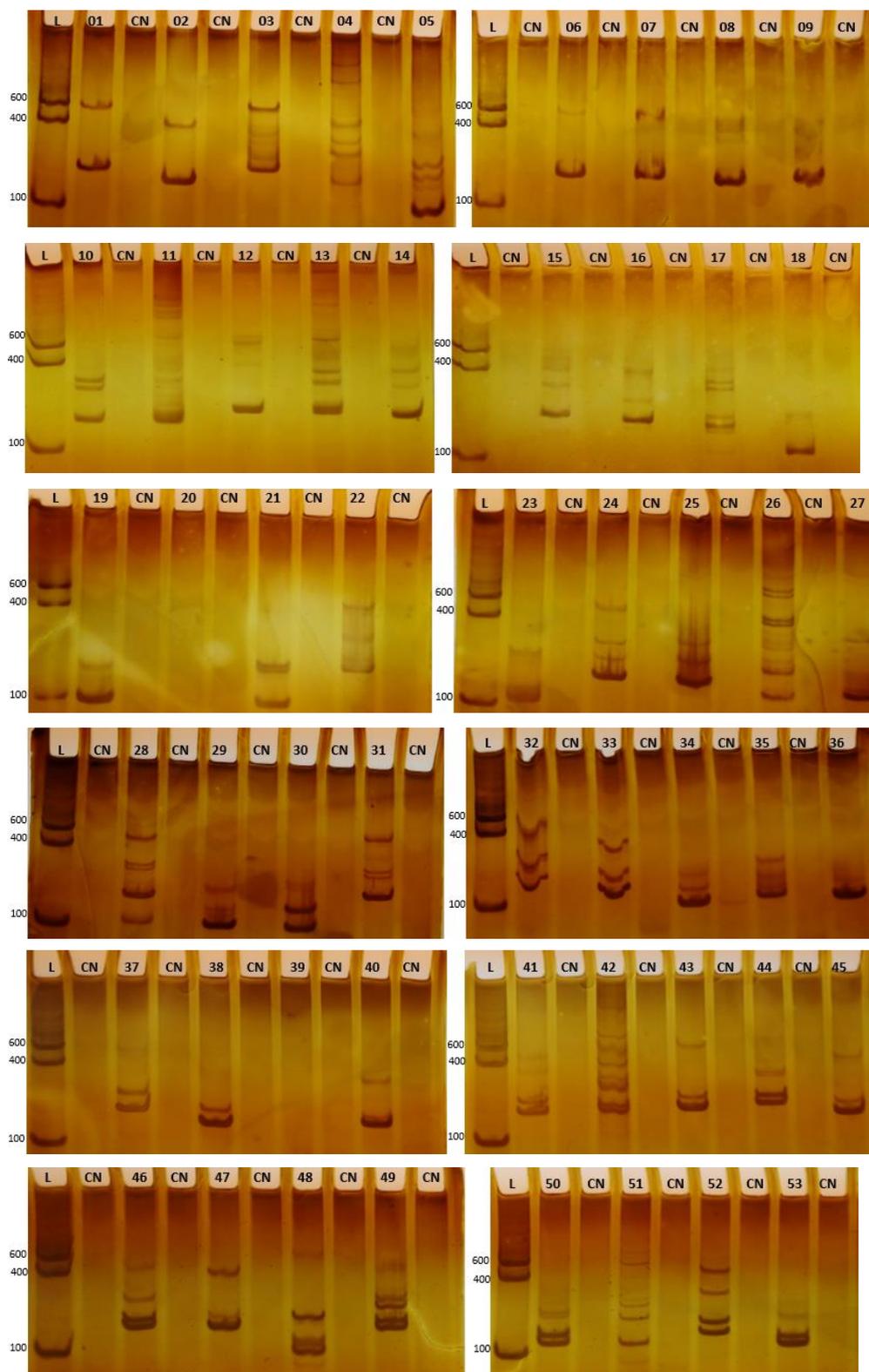


Figura 23: Resultado da amplificação inicial dos 53 pares de *primers* da *E. crassus*. Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. As reações foram feitas com pré mix IVB 2X, temperatura de anelamento de 62°C, 10 ng de DNA, 5 pmol de cada *primer* e 30 ciclos. **L:** Padrão peso molecular (600, 400, 100 pb (Phoneutria)). **01 a 53:** *Primers* da *E. crassus*. **CN:** Controle negativo de cada reação. O volume aplicado ao gel para cada amostra foi de 5 µl.

Além dos resultados mostrados anteriormente, foi testada a mesma reação de PCR com temperatura de anelamento de 62°C e 5% de DMSO, mas não houve uma diferença significativa no padrão de amplificação que pudesse ser alterado para futuras reações. De todas as reações de PCR que foram realizadas, 15 pares de *primers* de *E. crassus* foram selecionados são eles: 05, 07, 08, 09, 14, 16, 18, 25, 27, 30, 35, 36, 38, 40, 45, 48, 49 e 53.

A escolha do Pré mix IVB para a padronização dos *primers* bem como a temperatura inicial de 56° C nas reações de PCRs e 30 ciclos funcionou como um padrão para todas as reações iniciais. A aplicação de 0,5 µl de amplicon na padronização inicial também possibilitou dizer que alguns *primers* como por exemplo *E. crassus* 02, 03, 07, 08, 09, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 40, 41 e 46 funcionam bem em reações com 0,2 ng de DNA.

5.5 Resultados do sequenciamento do DNA total de *Boa constrictor constrictor*

O protocolo de extração diferenciada de mtDNA (Frezza, Cipolat, & Scorrano, 2007) para obtenção de mitocôndrias funcionais foi realizado apenas para a espécie *B. c. constrictor*. Utilizando o protocolo descrito por (Françoso, Gomes, & Arias, 2016) descrito durante o trabalho também foi possível obter bom resultado quando analisada a qualidade do sequenciamento conforme ilustrado na **Figura 24**.

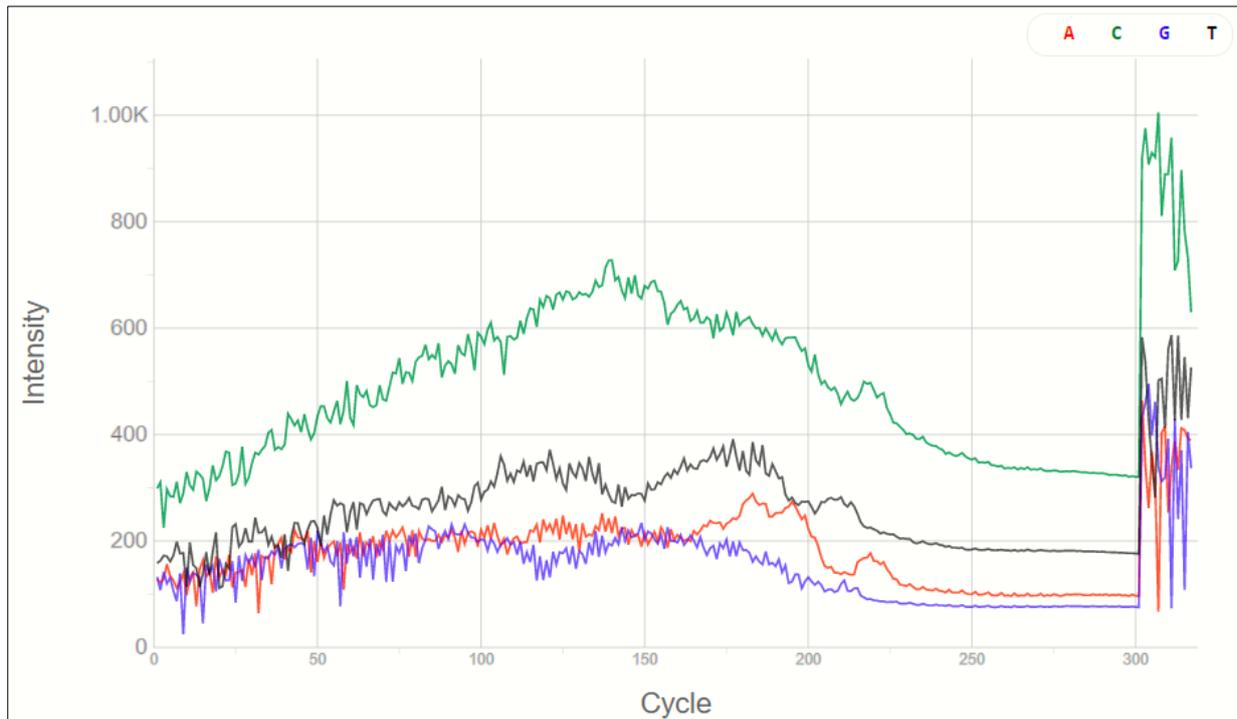


Figura 24: Gráfico mostrando a qualidade das *reads* no sequenciamento de mtDNA de *B. c. constrictor*. Cada linha colorida representa um tipo de base nitrogenada: vermelho (Adenina), verde (Citosina), roxo (Guanina) e preto (Timina).

A montagem do genoma mitocondrial foi realizada no software Geneious 11.1.15 tendo como genoma de referência a *Boa constrictor* (Dong & Kumazawa 2005). O mitogenoma de *Boa constrictor constrictor* (**Figura 25**) após montagem apresentou um tamanho de 18.905 pb bem como os 23 genes de tRNA, 2 genes de rRNA, 13 genes codificadores de proteínas seguidos de duas regiões controle ou D-loop conforme também descritos por (Dong & Kumazawa, 2005) em que foram publicados os genomas mitocondriais de seis serpentes e entre elas, a sequência mitocondrial de *Boa constrictor*.

estão relacionadas com variações nas regiões controle (Kumazawa et al., 1996, Jiang et al., 2007).

A publicação do genoma mitocondrial vai favorecer outras pesquisas relacionadas à espécie bem como o desenvolvimento de marcadores mitocondriais para futuras análises filogenéticas relacionadas à espécie ou alguma espécie próxima. Isto pode ser observado em um estudo desenvolvido por (Hinková e colaboradores de 2009) em foram analisadas 115 amostras representando seis subespécies de *Boa constrictor*, foi sequenciado um fragmento de 1.114 pb do gene Citocromo b e foram detectados 67 haplótipos.

Além das análises filogenéticas, o genoma mitocondrial pode favorecer as autoridades que fiscalizam o comércio destes animais, visto que se trata de uma espécie bastante comercializada tanto de forma legal quanto ilegal, conforme ilustra a **Figura 26** em que espécimes de serpentes são transportados em meias-calças e lençóis de forma clandestina.



Figura 2625: Serpentes comercializadas de forma ilegal. Serpentes (envolvidas por meias-calças) e sapos (envoltos em lençóis) vendidos de forma ilegal e apreendidos na rodoviária de Goiânia. (Fonte <https://g1.globo.com>).

5.6 Microssatélites *B. c. constrictor*

Para o desenho dos microssatélites de *B. c. constrictor* foram pesquisados no National Library of Medicine (NCBI) resultados de sequenciamento genômico e foram encontrados 34 resultados. O título do estudo está descrito como Sequenciamento e montagem usando a plataforma Illumina realizado na Universidade de Duke localizada na cidade de Durhan, na Carolina do Norte em 29 de maio de 2013. O número registrado da corrida é ERR340441 com um tamanho total de 5,7 GB com 7,4 G de bases no endereço: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=boa+constrictor+constrictor++ERR340441>

Este resultado foi submetido ao software SciRoKo 3.4 que identificou 28.201 regiões de microssatélites e destas, 53 regiões foram escolhidas para o desenho dos *primers* com *amplicons* de tamanhos entre 100 pb e 200 pb conforme mostra a **Tabela 06** abaixo:

Tabela 06: Regiões de microssatélites localizadas pelo programa SciRoKo e número de *primers* sintetizados para *B. c. constrictor*.

Tipos de repetições	Microssatélites encontrados pelo SciRoKo	Pares de <i>primers</i> sintetizados
Hexanucleotídeos	6660	1
Pentanucleotídeos	5757	7
Tetranucleotídeos	7072	15
Trinucleotídeos	5789	15
Dinucleotídeos	2923	15
Total	28201	53

Após a localização das regiões de microssatélites, as sequências foram submetidas ao software Geneious 11.1.15 para o desenho dos *primers*. Na **Tabela 07** são apresentados os motivos de repetição de cada microssatélite e se estes motivos são perfeitos ou imperfeitos.

As temperaturas de anelamento de cada *primer* ficaram em torno de 57 a 63°C conforme verificado no *Primer Blast* onde as sequências dos *primers* foram avaliadas com base a sua capacidade de amplificar o fragmento, o tamanho esperado e conteúdo GC entre 30 e 60% para as duas espécies.

Tabela 07: Sequências dos microssatélites e motivos de repetição da *B. c. constrictor*

Nome	Microssatélite	Motivo repetição	Perfeito	Não perfeito	Sequência em pb
Bcc 01	GCAGTTGCAGTTGCAGTTGCAGTTGCAGTTGCA GT	GCAGTT	X		35
Bcc 02	AAAACAAAACAAAACAA	AAAAC	X		17
Bcc 03	GAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGG AAAGGAAAGGAAAGGAAAG	GAAAG	X		50
Bcc 04	GGAAAGGAAAGGAAAG	GGAAA	X		16
Bcc 05	GCTGAGCTGAGCTGAGCT	GCTGA	X		18
Bcc 06	AAATAAAATAAAATAAAATAAAAT	AAATA	X		24
Bcc 07	GAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGG AAAGGAAAGGAAAGGAAAG	GAAAG	X		50
Bcc 08	TCCCATCCCATCCCATCCCAT	TCCCA	X		21
Bcc 09	AATCAATCAATCAATCAATCAATCAAT	AATC	X		27
Bcc 10	AGAAAGAAAGGAAAGAAAGAAAGAAAG	AAGA		X	26
Bcc 11	AGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCA	AGCA	X		32
Bcc 12	AATAAATAAATAAATAAATAAAT	AATA	X		23
Bcc 13	AGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAA AGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAA AGAAAGAAAGAAAGA	AGAA	X		79
Bcc 14	ATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT ATCTATCTATCTATCTATCTATCT	ATCT	X		60
Bcc 15	GTTTGTTTGTTTGTTT	GTTT	X		16
Bcc 16	AGGCAGGCAGGCAGGCAGGCAGG	AGGC	X		23
Bcc 17	AAATAAATAAATAAA	AAATA	X		15
Bcc 18	TATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTT	TATT	X		33

Tabela 08: Sequências e repetições dos 53 pares de *primers* para *B. c. constrictor*

Nome do primer	Motif	Foward	Reverse	Tam. Fragmento (pb)
B.c.c 01	GCAGTT	CAAGAAAGTAGGTCGCCGCC	AGGATGCGGGGAATTGTTGG	144
B.c.c 02	AAAAC	GCCCGTTTCAAAGTTCTGCT	TTCATCATTTCCAAAGCAGACC	102
B.c.c 03	GAAAG	GAAATTTTCACTGGTTGGGTCC	GACGTGTGCTCTTCCGATCT	104
B.c.c 04	GGAAA	GGTTGAGGAGAACAAAAAGCAA	TTCACGGCAACATGGGCT	132
B.c.c 05	GCTGA	GGGAAGTGAGAACATGCAAGAG	CATGTGGATTGCAACTGCCG	101
B.c.c 06	AAATA	ACGTCACGCAGCTTTCTACA	GACTCCCCTTTTACTGAAGACA	159
B.c.c 07	GAAAG	GTCTCTCTCAAGATGGGCTGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGAT	156
B.c.c 08	TCCCA	GCCATCTAGCCTAGTGTAGT	GCCCTTTTATTACAGCAGCATCC	109
B.c.c 09	AATC	TGGGAGACTTGAAAGAAAAGGT	ACCCTCAAATATTGTTGGACCA	182
B.c.c 10	AAGA	AGGATGAGTATAGGGAGCGG	TCTCCCTTTCTACCCCTCTCT	100
B.c.c 11	AGCA	TCATTATCAGCAGAGAGAGGAGG	ACATCTGTTTATTGCTTTGGTG	100
B.c.c 12	AATA	TTGTATGGGAGATGGGCAGG	GGTTATGTGGCGTGACTGGA	100
B.c.c 13	AGAA	TGCTGCATAGCTACAGAAACAA	CCTGTTTTCTCCATGGCAA	186
B.c.c 14	ATCT	CAGCCAAAGGCCAGAGATGA	CTAACCCCTTTCCCAACCCG	191
B.c.c 15	GTTT	AGGCAAAAACACACTGGGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGAT	175
B.c.c 16	AGGC	AAACCCAGAAGAGGAAGCGG	CTCTCCGATCTCTGCCAC	104
B.c.c 17	AAAT	AACAGCGGGTGCAATGTAGA	GCCCTCCTTTCCGATTGTCT	197
B.c.c 18	TATT	GTATCAGTGGCAATCCTTAGC	GCATGTCCAGGAAGTCATCA	114
B.c.c 19	TATT	GACCACACTTTGGACTAGGGG	CAAGTTGGGCGGCAGAGAAA	126
B.c.c 20	AAAC	AAGGAGTTTGCCACCTTGAGT	AGTTCAGACGTGTGCTCTTCC	200
B.c.c 21	TGAA	GCCCAGAGTCACTGGTTTGA	ACGCTCTTCCGATCTCCTCT	111
B.c.c 22	AACA	GGAGTCTGCACATCAGAAGGAA	GGAATAATGGGAGGGCGGAA	183
B.c.c 23	GTTT	GTCAATACCCATCTCCCACGA	CCACATCTCAAGCCGTTTCT	185
B.c.c 24	GCA	AAGCGTGAAAAGAGACAGACTGA	GGCGGGTGAGTGAAATGGTA	174
B.c.c 25	TCT	CACATTTGTGTGATCCCCTGA	CCACTGTACCCTGTGAGTG	132
B.c.c 26	GCC	TGATAGGCTCTCCGGATGGT	CCAGAACACACGGACGCA	170
B.c.c 27	AAG	AATTGTTCAAGCCAGCACAAGA	GCTACAGCCATTTGATTCTTCC	185
B.c.c 28	AAC	TGGCTGATGCCAGTCAGAGT	TGTTGTGCTCCGCCTCAAG	121
B.c.c 29	GCC	CCGTTTCCCTCTTTCCTATCAGA	CAGCGCATAGGAACACGTT	100
B.c.c 30	TGC	AGCCCTGATTAGATAAACCTGA	ACGGTCACATAACAAACCTT	109
B.c.c 31	GAT	CCCTGTTGGTCTACTGAACTT	GTGCCAGGAATGCTTAAATCA	108
B.c.c 32	TGC	ATATGAATCCTTGAGCAGCAGA	TGTTCCACATCAGTCAAGGC	100
B.c.c 33	AGC	GCAGTTATCAGGCACACTCT	GCCTCTGAATGGTAATTTGAGC	154
B.c.c 34	TCA	CAGACTACACTTTCAGCAATTC	CGTAAATCCATTCTCAGCTCA	158
B.c.c 35	GAG	CAACTGACAACCTGTGACTACT	CTTGTAAAAGGACTAAAAGGGC	178
B.c.c 36	CTG	GGTGGTCAACCTGGTTTTCA	GCTCATTGATCATCTGGAGGCA	185
B.c.c 37	AGC	AGGAGGTGGAGGAGCTCAAT	TCTCATGGAAGCTGACTGGT	146
B.c.c 38	AGC	GAAATCCAGCCACTCCCAC	CTGGAGCAGTTTGGCAATGG	138
B.c.c 39	TA	ATCAGAATCCACCAACAGCC	GCTCGGCTTAGACATAAAAACA	116
B.c.c 40	AG	ATGCTATAGGAGAGAGAGAGGG	TCCAAAGAGTAGAGCCGACT	100
B.c.c 41	AC	TCATGTCCGGAAAACAGCC	AATACAGAACACACGCGCAG	100
B.c.c 42	AG	TCTGCTCCTGGTGATTTCCC	TGTTGTGTTGAATCTGGTGGG	100
B.c.c 43	TG	CGGATCACAACCTGGACACCA	ACCTATGCAGAGCTACAGAAAGA	165
B.c.c 44	AC	CCAGCCAACCACTGCCTTTT	ACAACCCCAAAGTGCCAGAG	198
B.c.c 45	AG	GCTGGCCAAAAGGAACAGTC	TGCACCAGGTTACCACTTCT	188
B.c.c 46	AG	TTAGCTGGTCATAGCGCTGG	AGAAGTTGCCGAGAGCCTTC	165
B.c.c 47	TC	TCGAGCTTGTGAGCTGTGTT	GAGCCATTATGCGAGGGAGG	115
B.c.c 48	TG	TTTGCCTAGGCTGGGACAC	GTTGAATTGATTGTTGCACATGCT	120
B.c.c 49	AC	ATGTCGGAAAACAGCCAA	CTGGAGTTCAGACGTGTGCT	169
B.c.c 50	AG	CTCAGCTGCTCTGGTTTCTT	CGCTTGCTGTAGTTTAAAGGGAC	199
B.c.c 51	AC	AATGCATTGAGCACAGGCAG	GGGAATTCGGAACACAGCT	184
B.c.c 52	GA	TCAGACTTTGGTCACAGCTACT	TGGCGGTTGCTAACAAGACA	128
B.c.c 53	AC	ATGACTGCAAAACATAGGGGA	GTGGGAAAGGGCCCTAACTT	146

A grande variação e abundância e os diferentes tamanhos e motivos de repetições de microssatélites nas diferentes espécies podem nos direcionar a bons resultados regiões úteis para estudos posteriores. As abordagens de Sequenciamento de Nova Geração terem tido custos mais baixos, a obtenção de microssatélites tem sido cada vez mais explorado (Allentoft et al. 2009).

Muitos são os softwares especializados para a busca de regiões de microssatélites a partir dos resultados de sequenciamentos. O MSATCOMMANDER foi utilizado nos trabalhos de Chagas, 2015, Pereira, A. H. 2021, Pimentel, et al 2018, porém, o software SciRoKo tem uma plataforma bastante simples e de fácil manuseio. Com ele foi possível obter muitas sequências para ambas as espécies com bons resultados nos testes de PCR.

5.7 Resultados das padronizações dos 53 pares de *primers* de *Boa constrictor constrictor*

Os resultados apresentados a seguir referem-se à amplificação dos 53 pares de *primers* de *B. c. constrictor*. O primeiro teste de amplificação foi uma reação de PCR utilizando pré-mix IVB 2X, temperatura de anelamento de 56°C, 5 pmol de cada *primer*, 10 ng de DNA e 35 ciclos (**Figura 27**). Para esta espécie não foi aplicado o volume de 0,5 µl no gel de agarose, apenas a confirmação do padrão de banda realizada em gel de poliacrilamida 8% corado com prata (**Figura 28**).

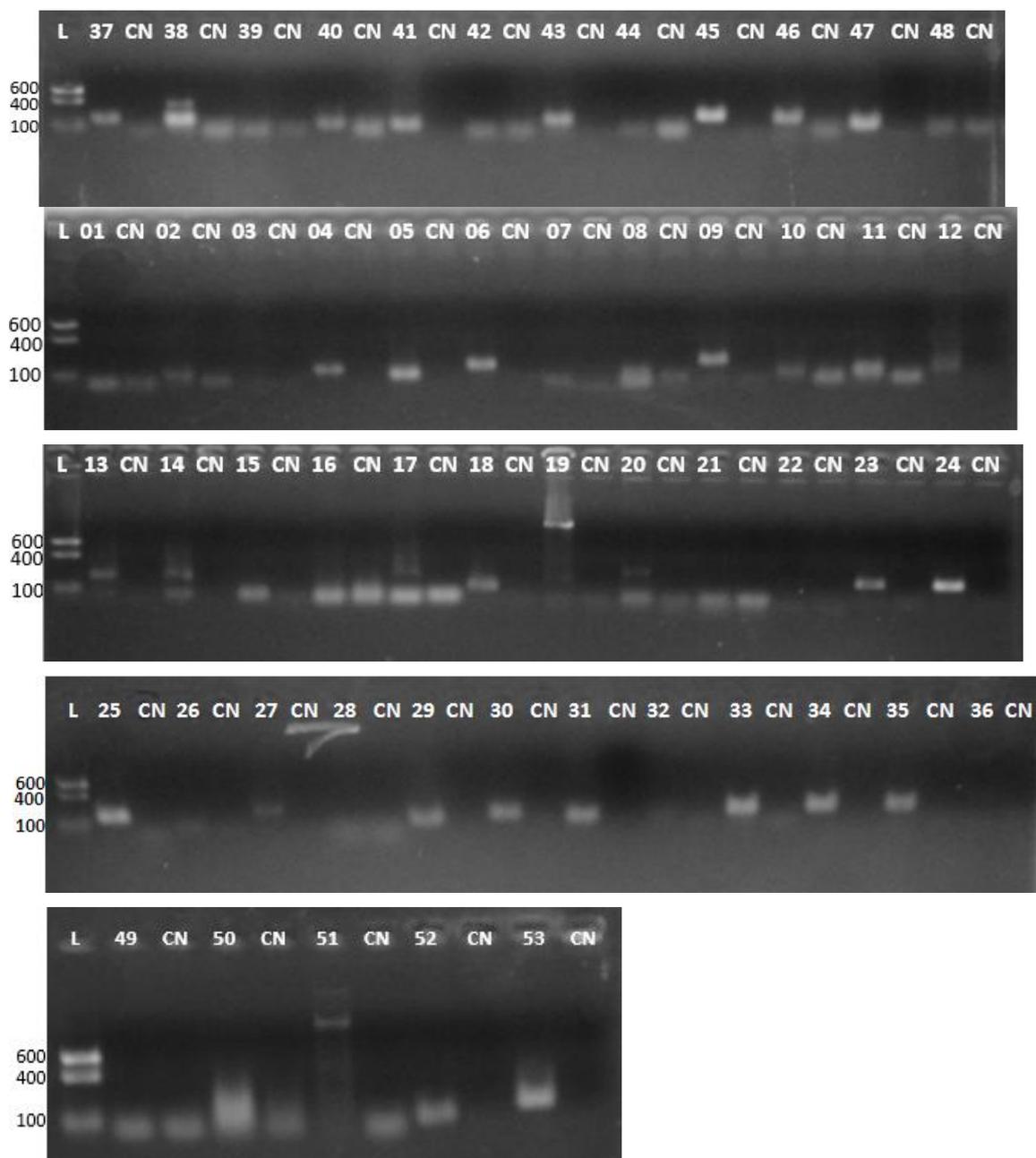


Figura 27: Resultado da amplificação inicial dos 53 pares de *primers* de *B. c. constrictor*. Gel de agarose 1,5% com TBE 0,5X corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV. Foram aplicados ao gel 10 μ l de cada amostra seguido de uma eletroforese de 30 min. As reações foram feitas com pré-mix IVB 2X, 5 pmol de *primer*, 10ng de DNA, temperatura de anelamento de 56°C e 35 ciclos. **L:** Padrão de peso molecular (600, 400, 100 pb - Phoneutria). **01 a 53:** *Primers* de *B. c. constrictor*. **CN:** Controle negativo de cada reação.

A **Figura 28** ilustra as mesmas reações de PCR corridas em gel de agarose mostrados na **Figura 27**, porém, aplicadas ao gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Este procedimento foi realizado para todos os testes de padronização.

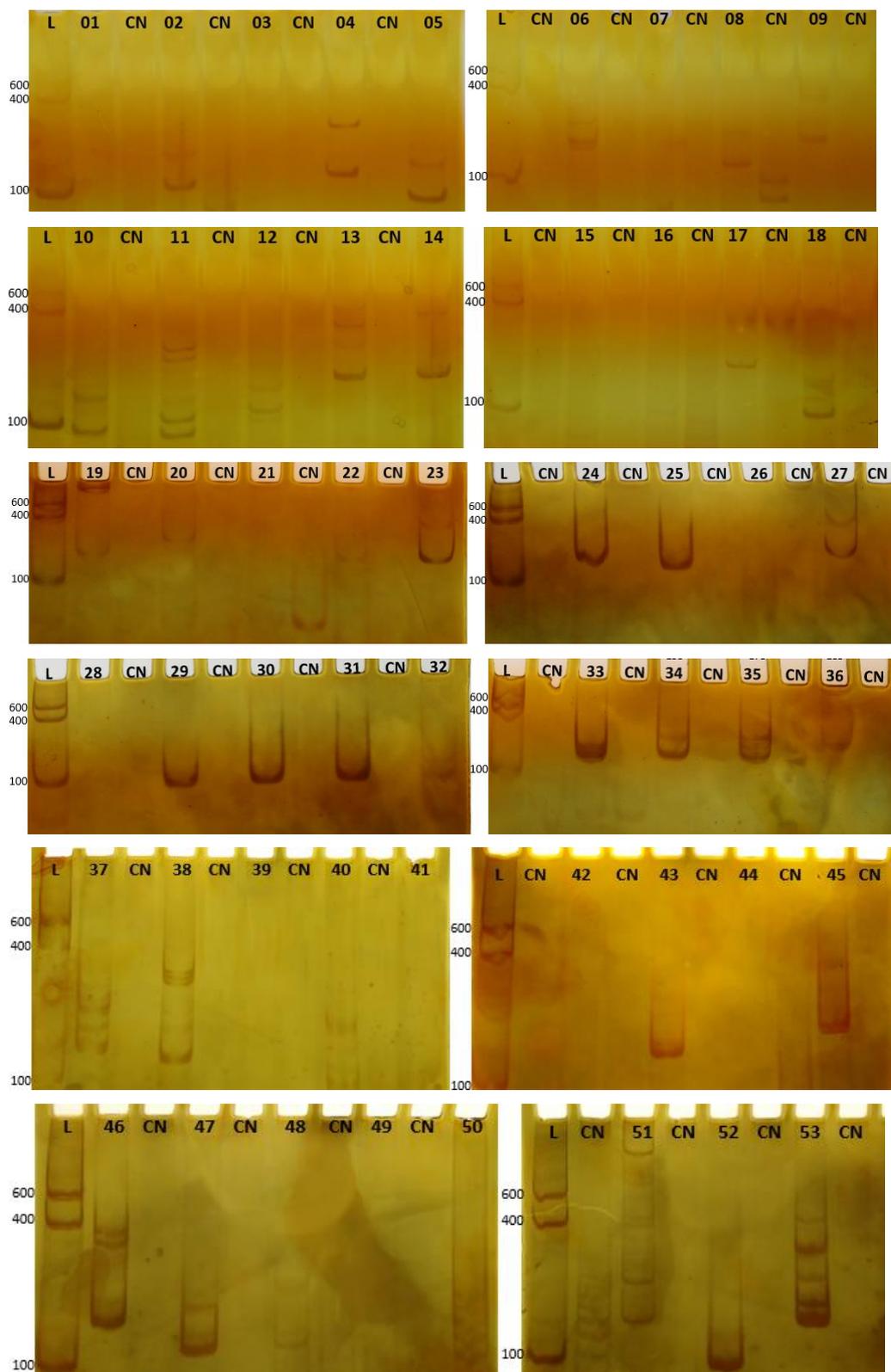


Figura 28: Amplicons produzidos no teste inicial com os 53 pares de *primers* de *B. c. constrictor*. Eletroforese em gel poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. O volume aplicado ao gel para cada amostra foi de 5 μ l. As reações foram feitas com pré-mix IVB 2X, 5 pmol de cada *primer*, 10 ng de DNA, temperatura de anelamento de 56°C e 35 ciclos. **L:** Padrão de peso molecular 600,400, 100 pb - Phoneutria). **01 a 53:** *Primers* de *B. c. constrictor*. **CN:** Controle negativo de cada reação.

Para a espécie *B. c. constrictor* a padronização das reações de PCR utilizando 5% de DMSO não foram realizadas com todos os *primers*, pois de acordo com os resultados dos testes iniciais, não ocorreu amplificação de todos os *primers*. A **Figura 29** ilustra a amplificação dos 21 pares de *primers* selecionados com seus respectivos controles negativos.

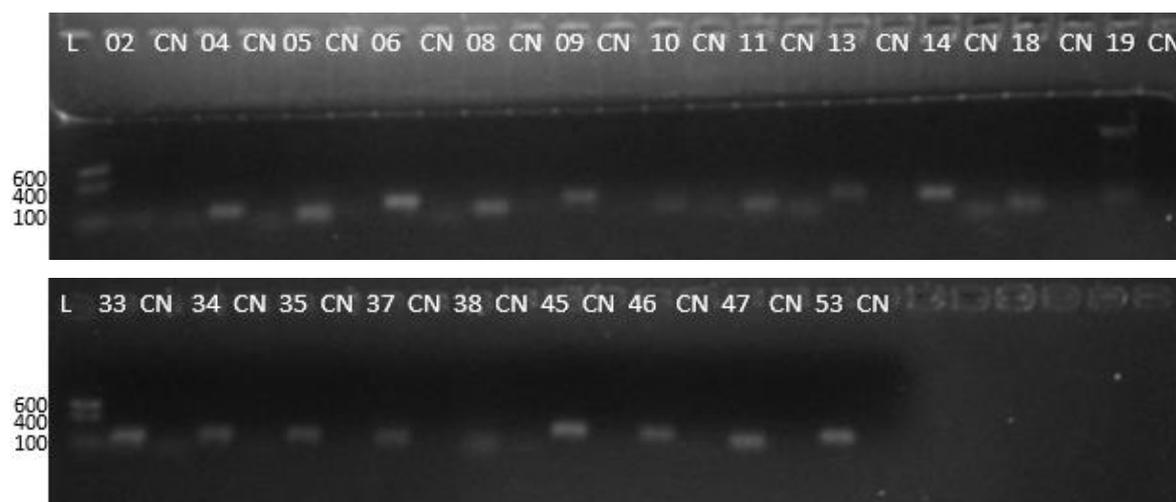


Figura 29: Amplicons produzidos com os 21 pares de *primers* da *B. c. constrictor*. Eletroforese de 30 min em gel agarose 1,5%, tampão TBE 1,5X e revelado em luz UV. As reações foram feitas com pré-mix IVB 2X, 5 pmol de cada *primer*, 10 ng de DNA, temperatura de anelamento de 62°C e 30 ciclos. O volume aplicado ao gel para cada amostra foi de 10 µl. **L** - Padrão de peso molecular (600, 400, 100 pb – Phoneutria). **02 a 53:** *Primers B. c. constrictor*. **CN:** Controle negativo de cada reação.

A partir destes resultados, 15 pares de *primers* durante os testes mostraram melhores amplificações e foram selecionados são eles: 02, 04, 05, 06, 08, 18, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 33, 47 e 53. Os *primers* 23, 24, 25, 29, 30 e 31 não estão presentes na **Figura 29**, mas apresentaram boas amplificações em testes anteriores.

Algo observado sem o auxílio de algum programa durante o a seleção dos *primers* foi se a região a ser amplificada não tinha outros tipos de repetições de microssatélites que pudesse ocasionar duplicidade de fragmentos no gel de agarose. De acordo com (Pimentel, et, al 2018) nem sempre é fácil a escolha de regiões para genotipagem, pois, demanda de uma boa calibração e este processo pode ser caro. A otimização inicial alinhada a uma boa escolha dos *primers* favorece os bons

resultados. Quando se tem um número grande de regiões conforme identificadas pelo software SciRoKo 3.4 para ambas as espécies, é mais trabalhosa a procura pelas melhores regiões, mas ao mesmo tempo as chances de se encontrar uma região que seja espécie específica em questão se torna ainda maior. Não foi o que aconteceu durante a realização deste trabalho, pois a procura por um *primer* espécie-específico demanda de testes com outras espécies e outros indivíduos parentes e isso não chegou a ser realizado. Dos 53 pares de *primers* foram selecionadas 15 regiões que podem posteriormente serem utilizadas e mais bem exploradas para verificar a paternidade de outros indivíduos bem como a variabilidade genética da espécie.

Apesar da seleção de 15 pares para ambas as espécies de acordo com o padrão de fragmento apresentado nos géis, estes *primers* não foram testados em outras espécies. Isso implica dizer que outros estudos podem ser conduzidos explorando a heterogeneidade e a riqueza alélica que pode ser encontrada com o uso destes marcadores. O objetivo deste trabalho foi desenvolver estes marcadores bem como efetuar a montagem dos mitogenomas das espécies, mas a partir daqui amplos estudos podem ser desenvolvidos tanto no âmbito dos microssatélites, quanto ao desenvolvimento de marcadores mitocondriais para enriquecer ainda mais os bancos de dados tanto no âmbito filogenéticos relacionados a estas espécies bem como as demais advindas destas ou que possuem algum grau de parentesco com elas.

6.0 Conclusão

Das quatro metodologias de extração de DNA, aquela que mostrou melhor rendimento foi o protocolo de Fenol e clorofórmio para o isolamento do DNA de *Boa constrictor constrictor* e *Epicrates crassus* seguido da purificação com Sephacryl. A extração de DNA mitocondrial (apenas para a espécie *Boa constrictor constrictor*) também apresentou excelente resultado sendo possível o sequenciamento e a montagem do seu genoma mitocondrial.

Os resultados obtidos com os genomas mitocondriais das espécies podem auxiliar pesquisadores no desenvolvimento de marcadores mitocondriais específicos e futuros testes de variabilidade genética bem como estudos de filogenia até mesmo de morfologia das espécies visto que mtDNA é mais passível de mutações.

A partir dos dados do sequenciamento genômico de *E. crassus* e do resultado obtido do Banco de dados NCBI de *B. c. constrictor* foi possível o desenho de 53 *primers* e escolha de 15 deles para cada uma das espécies.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram milhares de regiões de microssatélites para as espécies *B. c. constrictor* bem como para *E. crassus*. Estes marcadores ainda necessitam ser avaliados em relação a diversos parâmetros como: serem testados em espécies diferentes, variabilidade genética e número de alelos e amplificação cruzada com outras espécies, mas estes se mostram ferramentas essenciais para estudos de diversidade genética.

7. Referências Bibliográficas

Ahmad SF, Singchat W, Panthum T, Srikulnath K. Impact of Repetitive DNA Elements on Snake Genome Biology and Evolution. *Cells*. 2021 Jul 6;10(7):1707. doi: 10.3390/cells10071707. PMID: 34359877; PMCID: PMC8303610.

Allentoft ME, Schuster SC, Holdaway RN, et al. Identification of microsatellites from an extinct moa species using high-throughput (454) sequence data. *BioTechniques*. 2009; 46:195–200

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

Bacher, J. W., Hennes, L. F., Gu, T., Tereba, A., Micka, K. A., Sprecher, C. J., ... Schumm, J. W. (1999). Pentanucleotide Repeats: Highly Polymorphic Genetic Markers Displaying Minimal Stutter Artifact. *Promega Corporation*, 24–37.

Ballard, J.W.O. & Whitlock, M.C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13(4): 729-744.

Bedore, A. G. et al. (2017) 'Leporinus elongatus (Characiformes , Anostomidae): complete mtDNA sequence of an economically important fish from the Paraná and La Plata river basins', *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, 2(1), pp. 261–263. doi: 29 10.1080/23802359.2017.1318685.

Bento, H. J., Ferreira, A., Curcio, F. F., Mehanna, M., & Iglesias, G. A. (2019). Aspectos da biologia reprodutiva de *Boa constrictor constrictor*: um estudo histológico dos. 1551–1557.

Bernt M, Donath A, Jühling F, Externbrink F, Florentz C, Fritsch G, Pütz J, Middendorf M, Stadler PF. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol Phylogenet Evol*. 2013 Nov; 69(2):313-9. doi: 10.1016/j.ympev.2012.08.023. Epub 2012 Sep 7. PMID: 22982435.

Boletim Informativo BI - CISS/12 Centro de Informação em Saúde Silvestre) - fevereiro 2019. Tráfico de animais silvestres traz riscos à biodiversidade e ameaças à saúde silvestre e humana Parcerias apoiam órgãos de controle de tráfico animais silvestres. 3–4.

Brown WM, George MJr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979; 76: 1967-1971

Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. 2003. Forensics and mitochondrial DNA: applicatios, debates and foundations. Annual Review of Genomics and human genetics 4(1):119-141.

Castoe TA, Poole AW, de Koning AP, Jones KL, Tomback DF, Oyler-McCance SJ, Fike JA, Lance SL, Streicher JW, Smith EN, Pollock DD. Rapid microsatellite identification from Illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. PLoS One. 2012;7(2): and 30953. doi: 10.1371/journal.pone.0030953. Epub 2012 Feb 14.

Chagas, A. T. de A. (2015). Caracterização de marcadores moleculares com aplicabilidade para identificação de duas espécies de peixe com interesse forense: *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus costatus*.

Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA. 1974; 71:2777-2781.

Criatório Jiboias Brasil. Disponível em www.jiboiasbrasil.com.br. Acesso em 04/01/2020.

Dong S, Kumazawa Y. Complete mitochondrial DNA sequences of six snakes: phylogenetic relationships and molecular evolution of genomic features. J Mol Evol. 2005 Jul;61(1):12-22. doi: 10.1007/s00239-004-0190-9. Epub 2005 Jun 29. PMID: 16007493.

Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *NatureReviews*, 5(June), 435–445. <http://doi.org/10.1038/nrg1348>

Françoso, E., Gomes, F., & Arias, M. C. (2016). A protocol for isolating insect mitochondrial genomes: A case study of NUMT in *Melipona flavolineata* (Hymenoptera: Apidae). *Mitochondrial DNA*, 27(4), 2401–2404. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1028049>.

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. 2003. ExPASy:

the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788

Gomes N, Puerto G, Buononato MA, Ribeiro MFM. 1989. Atlas Anatômico de *Boa constrictor* Linnaeus, 1758 (Serpentes; Boidae). Monogr Inst Butantan, São Paulo. 59p.

Guichoux E, Lepoittevin C. and Revardel E. (2011) Current trends in microsatellite genotyping. 591– 611.

Frezza, C., Cipolat, S., & Scorrano, L. (2007). Organelle isolation: Functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature Protocols*, 2(2), 287–295. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.478>.

Illumina. 2016. Data sheet: DNA sequencing - Nextera DNA library preparation kits. 2 p.

Herrmann, B.G. & Frischauf, A. 1987. Isolation of genomic DNA. *Methods in Enzymology*, 152(1987): 180-183.

Jiang, Z. J.; Castoe, T. A.; Austin, C. C.; Burbrink, F. T.; Herron, M. D.; McGuire, J. A.; Parkinson, C. L.; Pollock, D. D. Comparative mitochondrial genomics of snakes: extraordinary substitution rate dynamics and functionality of the duplicate control region. *BMC Evolutionary Biology*, v. 23, n. 7, p. 1-14, 2007.

Kumazawa, Y.; Ota, H., Nishida, M.; Ozawa, T. Gene rearrangements in snake mitochondrial genomes: highly concerted evolution of control-region-like sequences duplicated and inserted into a tRNA gene cluster. *Molecular Biology and Evolution*, v. 13, n. 9, p. 1242-1254, 1996.

Kofler, R., Schlötterer, C., & Lelley, T. (2007). SciRoKo: A new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics*, Volume 23, Issue 13, July 2007, Pages 1683–1685, [DOI](#)

Kumazawa, Y., Ota, H., Nishida, M., & Ozawa, T. (1998). The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions. *Genetics*, 150(1), 313–329.

Lemos Queiroz, A. L. et al. (2018) 'Complete mitochondrial genome sequence of *Myrmecophaga tridactyla* from Brazilian Savanna', *Mitochondrial DNA Part B*:

Resources. Informa UK Ltd., 3(2), pp. 681–682. doi: 10.1080/23802359.2018.1481785.

Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações / Andreia Carina Turchetto-Zolet, Caroline Turchetto, Camila Martini Zanella e Gisele Passaia (organizadores). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.

Linacre, A. & Tobe, S.S. 2011. An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science. *Investigative Genetics*, 2(1): 1-9.

Nierman, W. C.; Eisen, J. A.; Fleischmann, R. D. et al. Genome data: what do we learn? *Curr Opin Struct Biol*, v. 10, p. 343-348, 2000.

Passos, P.; Fernandes, R. Revision of the *Epicrates cenchria* complex (Serpentes: Boidae). *Herpetological Monographs*, v. 22, n. 1, p. 1-30, 2008.

Pereira, A. H. Impacto de Usinas Hidrelétricas e do rompimento de Barragem de Rejeitos na estrutura genética populacional de peixes: Um estudo com *Prochilodus costatus* no Rio Paraopeba.

Pimentel, J. S. M., Carmo, A. O., Rosse, I. C., Martins, A. P. V., Ludwig, S., Facchin, S., Kalapothakis, E. (2018). High-throughput sequencing strategy for microsatellite genotyping using neotropical fish as a model. *Frontiers in Genetics*, 9(MAR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00073>

Pizzatto L. Ecomorfologia e estratégias reprodutivas nos Boidae (Serpentes), com ênfase nas espécies neotropicais. 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Faculdade de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

Pizzato, L.; Marques, O. A. V; Facure, K. Food habits of Brazilian boid snakes: overview and new data, with special reference to *Corallus hortulanus*. *Amphibia-Reptilia*, v. 30, n. 4, p. 533-544, 2009.

Rede de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres (RENCTAS). Vida silvestre: o estreito limiar entre preservação e destruição. Diagnóstico do tráfico de animais silvestres na Mata Atlântica: Corredores Central e Serra do Mar. Coordenação e organização de Angela Maria Branco. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.renctas.org.br/wp-content/uploads/2014/10/livro-renctas-final.pdf> >.

Reptile DataBase. Disponível em: <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>. Acesso em: 12 de outubro de 2019.

Reynolds, R.G.; Niemiler, M.L.; Revell, L.J. 2014. Toward a Tree-of-Life for the boas and pythons: multi locus species-level phylogeny with unprecedented taxon sampling. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 71: 201–213

Sambrook J, Fritsch, E.F. & Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 628 p.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

Scartozzoni, R. R., & Molina, F. B. (2004). Comportamento alimentar de *Boa constrictor*, *Epicrates cenchria* e *Corallus hortulanus* (Serpentes : Boidae) em Cativeiro. *Revista de Etologia*, 6(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.cali.2011.01.005>.

Sequencing Library Preparation. Disponível em: https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf. Acesso em 02/06/2020.

Vartia, S., Collins, P. C., Cross, T. F., Fitzgerald, R. D., Gauthier, D. T., Mc Ginnity, P., Carlsson, J. (2014). Multiplexing with three-*primer* PCR for rapid and economical microsatellite validation. *Hereditas*, 151(2–3), 43–54. <http://doi.org/10.1111/hrd2.00044>

Vitt, L. J., and J. P. Caldwell. 2014. *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Fourth Edition. Amsterdam: Elsevier.

Viviane Campos Garcia. (2012). *Avaliações ultrassonográficas dos ciclos reprodutivos das serpentes Boidae Neotropicais* Dissertação apresentada ao Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo.

Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*. 2019 Apr 25;8(4):379. doi: 10.3390/cells8040379. PMID: 31027297; PMCID: PMC6523345.

Yazbeck, G. M., and Kalapothakis, E. (2007). Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Genet. Mol. Res.* 5, 1026–1034