



Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Genética e Evolução

Origem e diferenciação do sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais. Análises comparativas entre espécies de répteis e aves

Prínciã Grejo Setti

Dissertação de Mestrado

São Carlos, 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

PRÍNCIA GREJO SETTI

ORIGEM E DIFERENCIAÇÃO DO SISTEMA ZZ/ZW DE
CROMOSSOMOS SEXUAIS. ANÁLISES COMPARATIVAS
ENTRE ESPÉCIES DE RÉPTEIS E AVES

SÃO CARLOS -SP

2025

PRÍNCIA GREJO SETTI

**ORIGEM E DIFERENCIAÇÃO DO SISTEMA ZZ/ZW DE CROMOSSOMOS
SEXUAIS. ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE ESPÉCIES DE RÉPTEIS E AVES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular ao Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Genética e Evolução.

Orientador: Marcelo de Bello Cioffi

SÃO CARLOS -SP

2025

Identificação Bibliográfica

Nome e sobrenome: **Príncia Grejo Setti**

Título da Dissertação: **Origem e diferenciação do sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais. Análises comparativas entre espécies de répteis e aves**

Título da Dissertação em inglês: **Origin and Differentiation of the ZZ/ZW Sex Chromosome System: Comparative Analyses among Reptile and Bird Species**

Programa de estudo: **Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular**

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi**

Ano de início: **2023**

Ano da defesa: **2025**

“Todos temos luz e trevas dentro de nós. O que importa é o lado o qual decidimos agir. Isso é o que realmente somos.”

(HARRY POTTER E A ORDEM DA FÊNIX. Direção: David Yates. Reino Unido, Estados Unidos: Warner Bros, 2007. 1 DVD)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Relatório de Defesa de Dissertação

Candidata: Prínci Grejo Setti

Aos 31/10/2025, às 09:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, a defesa de dissertação de mestrado sob o título: Origem e diferenciação do sistema ZZ/ZW de cromossomos sexuais: análises comparativas entre espécies de répteis e aves, apresentada pela candidata Prínci Grejo Setti. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca

Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi
Profa. Dra. Vanessa Bellini Bardella
Profa. Dra. Marie Altmanová

Função Instituição

Presidente UFSCar
Titular UNESP
Titular CAS

Conceito

APROVADO
APROVADO
APROVADO

Resultado

Final
APROVADO

Parecer da Comissão Julgadora*:

A BANCA AVALIOU DE FORMA POSITIVA A TESE APRESENTADA, A APRESENTAÇÃO FEITA E OS RESULTADOS GERADOS.

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Ivanildes Menezes, representante do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi

Representante do PPG: Ivanildes Menezes

Profa. Dra. Vanessa Bellini Bardella

Profa. Dra. Marie Altmanová

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Marie Altmanová e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ao) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste re

Documento assinado digitalmente

gov.br

MARCELO DE BELLO CIOFFI
Data: 31/10/2025 10:39:31-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi

() Não houve alteração no título () Houve alteração no título. O novo título passa a ser:

Observações:

- a) Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.
b) Para gozar dos direitos do título de Mestre ou Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, o candidato ainda precisa ter sua dissertação ou tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da UFSCar, meu reconhecimento pela formação sólida e pelo ambiente de crescimento científico. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsa de mestrado concedida (processo nº 2022/12296-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP));

Ao meu orientador, professor Marcelo, obrigada por ter confiado no meu potencial, pela paciência nas horas difíceis e pelo incentivo constante a pensar de forma crítica e autônoma. Sua orientação foi essencial em cada etapa deste processo.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente Geize e Alan, obrigada pela troca de conhecimentos, pelos risos partilhados e pelo apoio nos momentos mais puxados. À Marina e Mayara, pelo suporte técnico e pela disposição em ajudar sempre que precisei.

Aos amigos da graduação, que plantaram as primeiras sementes do que sou hoje como cientista: obrigada pela amizade, pelas discussões e pelo companheirismo que se estende até hoje.

À minha família, meu alicerce. Ao meu irmão Paulo e à minha irmã Paula, por estarem sempre ao meu lado, torcendo por mim, mesmo nos momentos em que eu mesma duvidei. À minha mãe, pelo amor incondicional e pela força que me inspira todos os dias. À minha avó, por todo carinho.

Ao meu pai, mesmo ausente fisicamente, sua presença me acompanhou em silêncio em cada página escrita, em cada conquista alcançada. Sua memória segue viva em mim, e esta conquista também é sua. E aos meus sobrinhos Gabriel e Arthur, que com a leveza e alegria da infância me lembram constantemente do que realmente importa. Vocês são uma luz nos meus dias. Agradeço também minha fiel companheira de quatro patas, Serena, que, com sua presença e carinho, trouxe leveza nos dias mais cansativos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta jornada: meu muito obrigada.

RESUMO

1
2 Os cromossomos sexuais constituem estruturas altamente dinâmicas nos vertebrados,
3 apresentando trajetórias evolutivas distintas entre linhagens. Esta dissertação investigou a
4 origem e a diferenciação do sistema ZZ/ZW em aves Palaeognathae e serpentes da família
5 Colubridae, com foco na caracterização de DNAs satélites e outros elementos repetitivos.
6 Foram aplicadas abordagens integrativas de citogenética clássica, hibridização in situ (FISH,
7 CGH) e análises genômicas de baixa cobertura. Nas aves, observou-se desde cromossomos
8 sexuais homomórficos em ratitas até forte heteromorfia em Tinamiformes, indicando diferentes
9 estágios de diferenciação. Em serpentes do gênero *Ptyas*, identificou-se cromossomos W pouco
10 diferenciados morfológicamente, mas enriquecidos em heterocromatina e sequências
11 repetitivas, sugerindo que a heterocromatinização precede a heteromorfia visível. Os resultados
12 evidenciam que a evolução dos cromossomos sexuais não segue um padrão único, sendo
13 modulada por múltiplos fatores históricos e ecológicos. Este trabalho contribui para a
14 compreensão da diversidade evolutiva dos sistemas ZW e reforça a importância de estudos
15 comparativos integrando citogenética, genômica e biologia evolutiva.

16 **Palavras-chave:** Cromossomos sexuais; DNA satélite; heterocromatina; evolução
17 cromossômica; sistema ZW

Abstract

18 Sex chromosomes are highly dynamic structures in vertebrates, showing distinct evolutionary
19 trajectories across lineages. This dissertation investigated the origin and differentiation of the
20 ZZ/ZW system in Palaeognathae birds and Colubridae snakes, focusing on the characterization
21 of satellite DNAs and other repetitive elements. An integrative approach combining classical
22 cytogenetics, in situ hybridization (FISH, CGH), and low-coverage genomic analyses was
23 applied. In birds, sex chromosomes ranged from homomorphic in ratites to highly
24 heteromorphic in Tinamiformes, indicating different stages of differentiation. In *Ptyas* snakes,
25 W chromosomes showed little morphological divergence from Z, but were enriched in
26 heterochromatin and repetitive sequences, suggesting that heterochromatinization may precede
27 visible heteromorphy. The results demonstrate that sex chromosome evolution does not follow
28 a single pattern but is shaped by multiple historical and ecological factors. This work
29 contributes to the understanding of the evolutionary diversity of ZW systems and highlights the
30 relevance of comparative studies integrating cytogenetics, genomics, and evolutionary biology.

31 **Keywords:** Sex chromosomes; satellite DNA; heterochromatin; chromosome evolution; ZW
32 system

- 34 **Figura 1:** Distribuição geográfica de Palaeognathae, mostrando espécies codificadas por cores
 35 com base em sua ocorrência geográfica: *Struthio* (roxo), *Apteryx* (verde), *Casuarius* (azul),
 36 *Dromaius* (laranja), *Crypturellus* (verde claro) e *Rhea* (rosa). A árvore de espécies datada foi
 37 obtida de (Prum et al., 2015). Idiogramas representativos para os cromossomos sexuais Z (azul
 38 claro) e W (vermelho claro) são fornecidos, juntamente com informações sobre seus padrões
 39 de bandas C (preto) (exceto para *Apteryx*). Os dados foram recuperados de (De Boer, 1980;
 40 Nishida-Umehara et al., 2007; Pigozzi, 2011 e dados atuais). Uma escala geológica com
 41 períodos-chave é representada à esquerda (N = Neógeno; P = Paleógeno).31
- 42 **Figura 2:** Metáfases femininas do emu destacando a localização cromossômica de 23
 43 DnoSatDNAs. Seus nomes de família estão indicados no canto inferior direito, em verde
 44 (marcado com Atto488-dUTP) ou vermelho (marcado com Atto550-dUTP). Enquanto o
 45 cromossomo W foi adequadamente identificado por uma hibridização sequencial com o
 46 microssatélite (GA)_n, o cromossomo Z não pôde ser identificado adequadamente com base em
 47 sua morfologia. Barra = 10 µm.....34
- 48 **Figura 3:** Metáfases femininas do emu destacando a localização cromossômica das repetições
 49 de microssatélites, indicadas em vermelho no canto inferior direito. Enquanto o cromossomo
 50 W foi identificado adequadamente por uma hibridização sequencial com o microssatélite
 51 (GA)_n, o cromossomo Z não pôde ser identificado adequadamente com base em sua
 52 morfologia. Barra = 10 µm.....35
- 53 **Figura 4:** Metáfases femininas de emu destacando a localização cromossômica das repetições
 54 de microssatélites. Os microssatélites estão indicados em vermelho no canto inferior direito.
 55 Enquanto o cromossomo W foi identificado adequadamente por uma hibridização sequencial
 56 com o microssatélite (GA)_n, o cromossomo Z não pôde ser identificado adequadamente com
 57 base em sua morfologia. Barra = 10 µm.....36
- 58 **Figura 5:** Metáfases femininas do inhambu-chintã destacando a localização cromossômica das
 59 repetições de microssatélites. Os microssatélites estão indicados em vermelho no canto inferior
 60 direito. Enquanto o cromossomo W foi identificado adequadamente por uma hibridização
 61 sequencial com o microssatélite (GA)_n, o cromossomo Z não pôde ser identificado
 62 adequadamente com base em sua morfologia. Barra = 10 µm.....37
- 63 **Figura 6:** Hibridização genômica intraespecífica com sondas de gDNA de machos e fêmeas de
 64 emu hibridizadas em cromossomos metafásicos femininos (**ad**). (**a**) Metáfases coradas com
 65 DAPI da fêmea de emu, (**b**) padrão de hibridização da sonda derivada de macho (verde), (**c**)

66	padrão de hibridização da sonda derivada de fêmea (vermelho) e (d) imagens mescladas de	
67	ambas as sondas genômicas e coloração DAPI. Hibridização genômica interespecífica entre o	
68	emu e a ema (eh). (e) Metáfases coradas com DAPI da fêmea de emu, (f) padrão de hibridização	
69	da sonda derivada de fêmea de emu (verde), (g) padrão de hibridização da sonda derivada de	
70	fêmea de ema maior (vermelho) e (h) imagens mescladas de ambas as sondas genômicas e	
71	coloração DAPI. Enquanto o cromossomo W foi adequadamente identificado por uma	
72	hibridização sequencial com o microssatélite (GA) _n , o cromossomo Z não pôde ser identificado	
73	adequadamente com base em sua morfologia. Barra = 5 µm.....	38
74	Figura 7: Cariótipos de <i>Ptyas korros</i> (a – d), <i>Ptyas mucosa</i> (e – h), <i>Chrysopelea ornata</i> (i – l)	
75	e <i>Fowlea flavipunctatus</i> (m – p) dispostos após coloração de Giemsa (a , b , e , f , i , j , m , n)	
76	e bandeamento C (c, d, g, h, k, l, o, p). Barra de escala = 10 µm.....	49
77	Figura 8: Metáfases femininas de <i>Ptyas korros</i> (PKO) hibridizadas com diferentes	
78	PkoSatDNAs. Barra de escala = 10 µm	51
79	Figura 9: Metáfases femininas de <i>Ptyas korros</i> (PKO), <i>Ptyas mucosa</i> (PMU), <i>Fowlea</i>	
80	<i>flavipunctatus</i> (FFL) e <i>Chrysopelea ornata</i> (COR) hibridizadas com uma sonda telomérica	
81	(TTAGGG) _n . As pontas de seta indicam as sequências teloméricas intersticiais (ITs). Barra de	
82	escala = 10 µm.....	52
83	Figura 10: Árvore filogenética truncada destacando padrões de hibridização de repetições de	
84	microssatélites. As imagens referentes ao cromossomo W de <i>Notechis scutattus</i> e (*) <i>Pogona</i>	
85	<i>vitticeps</i> (****) foram retiradas do estudo publicado por (Matsubara et al., 2016) enquanto os	
86	cromossomos W de <i>Spilotes pullatus</i> (**) e <i>Varanus acanthurus</i> (***) foram retirados dos	
87	estudos de (Viana et al., 2019) e (Matsubara et al., 2014), respectivamente.....	53
88	Figura 11: Metáfases mitóticas femininas de <i>Ptyas korros</i> (PKO) após análises de hibridização	
89	genômica comparativa intra (a – d) e inter (e – h) específica. (a, e) imagens DAPI; (b, f)	
90	padrões de hibridização de sondas genômicas femininas de PKO; (c) padrão de hibridização de	
91	sonda genômica masculina de PKO; (g) padrões de hibridização de sondas genômicas femininas	
92	de <i>Ptyas mucosa</i> (PMU); (d, h) imagens mescladas de ambas as sondas genômicas e	
93	contracoloração DAPI. As regiões coradas igualmente por ambas as sondas genômicas	
94	comparadas são representadas em amarelo (ou seja, uma combinação de verde e vermelho). Os	
95	cromossomos sexuais ZW estão em caixa. Barra de escala = 10 µm.....	54
96	Figura 12: Árvore filogenética das espécies analisadas obtida usando o TimeTree	
97	(http://www.timetree.org , acessado em 10 de fevereiro de 2025) destacando a suposta origem	
98	dos PkoSatDNAs.	58

LISTA DE ILUSTRAÇÕES SUPLEMENTARES

99	Figura Suplementar 1: Metáfases de fêmeas de ema (DNO), ema (RAM) e inhambu-chintã	
100	(CTA) destacando a distribuição da heterocromatina C-positiva. As figuras superiores mostram	
101	as metáfases contra-coradas com iodeto de propídio, enquanto as inferiores foram convertidas	
102	em escala de cinza, além de ajustes de brilho/contraste. Enquanto o cromossoma W foi	
103	devidamente identificado por uma hibridação sequencial com o microssatélite (GA) ₁₅ , o	
104	cromossoma Z não pôde ser devidamente identificado. Barra = 10 µm.	62
105	Figura Suplementar 2: Paisagens de repetições ilustrando a distribuição e divergência de todas	
106	as famílias de DnoSatDNA.....	63
107	Figura Suplementar 3: Lâminas metafásicas femininas e masculinas da ema destacando a	
108	localização cromossômica do microssatélite (GA) _n . É de notar que um único	
109	macrocromossomo, encontrado apenas em fêmeas, apresenta um forte sinal de (GA) _n na região	
110	pericentromérica. Uma vez que não existe qualquer contrapartida nos machos, podemos então	
111	assumir que corresponde ao cromossoma W (assinalado com uma seta). Barra = 10 µm	63
112	Figura Suplementar 4: Paisagens repetidas ilustrando a distribuição e divergência de todas as	
113	famílias de PkoSatDNA identificadas no genoma de <i>Ptyas korros</i>	65
114	Figura Suplementar 5: Gel de eletroforese mostrando o padrão de amplificação de todos os	
115	satélites em <i>Ptyas korros</i> e aqueles amplificados nas espécies congêneres.	66
116	Figura Suplementar 6: Sequências de microssatélites (identificadas em vermelho no canto	
117	inferior esquerdo) hibridizadas em machos e fêmeas de <i>P. korros</i> (PKO), <i>P. mucosa</i> (PMU) e	
118	<i>Crysopelea ornata</i> (COR). Barra de escala = 10 µm.	67
119	Figura Suplementar 7: Metáfases femininas de <i>Fowlea flavipunctatus</i> (FFL) hibridizadas com	
120	sequências microssatélites distintas (identificadas em vermelho no canto inferior direito). Barra	
121	de escala = 10 µm.	68
122	Figura Suplementar 8: Metáfases femininas de <i>Pogona vitticeps</i> (PVI) hibridizadas com as	
123	sondas BAC PV3L7 (vermelha) e PV116G15 (verde). Barra de escala = 10 µm.....	68
124	Figura Suplementar 9: Sondas ligadas ao sexo dos cromossomos Z (verde) e W (vermelho)	
125	na espécie doadora <i>Varanus acanthurus</i> (VAC). Barra de escala = 10 µm.	69

126

LISTA DE TABELAS

127	Tabela 1: Espécies, localidade, número e sexo dos indivíduos (N) utilizados no presente estudo	
128	33
129	Tabela 2: Espécie, origem, tamanho da amostra (N) e sexo dos indivíduos analisados.....	48

130

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

131 **Tabela Suplementar 1:** Principais características dos satDNAs da ema.....64

132 **Tabela Suplementar 2:** Principais características dos satDNAs *de Ptyas korros*.....65

134	1. INTRODUÇÃO GERAL	18
135	1.1. Cromossomos sexuais em vertebrados	18
136	1.2. Elementos repetitivos e o papel do DNA satélite na organização genômica.....	19
137	1.3. Sistemas ZZ/ZW em répteis: a família Colubridae como modelo	19
138	1.4. Sistema ZZ/ZW em aves – as Ratitas como modelo.....	21
139	2. OBJETIVOS.....	22
140	2.1. Objetivos gerais	22
141	2.2. Objetivos específicos.....	22
142	3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
143	3.1. Amostragem, Preparações Cromossômicas Mitóticas e Bandas C.....	23
144	3.2. Extração de DNA e Sequenciamento do Genoma	23
145	3.3. Análises Bioinformáticas: Caracterização dos satDNAs.....	24
146	3.4. Estimativa da Abundância e Diversidade de satDNAs.....	24
147	3.5. Projeto de Primers, Amplificação de DNA e Preparação de Sondas de satDNA.....	25
148	3.6. Hibridização In Situ por Fluorescência (FISH) e Sondas de Repetições Curtas.....	25
149	3.7. Hibridização Genômica Comparativa (CGH)	26
150	3.8. Investigação da homologia dos cromossomos sexuais entre cobras e lagartos.....	27
151	3.9. Análises microscópicas e processamento de imagens	27
152	4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
153	CAPÍTULO 1	29
154	Evolução dos cromossomos sexuais de aves: uma abordagem citogenômica em espécies de	
155	Palaeognathae	29
156	RESUMO	29
157	INTRODUÇÃO.....	30
158	MÉTODOS.....	33

159	Amostragem	33
160	RESULTADOS.....	33
161	Cariótipo e banda C	33
162	Conteúdo de DNA satélite do emu	33
163	Distribuição autossômica de DNAs repetitivos no emu	34
164	Distribuição de sequências repetitivas nos cromossomos sexuais do emu	35
165	Sequências repetitivas nas outras espécies de Palaeognathae	36
166	Amplificação de DnosatDNA em <i>Rhea americana</i>	38
167	Hibridização genômica comparativa	38
168	DISCUSSÃO.....	39
169	Organização geral dos satDNAs no genoma do emu.....	39
170	Evolução dos antigos cromossomos sexuais ZW recombinados em pássaros	40
171	CONCLUSÃO.....	43
172	CAPÍTULO 2	44
173	Evolução dos cromossomos sexuais ZW em cobras <i>Ptyas</i> (Reptilia, Colubridae): novos insights	
174	de uma perspectiva citogenética molecular	44
175	RESUMO	44
176	INTRODUÇÃO.....	45
177	MÉTODOS.....	48
178	Amostragem	48
179	RESULTADOS.....	48
180	Cariótipos e heterocromatina C-positiva	48
181	Conteúdo de DNA satélite de <i>Ptyas korros</i> e sua localização cromossômica	50
182	Amplificação de PkoSatDNAs em outras espécies	51
183	Mapeamento cromossômico de (TTAGGG) _n e motivos microsatélites	51
184	Hibridizações genômicas comparativas.....	54
185	Homologia dos cromossomos sexuais entre cobras e lagartos	55

186	DISCUSSÃO.....	56
187	Organização cariotípica geral dos Colubrídeos.....	56
188	Composição genômica e organização do DNA satélite em <i>Ptyas korros</i> e suas características	
189	compartilhadas com cobras e lagartos.....	57
190	O impacto de sequências repetidas na evolução do cromossomo W em serpentes caenofídios:	
191	heterocromatinização versus heteromorfismo.....	59
192	Conteúdo genético dos cromossomos sexuais em lagartos e sua relação com o gênero <i>Ptyas</i>	61
193	CONCLUSÃO.....	61
194	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	62
195	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
196	REFERENCIAS.....	71

197

1. INTRODUÇÃO GERAL

198

1.1. Cromossomos sexuais em vertebrados

199

200

201

202

203

204

205

206

Os cromossomos sexuais representam uma das regiões mais dinâmicas do genoma, exibindo grande variação em morfologia, composição gênica e trajetória evolutiva (Charlesworth, 1991; Ohno, 1967). Em diferentes grupos de eucariotos, eles surgiram de forma independente a partir de autossomos, adquirindo um locus determinante de sexo e acumulando mutações de efeito sexualmente antagônico (Charlesworth, 1991). Esse processo promoveu a supressão da recombinação entre os homólogos e desencadeou a diferenciação progressiva dos cromossomos específicos do sexo — Y em sistemas XX/XY ou W em sistemas ZZ/ZW (Bachtrog, 2008; Bull, 1983).

207

208

209

210

211

A perda de recombinação está associada ao acúmulo de mutações, expansão de sequências repetitivas e enriquecimento em heterocromatina, levando à degeneração estrutural e funcional do cromossomo sexo-específico (Bachtrog, 2008; Charlesworth et al., 2005). Apesar dessa tendência geral, os cromossomos sexuais não evoluem de forma uniforme: enquanto em alguns grupos eles permanecem homomórficos, em outros exibem forte heteromorfia.

212

213

214

215

216

217

Nos vertebrados, observa-se uma notável diversidade na estabilidade desses sistemas. Mamíferos, por exemplo, mantêm os cromossomos X e Y há cerca de 166 milhões de anos (Veyrunes et al., 2008), enquanto nas aves o sistema ZZ/ZW é conservado há pelo menos 120 milhões de anos (Mank & Ellegren, 2007). Em contraste, linhagens de peixes teleósteos e alguns répteis apresentam rápidas transições, inclusive entre espécies próximas (Kikuchi & Hamaguchi, 2013; Pan et al., 2016).

218

219

220

221

222

223

224

225

226

Uma das hipóteses para essa diferença sugere que vertebrados endotérmicos, por apresentarem termorregulação interna eficiente, seriam menos suscetíveis a reversões sexuais induzidas pela temperatura, o que favoreceria a estabilidade dos cromossomos sexuais (Grossen et al., 2011; Kikuchi & Hamaguchi, 2013). Entretanto, estudos recentes indicam que sistemas altamente conservados também ocorrem em ectotérmicos, como iguanas (Rovatsos et al., 2014) e serpentes caenofidianas (Rovatsos et al., 2015). Assim, a longevidade de um sistema sexual não parece estar vinculada apenas à fisiologia térmica ou ao padrão de heterogamia (XX/XY vs. ZZ/ZW) (Picard et al., 2018; Rovatsos; Vukić; Kratochvíl, 2016; Rovatsos et al., 2014a, 2014b, 2015).

227

228

229

Apesar dos avanços, ainda não está totalmente claro porque algumas linhagens mantêm cromossomos sexuais estáveis por centenas de milhões de anos, enquanto outras os substituem rapidamente. Evidências sugerem que fatores como tamanho populacional efetivo, intensidade

230 da seleção sexual e estratégias reprodutivas podem influenciar essas diferenças (Pischedda et
231 al., 2015; Romiguier et al., 2014). No entanto, a evolução dos cromossomos sexuais permanece
232 um campo aberto, com várias lacunas. Nesse contexto, o estudo de elementos repetitivos,
233 especialmente o DNA satélite, tem se mostrado essencial para compreender os mecanismos que
234 impulsionam a diferenciação e conservação desses sistemas ao longo do tempo.

235 ***1.2. Elementos repetitivos e o papel do DNA satélite na organização genômica***

236 Os genomas eucariotos contêm grande quantidade de sequências repetitivas, que em
237 algumas espécies podem corresponder a até dois terços do DNA total (Charlesworth et al., 1994;
238 Koenig & Weigel, 2015). Entre essas sequências, destaca-se o DNA satélite, formado por
239 repetições em tandem de curtas unidades (5–100 pb), geralmente acumuladas em regiões
240 heterocromáticas (Charlesworth et al., 1994).

241 Esses elementos localizam-se sobretudo em centrômeros, telômeros e regiões
242 pericentroméricas. Embora já tenham sido considerados DNA “lixo”, os satélites exercem
243 papéis importantes na regulação da heterocromatina constitutiva e na segregação cromossômica
244 durante a mitose e a meiose (Garrido-Ramos, 2017, 2015).

245 A composição e a abundância do DNA satélite variam amplamente entre os táxons, o que
246 reflete sua rápida evolução e especificidade de linhagem (Levy et al., 2007; Macas et al., 2007;
247 Mestrovic et al., 1998; Miga, 2015; Mravinac et al., 2002; Mravinac et al., 2005; Ruiz-Ruano
248 et al., 2016). Em vertebrados, essas diferenças são especialmente evidentes quando se
249 comparam grupos como mamíferos, aves e répteis, que apresentam dinâmicas genômicas
250 distintas (revisado por Garrido-Ramos, 2017). O conteúdo de DNA satélite em aves tende a ser
251 menor do que em outros vertebrados, com uma concentração mais discreta em regiões
252 heterocromáticas (Kretschmer et al., 2018). Por outro lado, répteis podem apresentar uma
253 variação mais ampla, com alguns grupos exibindo grandes blocos nos cromossomos sexuais
254 (Ahmad et al., 2021; Pasquesi et al., 2018).

255 A crescente aplicação de técnicas como FISH, CGH e sequenciamento genômico tem
256 possibilitado uma caracterização mais precisa desses elementos, permitindo inferências sobre
257 sua origem, evolução e papel funcional (Ruiz-Ruano et al., 2016)

258 ***1.3. Sistemas ZZ/ZW em répteis: a família Colubridae como modelo***

259 Os répteis representam um dos grupos mais diversos de amniotas, com mais de 11.000
260 espécies descritas (Uetz, 2025). Essa diversidade se reflete em múltiplos mecanismos de
261 determinação sexual, incluindo a determinação dependente da temperatura (TSD), a

262 determinação genética (GSD) e sistemas intermediários em que fatores ambientais modulam a
263 determinação genética (Alam et al., 2018; Deakin & Ezaz, 2019).

264 Entre as espécies com GSD, observa-se grande variação na heterogamia sexual. Em
265 alguns lagartos e tartarugas há heterogamia masculina (XX/XY), enquanto nas serpentes
266 predomina a heterogamia feminina (ZZ/ZW), em que machos são homogaméticos e fêmeas
267 heterogaméticas (Ezaz et al., 2005; Modi & Crews, 2005). Do ponto de vista citogenético, o
268 cromossomo Z mostra-se altamente conservado, enquanto o W apresenta ampla variação
269 estrutural, incluindo diferenças de tamanho, centrômero e padrões de heterocromatina
270 (O'Meally et al., 2010).

271 Essa diversidade de estados evolutivos do cromossomo W, que varia de formas pouco
272 diferenciadas até variantes altamente degeneradas enriquecidas em sequências repetitivas, faz
273 das serpentes modelos relevantes para o estudo da evolução cromossômica (Augstenová et al.,
274 2017; Viana et al., 2019). Além disso, seu cariótipo é estável, com número diploide próximo a
275 36 cromossomos, distribuídos entre macro e microcromossomos (Viana et al., 2019), o que
276 facilita comparações entre espécies.

277 Filogeneticamente, as serpentes dividem-se em dois grandes clados: os caenofídeos, ou
278 serpentes avançadas, que incluem famílias como Colubridae e Elapidae, e os não-caenofídeos,
279 representados por linhagens mais basais, como Boidae e Pythonidae (Rovatsos et al., 2015). A
280 diferenciação dos cromossomos sexuais é mais pronunciada nos caenofídeos, cujos
281 cromossomos W são, geralmente, altamente heterocromáticos e visivelmente distintos
282 (Rovatsos et al., 2015). Nesse processo, elementos repetitivos de DNA desempenham papel
283 central, especialmente motivos em tandem como (GATA)_n e (GACA)_n, amplamente
284 distribuídos em cromossomos sexuais de répteis (Augstenová et al., 2018).

285 Dentro dos caenofídeos, a família Colubridae destaca-se por sua alta diversidade, com
286 mais de 1.800 espécies descritas em sete subfamílias, representando cerca de metade das
287 serpentes conhecidas (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Pyron et al., 2013). Suas espécies
288 apresentam ampla variação ecológica e reprodutiva, incluindo formas peçonhentas e não
289 peçonhentas.

290 O gênero *Ptyas*, pertencente a Colubridae, reúne 13 espécies distribuídas principalmente
291 na Ásia, entre Índia, Japão, Afeganistão, Bangladesh, Mianmar, Camboja e Tailândia (Uetz,
292 2025). *Ptyas mucosa* já foi objeto de estudos citogenéticos que descreveram um cariótipo com
293 $2n = 34$, composto por 16 macrocromossomos e 18 microcromossomos, com cromossomos
294 sexuais homomórficos e heterocromatina no W (Sharma & Kour, 2005; Singh, 1972, 1974;

295 Singh et al., 1976). Em contraste, *Ptyas korros* permanece sem caracterização citogenética, não
296 havendo descrições sobre seu cariótipo, padrão de bandas C ou composição molecular.

297 **1.4. Sistema ZZ/ZW em aves – as Ratitas como modelo.**

298 As aves modernas (Neornithes) formam um grupo com cerca de 10.600 espécies
299 descritas (Gill, 2020). São tradicionalmente divididas em três grandes linhagens: Paleognatas
300 (que incluem Tinamiformes e Struthioniformes), Galloanseres e Neoaves (Jarvis et al., 2014;
301 Prum et al., 2015). De modo geral, compartilham cariótipos com número diploide elevado ($2n$
302 = 80), composto por poucos macrocromossomos e numerosos microcromossomos (Griffin et
303 al., 2007).

304 Todas as aves conhecidas apresentam o sistema de determinação sexual ZZ/ZW, no qual
305 machos são homogaméticos e fêmeas heterogaméticas. Esse sistema surgiu de um par
306 autossômico ancestral distinto daquele que originou o XY dos mamíferos, tendo o gene *Dmrt1*
307 papel central no processo (Marshall Graves; Shetty, 2001; Nanda et al., 1999; Smith & Gregory,
308 2009). A supressão inicial da recombinação entre Z e W ocorreu por inversões cromossômicas
309 no Z, posteriormente ampliadas em diferentes linhagens, o que levou à redução progressiva das
310 regiões pseudoautossômicas (Zhou et al., 2014).

311 Como no Y dos mamíferos, o cromossomo W das aves passou por degeneração,
312 tornando-se geralmente menor e enriquecido em heterocromatina (Kretschmer et al., 2018).
313 Esse processo está associado ao acúmulo de sequências repetitivas e à perda de grande parte
314 dos genes ancestrais. Em contraste, o cromossomo Z manteve tamanho relativamente estável e
315 mostra-se conservado em diferentes linhagens, apesar de apresentar rearranjos internos (Griffin
316 et al., 2007).

317 Entre as aves, o grau de diferenciação dos cromossomos sexuais varia amplamente. Nas
318 ratitas, Z e W são pouco diferenciados, morfologicamente semelhantes, exceto por pequenas
319 regiões heterocromáticas no W (Stiglec et al., 2007). Nos Tinamiformes, observa-se uma
320 condição intermediária, em que o W é ainda relativamente eucromático, mas já mostra redução
321 de tamanho (Garnero, 2006). Em contraste, em Neoaves e Galloanseres o W é altamente
322 heteromórfico e degenerado (Kretschmer et al., 2018; Stiglec et al., 2007).

323 Essa diversidade faz das Ratitas um modelo privilegiado para estudar os estágios iniciais
324 da diferenciação cromossômica no sistema ZZ/ZW. A comparação entre espécies com
325 cromossomos sexuais homomórficos, intermediários e altamente diferenciados permite
326 compreender como inversões, heterocromatinização e expansão de sequências repetitivas
327 moldaram a evolução dos cromossomos sexuais.

328 **2. OBJETIVOS**

329 **2.1. Objetivo geral**

330 O objetivo principal desta dissertação foi investigar o conteúdo genômico e estrutural dos
331 cromossomos sexuais Z e W em espécies representativas de répteis (serpentes Colubridae) e
332 aves (Palaeognathae), com ênfase na identificação e caracterização de sequências repetitivas e
333 seus possíveis papéis na evolução e diferenciação desses cromossomos.

334 **2.2. Objetivos específicos**

- 335 (i) Analisar os padrões morfológicos e citogenéticos dos cromossomos sexuais em
336 espécies de aves Palaeognathae e serpentes do gênero *Ptyas*, por meio de técnicas
337 clássicas e moleculares.
- 338 (ii) Caracterizar a distribuição e intensidade da heterocromatina nos cromossomos
339 sexuais, com foco especial no cromossomo W, buscando compreender sua relação
340 com os diferentes graus de diferenciação entre as espécies analisadas.
- 341 (iii) Identificar, mapear e comparar sequências repetitivas, especialmente DNAs satélite,
342 presentes nos cromossomos sexuais, a fim de avaliar sua composição na
343 heterocromatina.
- 344 (iv) Comparar a composição e a organização dos DNAs satélite entre os cromossomos
345 Z e W nas diferentes espécies analisadas, buscando padrões compartilhados ou
346 exclusivos.
- 347 (v) Investigar a correlação entre a morfologia (homomorfia vs. heteromorfia) e a
348 diferenciação molecular dos cromossomos sexuais, buscando elucidar padrões
349 evolutivos distintos dentro e entre os dois grupos estudados.
- 350 (vi) Contribuir para o entendimento dos mecanismos que moldam a evolução dos
351 sistemas sexuais do tipo ZW em vertebrados, por meio de uma abordagem
352 integrativa que combine dados de citogenética, genômica comparativa e biologia
353 evolutiva.

354 **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

355 **3.1. Amostragem, Preparações Cromossômicas Mitóticas e Bandas C**

356 As informações detalhadas sobre origem das amostras, número de indivíduos, sexo e local
357 de coleta estão apresentadas nas tabelas correspondentes em cada capítulo experimental (ver
358 Tabelas 1 e 2).

359 No **Capítulo 1**, foram analisadas três espécies de aves: *Dromaius novaehollandiae* (ema-
360 australiana), *Crypturellus tataupa* (inhambu-chintã) e *Rhea americana* (ema). As coletas foram
361 realizadas sob autorização do ICMBio/SISBIO (61047-2 e 68443-2) e do SISGEN (A96FF09).
362 Os espécimes de *D. novaehollandiae* e *R. americana* foram obtidos em criadouros *ex situ*,
363 enquanto os indivíduos de *C. tataupa* foram coletados em vida livre. Cromossomos foram
364 obtidos a partir de culturas de fibroblastos derivados da polpa da pena, seguindo Furo et al.
365 (2017). As células foram cultivadas em frascos de 25 cm² com meio DMEM (Gibco),
366 suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina (10.000 U/mL) /
367 estreptomicina (10.000 µg/mL) (Gibco). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê
368 de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Pampa (CEUA 018/2014).

369 No **Capítulo 2**, as preparações cromossômicas mitóticas foram obtidas a partir de culturas
370 de leucócitos *in vitro*, conforme Pokorná & Kratochvíl (2016). Suspensões celulares de *Pogona*
371 *vitticeps* e *Varanus acanthurus* foram fornecidas pela coleção de cromossomos da Universidade
372 de Camberra, estabelecida por Dobry et al. (2023) e Ezaz et al. (2005). Nenhum animal sofreu
373 ferimentos graves, e os espécimes coletados em vida livre foram liberados em seus locais de
374 origem após a coleta. Os demais répteis foram manipulados de acordo com protocolos éticos
375 vigentes.

376 Em todas as preparações, a heterocromatina constitutiva foi evidenciada pela técnica de
377 banda C (Sumner, 1972), e as lâminas foram contracoradas com iodeto de propídio (200 ng/mL
378 em 2× SSC, Sigma).

379 **3.2. Extração de DNA e Sequenciamento do Genoma**

380 Os DNAs genômicos (gDNAs) foram extraídos de tecidos de pena (aves) ou músculo
381 (répteis) utilizando o método padrão de fenol-clorofórmio (Russell, 2001). Em *Ptyas korros*,
382 um macho e uma fêmea foram submetidos ao sequenciamento genômico tipo shotgun de baixa
383 cobertura (plataforma BGISEQ-500, BGI Shenzhen), resultando em 2,41 Gb e 2,45 Gb de
384 dados, respectivamente (números de acesso SRA: SRR32267813 e SRR32267814).

385 Para *Dromaius novaehollandiae* (emu), o DNA genômico também foi extraído de um
386 macho e uma fêmea. As amostras foram sequenciadas pela plataforma BGISEQ-500 (pares de
387 extremidades 2×150 pb), com cobertura aproximada de $3\times$, considerada adequada para a
388 montagem do satelitoma (Ruiz-Ruano et al., 2016; Utsunomia et al., 2019). As leituras estão
389 disponíveis no SRA sob os números de acesso SRR26815296–SRR26815299.

390 **3.3. Análises Bioinformáticas: Caracterização dos satDNAs**

391 A caracterização do satelitoma foi conduzida de forma semelhante para *Dromaius*
392 *novaehollandiae* (emu) e *Ptyas korros* (cobra rato chinesa), utilizando o pipeline bioinformático
393 satMiner (Ruiz-Ruano et al., 2016). Inicialmente, as bibliotecas genômicas foram processadas
394 com Trimmomatic (Bolger et al., 2014) para remoção de adaptadores e filtragem de qualidade.

395 Em seguida, foi realizada uma seleção aleatória de 2×500.000 leituras para análise com a
396 ferramenta TAREAN (Novák et al., 2020), visando identificar sequências candidatas a DNA
397 satélite. As sequências identificadas foram filtradas das bibliotecas usando o software
398 DeconSeq (Schmieder & Edwards, 2011). A partir das sequências restantes, um novo
399 subconjunto de 2×500.000 leituras foi novamente selecionado e submetido ao TAREAN. Esse
400 processo foi repetido iterativamente até que nenhum novo satDNA fosse detectado.

401 Após essa triagem, outras sequências repetitivas, como famílias multigênicas, foram
402 removidas das sequências putativas de satDNA. Em ambas as espécies, as sequências foram
403 então agrupadas de acordo com sua similaridade: variantes ($> 95\%$), famílias (80–95%) e
404 superfamílias (50–80%). Para essa etapa, foi utilizado o RepeatMasker (Smith et al., 2013) em
405 ambas as espécies, e, especificamente em *P. korros*, os agrupamentos também foram verificados
406 com MUSCLE (Edgar, 2004). Os satDNAs caracterizados foram nomeados de acordo com a
407 espécie: DnoSatDNAs para *D. novaehollandiae* e PkoSatDNAs para *P. korros*.

408 **3.4. Estimativa da Abundância e Diversidade de satDNAs**

409 A abundância de cada satDNA foi estimada utilizando o RepeatMasker com o mecanismo
410 de busca “cross-match”. Para isso, em ambos os casos, foram utilizados $2 \times 5.000.000$ de
411 leituras selecionadas aleatoriamente e alinhadas ao catálogo de satDNAs previamente
412 construído.

413 A diversidade foi avaliada a partir da estimativa de distâncias genéticas com o script
414 calcDivergenceFromAlign.py, aplicando o modelo de substituição Kimura-2-parâmetro para a
415 construção de paisagens de repetição, que ilustram a divergência entre as famílias de satDNAs.

416 No caso de *P. korros*, os mapeamentos foram realizados por meio de um script Python
417 personalizado disponível publicamente.

418 **3.5. Projeto de Primers, Amplificação de DNA e Preparação de Sondas de satDNA**

419 Foram projetados primers específicos para os satDNAs identificados em ambas as espécies:
420 21 dos 24 satDNAs caracterizados em *Dromaius novaehollandiae* (DnoSatDNAs) e 6 satDNAs
421 em *Ptyas korros* (PkoSatDNAs). As reações de PCR foram realizadas em 34 ciclos, com os
422 seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 58–64 °C (30
423 a 60 segundos, conforme otimização), extensão a 72 °C por 1 minuto, e extensão final a 72 °C
424 por 7 minutos. Cada amplificação utilizou 10 ng de DNA genômico como molde.

425 Para confirmação das amplificações, os produtos foram verificados por eletroforese em gel
426 de agarose. No caso de *D. novaehollandiae*, a presença de satDNAs também foi testada no
427 genoma de *Rhea americana* (ema) sob as mesmas condições de PCR. De forma análoga, os
428 satDNAs de *P. korros* foram amplificados em outras espécies de répteis, permitindo investigar
429 a presença conservada desses elementos em táxons relacionados.

430 Todos os satDNAs amplificados foram convertidos em sondas fluorescentes por meio de
431 nick-translation (Jena Bioscience, Jena, Alemanha), com incorporação de fluoróforos Atto488-
432 dUTP (verde) ou Atto550-dUTP (vermelho), conforme as recomendações do fabricante.

433 **3.6. Hibridização In Situ por Fluorescência (FISH) e Sondas de Repetições Curtas**

434 No caso de *Dromaius novaehollandiae*, três DNAs satélites com unidades de repetição
435 menores que 40 pb (DnoSat04, DnoSat06 e DnoSat19) foram marcados diretamente com Cy3
436 na extremidade 5' durante a síntese (ThermoFisher Scientific). Para *Ptyas korros*, todos os
437 satDNAs amplificados também foram convertidos em sondas fluorescentes.

438 Além das sondas de satDNA, foram utilizados microssatélites específicos em cada grupo
439 taxonômico, com o objetivo de investigar o padrão de distribuição genômica dessas sequências
440 repetitivas:

- 441 • Aves (emu, ema e inhambu-chintã): foram aplicadas 17 sequências microssatélites
442 [(C)n, (A)n, (GA)n, (CA)n, (GC)n, (TA)n, (CAA)n, (CAG)n, (CAT)n, (GAG)n,
443 (TAA)n, (TAC)n, (GAC)n, (CGG)n, (CAC)n, (GAA)n e (GATA)n], todas marcadas
444 com Cy3 (VBC Biotech, Viena, Áustria).
- 445 • Serpentes (gênero *Ptyas*, *C. ornata* e *F. flavipunctatus*): foram utilizados cinco
446 microssatélites selecionados por sua possível associação com cromossomos sexuais em
447 répteis: [(AGAT)n, (AAT)n, (AG)n, (ATCC)n e (AAGG)n], também marcados com Cy3

448 (VBC Biotech, Viena, Áustria). Adicionalmente, foram utilizadas sondas teloméricas
449 com repetição (TTAGGG)_n detectadas pelo kit Telomere PNA FISH Cy3
450 (DAKO/Agilent, Santa Clara, EUA).

451 As hibridizações *in situ* por fluorescência (FISH) foram conduzidas em cromossomos
452 metafásicos preparados de culturas celulares, e as condições experimentais seguiram os
453 protocolos descritos em Pinkel et al. (1986) e Yano et al. (2017), com ajustes conforme cada
454 grupo e tipo de sonda.

455 **3.7. Hibridização Genômica Comparativa (CGH)**

456 A hibridização genômica comparativa (CGH) foi realizada para investigar a diferenciação
457 molecular dos cromossomos sexuais em diferentes espécies de aves e serpentes. Os DNAs
458 genômicos (gDNAs) de machos e fêmeas foram extraídos e marcados por nick-translation com
459 os fluoróforos Atto550-dUTP (vermelho) e Atto488-dUTP (verde) (Jena Biosciences, Jena,
460 Alemanha).

461 Para as serpentes do gênero *Ptyas*, realizamos experimentos intraespecíficos comparando
462 machos e fêmeas de *P. korros*, hibridizando as sondas diretamente contra os cromossomos
463 femininos, sem a utilização de bloqueio com DNA C0t-1 para sequências repetitivas
464 compartilhadas, conforme protocolo de Matsubara et al., (2013) para répteis. Também foram
465 feitas comparações interespecíficas entre fêmeas de *P. korros* e *P. mucosa*, aplicando a mesma
466 metodologia.

467 Nos experimentos com aves (*Dromaius novaehollandiae* e *Rhea americana*), foi adotado
468 um protocolo similar, porém com o uso de DNA C0t-1 não marcado como bloqueador para
469 sequências repetitivas compartilhadas, preparado conforme Zwick et al., (1997). A proporção
470 da sonda vs. DNA C0t-1 foi escolhida com base em investigações anteriores do nosso grupo de
471 pesquisa (De Moraes et al., 2019; Sember et al., 2018; Toma et al., 2019; Tura et al., 2022; Yano
472 et al., 2017). A mistura de hibridização final para cada lâmina foi composta de sondas
473 genômicas masculinas e femininas (500 ng cada) suplementadas com 3 µg de DNA C0t-1
474 derivado de machos. Para a comparação interespecífica entre emu e ema, as sondas femininas
475 das duas espécies foram hibridizadas contra cromossomos femininos do emu, com a mistura
476 contendo 500 ng de cada sonda suplementada por 4 µg de DNA C0t-1 (2 µg de cada espécie).
477 Os experimentos em aves seguiram a metodologia descrita por Sember et al. (2018).

478 Devido à indisponibilidade de DNA genômico, a espécie *Crypturellus tataupa* não foi
479 incluída nas análises de CGH.

480 **3.8. Investigação da homologia dos cromossomos sexuais entre cobras e lagartos**

481 Em nosso estudo, também analisamos as supostas homologias entre os cromossomos
482 sexuais do dragão barbudo (*P. vitticeps*) e as espécies *Ptyas* usando dois clones BAC de *P.*
483 *vitticeps*, descrito especificamente pv03L07 e pv116G15, conforme por (Ezaz et al., 2013).
484 Esses clones foram selecionados devido à sua localização nos cromossomos Z e W das espécies
485 doadoras. As sondas foram marcadas com fluoróforos laranja (pv3L7) e verde (pv116G15)
486 usando 0,5–1 µg de cada clone BAC via tradução nick (Abbott Molecular, Botany, NSW,
487 Austrália), seguindo o protocolo do fabricante com modificações. As sondas marcadas foram
488 incubadas a 15 °C por 1 h e 45 min e então aquecidas a 70 °C para encerrar a reação.
489 Posteriormente, foram coprecipitadas com glicogênio e etanol 100% e armazenadas a -20 °C
490 durante a noite. No dia seguinte, as sondas foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de
491 hibridização. Cromossomos metafásicos de *P. vitticeps* foram utilizados como controle positivo.
492 Sondas direcionadas aos cromossomos W e Z de *V. acanthurus* (Iannucci et al., 2019) também
493 foram hibridizadas com cromossomos das duas espécies de *Ptyas* e *P. vitticeps*.

494 **3.9. Análises microscópicas e processamento de imagens**

495 Pelo menos 30 espalhamentos de metáfase por indivíduo foram analisados para confirmar
496 os resultados de 2n, estrutura do cariótipo, FISH e CGH. As imagens foram capturadas usando
497 um microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão), com CoolSNAP, e
498 as imagens foram processadas usando o software Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics,
499 Silver Spring, MD, EUA). Os cariótipos das serpentes foram organizados com base em tamanho
500 decrescente (macro e microcromossomo), uma vez que essa configuração reflete melhor a
501 organização cromossômica predominante observada em serpentes e facilita a comparação com
502 estudos anteriores.

503 **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

504 Os resultados, assim como sua respectiva discussão, obtidos no desenvolvimento da presente
505 dissertação são apresentados a seguir, no formato de capítulos:

506

507 **Capítulo 1** – Evolução dos cromossomos sexuais de aves: uma abordagem citogenômica em
508 espécies de Palaeognathae

509 Setti et al. *International Journal of Molecular Sciences* 26(10), 4540 (2025).

510 doi: <https://doi.org/10.1186/s12862-024-02230-5>

511

512 **Capítulo 2** – Evolução dos cromossomos sexuais ZW em cobras *Ptyas* (Reptilia, Colubridae):
513 novos insights de uma perspectiva citogenética molecular

514 Setti et al, *BMC Ecology and Evolution* 24:51 (2024).

515 doi: <https://doi.org/10.3390/ijms26104540>

516 **CAPÍTULO 1**

517 ***Evolução dos cromossomos sexuais de aves: uma abordagem citogenômica em espécies de***
518 ***Palaeognathae***

519 Artigo publicado no periódico: *BMC Ecology and Evolution*

520 **RESUMO**

521 Diferentes padrões de diferenciação de cromossomos sexuais são vistos em aves Palaeognathae,
522 uma linhagem que inclui as ratitas (Struthioniformes, Rheiformes, Apterygiformes,
523 Casuariiformes e o grupo irmão Tinamiformes). Enquanto algumas espécies de Tinamiformes
524 têm cromossomos W bem diferenciados, tanto Z quanto W de todas as ratitas que não voam
525 ainda são morfologicamente indiferenciadas. Aqui, conduzimos uma análise abrangente da
526 diferenciação ZW em aves usando uma combinação de abordagens citogenéticas, genômicas e
527 bioinformáticas. Todo o conjunto de satDNAs do emu (*Dromaius novaehollandiae*) foi descrito
528 e caracterizado. Além disso, examinamos as localizações *in situ* desses satDNAs ao lado de
529 várias repetições de microsatélites e realizamos hibridizações genômicas comparativas em
530 duas espécies relacionadas: a ema (*Rhea americana*) e o inhambu-chintã (*Crypturellus*
531 *tataupa*). Das 24 famílias de satDNA identificadas (que representam a maior diversidade de
532 satDNAs já descoberta em qualquer espécie de ave), apenas três delas se acumularam nos
533 cromossomos sexuais do emu, sem acúmulo perceptível observado no cromossomo W. Os
534 cromossomos W, tanto da ema quanto do emu, não apresentaram acúmulo significativo de
535 heterocromatina C-positiva nem de DNAs repetitivos, indicando sua grande indiferenciação
536 tanto em nível morfológico quanto molecular. Em contraste, o inhambu-chintã possui um
537 cromossomo W altamente diferenciado que acumula diversas repetições de DNA. As
538 descobertas fornecem novas informações sobre a arquitetura do genoma aviário e uma visão
539 interna dos pontos de partida da diferenciação dos cromossomos sexuais nas aves.

540 **INTRODUÇÃO**

541 O modelo canônico de evolução dos cromossomos sexuais afirma que eles são derivados
542 de um par autossômico quando um dos homólogos adquire um gene determinante do sexo,
543 seguido pelo acúmulo de mutações sexualmente antagônicas neste protocromossomo
544 sexual (Bachtrog, 2008; Bull, 1983; Charlesworth, 1991). Conseqüentemente, a recombinação
545 entre os cromossomos é gradualmente reduzida, seguida pelo acúmulo de sequências repetitivas
546 de DNA e heterocromatina no cromossomo W ou Y em diferenciação (Bull, 1983; Charlesworth
547 et al., 2005; Muller, 1918; Rice, 1984; Ohno, 1967). Os DNAs repetitivos são os primeiros
548 elementos a se acumular nos estágios iniciais de recombinação da diferenciação dos
549 cromossomos sexuais, o que pode levar a um heteromorfismo detectável entre eles (para uma
550 revisão, veja Charlesworth et al., 1994; Gvozdev et al., 2005). Esse acúmulo geralmente
551 envolve elementos transponíveis ou DNAs satélites (revisados em Bergero & Charlesworth,
552 2009). Esse processo é evidente mesmo em cromossomos sexuais que ainda estão evoluindo,
553 como os de *Drosophila miranda* (Steinemann & Steinemann, 1992), *Silene latifolia* (Hobza et
554 al., 2006; Kejnovsky et al., 2006) ou *Carica papaya* (Liu et al., 2004). Portanto, o acúmulo de
555 repetições pode representar um estágio inicial na modificação do cromossomo específico do
556 sexo, mesmo antes que os genes comecem a degenerar (Steinemann & Steinemann, 2005). Hoje
557 em dia, a citogenética combinada com outros métodos genômicos atualizados, como o
558 sequenciamento de alto rendimento, fornece uma visão geral mais detalhada do caminho
559 evolutivo dos cromossomos sexuais (Garrido-Ramos, 2017; Mora et al., 2020; Ruiz-Ruano et
560 al., 2016).

561 Com mais de 11.000 espécies, as aves representam um grupo muito diverso de
562 vertebrados tetrápodes (BirdLife International. Ficha informativa sobre áreas importantes para
563 a proteção de aves”, 2023; Brusatte et al., 2015; Prum et al., 2015). Elas são divididas em dois
564 clados, Palaeognathae e Neognathae, com base na anatomia palatina. As aves Palaeognathae
565 abrangem as ratitas 'não voadoras', incluindo os kiwis (Apterygiformes), casuares
566 (Casuariiformes), emas (Rheiformes) e avestruzes (Struthioniformes), e também os tinamous
567 'voadores' (Tinamiformes) (Prum et al., 2015). Embora Palaeognathae seja considerado um
568 grupo monofilético (Prum et al., 2015), novas evidências (ou seja: dados moleculares, incluindo
569 evolução regulatória convergente, relações biogeográficas e filogenômicas de paleognatas
570 extintos) apontam que os Palaeognathae (antigos Ratitas) não voadores são parafiléticos, uma
571 vez que houve muitas perdas paralelas de voo em toda a linhagem Palaeognathae (Harshman et

572 al., 2008; Sackton et al., 2018; Yonezawa et al., 2017). A distribuição geográfica atual de
573 Palaeognathae é mostrada na (Figura 1).

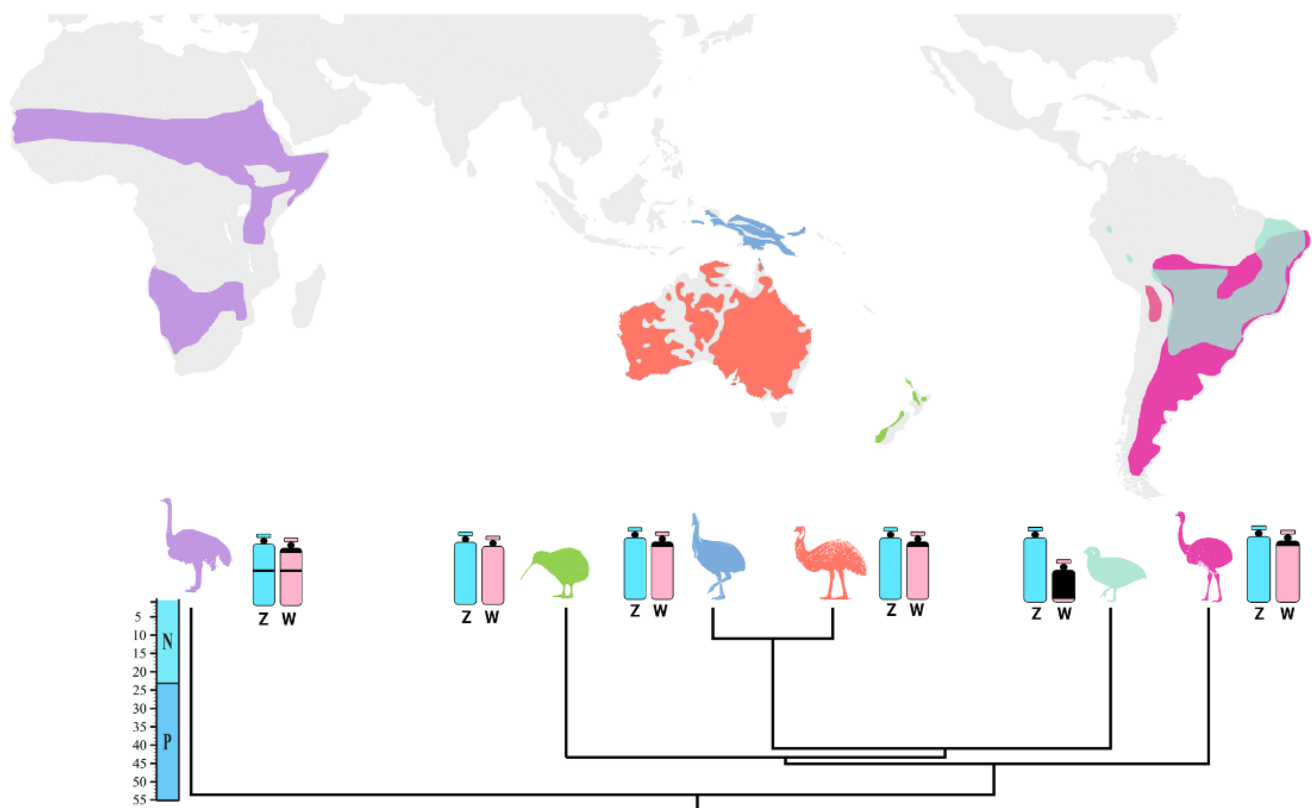


Figura 1: Distribuição geográfica de Palaeognathae, mostrando espécies codificadas por cores com base em sua ocorrência geográfica: *Struthio* (roxo), *Apteryx* (verde), *Casuarius* (azul), *Dromaius* (laranja), *Crypturellus* (verde claro) e *Rhea* (rosa). A árvore de espécies datada foi obtida de (Prum et al., 2015). Idiogramas representativos para os cromossomos sexuais Z (azul claro) e W (vermelho claro) são fornecidos, juntamente com informações sobre seus padrões de bandas C (preto) (exceto para *Apteryx*). Os dados foram recuperados de (De Boer, 1980; Nishida-Umehara et al., 2007; Pigozzi, 2011 e dados atuais). Uma escala geológica com períodos-chave é representada à esquerda (N = Neógeno; P = Paleógeno).

574 Observando o grupo Palaeognathae de uma perspectiva citogenética, é digno de nota
575 que algumas espécies de Tinamiformes exibem variabilidade significativa na diferenciação do
576 cromossomo W, enquanto as ratitas ainda apresentam grandes cromossomos indiferenciados
577 abrigo um pobre acúmulo de heterocromatina (Liu et al., 2021; Singhet al., 1976; Takagi et
578 al., 1972; Xu & Zhou, 2020) (Figura 1). Por exemplo, apesar de ter mais de 100 milhões de
579 anos, o cromossomo W do avestruz (*Struthio camelus*) ainda tem 65% do tamanho do
580 cromossomo Z (Yazdi et al., 2023). Os paleognatas têm seções não degeneradas significativas
581 (também conhecidas como regiões pseudoautossômicas ou PARs) em seus cromossomos
582 sexuais, em contraste com outras aves (Xu et al., 2019; Yazdi et al., 2023). No avestruz, apenas
583 um terço dos cromossomos Z não se recombinam com o W, enquanto no emu, a região não

584 recombinante é ainda mais curta, estando confinada ao centrômero W e aos braços curtos Z,
585 que contêm o gene DMRT1 (Liu et al., 2021; Shetty et al., 2002; Stiglec et al., 2007).

586 O emu (*Dromaius novaehollandiae*) é uma das espécies de ratitas mais icônicas, sendo
587 a primeira espécie de ave a ter seus cromossomos hibridizados com sondas de
588 macrocromossomos de galinha (Shetty et al., 1999). Emu, emas e outras ratitas foram
589 profundamente exploradas para entender o caminho evolutivo das aves devido à sua posição
590 basal na filogenia aviária e cariótipos ancestralmente semelhantes. As descobertas incluem (i)
591 o arranjo e a organização dos cromossomos no núcleo (Liu et al., 2021; Nishida-Umehara et
592 al., 2007; Shetty et al., 2002); (ii) o baixo número de rearranjos e deleções cromossômicas na
593 escala BAC (Chapus & Edwards, 2009) ; e (iii) as mudanças na conformação da cromatina na
594 diferenciação dos antigos cromossomos sexuais recombinados (Liu et al., 2021).

595 Aqui, conduzimos uma análise abrangente dos antigos cromossomos ZW recombinantes
596 entre aves, usando o emu - *D. novaehollandiae* - como modelo. Nosso objetivo foi responder
597 às seguintes perguntas: (i) os DNAs repetitivos são amplamente acumulados nos cromossomos
598 sexuais, visto que eles ainda são grandes e indiferenciados? (ii) o cromossomo W acumula
599 sequências repetitivas únicas não encontradas no Z? (iii) essas mesmas repetições acumuladas
600 nos cromossomos Z e/ou W do emu também são conservadas nos cromossomos W de outras
601 espécies intimamente relacionadas? Nesse sentido, comparamos as diferenças intragenômicas
602 entre machos e fêmeas. Usamos abordagens citogenéticas e genômicas para analisar sua
603 composição de satélites e o suposto envolvimento desses DNAs satélites e microssatélites nos
604 estágios iniciais da diferenciação do cromossomo W. Além disso, essas sequências também
605 foram hibridizadas nos cromossomos de duas outras espécies de Palaeognathae: a ema (*Rhea*
606 *americana* , Rheiformes, Rheidae), que também exibe cromossomos ZW morfologicamente
607 indiferenciados, e o inhambu-chintã (*Crypturellus tataupa* , Tinamiformes, Tinamidae), uma
608 espécie incluída em um grupo irmão das ratitas com um cromossomo W bem diferenciado.

609 **MÉTODOS**

610 Os métodos estão detalhadamente descritos na seção 3 (materiais e métodos).

611 **Amostragem**

612 Indivíduos de *Dromaius novaehollandiae* (DNO; Emu); *Crypturellus tataupa* (CTA;
613 inhambu-chintã) e *Rhea americana* (RAM; ema) foram analisados neste estudo (**Tabela 1**).

Tabela 1: Espécies, localidade, número e sexo dos indivíduos (N) utilizados no presente estudo

Epécies	Localização	N
<i>Dromaius novaehollandiae</i> (DNO; Emu)	Glorinha (RS)	(01♀; 01♂)
<i>Crypturellus tataupa</i> (CTA; Inhambu-chintã)	Porto Vera Cruz (RS)	(01♀; 02♂)
<i>Rhea americana</i> (RAM; ema)	Sapucaia do Sul (RS)	(01♀; 0♂)

614 RS: Rio Grande do Sul

615 **RESULTADOS**

616 **Cariótipo e banda C**

617 Primeiro, investigamos e confirmamos que o 2n para todas as três espécies de
618 Palaeognathae investigadas era 80, o que corroborou informações anteriores para essas
619 espécies (Gunski & Giannoni, 1998; Pigozzi, 2011; Takagi et al., 1972) . Para todas as espécies,
620 o mesmo padrão para os autossomos foi observado, ou seja: enquanto vários
621 microcromossomos são heterocromáticos, a maioria dos macrocromossomos exibe
622 heterocromatina C-positiva em regiões centroméricas. No entanto, o cromossomo W do
623 inhambu-chintã era totalmente heterocromático, em contraste com os cromossomos Z de todas
624 as espécies e os cromossomos W do emu e da ema, que mostraram blocos heterocromáticos C-
625 positivos muito fracos na região centromérica (**Figura Suplementar 1**).

626 **Conteúdo de DNA satélite do emu**

627 Para iniciar as respostas propostas neste trabalho, identificamos 24 famílias de satDNA
628 no genoma do emu, designadas como DnoSatDNAs e numeradas da mais para a menos
629 abundante no genoma (**Tabela Suplementar 1**). O comprimento da unidade de repetição (RUL)
630 teve uma mediana de 214 pb e um intervalo de 31 a 5,881 pb. Satélites longos (> 100 pb) foram
631 o tipo mais comum, compreendendo 20 satDNAs. A porcentagem A + T foi de 41.375%,
632 indicando uma predominância dos pares de bases G + C. A **Figura Suplementar 2** exibe as
633 paisagens de repetição ilustrando a distribuição e divergência de todas as famílias de
634 DnoSatDNA.

635 Embora, em geral, a maioria das sequências de satDNA tenha um conteúdo notável de
636 A + T (Garrido-Ramos, 2015; Talbert & Henikoff, 2020), isso não ocorre no emu, como também
637 foi encontrado anteriormente em pássaros (Peona et al., 2023). Descobrimos que 23 dos 24
638 DnoSatDNAs contêm mais de 50% de pares de bases G + C, o que não ocorre em alguns
639 genomas de pássaros (Peona et al., 2023), indicando uma possível característica específica. A
640 única exceção foi o DnoSat02, que é rico em AT (56,60%) e representa o maior satDNA (5881
641 RUL).

642 *Distribuição autossômica de DNAs repetitivos no emu*

643 As investigações *in situ* destacaram que a maioria dos DnoSatDNAs (20 de 23) estavam
644 localizados exclusivamente em autossomos. Os DnoSat02, 07 e 24 hibridizaram apenas em um
645 par de microcromossomos, enquanto os DnoSat8, 14, 17, 18, 20, 22 e 23 hibridizaram em um
646 par de macrocromossomos. O DnoSat05 desviou-se desse padrão e hibridizou na região
647 telomérica de todos os cromossomos. Por outro lado, os DnoSat01, 03, 06, 09, 10, 12, 13, 15 e
648 19 foram mapeados em múltiplos micro ou macrocromossomos (**Figura 2**).

649

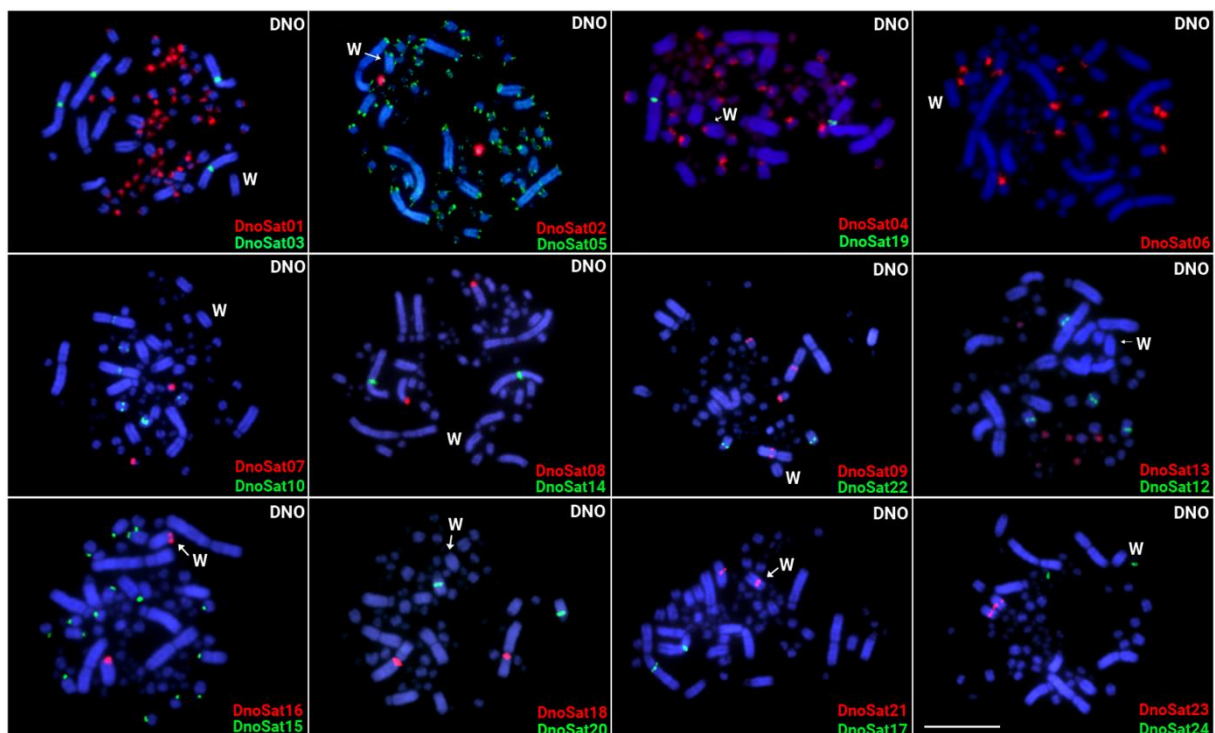


Figura 2: Metáfases de fêmeas do emu destacando a localização cromossômica de 23 DnoSatDNAs. Seus nomes de família estão indicados no canto inferior direito, em verde (marcado com Atto488-dUTP) ou vermelho (marcado com Atto550-dUTP). Enquanto o cromossomo W foi adequadamente identificado por uma hibridização sequencial com o microssatélite (GA)_n, o cromossomo Z não pôde ser identificado adequadamente com base em sua morfologia. Barra = 10 µm

650 Por outro lado, apenas 06 de 17 microssatélites testados apresentaram sinal FISH
651 positivo nos cromossomos do emu. Com exceção de (GA)_n, que exibe sinais em muitos
652 autossomos e no cromossomo W (consulte a **Figura 3 suplementar**), todos os outros foram
653 mapeados exclusivamente em autossomos, principalmente em microcromossomos (**Figura 3**).

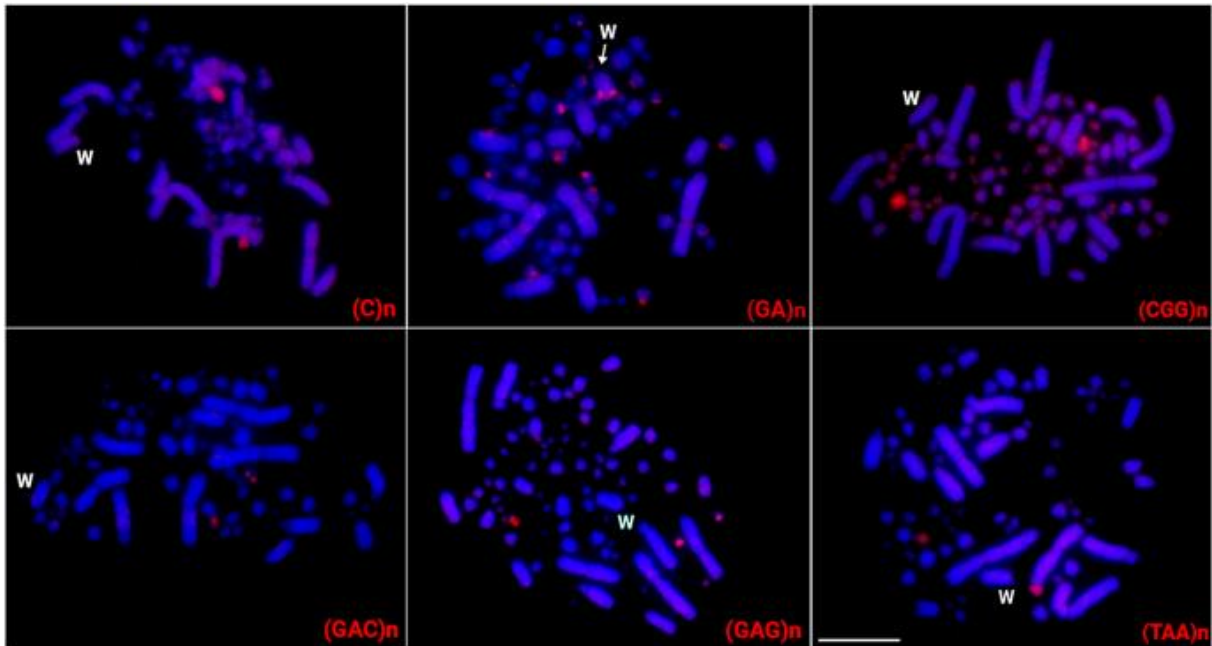


Figura 3: Metáfases de fêmeas do emu destacando a localização cromossômica das repetições de microssatélites, indicadas em vermelho no canto inferior direito. Enquanto o cromossomo W foi identificado adequadamente por uma hibridização sequencial com o microssatélite (GA)_n, o cromossomo Z não pôde ser identificado adequadamente com base em sua morfologia. Barra = 10 µm.

654 ***Distribuição de sequências repetitivas nos cromossomos sexuais do emu***

655 Apenas três DnoSatDNAs, chamados DnoSat04, DnoSat16 e DnoSat21, e o
656 microssatélite (GA)_n mostraram hibridização nos cromossomos sexuais do emu. Apesar de
657 também ser acumulado em muitos autossomos, a presença de um sinal (GA)_n conspícuo na
658 região pericentromérica de um único macrocromossomo, exclusivo das fêmeas (**Figura**
659 **Suplementar 3**), nos permite identificá-lo como o cromossomo W. DnoSat16 e DnoSat21
660 foram mapeados nos cromossomos Z e W. Embora o cromossomo Z não possa ser
661 adequadamente identificado com base em sua morfologia, dado que ambos os DnoSatDNAs
662 mostram apenas dois sinais de hibridização, um dos quais está localizado no cromossomo W,
663 podemos inferir que o outro sinal está localizado no cromossomo Z. Por outro lado, DnoSat04
664 exibe sinais no cromossomo W e em vários autossomos, tanto em micro quanto em
665 macrocromossomos. Portanto, neste caso, sua presença no cromossomo Z não pode ser
666 confirmada (**Figuras 2 e 3**).

667 *Sequências repetitivas nas outras espécies de Palaeognathae*

668 Nenhum dos DnoSatDNAs produziu sinais FISH nos cromossomos da ema e do
669 inhambu-chintã, mostrando que essas mesmas repetições não são conservadas nos
670 cromossomos W dessas duas espécies intimamente relacionadas.

671 Dos 17 microssatélites testados, apenas quatro [denominados (CGG)_n, (CAC)_n, (GA)_n
672 e (GAG)_n] apresentaram sinais FISH positivos nos cromossomos da ema. O microssatélite
673 (GA)_n foi mapeado no cromossomo W e no terceiro maior par de macrocromossomos. (GAG)_n
674 foi encontrado em um par autossômico de macrocromossomos, enquanto (CAC)_n e (CGG)_n
675 apresentaram sinais positivos apenas nos microcromossomos (**Figura 4**).

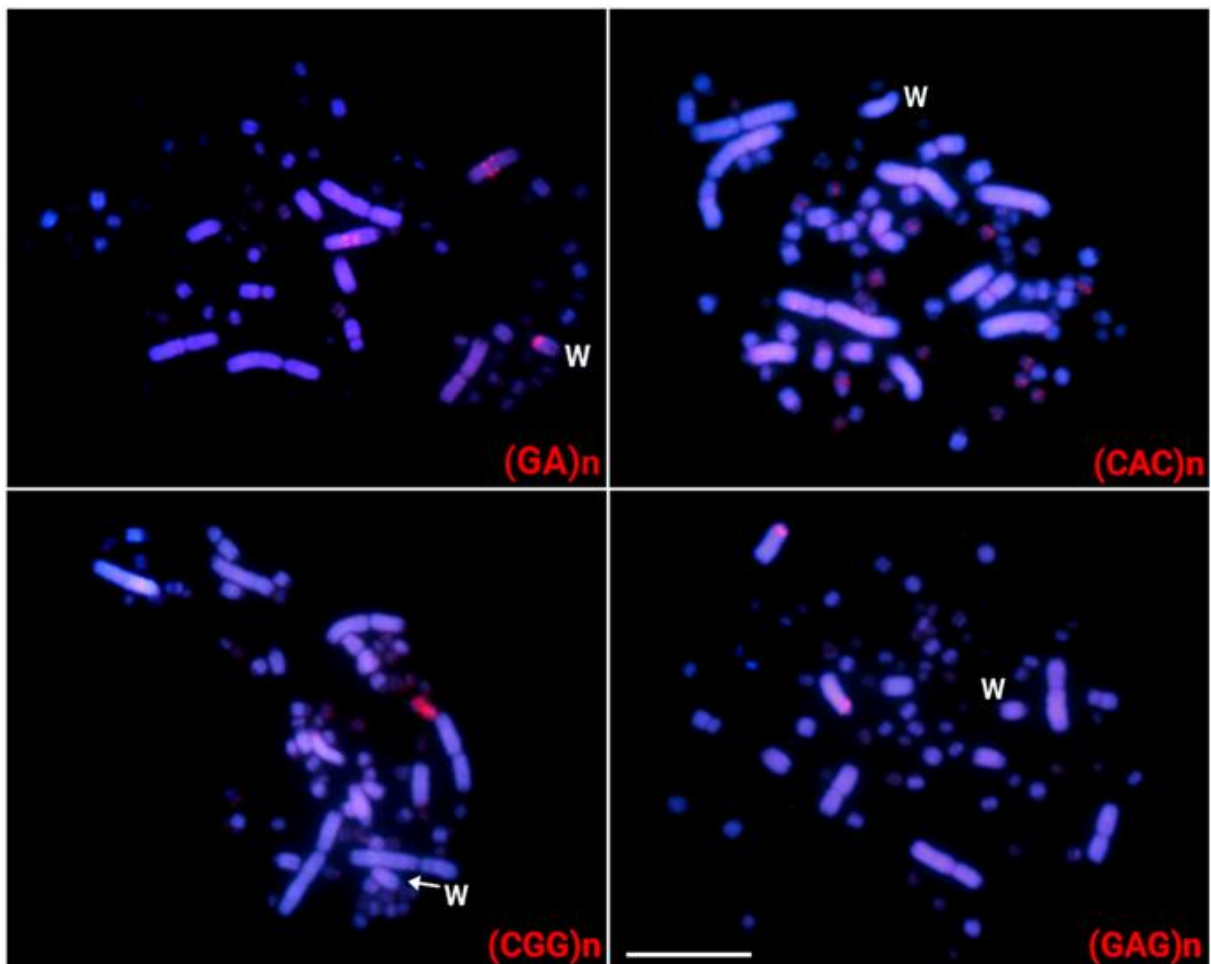


Figura 4: Metáfases de fêmeas de ema destacando a localização cromossômica das repetições de microssatélites. Os microssatélites estão indicados em vermelho no canto inferior direito. Enquanto o cromossomo W foi identificado adequadamente por uma hibridização sequencial com o microssatélite (GA)_n, o cromossomo Z não pôde ser identificado adequadamente com base em sua morfologia. Barra = 10 µm.

676 Diferentemente do cenário encontrado para ambas as espécies de ratitas (emu e ema),
677 nove sequências de microssatélites foram altamente acumuladas nos cromossomos do inhambu-
678 chintã. Com exceção dos microssatélites (CGG)_n e (CAG)_n, que foram mapeados em apenas

679 um par de microcromossomos, todos os outros foram mapeados no cromossomo W. Enquanto
680 o microsatélite (GA)₁₅ foi mapeado exclusivamente no cromossomo W, (A)_n, (CA)_n,
681 (CAA)_n, (CAC)_n, (GAA)_n, (TA)_n e (TAC)_n também estavam presentes em outros macro e
682 microcromossomos (**Figura 5**).

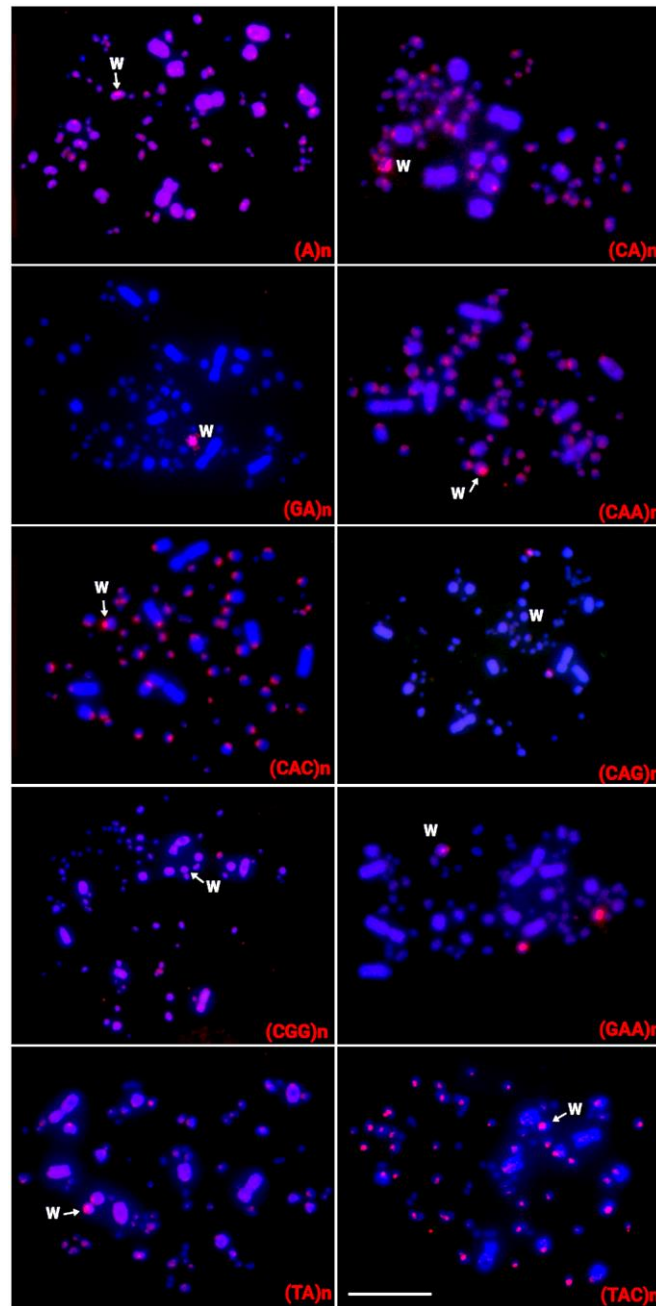


Figura 5: Metáfases de fêmeas do inhambu-chintã destacando a localização cromossômica das repetições de microsatélites. Os microsatélites estão indicados em vermelho no canto inferior direito. Enquanto o cromossomo W foi identificado adequadamente por uma hibridização sequencial com o microsatélite (GA)_n, o cromossomo Z não pôde ser identificado adequadamente com base em sua morfologia. Barra = 10 µm

683 ***Amplificação de DnosatDNA em Rhea americana***

684 Entre todos os 24 DnoSatDNAs investigados, os satélites DnoSat01, 03, 08, 14, 16, 20
685 e 21 também estavam presentes no genoma da ema. No entanto, após estudos de FISH, nenhum
686 deles produziu sinais de hibridização em seus cromossomos (dados não mostrados).

687 ***Hibridização genômica comparativa***

688 Por fim, ao analisar sequências específicas para cada sexo, identificamos múltiplas
689 regiões sobrepostas, principalmente nas regiões centroméricas de todos os macros e
690 microcromossomos do emu. Não foi revelada nenhuma sequência específica da fêmea no
691 cromossomo W. Comparações interespecíficas entre o emu e as fêmeas de ema evidenciaram o
692 acúmulo de sequências específicas do emu na maioria dos cromossomos e em alguns
693 microcromossomos (**Figura 6**).

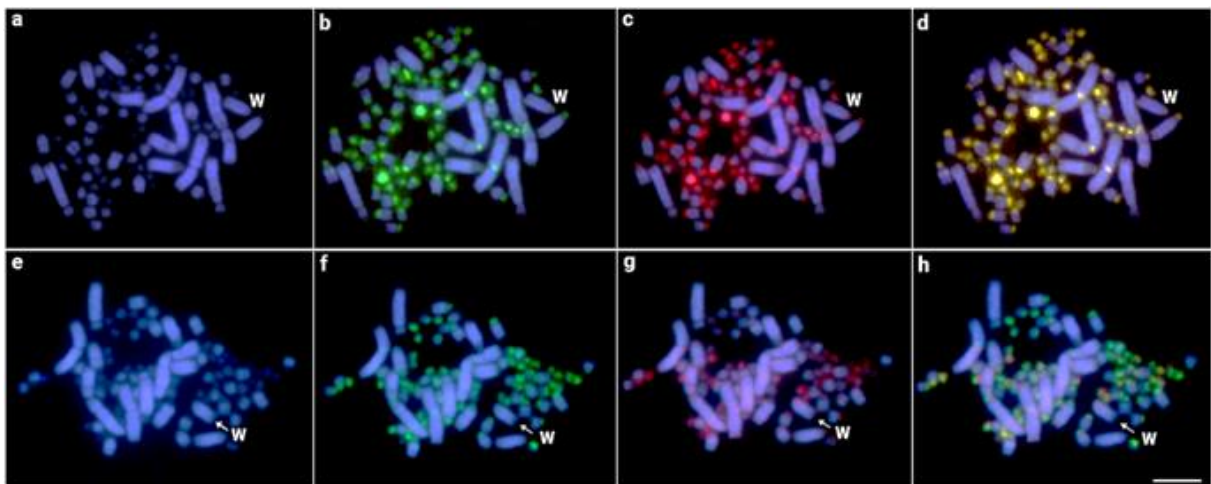


Figura 6: Hibridização genômica intraespecífica com sondas de gDNA de machos e fêmeas de emu hibridizadas em cromossomos metafásicos femininos (**ad**). (**a**) Metáfases coradas com DAPI da fêmea de emu, (**b**) padrão de hibridização da sonda derivada de macho (verde), (**c**) padrão de hibridização da sonda derivada de fêmea (vermelho) e (**d**) imagens mescladas de ambas as sondas genômicas e coloração DAPI. Hibridização genômica interespecífica entre o emu e a ema (**eh**). (**e**) Metáfases coradas com DAPI da fêmea de emu, (**f**) padrão de hibridização da sonda derivada de fêmea de emu (verde), (**g**) padrão de hibridização da sonda derivada de fêmea de ema maior (vermelho) e (**h**) imagens mescladas de ambas as sondas genômicas e coloração DAPI. Enquanto o cromossomo W foi adequadamente identificado por uma hibridização sequencial com o microssatélite (GA)_n, o cromossomo Z não pôde ser identificado adequadamente com base em sua morfologia. Barra = 5 µm.

694 **DISCUSSÃO**

695 **Organização geral dos satDNAs no genoma do emu**

696 As aves frequentemente apresentam genomas mais curtos devido à diminuição do seu
697 conteúdo de DNA repetitivo e do número de genes relacionados às necessidades metabólicas e
698 ao voo, o que expõe essas espécies a uma forte seleção estabilizadora (Kapusta et al., 2017;
699 Organ et al., 2007; Zhang & Edwards, 2012; Zhang et al., 2014). Consequentemente, presume-
700 se que a maioria das espécies de aves possua um pequeno número de sequências repetitivas,
701 levando a um menor número de famílias de satDNA (Kretschmer et al., 2018). No entanto, essa
702 hipótese é apoiada por dados disponíveis limitados (De Oliveira et al., 2024; Peona et al., 2023;
703 Souza et al., 2024). Esse cenário muda completamente em relação a algumas aves incapazes de
704 voar. Além de possuírem ossos mais densos e pesados, as aves incapazes de voar apresentam
705 genomas maiores e com maior quantidade de DNAs repetitivos (Gregory, 2005; Hughes, 1999;
706 Sackton et al., 2018). Assim, encontramos 24 sequências de satDNA no emu (que correspondem
707 a aproximadamente 6% de seu genoma), um número maior do que aqueles previamente
708 documentados, que são predominantemente longos (ou seja, excedendo 100 pb), com uma
709 proporção de abundância de fêmeas para machos quase igual (Tabela 1). Para obter um
710 resultado mais preciso, investigamos a ocorrência de DnoSat02 em algumas outras espécies
711 usando os genomas montados do emu (GCF_003342905.1): *Apteryx*
712 *rowi* (GCF_003343035.1), *Gavialis gangeticus* (GCF_001723915.1) e *Gallus*
713 *gallus* (GCF_016699485.2). Essa sequência foi encontrada apenas no emu, sem repetições em
714 tandem em nenhuma das outras espécies.

715 Exceto por DnoSat04, DnoSat16 e DnoSat21, todos os outros DnoSatDNAs foram
716 mapeados exclusivamente para autossomos, tanto em macro quanto em microcromossomos,
717 mas preferencialmente nos últimos (**Figura 2**). Resultados comparáveis também foram
718 descobertos na ema menor (*Pterocnemia pennata*) e na ema (*Rhea americana*) utilizando
719 digestão de DNA genômico com uma endonuclease de restrição (Yamada et al., 2002). Essa
720 condição também está ligada à redução do genoma aviário quando comparado ao de répteis,
721 devido à considerável correlação entre o conteúdo de GC e a maior tendência de remover
722 regiões não codificantes (Liu et al., 2021). Por outro lado, embora sete DnoSatDNAs também
723 estivessem presentes no genoma da ema (dados não mostrados), nenhum deles apresentou sinais
724 positivos de hibridização após investigações de FISH. Conforme demonstrado anteriormente
725 em insetos e plantas (Mestrovic et al., 1998; Mravinac et al., 2002; Navajas-Pérez et al., 2009),
726 espécies relacionadas podem ter uma coleção ancestral de diferentes famílias de satDNA

727 conservadas que são amplificadas de forma diferente em cada linhagem. Como resultado,
728 apenas algumas cópias dessas sequências são encontradas entre espécies relacionadas (Garrido-
729 Ramos, 2017). A evolução dos satDNAs pode ser explicada por duas hipóteses
730 complementares: (i) a da biblioteca, que aborda a expansão, contração e homogeneização
731 independentes de satDNAs em espécies divergentes; (ii) a hipótese combinada, que considera
732 processos de recombinação que levam à duplicação, exclusão e homogeneização de satDNAs
733 comuns em espécies divergentes (Dos Santos et al., 2021; Dover, 1982; Fry & Salser, 1977;
734 Garrido-Ramos, 2017; Thakur et al., 2021). Juntas, essas hipóteses podem explicar como os
735 satDNAs evoluíram e porque sua conservação a longo prazo, na verdade, não é esperada.

736 *Evolução dos antigos cromossomos sexuais ZW recombinados em pássaros*

737 Embora os cromossomos sexuais tenham sido extensivamente investigados desde o
738 início dos anos 1900 (Muller, 1918), ainda há muitas perguntas sem resposta, e novos estudos
739 estão consistentemente identificando novos caminhos para sua evolução (Furman et al., 2020;
740 Meisel, 2020; Perrin, 2009, 2021). Entre as aves, a maioria das espécies contém um sistema de
741 cromossomos sexuais ZZ/ZW bem diferenciado, com cromossomos W pequenos e
742 heterocromáticos (revisado em Kretschmer et al., 2018; Pigozzi & Solari, 1999; Wang et al.,
743 2014). Em contraste, as aves ratitas apresentam cromossomos sexuais morfologicamente
744 indiferenciados, com Z e W ainda sendo morfologicamente semelhantes (Nishida-Umehara et
745 al., 1999; Nishida-Umehara et al., 2007; Ogawa et al., 1998; Tsuda et al., 2007). Uma das
746 melhores maneiras de analisar as etapas da diferenciação dos cromossomos sexuais é investigá-
747 las em grupos onde esse processo ainda está em desenvolvimento ou em estágio inicial, como
748 nas espécies de ratitas.

749 No presente estudo, as abordagens citogenéticas e genômicas combinadas
750 demonstraram que os cromossomos W do emu e da ema são grandes e indiferenciados. Além
751 de serem morfologicamente semelhantes ao Z e pobres em conteúdo de heterocromatina, não
752 há acúmulo específico de repetições nos cromossomos W. No emu, apenas três DnoSatDNAs
753 foram encontrados nos cromossomos sexuais, sem diferença discernível no acúmulo no
754 cromossomo W (**Figura 2**). O microssatélite (GA)_n é a única exceção, mostrando um padrão
755 distinto de acúmulo no cromossomo W em ambas as espécies (**Figuras 3 e 4**). Além disso,
756 nenhuma diferenciação molecular substancial foi obtida em seus cromossomos W após
757 experimentos de CGH intra e interespecíficos (**Figura 6**).

758 A causa primária da diferenciação dos cromossomos Y ou W é a cessação da
759 recombinação entre uma porção significativa, se não toda, de um par sexual X/Y ou Z/W

760 previamente indiferenciado (Charlesworth & Charlesworth, 2000, 1980; Fisher, 1931). Da
761 mesma forma, a heterocromatinização está intimamente relacionada ao acúmulo de sequências
762 repetitivas de DNA nos cromossomos W ou Y, contribuindo para sua diferenciação morfológica
763 e a origem de um PAR curto (Singh et al., 1980). A pintura cromossômica com uma sonda
764 derivada de Z de galinha produziu sinais FISH em todo o comprimento do cromossomo Z do
765 emu, mostrando sua grande homologia. Essas pinturas também produziram sinais ao longo da
766 maior parte do cromossomo W, exceto por uma pequena região em seu braço curto e na região
767 centromérica, demonstrando a grande homologia compartilhada pelo par sexual do emu (Shetty
768 et al., 1999). Nesse cenário, apenas dois DnoSatDNAs (16 e 21) foram compartilhados
769 exclusivamente pelos cromossomos Z e W e provavelmente localizados na região PAR. Apesar
770 de sua distribuição semelhante, a análise *in silico* sugere que o DnoSat18 é duas vezes mais
771 abundante em fêmeas, enquanto a proporção fêmea-macho do DnoSat21 é de 1,08 (**Tabela**
772 **Suplementar 1**), indicando um possível acúmulo do DnoSat18 e uma diferenciação precoce do
773 cromossomo W do emu.

774 Por outro lado, apesar de ser filogeneticamente relacionado e pertencer ao mesmo grupo
775 de pássaros (Palaeognathae), o tinamou tataupa exhibe um cromossomo W bem diferenciado e
776 rico em heterocromatismo que acumula grandes quantidades de repetições de microssatélites,
777 embora não preserve nenhum DnoSatDNA (**Figura 5**). Dados anteriores de lagartos, plantas e
778 peixes enfatizam que os microssatélites representam os primeiros colonizadores de novos
779 cromossomos sexuais Y/W após a recombinação do par sexual ser interrompida (Cioffi et al.,
780 2012; Kejnovsky et al., 2009; Pokorná et al., 2011). Por sua vez, contrastando com outras
781 espécies de Tinamiformes, o inhambu-chintã exhibe uma característica distinta no cromossomo
782 W, que é completamente heterocromático, conforme demonstrado por (Garnero, 2006) e
783 (Pigozzi, 2011), bem como por nossa investigação atual. Devido a essa natureza
784 heterocromática, a região recombinante entre os cromossomos sexuais do inhambu-chintã é
785 notavelmente menor em comparação com outras espécies. Esta região está confinada ao
786 segmento terminal do braço longo do cromossomo W, em contraste com o inhambu martineta
787 (*Eudromia elegans*), onde a região recombinante abrange um quarto do comprimento do
788 cromossomo W (Pigozzi, 2011). Embora o emu e o inhambu-chintã pertençam ao grupo
789 Palaeognathae, eles divergiram em aproximadamente 62 milhões de anos atrás (Kumar et al.,
790 2022), o que ajuda a entender seu modo contrastante de evolução dos cromossomos sexuais.

791 Cromossomos sexuais muito antigos e morfológicamente indiferenciados também
792 foram documentados, como os presentes nos peixes esturjões (~ 180Mya) e osteoglossiformes

793 (~ 200Mya) (Cioffi et al., 2019; Kuhl et al., 2021), bem como nas ratitas (> 130Mya) (Yazdi
794 & Ellegren, 2014). As ratitas, no entanto, destacam-se entre os casos acima mencionados
795 porque, em contraste com os outros exemplos, a grande maioria das espécies de pássaros
796 estabeleceu um sistema sexual ZZ/ZW bem diferenciado. Além disso, a possibilidade desses
797 cromossomos passarem por um evento de renovação ao longo do tempo é bastante baixa (Yazdi
798 et al., 2020). Então, o que sustenta sua grande indiferenciação de longo prazo? A prevalência
799 de cromossomos sexuais homomórficos por mais de 130 milhões de anos entre espécies de
800 ratitas e as forças evolutivas que podem ter dificultado sua diferenciação do cromossomo W
801 podem ser explicadas por duas hipóteses: (i) a primeira relaciona como o viés sexual afeta a
802 expressão gênica do cromossomo Z, tanto em suas regiões PAR quanto não recombinantes.
803 Esse viés pode limitar a prole de um alelo sexualmente antagônico ao sexo que se beneficia,
804 levando a um processo evolutivo que produz espécies com cromossomos homomórficos (Otto
805 et al., 2011; Vicoso et al., 2013); (ii) A segunda hipótese postula que a recombinação perto da
806 região PAR pode quebrar a associação entre as regiões ligadas ao sexo e as regiões PAR, o que,
807 por sua vez, minimiza a influência da ligação sexual com genes próximos e reduz a
808 probabilidade de mutações específicas do sexo (Yazdi et al., 2023). Com esse evento em
809 particular, uma alta taxa de recombinação entre os cromossomos sexuais provavelmente causa
810 a grande extensão do PAR, como mostrado no avestruz (Yazdi et al., 2023).

811 **CONCLUSÃO**

812 Neste estudo, caracterizamos a biblioteca completa de satDNA, comumente chamada
813 de satelitoma, do emu e conduzimos uma análise comparativa com duas outras espécies de
814 Palaeognathae: a ema e o inhambu-chintã. Mostramos a ocorrência de 24 sequências distintas
815 de satDNA, um número notavelmente maior em comparação com casos previamente
816 documentados em outras espécies de aves. No entanto, não foi observado grande acúmulo de
817 heterocromatina C-positiva e DNAs repetitivos nos cromossomos W do emu e da ema,
818 destacando que eles escaparam de uma grande diferenciação no nível molecular. O inhambu-
819 chintã, por outro lado, apresenta um cenário contrastante, dado seu cromossomo W altamente
820 diferenciado, que acumula várias repetições de DNA. Os resultados nos permitem ter uma visão
821 interna dos estágios iniciais da diferenciação dos cromossomos sexuais em aves, além de
822 oferecer novos *insights* sobre a arquitetura do genoma aviário.

823 **REFERÊNCIAS**

824 As referências deste capítulo encontram-se reunidas ao final da dissertação.

825 **CAPÍTULO 2**

826 ***Evolução dos cromossomos sexuais ZW em cobras Ptyas (Reptilia, Colubridae): novos***
827 ***insights de uma perspectiva citogenética molecular***

828 Artigo publicado no periódico: *International Journal of Molecular Sciences*

829 **RESUMO**

830 As cobras são citogeneticamente dinâmicas, caracterizadas por números cromossômicos
831 diploides amplamente conservados, embora exibam estágios evolutivos variáveis de seus
832 cromossomos sexuais. Este estudo examinou quatro cobras, com foco especial no gênero *Ptyas*,
833 para fornecer *insights* evolutivos sobre a evolução dos cromossomos sexuais ZW. Realizamos
834 uma extensa caracterização cariotípica usando abordagens citogenéticas convencionais e
835 moleculares, descrevemos pela primeira vez o cariótipo de *Ptyas korros* e revisitamos as
836 descrições cariotípicas de *P. mucosa*, *Chrysopelea ornata* e *Fowlea flavipunctatus*.
837 Descobrimos que todas as espécies, exceto *F. flavipunctatus*, têm cromossomos W altamente
838 heterocromáticos enriquecidos em satDNAs ou repetições de microssatélites. Sequências
839 repetitivas se acumulam com a heterocromatinização do cromossomo W, mas não estão
840 necessariamente associadas a esse processo, demonstrando a composição dinâmica dos
841 cromossomos sexuais de cobras. Sondas autossômicas específicas de loci e de cromossomos
842 sexuais de *Pogona vitticeps* e *Varanus acanthurus* não apresentaram sinais de hibridização em
843 cobras *Ptyas*, sugerindo caminhos evolutivos divergentes. Essa descoberta destacou a natureza
844 dinâmica da evolução dos cromossomos sexuais em cobras, que ocorreu de forma independente
845 em lagartos.

846 **Palavras-chave:**

847 répteis ; cromossomos sexuais ; PEIXES ; sistema ZW ; evolução

848 **INTRODUÇÃO**

849 As cobras constituem uma das classes mais notáveis de répteis, com mais de 4000
850 espécies atualmente descritas, que são agrupadas em oito famílias, classificadas como
851 caenofídios (“cobras avançadas”) e não caenofídios (“cobras mais velhas”) (Streicher & Wiens,
852 2016; Uetz, 2025; Vidal et al., 2006; Zaher et al., 2009). As cobras caenofídios abrangem táxons
853 como Colubridae, enquanto as cobras não caenofídios são classificadas em clados primitivos,
854 incluindo as famílias Boidae e Pythonidae (Lee et al., 2007; Pyron et al., 2014; Pyron;
855 Reynolds; Burbrink, 2014; Pyron; Burbrink; Wiens, 2013; Rovatsos et al., 2015; Uetz, 2025;
856 Yamada; Nishida-Umehara; Matsuda, 2004). As cobras são conhecidas por apresentar uma
857 grande estabilidade cariotípica, onde a maioria das espécies possui 34–36 cromossomos,
858 organizados em 8 pares de macro e 9–10 pares de microcromossomos (Baker et al., 1972; Beçak
859 et al., 1962; Gorman, 1981; Gutierrez et al., 1988; Oguiura et al., 2009; Viana et al., 2020). As
860 cobras avançadas exibem cromossomos sexuais ZW altamente diferenciados, tipicamente o
861 quarto ou quinto maior par de cromossomos, com o cromossomo W frequentemente sendo
862 heteromórfico e heterocromático (Beçak & Beçak, 1969; Mengden & Stock, 1980; Singh et al.,
863 1968). Em contraste, outras linhagens de cobras frequentemente têm cromossomos sexuais
864 homomórficos, tornando-os indetectáveis por técnicas citogenéticas convencionais (Pšenička
865 et al., 2025). Essa dificuldade em identificar seus cromossomos sexuais levou à noção
866 predominante de que a maioria das cobras tem um sistema ZZ/ZW, no qual as fêmeas são
867 heterogaméticas (Augstenová et al., 2018; Beçak et al., 1964; Matsubara et al., 2006; Rovatsos
868 et al., 2015). No entanto, novas evidências fornecem forte suporte para a existência de um
869 sistema XY em certas linhagens, sugerindo que a diversidade nos mecanismos de determinação
870 do sexo dentro do grupo pode ter sido subestimada (Augstenová et al., 2018; Viana et al., 2020).
871 A coexistência de cromossomos sexuais homomórficos e altamente diferenciados indica um
872 cenário evolutivo mais dinâmico do que se pensava anteriormente, reforçando a necessidade de
873 abordagens moleculares mais detalhadas para esclarecer a evolução dos sistemas de
874 determinação sexual em cobras (Augstenová et al., 2018; Pšenička et al., 2025).

875 Colubridae representa um dos grupos mais especiais entre as cobras, que atualmente
876 inclui sete subfamílias: Natricinae, Pseudoxenodontinae, Dipsadinae, Sibynophiinae,
877 Calamariinae, Grayiinae e Colubrinae. Juntas, elas constituem mais da metade de todas as
878 espécies de cobras, ou cerca de 1800 espécies válidas (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Pyron
879 et al., 2013). A ecologia dessas cobras é notavelmente diversificada, incluindo espécies
880 venenosas e não venenosas (Ching et al., 2006; Datta & Tu, 1993; Hedley & Eatwll, 2019;

881 Heyborne & Mackessy, 2013; Hill & Mackessy, 2000; Mackessy, 2002; Prado-Franceschi &
882 Hyslop, 2002). Investigações citogenéticas de espécies de Colubridae revelaram diversidade
883 significativa em números diploides ($2n$), variando de $2n = 24$ (em *Hydrodynastes bicinctus*) a
884 $2n = 54$ (em *Clelia occipitolutea*) (Beçak & Beçak, 1969), juntamente com mudanças
885 morfológicas em seus cromossomos sexuais, incluindo um sistema ZW homomórfico e
886 altamente diferenciado (Beçak & Beçak, 1969; Viana et al., 2019; Singh, 1972; Singh et al.,
887 1976). No entanto, a maioria das espécies ainda carece de dados citogenéticos, e a
888 diversificação cariotípica de vários grupos é inadequadamente pesquisada ou totalmente
889 negligenciada (Viana et al., 2019). O gênero *Ptyas*, comumente chamado de cobras-rato,
890 compreende 13 espécies distribuídas principalmente no sudeste da Ásia (Uetz, 2025) e é um
891 dos gêneros de Colubridae menos estudados. Os únicos estudos citogenéticos envolvendo o
892 gênero *Ptyas* foram realizados na década de 1970 com a espécie *Ptyas mucosa*, que indicou $2n$
893 $= 36$ e cromossomos sexuais ZW homomórficos (Singh, 1972; Singh et al., 1976). A posição
894 evolutiva de *Ptyas* dentro dos Colubridae representa uma oportunidade atraente para examinar
895 padrões de amplificação de sequência repetitiva e evolução cromossômica (Figueroa et al.,
896 2016). Essas análises são contextualizadas por meio de comparações citogenéticas com outras
897 cobras da mesma área geográfica, embora de gêneros diferentes, ou mesmo de regiões remotas.
898 Isso permite a análise dos caminhos evolutivos dos cromossomos sexuais e sequências
899 repetitivas em cobras, ao mesmo tempo em que melhora nossa compreensão dos processos por
900 trás da diferenciação cromossômica, especialmente a heterogeneidade dentro do par de
901 cromossomos sexuais ZW.

902 Nosso estudo envolveu uma investigação completa, utilizando quatro cobras, com foco
903 especial em duas espécies de *Ptyas* (a cobra-rato chinesa *Ptyas korros* e a cobra-rato
904 oriental *Ptyas mucosa*) como modelos. Nosso objetivo foi abordar as seguintes questões: (i) Os
905 cromossomos sexuais homomórficos dessas cobras também são molecularmente
906 indiferenciados? (ii) Existe uma correlação entre heteromorfismo, heterocromatização e o
907 acúmulo de sequências repetidas? (iii) O cromossomo W de *Ptyas* contém sequências
908 repetitivas distintas ausentes no cromossomo Z? (iv) As mesmas repetições presentes nos
909 cromossomos Z e/ou W de *P. korros* também são preservadas nos cromossomos W de *P.*
910 *mucosa* e em outras espécies intimamente relacionadas? (v) Os cromossomos sexuais
911 de *Ptyas* compartilham sequências semelhantes com lagartos escamados? Para abordar essas
912 questões, conduzimos uma caracterização cariotípica abrangente empregando metodologias
913 citogenéticas convencionais e moleculares em duas espécies de *Ptyas*, abrangendo montagem

914 cariotípica, bandamento C, comparações genômicas entre sexos e espécies, identificação de
915 Sequências Teloméricas Intersticiais (ITS) e mapeamento de sequências de microssatélites.
916 Posteriormente, caracterizamos o satélite (ou seja, toda a coleção de DNAs satélites) de *P.*
917 *korros* e empregamos análises extensivas para determinar a trajetória evolutiva dos
918 cromossomos sexuais em espécies filogeneticamente análogas, abrangendo outras cobras
919 Colubridae (*Ptyas mucosa*, a quilha-amarela-manchada *Fowlea flavipunctatus* e a cobra-
920 dourada *Chrysopelea ornata*), além da cobra-tigre *Notechis scutatus* (Elapidae) e do lagarto-
921 de-cauda-espinhosa *Varanus acanthurus* (Squamata, Varanidae), um membro de um clado
922 basal de lagartos. Além disso, para elucidar as sequências sexuais compartilhadas em répteis,
923 também mapeamos cromossomos artificiais bacterianos ligados ao sexo (BACs) do dragão
924 barbudo central *Pogona vitticeps* (Squamata, Agamidae) para examinar sua conservação entre
925 répteis escamados.

926 **MÉTODOS**

927 Os métodos estão detalhadamente descritos na seção 3 (materiais e métodos).

928 **Amostragem**

929 A **Tabela 2** resume a origem das amostras, o número de indivíduos analisados e seu
930 sexo.

Tabela 2: Espécie, origem, tamanho da amostra (N) e sexo dos indivíduos analisados.

Espécie e abreviação (quando usado)	Origem das amostras	N
<i>Ptyas korros</i> (PKO)	Khon Kaen, Tailândia	02♀; 01♂
<i>Ptyas mucosa</i> (PMU)	Khon Kaen, Tailândia	02♀; 02♂
<i>Chrysopelea ornata</i> (COR)	Khon Kaen, Tailândia	01♀; 01♂
<i>Fowlea flavipunctatus</i> (FFL)	Khon Kaen, Tailândia	01♀; 01♂
<i>Notechis scutatus</i> (NSC)	Camberra, Austrália	01♀
<i>Pogona vitticeps</i> (PVI)	Camberra, Austrália	01♀
<i>Varanus acanthurus</i> (VAC)	Camberra, Austrália	02♀

931 **RESULTADOS**

932 **Cariótipos e heterocromatina C-positiva**

933 Ambas as espécies de *Ptyas* (*P. korros* e *P. mucosa*) apresentaram um número diploide
934 de $2n = 34$, com 16 macrocromossomos e 18 microcromossomos (**Figura 7 a,b,e,f**). *C.*
935 *ornata* apresentou $2n = 36$, com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos (**Figura 7 i,j**).
936 Em contraste, *F. flavipunctatus* apresentou um número diploide de $2n = 42$, consistindo de 18
937 macrocromossomos e 24 microcromossomos (**Figura 7 m,n**).

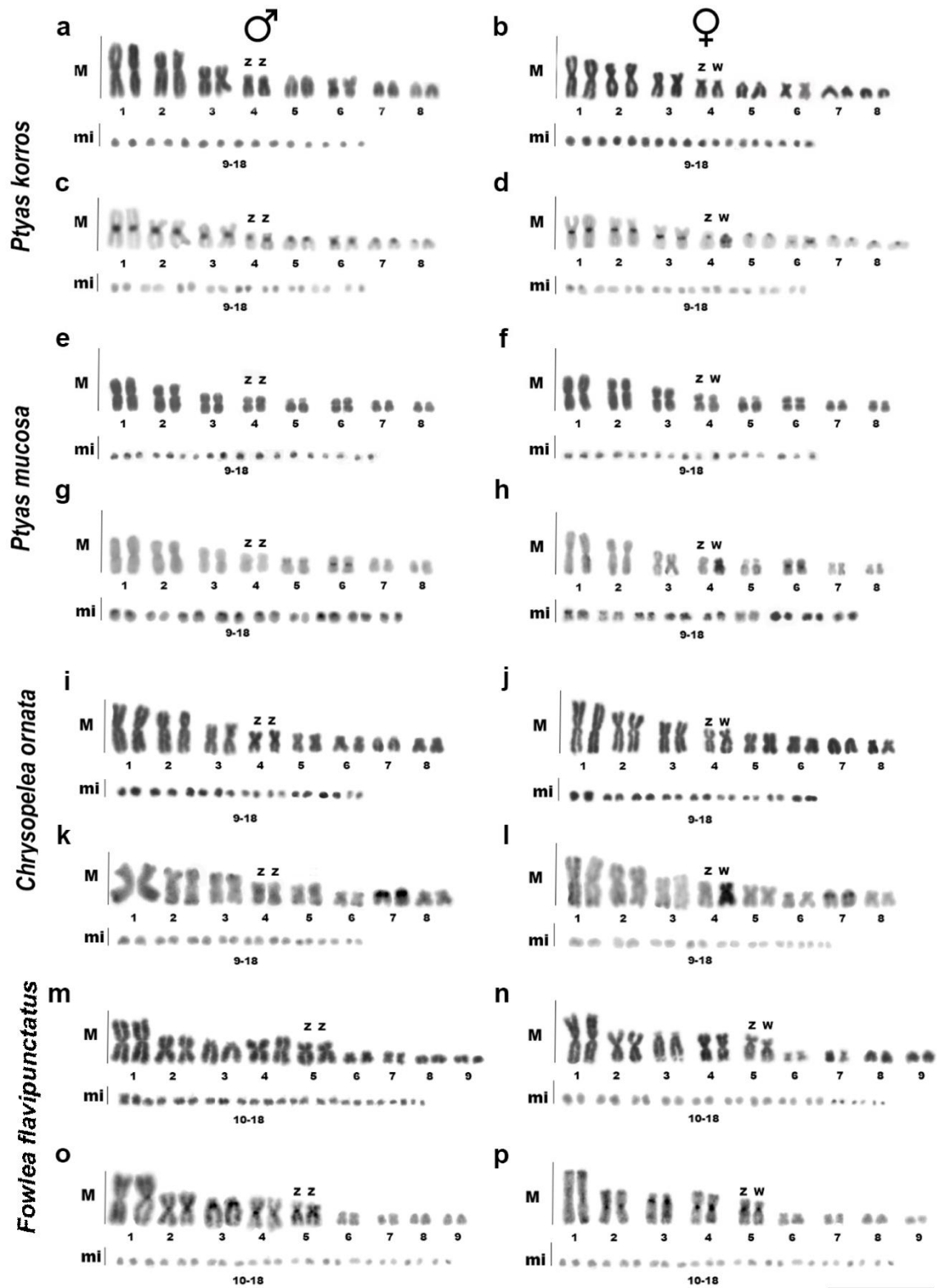


Figura 7: Cariótipos de *Ptyas korros* (a – d), *Ptyas mucosa* (e – h), *Chrysopelea ornata* (i – l) e *Fowlea flavipunctatus* (m – p) dispostos após coloração de Giemsa (a, b, e, f, i, j, m, n) e bandeamento C (c, d, g, h, k, l, o, p). Barra de escala = 10 μm.

938

A análise do padrão geral de bandas C revelou diferenças claras entre as espécies

939

analisadas. *P. korros* e *F. flavipunctatus* exibiram bandas heterocromáticas em quase todos os

940 centrômeros (**Figura 7 c,d,o,p**). Em contraste, *C. ornata* e *P. mucosa* apresentaram marcação
941 heterocromática predominantemente restrita ao cromossomo W, com pouca ou nenhuma
942 detecção nos demais cromossomos (**Figura 7 g,h,k,l**).

943 A análise de bandas C revelou ainda um cromossomo W marcadamente
944 heterocromático em ambas as espécies *de Ptyas* e *C. ornata*, permitindo a identificação precisa
945 do par sexual ZW como o quarto maior par no cariótipo dessas espécies (**Figura 7 d,h,l**). Apesar
946 de pequenas variações na localização centromérica do cromossomo W, os cromossomos sexuais
947 ZW foram indistinguíveis após a coloração de Giemsa. Apenas *F. flavipunctatus* não exibiu
948 acúmulo de heterocromatina no W; no entanto, o heteromorfismo significativo entre o Z e o W
949 facilitou a identificação precisa do par sexual como o quinto maior par no cariótipo nesta
950 espécie (**Figura 7 n,p**). Além das análises, microssatélites também foram usados para
951 identificar os cromossomos sexuais (a serem descritos abaixo).

952 ***Conteúdo de DNA satélite de Ptyas korros e sua localização cromossômica***

953 Descobrimos seis famílias de DNA satélite no genoma de *P. korros*, doravante
954 denominadas PkoSatDNAs (ver **Tabela Suplementar 2**). O comprimento da unidade de
955 repetição apresentou uma mediana de 167 pares de bases e variou de 149 a 324 pares de bases.
956 A porcentagem de adenina e timina foi de 63,09%, refletindo a predominância desses pares de
957 bases. A **Figura Suplementar 4** mostra as paisagens de repetição, que ilustram a distribuição
958 e a variação entre todas as famílias de PkoSatDNA. Os resultados completos para cada satélite
959 estão descritos na **Tabela Suplementar 2**. As sequências estão disponíveis no NCBI-Genbank,
960 sob os números de acesso PV358982–PV358987.

961 Embora todos os seis PkoSatDNAs tenham sido amplificados com sucesso por PCR
962 (**Figura Suplementar 5**), apenas quatro deles (PkoSat01-168, PkoSat02-245, PkoSat04-149 e
963 PkoSat05-166) exibiram sinais positivos de hibridização nos cromossomos de *P.*
964 *korros* (**Figura 8**). PkoSat01-168 e PkoSat04-149 foram encontrados em autossomos, com
965 PkoSat01-168 hibridizando em dois pares de microcromossomos e PkoSat04-149 em um par
966 de macrocromossomos (**Figura 8**). PkoSat02-245 estava presente na região subtelomérica do
967 cromossomo W e no centrômero do terceiro par mais longo de autossomos (**Figura 8**).
968 PkoSat05-166 foi mapeado nas regiões centroméricas de quase todos os cromossomos, exceto
969 no cromossomo W, que também apresentou sinais principalmente na região telomérica dos
970 braços longos (**Figura 8**). Nenhum sinal foi detectado no cromossomo Z.

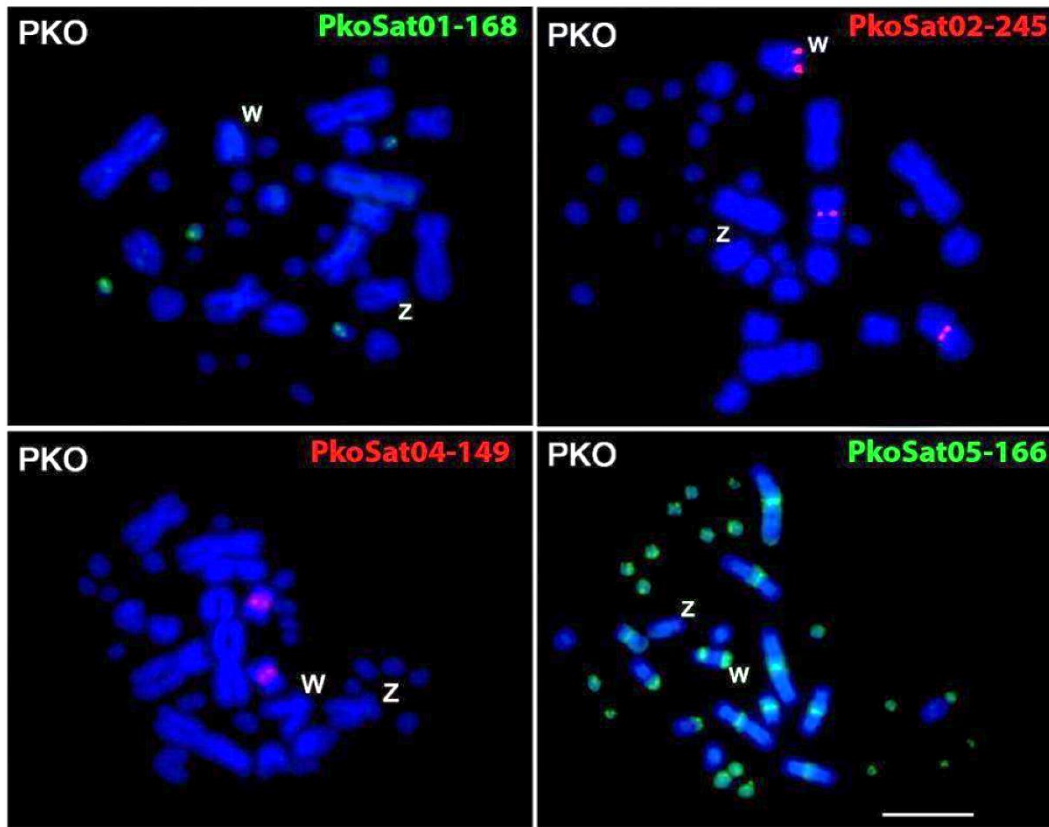


Figura 8: Metáfases de fêmeas de *Ptyas korros* (PKO) hibridizadas com diferentes PkoSatDNAs. Barra de escala = 10 μ m

971 ***Amplificação de PkoSatDNAs em outras espécies***

972 Dentre os PkoSatDNAs, apenas PkoSat01-168, PkoSat02-245, PkoSat03-324 e
 973 PkoSat05-166 foram detectados no genoma de *P. mucosa*. Além disso, apenas PkoSat02-245 e
 974 PkoSat04-149 foram identificados no genoma de *V. acanthurus* (ver **Figura Suplementar 5**).
 975 Não foi observada nenhuma indicação de amplificação por PCR de qualquer PkoSatDNA nas
 976 demais espécies examinadas. No entanto, análises FISH adicionais não revelaram evidências
 977 de hibridização nos cromossomos de nenhuma espécie, exceto *P. korros* (**Figura 8**).

978 ***Mapeamento cromossômico de (TTAGGG)_n e motivos microssatélites***

979 Para investigar padrões de diferenciação cromossômica, particularmente nos
 980 cromossomos sexuais, realizamos hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) usando
 981 sequências de microssatélites e teloméricas como sondas. Estudos anteriores mostraram que
 982 certos motivos de microssatélites, como (AG)_n, (AAGG)_n, (AAT)_n, (AGAT)_n e (ATCC)_n,
 983 frequentemente se acumulam em cromossomos sexuais degenerados, especialmente o
 984 cromossomo W, em vários grupos de vertebrados (Matsubara et al., 2014, 2016). Esses motivos
 985 podem servir como indicadores de diferenciação estrutural e podem ajudar a revelar processos

986 evolutivos que atuam nos cromossomos sexuais. Além disso, a sonda de repetição telomérica
987 (TTAGGG)_n foi usada para avaliar a integridade das extremidades dos cromossomos e
988 identificar possíveis sítios teloméricos intersticiais (ITSS), que podem indicar eventos passados
989 de fusão cromossômica ou rearranjo intracromossômico.

990 Repetições teloméricas (TTAGGG)_n exibiram ITS em todas as espécies de serpentes
991 examinadas: (i) no sexto par de cromossomos em ambas as espécies de *Ptyas*, (ii) no primeiro
992 par em *C. ornata* e (iii) nos três primeiros pares em *F. flavipunctatus* (**Figura 9**). No entanto,
993 nenhum ITS foi detectado nos cromossomos sexuais.

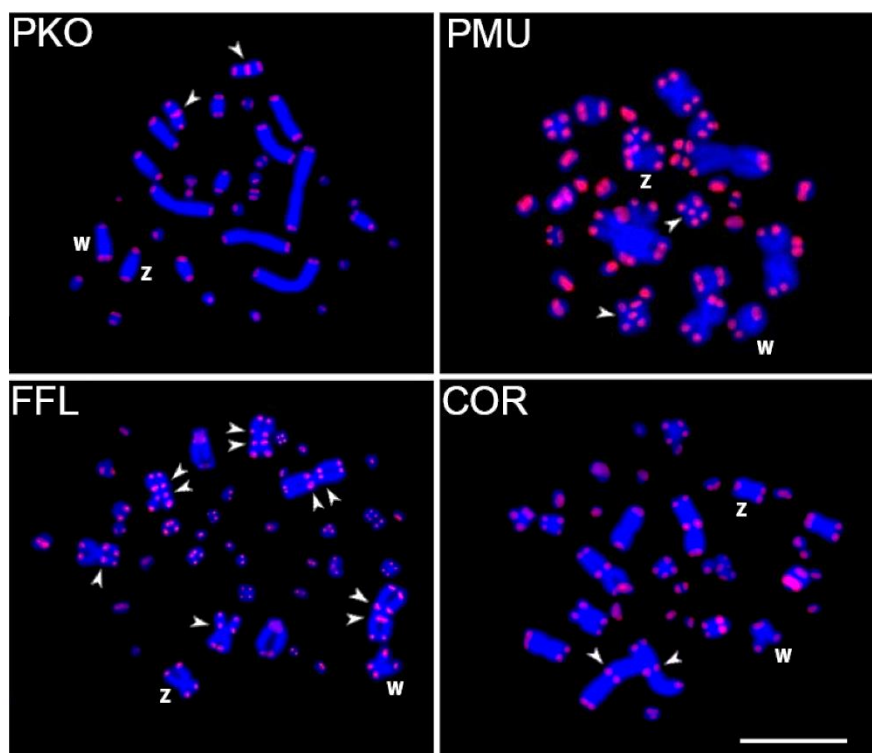


Figura 9: Metáfases femininas de *Ptyas korros* (PKO), *Ptyas mucosa* (PMU), *Fowlea flavipunctatus* (FFL) e *Chrysopelea ornata* (COR) hibridizadas com uma sonda telomérica (TTAGGG)_n. As pontas de seta indicam as sequências teloméricas intersticiais (ITSS). Barra de escala = 10 μm.

994 A distribuição cromossômica de repetições de microssatélites revelou padrões
995 variados de hibridização entre os cromossomos sexuais ZW das espécies analisadas. Três
996 sequências, (AG)_n, (ATCC)_n e (AGAT)_n, mostraram acúmulo massivo no cromossomo W
997 em *Ptyas* e *C. ornata*, exibindo um sinal intenso ao longo de todo o seu comprimento (**Figura**
998 **10**). O motivo (AAGG)_n mostrou uma distribuição dispersa ao longo do cromossomo W de *C.*
999 *ornata*, enquanto em *P. korros* estava concentrado na região centromérica, e em *P.*
1000 *mucosa* mostrou um padrão bitelomérico. O motivo (AAT)_n, por outro lado, acumulou-se
1001 exclusivamente na região centromérica do cromossomo W de *C. ornata*. Em geral, os

1002 cromossomos autossômicos mostraram padrões de marcação predominantemente teloméricos
 1003 ou centroméricos. Os cromossomos Z mostraram padrões de marcação semelhantes aos
 1004 autossomos, exceto o motivo (AGAT)_n em *P. korros*, que não mostrou sinais (**Figura**
 1005 **Suplementar 6**). Em *F. flavipunctatus*, os motivos microssatélites analisados estavam restritos
 1006 às regiões teloméricas, sem distinção entre cromossomos sexuais e autossômicos (**Figura**
 1007 **Suplementar 7**). Além disso, a sequência (AT)_n estava ausente, como observado em espécies
 1008 do gênero *Ptyas*.

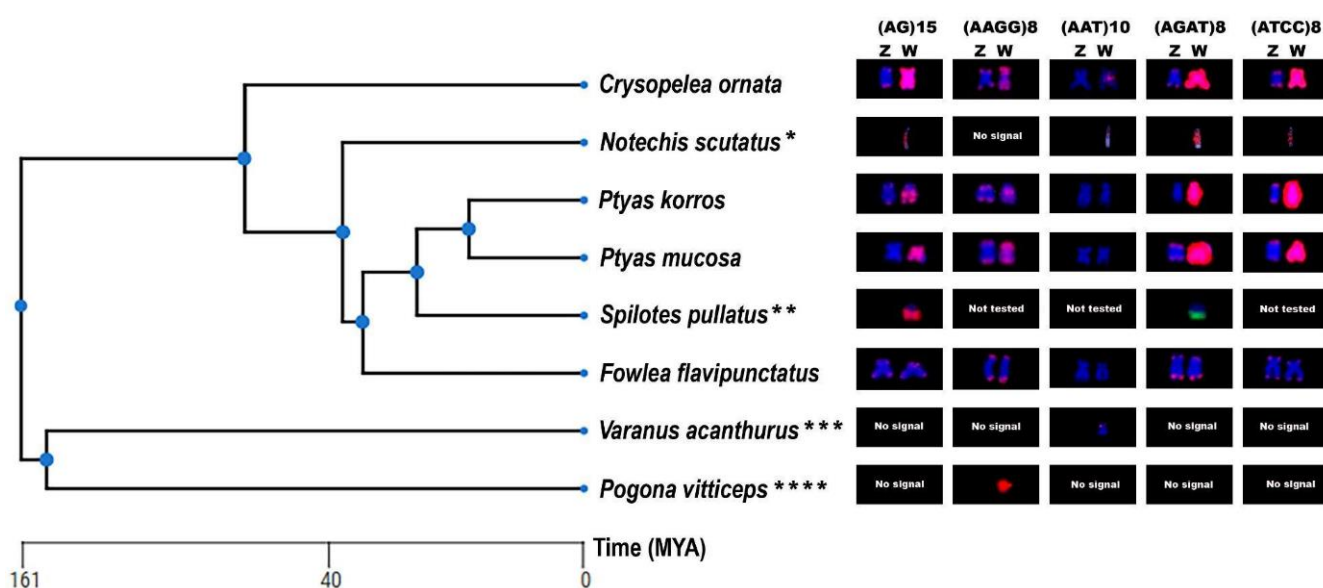


Figura 10: Árvore filogenética truncada destacando padrões de hibridização de repetições de microssatélites. As imagens referentes ao cromossomo W de *Notechis scutattus* e (*) *Pogona vitticeps* (****) foram retiradas do estudo publicado por (Matsubara et al., 2016) enquanto os cromossomos W de *Spilotes pullatus* (**) e *Varanus acanthurus* (***) foram retirados dos estudos de (Viana et al., 2019) e (Matsubara et al., 2014), respectivamente.

1009 Os cromossomos W foram identificáveis devido ao seu acúmulo heterocromático
 1010 significativo (ver **Figura 7**) e ao acúmulo diferencial de microssatélites. Tanto em *Ptyas* quanto
 1011 em *C. ornata*, o cromossomo W exibe um sinal significativo para as sequências (AGAT)_n,
 1012 (AG)_n e (ATCC)_n (**Figura Suplementar 6**).

1013 Para complementar nossas análises, construímos uma árvore filogenética usando a
 1014 plataforma TimeTree, incorporando nossos próprios dados junto com dados citogenéticos
 1015 publicados anteriormente para *S. pullatus* (Viana et al., 2019), *N. scutatus*, *P. vitticeps*
 1016 (Matsubara et al., 2016) e *V. acanthurus* (Matsubara et al., 2014). Essas espécies foram
 1017 incluídas para fornecer contexto comparativo para nossas descobertas (**Figura 10**).

1018 **Hibridizações genômicas comparativas**

1019 Primeiro, realizamos comparações intraespecíficas principalmente para examinar a
1020 composição molecular dos cromossomos sexuais de *P. korros*. Por meio da hibridização de
1021 DNA genômico masculino e feminino em metáfase de fêmeas de *P. korros*, todos os
1022 cromossomos (exceto o W) foram corados igualmente com essas sondas, principalmente nas
1023 regiões centroméricas (que são altamente heterocromáticas, como mostrado pela banda C)
1024 (**Figura 7 c,d**). A sonda de DNA genômico completo feminino pintou todo o cromossomo W,
1025 com um sinal forte na maior parte do Wq (**Figura 11 a–d**). As sondas de gDNA femininas e
1026 masculinas mostraram forte hibridização com o cromossomo W, conforme ilustrado na **Figura**
1027 **11 c**. Esse padrão sugere a presença de sequências repetitivas compartilhadas entre a região
1028 centromérica do Z e a maior parte do cromossomo W, com uma possível amplificação desses
1029 elementos no último. Embora o CGH possa detectar elementos repetitivos amplamente
1030 distribuídos, esse padrão de hibridização não foi observado com nenhuma das outras sondas

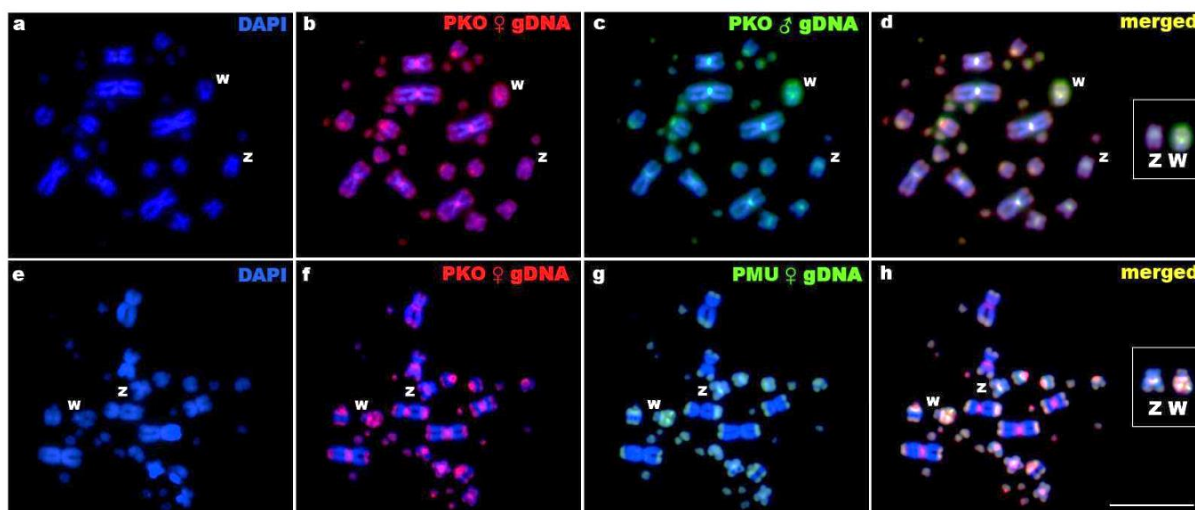


Figura 11: Metáfases mitóticas femininas de *Ptyas korros* (PKO) após análises de hibridização genômica comparativa intra (**a – d**) e inter (**e – h**) específica. (**a, e**) imagens DAPI; (**b, f**) padrões de hibridização de sondas genômicas femininas de PKO; (**c**) padrão de hibridização de sonda genômica masculina de PKO; (**g**) padrões de hibridização de sondas genômicas femininas de *Ptyas mucosa* (PMU); (**d, h**) imagens mescladas de ambas as sondas genômicas e contracoloração DAPI. As regiões coradas igualmente por ambas as sondas genômicas comparadas são representadas em amarelo (ou seja, uma combinação de verde e vermelho). Os cromossomos sexuais ZW estão em caixa. Barra de escala = 10 μ m.

1031 testadas neste estudo. Portanto, este resultado destaca uma característica potencialmente única
1032 e anteriormente não reconhecida na diferenciação do cromossomo W nesta espécie.

1033 Na investigação interespecífica, não foram observadas variações substanciais na
1034 composição genômica dos cromossomos W das duas espécies de *Ptyas*. No entanto,
1035 observamos o acúmulo de sequências específicas de *P. korros* nos centrômeros de vários
1036 autossomos (**Figura 11 e-h**).

1037 ***Homologia dos cromossomos sexuais entre cobras e lagartos***

1038 No dragão barbudo *P. vitticeps* (PVI), o clone BAC designado pv3L7 hibridiza
1039 particularmente com o telômero dos braços longos do cromossomo 2 e com um telômero de
1040 cada um dos microcromossomos Z e W, conforme relatado anteriormente por (Ezaz et al., 2013)
1041 (**Figura Suplementar 8**). Por outro lado, o clone BAC pv116G15, que engloba o gene NRSA1
1042 — crucial para a diferenciação sexual — também hibridiza com os cromossomos sexuais Z e
1043 W, mas no telômero oposto ao local de ligação da sequência pv3L7 em cada cromossomo
1044 (**Figura Suplementar 8**). Nenhum sinal de hibridização das sequências examinadas foi
1045 observado em nenhuma espécie de cobra.

1046 Para complementar nossa investigação das sequências ligadas ao sexo em lagartos e
1047 cobras, empregamos sondas desenvolvidas anteriormente por (Dobry et al., 2025) a partir dos
1048 cromossomos W e Z de *V. acanthurus*.

1049 Em *V. acanthurus*, a sonda cromossômica W exibiu sinais tanto no cromossomo W
1050 quanto no telômero dos braços longos de um par de macrocromossomos (**Figura Suplementar**
1051 **9**). Por outro lado, a sonda cromossômica Z exibiu um sinal forte no Z, além de sinais fracos
1052 no W e em três pares de microcromossomos (**Figura Suplementar 9**). Ambos os resultados
1053 confirmam descobertas anteriores (Dobry et al., 2025). No entanto, quando hibridizados nas
1054 duas espécies de *Ptyas* e *P. vitticeps*, eles não exibiram nenhum sinal de hibridização positivo.

1055 **DISCUSSÃO**

1056 Este trabalho responde a inúmeras questões críticas sobre a diferenciação cromossômica
1057 sexual de cobras, que apresentamos no final da seção de introdução. Demonstramos que os
1058 cromossomos sexuais dessas quatro espécies de cobras são homomórficos, mas mostram algum
1059 grau de diferenciação molecular. Também identificamos uma alta correlação entre
1060 heterocromatização e acúmulo de repetições, notavelmente no cromossomo W, sugerindo que
1061 essas sequências são críticas para sua diferenciação. Descobrimos que o cromossomo W de *P.*
1062 *mucosa* tem sequências repetitivas distintas do Z e confirmamos que várias das sequências
1063 repetidas encontradas nos cromossomos W de *P. korros* também são encontradas em *P. mucosa*,
1064 mostrando que espécies intimamente relacionadas compartilham sequências semelhantes, mas
1065 com alguma variação em abundância e distribuição. Essas descobertas nos permitem lançar luz
1066 sobre como os cromossomos sexuais de cobras evoluem e se diferenciam.

1067 **Organização cariotípica geral dos Colubrídeos**

1068 Neste estudo, focamos na análise do conteúdo de satDNA da cobra-rato chinesa *P.*
1069 *korros* (que exibe um sistema de cromossomos sexuais ZW homomórfico) e na exploração da
1070 composição molecular do cromossomo W em relação à sua trajetória evolutiva em espécies
1071 filogeneticamente análogas, abrangendo outras cobras Colubridae e Elapidae e um lagarto basal
1072 (*V. acanthurus*). Além de elucidar a composição molecular do cromossomo W em duas espécies
1073 de *Ptyas* pouco exploradas, os resultados indicaram que o acúmulo de sequências repetitivas
1074 está diretamente ligado à heterocromatização do cromossomo W, embora não esteja
1075 consistentemente associado ao seu heteromorfismo. Essa descoberta destacou a natureza
1076 dinâmica da evolução dos cromossomos sexuais em cobras, que ocorreu independentemente
1077 em lagartos.

1078 Entre as cobras, $2n = 34$ e $2n = 36$ cromossomos representam os dois números diplóides
1079 mais comuns, com variantes variando de $2n = 24$ a $2n = 52$ observadas em várias famílias
1080 (Beçak & Beçak, 1969; Mezzasalma et al., 2024; Oguiura et al., 2009). Neste trabalho,
1081 descrevemos pela primeira vez o cariótipo da cobra colubrídeo endêmica do sudeste da Ásia, *P.*
1082 *korros* ($2n = 34$, composta de 16 macro e 18 microcromossomos), e revisamos os cariótipos das
1083 outras três espécies, todos corroborando suas descrições anteriores: *Ptyas mucosa* ($2n = 34$)
1084 (Singh, 1972, 1974; Singh et al., 1976), *Chrysopelea ornata* ($2n = 36$) (Donbundit et al., 2022;
1085 Singh, 1974) e *Fowlea flavipunctatus* ($2n = 42$) (Donbundit, 2020). A variação do número
1086 diplóide encontrada aqui concorda com o intervalo de $2n$ mais geralmente relatado em cobras,

1087 exceto para *F. flavipunctatus* , que exibe um 2n mais alto do que normalmente visto em outras
1088 espécies de Natricinae (Beçak & Beçak, 1969; Oguiura et al., 2009).

1089 Em nosso estudo, sítios teloméricos intersticiais (ITSs) foram detectados em todas as
1090 espécies analisadas, um padrão consistente com achados em outras linhagens de serpentes,
1091 como Boidae, conforme relatado por (Rovatsos et al., 2015; Viana et al., 2020). Entretanto,
1092 algumas espécies dentro da família Colubridae foram relatadas como carentes de ITSs,
1093 indicando que a presença desses elementos pode variar significativamente entre os grupos
1094 (Viana et al., 2019). Essa variabilidade sugere que, embora os répteis escamados geralmente
1095 exibam cariótipos conservados, eles podem experimentar uma taxa relativamente alta de
1096 rearranjos intracromossômicos e uma baixa taxa de rearranjos intercromossômicos (Rovatsos
1097 et al., 2015).

1098 ***Composição genômica e organização do DNA satélite em Ptyas korros e suas características*** 1099 ***compartilhadas com cobras e lagartos***

1100 As cobras representam um grupo intrigante para investigação genômica e citogenética,
1101 particularmente no que diz respeito à variedade de sequências repetitivas em sua diversificação
1102 e evolução (Ahmad et al., 2021). Progresso significativo foi feito em relação às investigações
1103 de DNA satélite em genomas de vertebrados, particularmente em aves (Brown & Jones, 1972;
1104 Cacciò et al., 1994; Deryusheva et al., 2007; Liangouzov et al., 2002; Saifitdinova et al., 2001;
1105 Tsuda et al., 2007; Yamada et al., 2002; Yamada et al., 2004), mamíferos (Adega et al., 2009;
1106 Escudeiro et al., 2019; Macaya et al., 1978; Mazrimas & Hatch, 1977; Slamovits et al., 2001;
1107 Vourc'h & Biamonti, 2011), répteis (Kawagoshi et al., 2008; Romanenko et al., 2022;
1108 Yurchenko et al., 2024) e peixes (Crepaldi & Parise-Maltempi, 2020; De Oliveira et al., 2023;
1109 Deon et al., 2020; Goes et al., 2022; Utsunomia et al., 2019); no entanto, o conhecimento sobre
1110 essas sequências em cobras permanece limitado a algumas espécies, a maioria usando apenas
1111 métodos clássicos de isolamento de satélite (Matsubara et al., 2015; Panicker & Singh, 1994;
1112 Singh et al., 1976, 1980, 1979; Thongchum et al., 2019).

1113 Neste contexto, os genomas de cobras desafiam o paradigma amplamente aceito de uma
1114 correlação linear entre o tamanho do genoma e o conteúdo de sequência repetitiva, já que seus
1115 tamanhos de genoma variam de 1,3 a 3,8 Gbp e podem exibir níveis variáveis de elementos
1116 repetitivos (Ahmad et al., 2020, 2021; Gregory, 2025; Pasquesi et al., 2018). Descobrimos seis
1117 famílias de satDNA em *P. korros* e nossa análise *in silico* demonstrou semelhanças
1118 significativas entre dois PkoSatDNAs e dois outros satDNAs derivados de *Pantherophis*
1119 *guttatus* (Colubridae), (doravante designados como PguSatDNAs), previamente documentados

1120 por (Lisachov et al., 2023). PkoSat01-168 e PguSat03-169 apresentam identidade de 93,49%,
 1121 enquanto PkoSat05-166 e PguSat01-167 apresentam similaridade de 81,44%. Ambas as
 1122 variantes apresentaram distribuição cromossômica semelhante entre suas respectivas espécies,
 1123 incluindo o padrão observado no cromossomo W, sugerindo uma origem ancestral comum e
 1124 subsequente amplificação diferencial dessas sequências em Colubridae. Integrando análises *in*
 1125 *silico*, *in situ* e PCR, inferimos uma possível via evolutiva para a origem dos DNAs de PkoSat
 1126 em espécies selecionadas de cobras e lagartos (**Figura 12**).

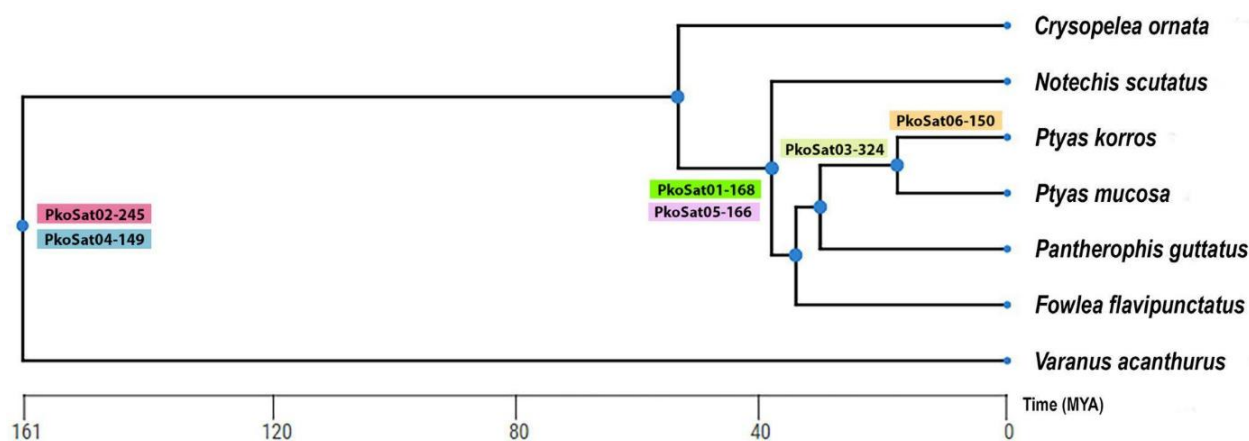


Figura 12: Árvore filogenética das espécies analisadas obtida usando o TimeTree (<http://www.timetree.org>, acessado em 10 de fevereiro de 2025) destacando a suposta origem dos PkoSatDNAs.

1127 Nosso estudo sugere que PkoSat02-245 e PkoSat04-149 parecem ter evoluído de um
 1128 ancestral comum de cobras compartilhadas por *V. acanthurus* usadas neste estudo. Embora
 1129 essas sequências tenham permanecido minimamente amplificadas em *P. mucosa* e *V.*
 1130 *acanthurus*, elas experimentaram uma expansão evolutiva significativa em *P. korros*, um
 1131 cenário que sugere uma divergência no mecanismo de amplificação entre as espécies. Em
 1132 contraste, essas mesmas sequências parecem ter sido eliminadas em outras cobras do mesmo
 1133 grupo. Além disso, as sequências PkoSat01-168 e PkoSat05-166 se originaram de um ancestral
 1134 comum das espécies *Ptyas*, *N. scutatus*, *P. guttatus* e *F. flavipunctatus*. Notamos uma
 1135 amplificação considerável dessas sequências em *P. korros* e *P. guttatus*; entretanto, em *P.*
 1136 *mucosa*, a amplificação foi menos pronunciada, e em *F. flavipunctatus* e *N. scutatus*, essas
 1137 sequências parecem estar perdidas. Esse padrão sugere que os mecanismos que governam a
 1138 evolução de certas sequências de satDNA diferem entre as linhagens. PkoSat03-324 parece ser
 1139 difundido entre outras espécies de *Ptyas*, mas PkoSat06-150 é exclusivo de *P. korros*. O
 1140 compartilhamento de sequências ancestrais, exibindo diferentes graus de amplificação entre
 1141 espécies relacionadas, é um fenômeno bem documentado em outros grupos taxonômicos, como

1142 insetos, plantas e pássaros (Mestrovic et al., 1998; Mravinac et al., 2002; Navajas-Pérez et al.,
1143 2009; Setti et al., 2024).

1144 ***O impacto de sequências repetidas na evolução do cromossomo W em serpentes caenofídios:***
1145 ***heterocromatinização versus heteromorfismo***

1146 Desde o início da década de 1970, foi proposto que a heterocromatinização, em vez do
1147 surgimento de mudanças estruturais, representa o primeiro estágio na diferenciação dos
1148 cromossomos W em cobras (Ray-Chaudhuri et al., 1971). Desde então, vários estudos foram
1149 conduzidos para explorar seu conteúdo genômico (Pšenička et al., 2025). O crescente número
1150 de investigações moleculares mais avançadas está levando à reavaliação de suposições
1151 previamente aceitas sobre cromossomos sexuais em cobras (Augstenová et al., 2017, 2018;
1152 Rovatsos et al., 2015). Isso exemplifica que agora reconhecemos a heterogamia masculina em
1153 táxons primitivos, como jiboias e pítons, que antes eram considerados como possuidores de
1154 sistemas ZZ/ZW pouco diferenciados, comparáveis aos de pássaros (Augstenová et al., 2018;
1155 Matsubara et al., 2016).

1156 Da mesma forma, os cromossomos sexuais de cobras avançadas foram caracterizados
1157 como derivados, exibindo um alto grau de diferenciação e possuindo cromossomos W altamente
1158 heterocromáticos, características consideradas sinapomórficas do clado (Augstenová et al.,
1159 2017; Rovatsos et al., 2015, 2018). No entanto, a arquitetura e o desenvolvimento dos
1160 cromossomos sexuais em cobras são muito mais complexos do que se pensava anteriormente
1161 (Augstenová et al., 2018). Observamos que tanto *P. mucosa* quanto *C. ornata* tinham
1162 cromossomos sexuais marcadamente distintos, distinguidos por um cromossomo W altamente
1163 heterocromático enriquecido por sequências repetitivas (**Figura 7 g, h, k, l e Figura 10**). Em
1164 contraste com o cromossomo Z, o cromossomo W de *P. korros* também exibe uma quantidade
1165 substancial de heterocromatina além do centrômero, bem como um acúmulo diferencial de
1166 sequências repetidas (**Figura 7 c, d**). Essas sequências incluem os satDNAs PkoSat02-245 e
1167 PkoSat05-166, bem como os motivos (AG)_n, (AGAT)_n e (ATCC)_n (**Figura 10 e Figura S6**).
1168 Assim, cromossomos sexuais heteromórficos com repetições acumuladas podem representar
1169 apenas um estágio posterior na evolução dos cromossomos sexuais (O’Meally et al., 2010;
1170 Pokorná et al., 2011). Apesar dessas diferenças que podemos analisar entre os cromossomos Z
1171 e W de *P. korros*, o CGH intraespecífico não foi capaz de identificar diferenças genômicas entre
1172 os cromossomos sexuais, e isso se deve às limitações da técnica, como resolução limitada ou
1173 dificuldade em hibridizar sequências repetitivas, que são lacunas que foram preenchidas pelas
1174 outras hibridizações e bandas C. Por outro lado, os resultados obtidos pelo CGH interespecífico

1175 são corroborados pelas diferenças genômicas encontradas nos cromossomos sexuais de *P.*
1176 *korros* e *P. mucosa*, com o padrão de hibridização satélite e microssatélite destacando uma
1177 diferenciação avançada entre essas duas espécies irmãs.

1178 Um cenário oposto é encontrado em *F. flavipunctatus*, que exibe um cromossomo W
1179 totalmente eucromático, sem qualquer acúmulo diferencial de microssatélites (**Figura 7 o,p**
1180 e **Figura 10**). A escassez de acúmulo de microssatélites nos cromossomos sexuais desta espécie
1181 é semelhante à situação observada nos cromossomos sexuais homomórficos de cobras mais
1182 basais (O’Meally et al., 2010; Pokorná et al., 2011; Singh et al., 1976), e pode indicar um estágio
1183 inicial de diferenciação dos cromossomos sexuais, apesar do heteromorfismo. No entanto, este
1184 cenário não se restringe a uma única espécie, e uma situação semelhante foi observada
1185 em *Spilotes sulphureus* (Viana et al., 2019). Esses resultados sugerem que o heteromorfismo, a
1186 quantidade de heterocromatina e a degradação evolutiva dos cromossomos das cobras sexuais
1187 provavelmente evoluíram independentemente, impulsionados por processos divergentes ainda
1188 desconhecidos (Martinez et al., 2008; Matsubara et al., 2016; Pokorná et al., 2010, 2011). Este
1189 é um ponto de vista significativo para a compreensão da evolução dos cromossomos, pois
1190 sugere que esses três fatores devem ser tratados de forma independente. Anteriormente,
1191 (Pokorná et al., 2011) propuseram que o acúmulo de sequências repetitivas está diretamente
1192 associado à heterocromatização do cromossomo W; entretanto, nem sempre está relacionado ao
1193 seu heteromorfismo. Esse fenômeno, embora essencial para a diferenciação cromossômica, não
1194 se restringe a eventos particulares.

1195 Os cromossomos sexuais das cobras parecem ter herdado sequências de seu ancestral
1196 comum, posteriormente influenciados por diversas pressões evolutivas, levando a padrões
1197 distintos de amplificação ou perda de nucleotídeos (Pokorná et al., 2011; Rovatsos et al., 2015,
1198 2018). Por exemplo, o motivo (AG)_n foi detectado nos cromossomos sexuais de todas as cobras
1199 examinadas. A conservação desse padrão em várias espécies indica sua potencial herança de
1200 um ancestral comum, desempenhando um papel útil na diferenciação sexual, conforme relatado
1201 anteriormente em outros táxons reptilianos (Matsubara et al., 2016). A ausência de homologia
1202 entre os cromossomos sexuais de cobras e lagartos sugere que os microssatélites comuns a
1203 ambos experimentaram eventos de amplificação independentes durante sua história evolutiva,
1204 conforme ilustrado na **Figura 12**. Nosso estudo, portanto, apoia a hipótese de (Matsubara et
1205 al., 2016), que postula que as sequências evoluíram independentemente em linhagens
1206 reptilianas distintas. Um exemplo exemplar é o motivo AAGG, comum a certas cobras e *P.*
1207 *vitticeps*.

1208 **Conteúdo genético dos cromossomos sexuais em lagartos e sua relação com o gênero *Ptyas***
1209 Sondas de BAC e cromossomos sexuais derivadas de dois lagartos australianos
1210 [denominados *P. vitticeps* (Agamidae) e *V. acanthurus* (Varanidae)] foram mapeadas *in situ* nos
1211 dois *Ptyas* para investigar a possibilidade de homologia entre espécies de répteis. Estudos
1212 anteriores sugerem que o cromossomo W em cobras compartilha homologia com os
1213 cromossomos sexuais de outros amniotas (Ahmad et al., 2021). Além disso, a presença de
1214 regiões homólogas em vários cromossomos em diferentes espécies apoia a ideia de que os
1215 cromossomos sexuais de cobras evoluíram por meio de rearranjos cromossômicos mediados
1216 por sequências repetitivas (Ahmad et al., 2021). No entanto, não encontramos nenhum sinal
1217 positivo. Esses resultados se alinham com a visão atual de que os répteis — um grupo
1218 parafilético de amniotas ectotérmicos — têm determinação sexual variável e em rápida
1219 evolução e não seguem caminhos únicos de evolução, como proposto para aves e mamíferos
1220 (Alam et al., 2018; Ezaz et al., 2009; Kratochvíl et al., 2021).

1221 **CONCLUSÃO**

1222 Os resultados do nosso estudo oferecem contribuições significativas para a compreensão
1223 da evolução do sistema ZW em cobras. A análise revelou que, mesmo em cromossomos sexuais
1224 homomórficos, como os observados em *C. ornata* e espécies de *Ptyas*, os cromossomos W
1225 podem exibir variações moleculares notáveis, com sequências repetitivas únicas e sendo
1226 altamente heterocromáticos. Além disso, foi observado que, apesar da proximidade filogenética
1227 entre as espécies do gênero *Ptyas*, houve um baixo grau de compartilhamento de sequências de
1228 DNA satélite, sugerindo caminhos evolutivos independentes e adaptativos para cada espécie.
1229 Finalmente, os cromossomos sexuais ZW de cobras demonstraram ter se diferenciado
1230 significativamente, adquirindo características únicas em relação ao seu grupo irmão, os
1231 lagartos. Essas descobertas são essenciais para o avanço da compreensão da evolução dos
1232 répteis e fornecem novas bases para futuras investigações sobre os mecanismos moleculares
1233 que moldaram a diversidade genética desses animais. Este estudo faz parte de uma série de
1234 estudos citogenéticos e genômicos adicionais com foco na evolução dos cromossomos sexuais
1235 em vertebrados.

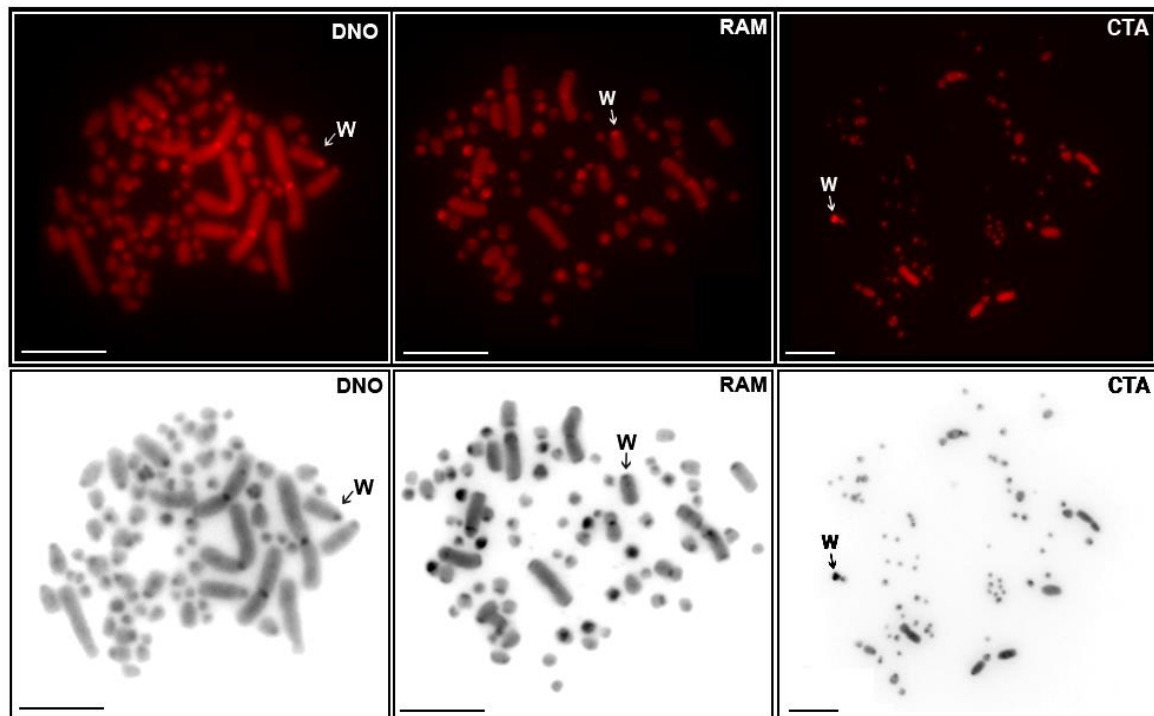


Figura Suplementar 1: Metáfases de fêmeas de ema (DNO), ema (RAM) e inhambu-chintã (CTA) destacando a distribuição da heterocromatina C-positiva. As figuras superiores mostram as metáfases contra-coradas com iodeto de propídio, enquanto as inferiores foram convertidas em escala de cinza, além de ajustes de brilho/contraste. Enquanto o cromossoma W foi devidamente identificado por uma hibridação sequencial com o microsatélite (GA)15, o cromossoma Z não pôde ser devidamente identificado. Barra = 10 μ m.

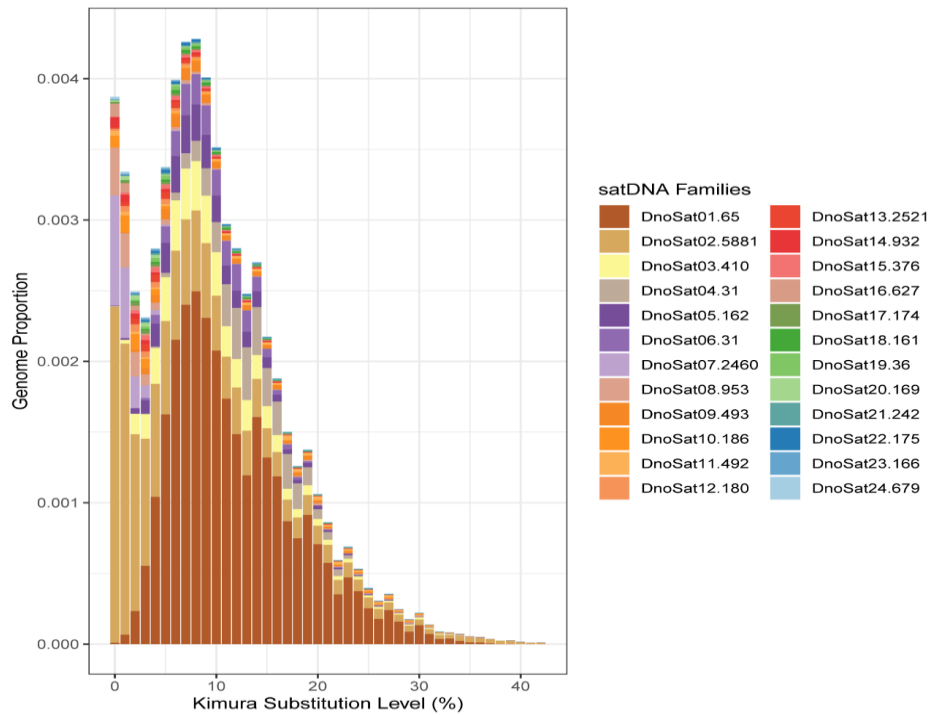


Figura Suplementar 2: Paisagens de repetições ilustrando a distribuição e divergência de todas as famílias de DnoSatDNA.

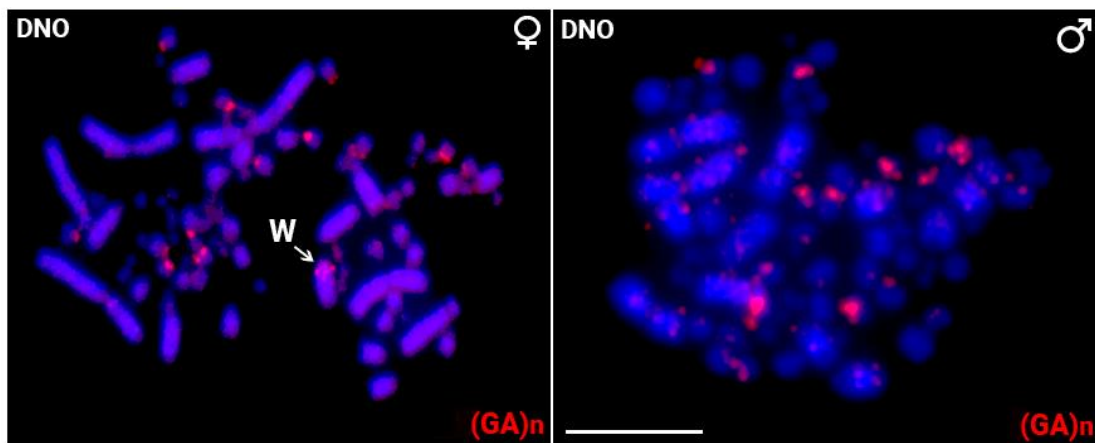


Figura Suplementar 3: Lâminas metafásicas femininas e masculinas da ema destacando a localização cromossômica do microssatélite (GA)_n. É de notar que um único macrocromossomo, encontrado apenas em fêmeas, apresenta um forte sinal de (GA)_n na região pericentromérica. Uma vez que não existe qualquer contrapartida nos machos, podemos então assumir que corresponde ao cromossoma W (assinalado com uma seta). Barra = 10 μm

Tabela Suplementar 1: Principais características dos satDNAs da ema

satDNA family	RUL	Abundance (M)	Abundance (F)	Abundance (F/M)	A+T (%)
DnoSat01-65	65	0.024141958	0.029768812	1.233073613	36.90%
DnoSat02-5881	5881	0.014855083	0.013987972	0.941628675	56.60%
DnoSat03-410	410	0.002765063	0.004161444	1.50500839	41.50%
DnoSat04-31	31	0.003485776	0.003419289	0.980926163	42.00%
DnoSat05-162	162	0.003453255	0.002494376	0.722326013	40.70%
DnoSat06-31	31	0.002542566	0.001998162	0.785884068	35.50%
DnoSat07-2460	2460	0.000909707	0.001696275	1.864639248	52.00%
DnoSat08-953	953	0.000905984	0.001130665	1.247996818	39.90%
DnoSat09-493	493	0.000503838	0.00084015	1.667502496	40.80%
DnoSat10-186	186	0.00087018	0.000600285	0.689840047	39.20%
DnoSat11-492	492	0.00025661	0.000457174	1.781592431	41.10%
DnoSat12-180	180	0.000418681	0.000364115	0.869670914	37.80%
DnoSat13-2521	2521	0.00025421	0.000359398	1.413784508	41.30%
DnoSat14-932	932	0.000467166	0.000342343	0.732806599	28.60%
DnoSat15-376	376	0.000304624	0.000279255	0.916722462	42.30%
DnoSat16-627	627	0.000163236	0.000234889	1.438957226	39.70%
DnoSat17-174	174	0.000221117	0.00022	0.994949133	43.10%
DnoSat18-161	161	9.59525E-05	0.000207653	2.164128281	31.10%
DnoSat19-36	36	0.000386925	0.000170505	0.44066695	44.40%
DnoSat20-169	169	0.000542337	0.00016956	0.312647875	45.60%
DnoSat21-242	242	0.000153507	0.000166089	1.081964887	44.20%
DnoSat22-175	175	0.000216786	0.000150984	0.696465924	45.10%
DnoSat23-166	166	0.000121372	0.000143113	1.179123228	47.00%
DnoSat24-679	679	0.000144836	0.000142657	0.984960761	36.70%

Tabela Suplementar 2: Principais características dos satDNAs de *Ptyas korros*.

satDNA family	Rul	Abundance (F)	Abundance (M)	Abundance (F/M)	A+T (%)
PkoSat1-168	168	0,001149156	0,000841797	1,365122953	63,0952381
PkoSat2-245	245	0,000731083	0,000759606	0,962450493	56,73469388
PkoSat3-324	324	0,000572737	0,000611321	0,936885308	63,27160494
PkoSat4-149	149	0,000216136	0,000114426	1,888880659	63,08724832
PkoSat5-166	166	0,000152454	0,000166577	0,915216338	62,04819277
PkoSat6-150	150	0,000131901	0,000164344	0,802592203	64,66666667

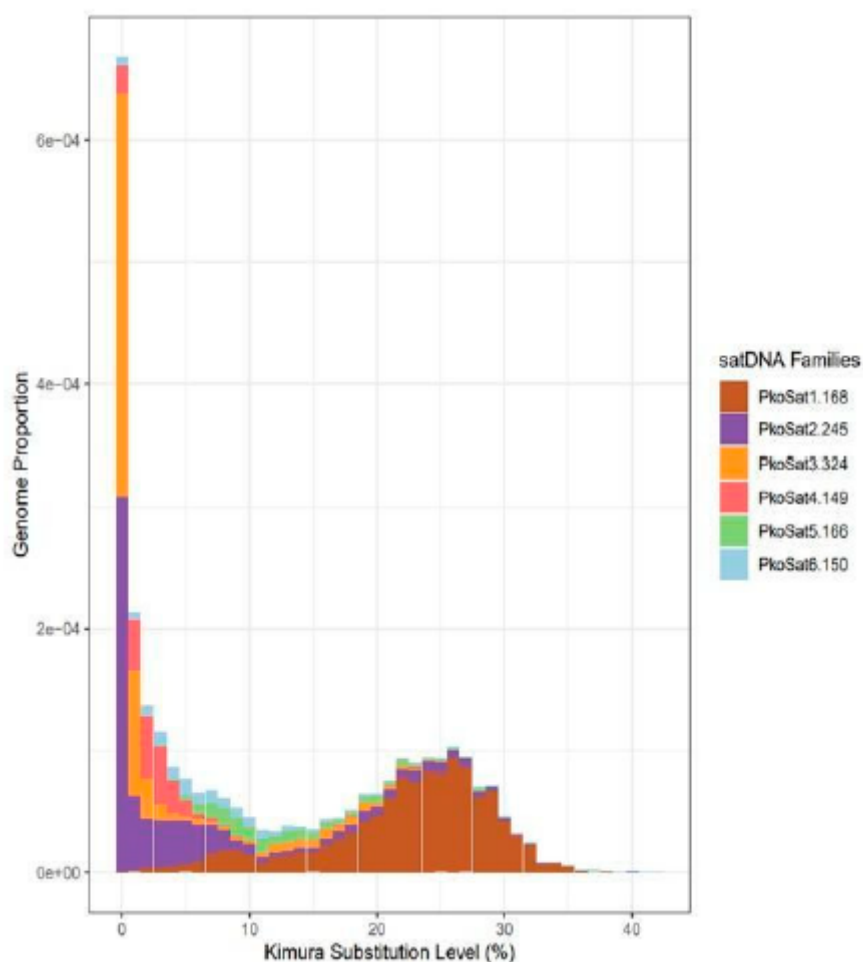


Figura Suplementar 4: Paisagens repetidas ilustrando a distribuição e divergência de todas as famílias de PkoSatDNA identificadas no genoma de *Ptyas korros*.

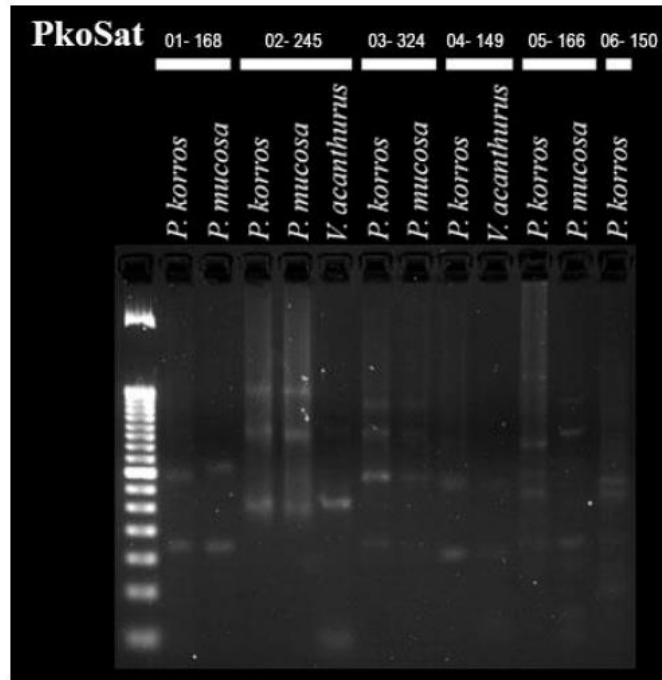


Figura Suplementar 5: Gel de eletroforese mostrando o padrão de amplificação de todos os satélites em *Ptyas korros* e aqueles amplificados nas espécies congêneres.

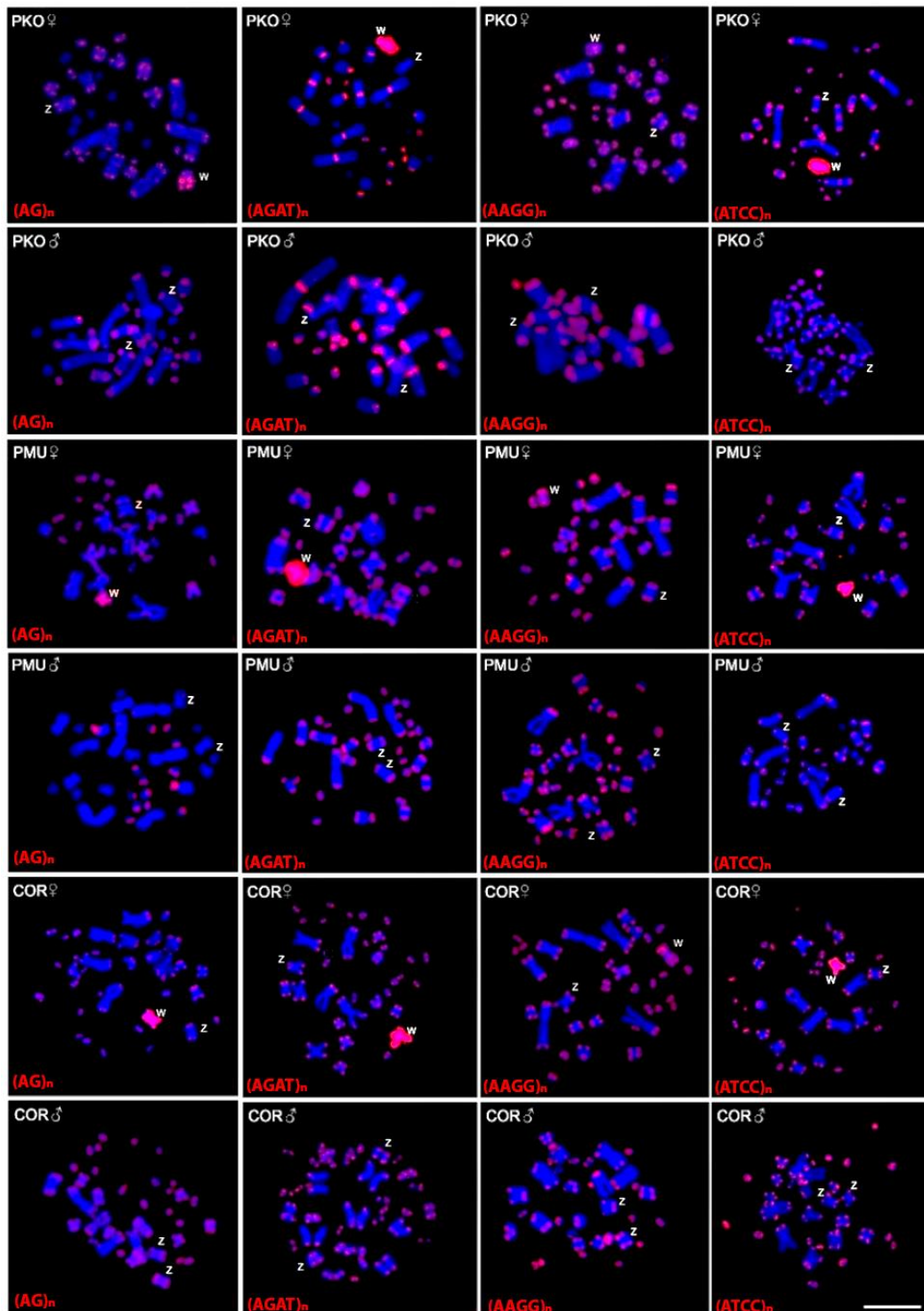


Figura Suplementar 6: Sequências de microssatélites (identificadas em vermelho no canto inferior esquerdo) hibridizadas em machos e fêmeas de *P. korros* (PKO), *P. mucosa* (PMU) e *Crysopelea ornata* (COR). Barra de escala = 10 μ m.

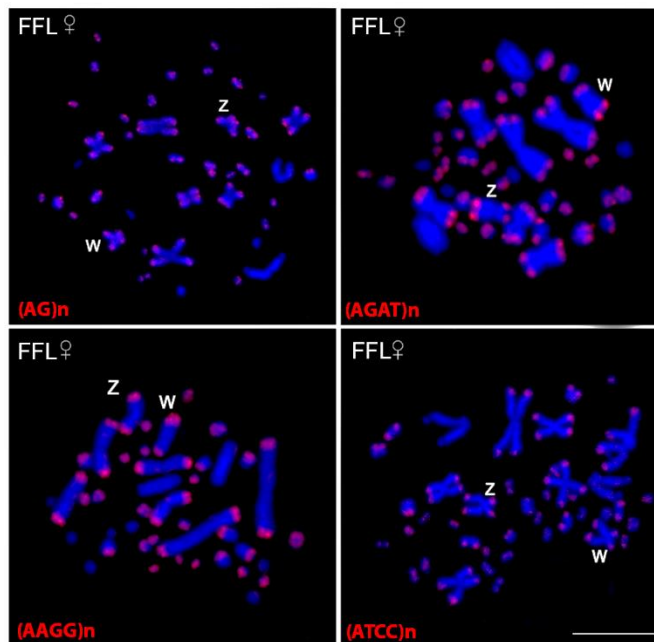


Figura Suplementar 7: Metáfases femininas de *Fowlea flavipunctatus* (FFL) hibridizadas com sequências microssatélites distintas (identificadas em vermelho no canto inferior direito). Barra de escala = 10 μ m.

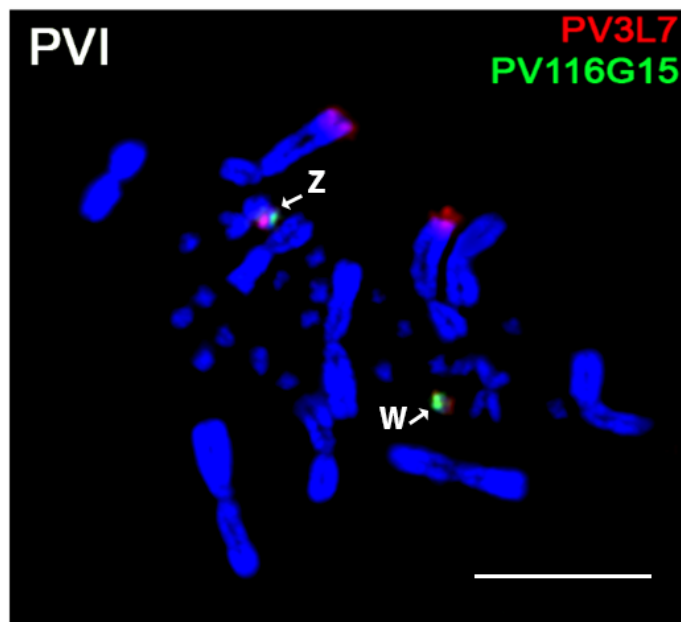


Figura Suplementar 8: Metáfases femininas de *Pogona vitticeps* (PVI) hibridizadas com as sondas BAC PV3L7 (vermelha) e PV116G15 (verde). Barra de escala = 10 μ m.

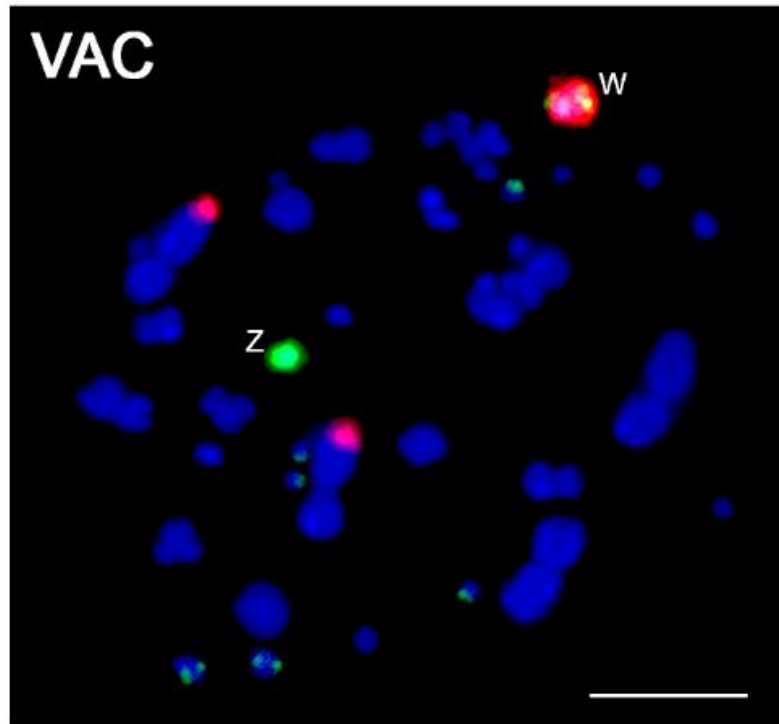


Figura Suplementar 9: Sondas ligadas ao sexo dos cromossomos Z (verde) e W (vermelho) na espécie doadora *Varanus acanthurus* (VAC). Barra de escala = 10 μ m.

1237 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

1238 A análise integrada dos estudos sobre a evolução dos cromossomos sexuais em aves
1239 Palaeognathae e em serpentes do gênero *Ptyas* oferece uma contribuição significativa para a
1240 compreensão dos mecanismos citogenéticos e genômicos que moldam os sistemas sexuais nos
1241 vertebrados. Ao explorar dois grupos filogeneticamente distintos, mas com padrões
1242 comparáveis de variação, foi possível evidenciar que a diferenciação dos cromossomos sexuais
1243 é um processo evolutivamente dinâmico, marcado por trajetórias diversas e influenciado por
1244 fatores como a heterocromatinização, o acúmulo de sequências repetitivas e a manutenção de
1245 regiões pseudoautossômicas. Nas aves Palaeognathae, observou-se uma ampla variação
1246 estrutural entre espécies intimamente relacionadas. Enquanto ratitas como *Dromaius*
1247 *novaehollandiae* e *Rhea americana* mantêm cromossomos sexuais Z e W estruturalmente
1248 semelhantes (homomórficos), com baixa heterocromatinização e poucos elementos repetitivos
1249 no cromossomo W, a espécie tinamiforme *Crypturellus tataupa* apresenta um sistema ZW
1250 altamente heteromórfico. Esse contraste evidencia que a evolução dos cromossomos sexuais
1251 em aves não segue um caminho linear, refletindo múltiplas pressões seletivas.

1252 Padrão semelhante é observado em serpentes, nas quais coexistem espécies com
1253 cromossomos sexuais homomórficos e heteromórficos. Em algumas espécies de serpentes,
1254 como no gênero *Ptyas* o W é pouco diferenciado morfológicamente, enquanto em outras é
1255 altamente degradado. Ainda assim, mesmo nas espécies com cromossomos sexuais
1256 homomórficos, é possível observar um expressivo acúmulo de heterocromatina e sequências
1257 repetitivas. Dessa forma, a heterocromatização do cromossomo W, como evidenciado em *Ptyas*,
1258 emerge como um fator central no processo de diferenciação molecular dos cromossomos
1259 sexuais, não estando, necessariamente, correlacionada à heteromorfia cromossômica.

1260 Em conjunto, os resultados discutidos reforçam que os cromossomos sexuais não
1261 evoluem de forma uniforme ou previsível. Ao contrário, a evolução desses sistemas se dá de
1262 maneira mosaica e multifásica, com graus variados de diferenciação sexual influenciados por
1263 fatores ecológicos, seletivos e históricos distintos em cada linhagem. A presença dessas
1264 diferentes condições sugere que o sistema ZW pode ter se diferenciado múltiplas vezes, ou ter
1265 passado por eventos de reversão ou estagnação em diferentes pontos de sua história evolutiva.
1266 Portanto, os estudos aqui analisados não apenas aprofundam o entendimento sobre a
1267 diversidade dos sistemas sexuais em aves e répteis, como também destacam a importância de
1268 abordagens integrativas, combinando citogenética, genômica comparativa e biologia evolutiva,
1269 para elucidar os processos que regem a evolução dos cromossomos sexuais nos vertebrados.

1270 **REFERENCIAS**

- 1271 ADEGA, F.; GUEDES-PINTO, H.; CHAVES, R. Satellite DNA in the Karyotype Evolution of
1272 Domestic Animals – Clinical Considerations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 126, n.
1273 1–2, p. 12–20, 2009.
- 1274 AHMAD, Syed *et al.* Consequence of Paradigm Shift with Repeat Landscapes in Reptiles:
1275 Powerful Facilitators of Chromosomal Rearrangements for Diversity and Evolution. **Genes**, v.
1276 11, n. 7, p. 827, 21 jul. 2020.
- 1277 AHMAD, Syed Farhan *et al.* Impact of Repetitive DNA Elements on Snake Genome Biology
1278 and Evolution. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1707, 6 jul. 2021.
- 1279 ALAM, Shayer Mahmood Ibney *et al.* Did Lizards Follow Unique Pathways in Sex
1280 Chromosome Evolution? **Genes**, v. 9, n. 5, p. 239, 3 maio 2018.
- 1281 AUGSTENOVÁ, Barbora *et al.* Evolutionary Dynamics of the W Chromosome in
1282 Caenophidian Snakes. **Genes**, v. 9, n. 1, p. 5, 28 dez. 2017.
- 1283 AUGSTENOVÁ, Barbora *et al.* ZW, XY, and yet ZW: Sex chromosome evolution in snakes
1284 even more complicated: BRIEF COMMUNICATION. **Evolution**, v. 72, n. 8, p. 1701–1707,
1285 ago. 2018.
- 1286 BACHTROG, Doris. The Temporal Dynamics of Processes Underlying Y Chromosome
1287 Degeneration. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1513–1525, 1 jul. 2008.
- 1288 BACHTROG, Doris. The Y Chromosome as a Battleground for Intragenomic Conflict. **Trends**
1289 **in Genetics**, v. 36, n. 7, p. 510–522, jul. 2020.
- 1290 BAKER, Robert J.; MENGDEN, Greg A.; BULL, James J. Karyotypic Studies of Thirty-Eight
1291 Species of North American Snakes. **Copeia**, v. 1972, n. 2, p. 257, 8 jun. 1972.
- 1292 BEÇAK, W.; BEÇAK, M. L.; NAZARETH, H. R. S. Karyotypic Studies of two Species of
1293 South American Snakes (*Boa constrictor amarali* and *Bothrops jararaca*). **Cytogenetic and**
1294 **Genome Research**, v. 1, n. 6, p. 305–313, 1962.
- 1295 BEÇAK, W.; BEÇAK, Maria Luiza. Cytotaxonomy and chromosomal evolution in Serpentes.
1296 **Cytogenetic and Genome Research**, v. 8, n. 4, p. 247–262, 1969.
- 1297 BERGERO, Roberta; CHARLESWORTH, Deborah. The evolution of restricted recombination
1298 in sex chromosomes. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 2, p. 94–102, fev. 2009.
- 1299 BEÇAK, Willy *et al.* Close karyological kinship between the reptilian suborder serpentes and
1300 the class aves. **Chromosoma**, v. 15, n. 5, p. 606–617, 1964.
- 1301 **BirdLife International. Ficha informativa sobre áreas importantes para a proteção de**
1302 **aves.** , 2023. Disponível em: <<https://www.birdlife.org/>>
- 1303 BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer
1304 for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.

- 1305 BROWN, J. E.; JONES, K. W. Localisation of satellite DNA in the microchromosomes of the
1306 Japanese quail by *in situ* hybridization. **Chromosoma**, v. 38, n. 3, p. 313–318, 1972.
- 1307 BRUSATTE, Stephen L.; O’CONNOR, Jingmai K.; JARVIS, Erich D. The Origin and
1308 Diversification of Birds. **Current Biology**, v. 25, n. 19, p. R888–R898, out. 2015.
- 1309 BULL, J. J. **Evolution of sex determining mechanisms**. [S.l.]: Benjamin/Cummings: Menlo
1310 Park, 1983.
- 1311 CACCIÒ, Simone *et al.* Single-copy sequence homology among the GC-richest isochores of
1312 the genomes from warm-blooded vertebrates. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, n. 4, p.
1313 331–339, out. 1994.
- 1314 CHAPUS, Charles; EDWARDS, Scott V. Genome evolution in Reptilia: in silico chicken
1315 mapping of 12,000 BAC-end sequences from two reptiles and a basal bird. **BMC Genomics**,
1316 v. 10, n. Suppl 2, p. S8, 2009.
- 1317 CHARLESWORTH, Brian. The Evolution of Sex Chromosomes. **Science**, v. 251, n. 4997, p.
1318 1030–1033, mar. 1991.
- 1319 CHARLESWORTH, Brian; CHARLESWORTH, Deborah. The degeneration of Y
1320 chromosomes. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B:
1321 Biological Sciences**, v. 355, n. 1403, p. 1563–1572, 29 nov. 2000.
- 1322 CHARLESWORTH, Brian; SNIEGOWSKI, Paul; STEPHAN, Wolfgang. The evolutionary
1323 dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215–220, 15 set. 1994.
- 1324 CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. Sex differences in fitness and selection for
1325 centric fusions between sex-chromosomes and autosomes. **Genetical Research**, v. 35, n. 2, p.
1326 205–214, abr. 1980.
- 1327 CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, G. Steps in the evolution of
1328 heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, n. 2, p. 118–128, ago. 2005.
- 1329 CHING, Ana T. C. *et al.* Some aspects of the venom proteome of the Colubridae snake
1330 *Philodryas olfersii* revealed from a Duvernoy’s (venom) gland transcriptome. **FEBS Letters**,
1331 v. 580, n. 18, p. 4417–4422, 7 ago. 2006.
- 1332 CREPALDI, Carolina; PARISE-MALTEMPI, Patricia P. Heteromorphic Sex Chromosomes
1333 and Their DNA Content in Fish: An Insight through Satellite DNA Accumulation in
1334 *Megaleporinus elongatus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 1, p. 38–46, 2020.
- 1335 DATTA, Geeta; TU, Anthony T. Toxicology and Biochemistry of Colubridae Venom. **Journal
1336 of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 12, n. 1, p. 63–89, jan. 1993.
- 1337 DE BELLO CIOFFI, Marcelo *et al.* The key role of repeated DNAs in sex chromosome
1338 evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. **Molecular Cytogenetics**, v. 5,
1339 n. 1, p. 28, dez. 2012.

- 1340 DE BELLO CIOFFI, Marcelo *et al.* Deciphering the Evolutionary History of Arowana Fishes
 1341 (Teleostei, Osteoglossiformes, Osteoglossidae): Insight from Comparative Cytogenomics.
 1342 **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 4296, 2 set. 2019.
- 1343 DE MORAES, Renata Luiza Rosa *et al.* Comparative Cytogenetics and Neo-Y Formation in
 1344 Small-Sized Fish Species of the Genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). **Frontiers in**
 1345 **Genetics**, v. 10, p. 678, 2 ago. 2019.
- 1346 DE OLIVEIRA, Alan Moura *et al.* Satellite DNAs, heterochromatin, and sex chromosomes of
 1347 the wattled jacana (Charadriiformes; Jacanidae): a species with highly rearranged karyotype.
 1348 **Genome**, v. 67, n. 4, p. 109–118, 1 abr. 2024.
- 1349 DE OLIVEIRA FURO, Ivanete *et al.* Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Myiopsitta*
 1350 *monachus* and *Amazona aestiva* (Psittaciformes, Psittacidae) with Emphasis on the Sex
 1351 Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 151, n. 3, p. 151–160, 2017.
- 1352 DE OLIVEIRA, Mariannah Pravatti Barcellos *et al.* Following the Pathway of W Chromosome
 1353 Differentiation in *Triportheus* (Teleostei: Characiformes). **Biology**, v. 12, n. 8, p. 1114, 10 ago.
 1354 2023.
- 1355 DEAKIN, Janine E.; EZAZ, Tariq. Understanding the Evolution of Reptile Chromosomes
 1356 through Applications of Combined Cytogenetics and Genomics Approaches. **Cytogenetic and**
 1357 **Genome Research**, v. 157, n. 1–2, p. 7–20, 2019.
- 1358 DEON, Geize Aparecida *et al.* Highly Rearranged Karyotypes and Multiple Sex Chromosome
 1359 Systems in Armored Catfishes from the Genus *Harttia* (Teleostei, Siluriformes). **Genes**, v. 11,
 1360 n. 11, p. 1366, 18 nov. 2020.
- 1361 DERYUSHEVA, Svetlana *et al.* Tandem 41-bp repeats in chicken and Japanese quail genomes:
 1362 FISH mapping and transcription analysis on lampbrush chromosomes. **Chromosoma**, v. 116,
 1363 n. 6, p. 519–530, 12 nov. 2007.
- 1364 DOBRY, Jason *et al.* Widespread chromosomal rearrangements preceded genetic divergence in
 1365 a monitor lizard, *Varanus acanthurus* (Varanidae). **Chromosome Research**, v. 31, n. 1, p. 9, 6
 1366 fev. 2023.
- 1367 DOBRY, Jason *et al.* The role of unbalanced segmental duplication in sex chromosome
 1368 evolution in Australian ridge-tailed goannas. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 8545, 12 mar.
 1369 2025.
- 1370 DONBUNDIT. First Study on Chromosomal Feature and NORs Localization of the Yellow-
 1371 spotted Keelback Snake, *Fowlea flavipunctatus* (Squamata, Natricinae) in Thailand. **Science**
 1372 **Technology and Engineering Journal (STEJ)**, v. 6, p. 3745, 2020.
- 1373 DONBUNDIT, Nattasuda *et al.* Karyomorphological delineation, and the NOR loci on the sex
 1374 chromosome in three species of *Chrysopoleinid* (Chrysopoleinae: Colubridae) from Thailand.
 1375 **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 23, n. 7, 16 jul. 2022.
- 1376 DOS SANTOS, Rodrigo Zeni *et al.* A long-term conserved satellite DNA that remains
 1377 unexpanded in several genomes of Characiformes fish is actively transcribed. **Genome Biology**
 1378 **and Evolution**, p. evab002, 27 jan. 2021.

- 1379 DOVER, Gabriel. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. **Nature**, v. 299, n.
1380 5879, p. 111–117, set. 1982.
- 1381 EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
1382 throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 8 mar. 2004.
- 1383 ESCUDEIRO, Ana *et al.* Conservation, Divergence, and Functions of Centromeric Satellite
1384 DNA Families in the Bovidae. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 4, p. 1152–1165, 1
1385 abr. 2019.
- 1386 EZAZ, Tariq *et al.* The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes.
1387 **Chromosome Research**, v. 13, n. 8, p. 763–776, dez. 2005.
- 1388 EZAZ, Tariq *et al.* The ZW sex microchromosomes of an Australian dragon lizard share no
1389 homology with those of other reptiles or birds. **Chromosome Research**, v. 17, n. 8, p. 965–
1390 973, dez. 2009.
- 1391 EZAZ, Tariq *et al.* Sequence and gene content of a large fragment of a lizard sex chromosome
1392 and evaluation of candidate sex differentiating gene R-spondin 1. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1,
1393 p. 899, 2013.
- 1394 F. VIANA, Patrik *et al.* Evolutionary Insights of the ZW Sex Chromosomes in Snakes: A New
1395 Chapter Added by the Amazonian Puffing Snakes of the Genus *Spilotes*. **Genes**, v. 10, n. 4, p.
1396 288, 9 abr. 2019.
- 1397 FIGUEROA, Alex *et al.* A Species-Level Phylogeny of Extant Snakes with Description of a
1398 New Colubrid Subfamily and Genus. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0161070, 7 set. 2016.
- 1399 FISHER, R. A. THE EVOLUTION OF DOMINANCE. **Biological Reviews**, v. 6, n. 4, p. 345–
1400 368, out. 1931.
- 1401 FRY, Kirk; SALSER, Winston. Nucleotide sequences of HS- α satellite DNA from kangaroo rat
1402 *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell**, v. 12, n. 4, p.
1403 1069–1084, dez. 1977.
- 1404 FURMAN, Benjamin L. S. *et al.* Sex Chromosome Evolution: So Many Exceptions to the
1405 Rules. **Genome Biology and Evolution**, v. 12, n. 6, p. 750–763, 1 jun. 2020.
- 1406 GARNERO, ADV. Alta homeologia cariotípica na família Tinamidae (Aves: Tinamiformes).
1407 **Revista Brasileira de Ornitologia**, 2006.
- 1408 GARRIDO-RAMOS, Manuel. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, v. 8, n. 9, p. 230, 18
1409 set. 2017.
- 1410 GARRIDO-RAMOS, Manuel A. Satellite DNA in Plants: More than Just Rubbish. **Cytogenetic
1411 and Genome Research**, v. 146, n. 2, p. 153–170, 2015.
- 1412 GILL, F. **IOC World Bird List**, 2020. Disponível em:
1413 <<https://www.worldbirdnames.org/new/>>

- 1414 GOES, Caio Augusto Gomes *et al.* Revealing the Satellite DNA History in *Psalidodon* and
 1415 *Astyanax* Characid Fish by Comparative Satellitomics. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 884072,
 1416 21 jun. 2022.
- 1417 GORMAN, George C. The Chromosomes of Laticauda and a Review of Karyotypic Evolution
 1418 in the Elapidae. **Journal of Herpetology**, v. 15, n. 2, p. 225, 30 abr. 1981.
- 1419 GREGORY, T. R. **Animal Genome Size Database**. , 2025.
- 1420 GREGORY, T. Ryan. Genome Size Evolution in Animals. *In: The Evolution of the Genome*.
 1421 [S.l.]: Elsevier, 2005. p. 3–87.
- 1422 GRIFFIN, D. K. *et al.* The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular
 1423 cytogenetics. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 117, n. 1–4, p. 64–77, 2007.
- 1424 GROSSEN, Christine; NEUENSCHWANDER, Samuel; PERRIN, Nicolas. Temperature-
 1425 dependent turnovers in sex-determination mechanisms: a quantitative model: temperature-
 1426 dependent turnovers in sex determination. **Evolution**, v. 65, n. 1, p. 64–78, jan. 2011.
- 1427 GUNSKI, Ricardo José; GIANNONI, Miriam Luz. Nucleolar organizer regions and a new
 1428 chromosome number for *Rhea americana* (Aves: Rheiformes). **Genetics and Molecular
 1429 Biology**, v. 21, n. 2, p. 207–210, jun. 1998.
- 1430 GUTIERREZ, Jose Maria *et al.* Karyotypes of Five Species of Coral Snakes (Micrurus).
 1431 **Journal of Herpetology**, v. 22, n. 1, p. 109, mar. 1988.
- 1432 GVOZDEV, Vladimir A.; KOGAN, Galina L.; USAKIN, Lev A. The Y chromosome as a target
 1433 for acquired and amplified genetic material in evolution. **BioEssays**, v. 27, n. 12, p. 1256–1262,
 1434 dez. 2005.
- 1435 HARSHMAN, John *et al.* Phylogenomic evidence for multiple losses of flight in ratite birds.
 1436 **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36, p. 13462–13467, 9 set. 2008.
- 1437 HEDLEY, Joanna; EATWELL, Kevin. Nonvenomous Colubrid Snakes (Colubridae). *In:*
 1438 **Companion Animal Care and Welfare: The UFAW Companion Animal Handbook**. [S.l.]:
 1439 James Yeates, 2019.
- 1440 HEYBORNE, William H.; MACKESSY, Stephen P. Identification and characterization of a
 1441 taxon-specific three-finger toxin from the venom of the Green Vinesnake (*Oxybelis fulgidus*;
 1442 family Colubridae). **Biochimie**, v. 95, n. 10, p. 1923–1932, out. 2013.
- 1443 HILL, Robert E.; MACKESSY, Stephen P. Characterization of venom (Duvernoy's secretion)
 1444 from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. **Toxicon**,
 1445 v. 38, n. 12, p. 1663–1687, dez. 2000.
- 1446 HOBZA, Roman *et al.* An accumulation of tandem DNA repeats on the Y chromosome in *Silene*
 1447 *latifolia* during early stages of sex chromosome evolution. **Chromosoma**, v. 115, n. 5, p. 376–
 1448 382, out. 2006.
- 1449 HUGHES, AL. **Adaptive evolution of genes and genomes**. [S.l.]: Oxford: University, 1999.

- 1450 IANNUCCI, Alessio *et al.* Isolating Chromosomes of the Komodo Dragon: New Tools for
1451 Comparative Mapping and Sequence Assembly. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 157,
1452 n. 1–2, p. 123–131, 2019.
- 1453 JARVIS, Erich D. *et al.* Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of
1454 modern birds. **Science**, v. 346, n. 6215, p. 1320–1331, 12 dez. 2014.
- 1455 JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, Inácio *et al.* Colubrid Venom Composition: An -Omics
1456 Perspective. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 230, 23 jul. 2016.
- 1457 KAPUSTA, Aurélie; SUH, Alexander; FESCHOTTE, Cédric. Dynamics of genome size
1458 evolution in birds and mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114,
1459 n. 8, 21 fev. 2017.
- 1460 KAWAGOSHI, Taiki *et al.* Molecular structures of centromeric heterochromatin and karyotypic
1461 evolution in the Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) (Crocodylidae, Crocodylia).
1462 **Chromosome Research**, v. 16, n. 8, p. 1119–1132, dez. 2008.
- 1463 KEJNOVSKY, E. *et al.* The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex
1464 chromosomes in plants. **Heredity**, v. 102, n. 6, p. 533–541, jun. 2009.
- 1465 KEJNOVSKY, Eduard *et al.* Accumulation of chloroplast DNA sequences on the Y
1466 chromosome of *Silene latifolia*. **Genetica**, v. 128, n. 1–3, p. 167–175, set. 2006.
- 1467 KIDWELL, Margaret G.; LISCH, Damon R. PERSPECTIVE: TRANSPOSABLE
1468 ELEMENTS, PARASITIC DNA, AND GENOME EVOLUTION. **Evolution**, v. 55, n. 1, p. 1–
1469 24, jan. 2001.
- 1470 KIKUCHI, Kiyoshi; HAMAGUCHI, Satoshi. Novel sex-determining genes in fish and sex
1471 chromosome evolution. **Developmental Dynamics**, v. 242, n. 4, p. 339–353, abr. 2013.
- 1472 KOENIG, Daniel; WEIGEL, Detlef. Beyond the thale: comparative genomics and genetics of
1473 *Arabidopsis* relatives. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 5, p. 285–298, maio 2015.
- 1474 KRATOCHVÍL, Lukáš; GAMBLE, Tony; ROVATSOS, Michail. Sex chromosome evolution
1475 among amniotes: is the origin of sex chromosomes non-random? **Philosophical Transactions
1476 of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 376, n. 1833, p. 20200108, 13 set. 2021.
- 1477 KRETSCHMER, Rafael; FERGUSON-SMITH, Malcolm; DE OLIVEIRA, Edivaldo.
1478 Karyotype Evolution in Birds: From Conventional Staining to Chromosome Painting. **Genes**,
1479 v. 9, n. 4, p. 181, 27 mar. 2018.
- 1480 KUHL, Heiner *et al.* A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the
1481 oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes.
1482 **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 376, n. 1832, p.
1483 20200089, 30 ago. 2021.
- 1484 KUHN, G. C. S. ‘Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*’.
1485 **Heredity**, v. 115, n. 1, p. 1–2, jul. 2015.

- 1486 KUMAR, Sudhir *et al.* TimeTree 5: An Expanded Resource for Species Divergence Times.
1487 **Molecular Biology and Evolution**, v. 39, n. 8, p. msac174, 3 ago. 2022.
- 1488 LEE, Michael S. Y. *et al.* Phylogeny of snakes (Serpentes): Combining morphological and
1489 molecular data in likelihood, Bayesian and parsimony analyses. **Systematics and Biodiversity**,
1490 v. 5, n. 4, p. 371–389, nov. 2007.
- 1491 LEVY, Samuel *et al.* The Diploid Genome Sequence of an Individual Human. **PLoS Biology**,
1492 v. 5, n. 10, p. e254, 4 set. 2007.
- 1493 LIANGOZOV, I. A. *et al.* Monomers of a satellite DNA sequence of chaffinch (*Fringilla*
1494 *coelebs* L., Aves: Passeriformes) contain short clusters of the TTAGGG repeat. **Russian**
1495 **Journal of Genetics**, v. 38, n. 12, p. 1359–1364, 2002.
- 1496 LISACHOV, Artem *et al.* Conservation of Major Satellite DNAs in Snake Heterochromatin.
1497 **Animals**, v. 13, n. 3, p. 334, 17 jan. 2023.
- 1498 LIU, Jing *et al.* A new emu genome illuminates the evolution of genome configuration and
1499 nuclear architecture of avian chromosomes. **Genome Research**, v. 31, n. 3, p. 497–511, mar.
1500 2021.
- 1501 LIU, Zhiyong *et al.* A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome
1502 evolution. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 348–352, jan. 2004.
- 1503 MACAS, Jiří; NEUMANN, Pavel; NAVRÁTILOVÁ, Alice. Repetitive DNA in the pea (*Pisum*
1504 *sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to
1505 soybean and *Medicago truncatula*. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 427, 2007.
- 1506 MACAYA, Gabriel; CORTADAS, Jordi; BERNARDI, Giorgio. An Analysis of the Bovine
1507 Genome by Density-Gradient Centrifugation: Preparation of the dG+dC-Rich DNA
1508 Components. **European Journal of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 179–188, mar. 1978.
- 1509 MACKESSY, Stephen P. BIOCHEMISTRY AND PHARMACOLOGY OF COLUBRID
1510 SNAKE VENOMS. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 21, n. 1–2, p. 43–83, jan. 2002.
- 1511 MANK, Judith E.; ELLEGREN, Hans. Parallel divergence and degradation of the avian W sex
1512 chromosome. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 8, p. 389–391, ago. 2007.
- 1513 MARSHALL GRAVES, Jennifer A.; SHETTY, Swathi. Sex from W to Z: Evolution of
1514 vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. **Journal of Experimental Zoology**,
1515 v. 290, n. 5, p. 449–462, 15 set. 2001.
- 1516 MARTINEZ, Pedro Alonzo *et al.* An XX/XY heteromorphic sex chromosome system in the
1517 Australian chelid turtle *Emydura macquarii*: A new piece in the puzzle of sex chromosome
1518 evolution in turtles. **Chromosome Research**, v. 16, n. 6, p. 815–825, set. 2008.
- 1519 MATSUBARA, Kazumi *et al.* Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes,
1520 birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. **Proceedings of**
1521 **the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 48, p. 18190–18195, 28 nov. 2006.

- 1522 MATSUBARA, Kazumi *et al.* Karyotypic analysis and FISH mapping of microsatellite motifs
 1523 reveal highly differentiated XX/XY sex chromosomes in the pink-tailed worm-lizard (*Aprasia*
 1524 *parapulchella*, Pygopodidae, Squamata). **Molecular Cytogenetics**, v. 6, n. 1, p. 60, 2013.
- 1525 MATSUBARA, Kazumi *et al.* Highly Differentiated ZW Sex Microchromosomes in the
 1526 Australian Varanus Species Evolved through Rapid Amplification of Repetitive Sequences.
 1527 **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95226, 17 abr. 2014.
- 1528 MATSUBARA, Kazumi *et al.* Molecular cloning and characterization of satellite DNA
 1529 sequences from constitutive heterochromatin of the habu snake (*Protobothrops flavoviridis*,
 1530 Viperidae) and the Burmese python (*Python bivittatus*, Pythonidae). **Chromosoma**, v. 124, n.
 1531 4, p. 529–539, dez. 2015.
- 1532 MATSUBARA, Kazumi *et al.* Amplification of microsatellite repeat motifs is associated with
 1533 the evolutionary differentiation and heterochromatinization of sex chromosomes in Sauropsida.
 1534 **Chromosoma**, v. 125, n. 1, p. 111–123, mar. 2016.
- 1535 MAZRIMAS, J. A.; HATCH, F. T. Similarity of satellite DNA properties in the order Rodentia.
 1536 **Nucleic Acids Research**, v. 4, n. 9, p. 3215–3228, 1977.
- 1537 MEISEL, Richard P. Evolution of Sex Determination and Sex Chromosomes: A Novel
 1538 Alternative Paradigm. **BioEssays**, v. 42, n. 9, p. 1900212, set. 2020.
- 1539 MENGDEN, Gregory A.; STOCK, A. Dean. Chromosomal evolution in serpentes; a
 1540 comparison of G and C chromosome banding patterns of some colubrid and boid genera.
 1541 **Chromosoma**, v. 79, n. 1, p. 53–64, jun. 1980.
- 1542 MESTROVIC, N. *et al.* Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus*--experimental
 1543 evidence for the “library” hypothesis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 8, p. 1062–
 1544 1068, 1 ago. 1998.
- 1545 MEZZASALMA, Marcello *et al.* Karyotype Diversification and Chromosome Rearrangements
 1546 in Squamate Reptiles. **Genes**, v. 15, n. 3, p. 371, 18 mar. 2024.
- 1547 MIGA, Karen H. Completing the human genome: the progress and challenge of satellite DNA
 1548 assembly. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 421–426, set. 2015.
- 1549 MODI, William S.; CREWS, David. Sex chromosomes and sex determination in reptiles.
 1550 **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 15, n. 6, p. 660–665, dez. 2005.
- 1551 MORA, Pablo *et al.* Satellitome Analysis in the Ladybird Beetle *Hippodamia variegata*
 1552 (Coleoptera, Coccinellidae). **Genes**, v. 11, n. 7, p. 783, 13 jul. 2020.
- 1553 MRAVINAC, Brankica *et al.* Sequence of PRAT Satellite DNA “Frozen” in Some Coleopteran
 1554 Species. **Journal of Molecular Evolution**, v. 54, n. 6, p. 774–783, jun. 2002.
- 1555 MRAVINAC, Brankica; PLOHL, Miroslav; UGARKOVIĆ, Đurdica. Preservation and High
 1556 Sequence Conservation of Satellite DNAs Suggest Functional Constraints. **Journal of**
 1557 **Molecular Evolution**, v. 61, n. 4, p. 542–550, out. 2005.

- 1558 MULLER, Hermann J. GENETIC VARIABILITY, TWIN HYBRIDS AND CONSTANT
1559 HYBRIDS, IN A CASE OF BALANCED LETHAL FACTORS. **Genetics**, v. 3, n. 5, p. 422–
1560 499, 1 set. 1918.
- 1561 NANDA, I. *et al.* Synteny conservation of the Z chromosome in 14 avian species (11 families)
1562 supports a role for Z dosage in avian sex determination. **Cytogenetic and Genome Research**,
1563 v. 122, n. 2, p. 150–156, 2008.
- 1564 NANDA, Indrajit *et al.* 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human
1565 chromosome 9. **Nature Genetics**, v. 21, n. 3, p. 258–259, mar. 1999.
- 1566 NAVAJAS-PÉREZ, R.; QUESADA DEL BOSQUE, M. E.; GARRIDO-RAMOS, M. A. Effect
1567 of location, organization, and repeat-copy number in satellite-DNA evolution. **Molecular**
1568 **Genetics and Genomics**, v. 282, n. 4, p. 395–406, out. 2009.
- 1569 NISHIDA-UMEHARA, Chizuko *et al.* Differentiation of Z and W chromosomes revealed by
1570 replication banding and fish mapping of sex-chromosome-linked DNA markers in the
1571 cassowary (Aves, Ratitae). **Chromosome Research**, v. 7, n. 8, p. 635–640, 1999.
- 1572 NISHIDA-UMEHARA, Chizuko *et al.* The molecular basis of chromosome orthologies and
1573 sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. **Chromosome Research**, v. 15, n. 6,
1574 p. 721–734, out. 2007.
- 1575 NOVÁK, Petr; NEUMANN, Pavel; MACAS, Jiří. Global analysis of repetitive DNA from
1576 unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, v. 15, n. 11, p. 3745–
1577 3776, nov. 2020.
- 1578 OGAWA, Akira; MURATA, Koichi; MIZUNO, Shigeki. The location of Z- and W-linked
1579 marker genes and sequence on the homomorphic sex chromosomes of the ostrich and the emu.
1580 **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 8, p. 4415–4418, 14 abr. 1998.
- 1581 OGUIURA, N.; FERRAREZZI, H.; BATISTIC, R. F. Cytogenetics and Molecular Data in
1582 Snakes: A Phylogenetic Approach. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 127, n. 2–4, p. 128–
1583 142, 2009.
- 1584 O'MEALLY, Denis *et al.* Non-homologous sex chromosomes of birds and snakes share
1585 repetitive sequences. **Chromosome Research**, v. 18, n. 7, p. 787–800, nov. 2010.
- 1586 ORGAN, Chris L. *et al.* Origin of avian genome size and structure in non-avian dinosaurs.
1587 **Nature**, v. 446, n. 7132, p. 180–184, mar. 2007.
- 1588 OTTO, Sarah P. *et al.* About PAR: The distinct evolutionary dynamics of the pseudoautosomal
1589 region. **Trends in Genetics**, v. 27, n. 9, p. 358–367, set. 2011.
- 1590 PAN, Qiaowei *et al.* Vertebrate sex-determining genes play musical chairs. **Comptes Rendus**.
1591 **Biologies**, v. 339, n. 7–8, p. 258–262, 10 jun. 2016.
- 1592 PANICKER, S. G.; SINGH, L. Banded krait minor satellite (Bkm) contains sex and species-
1593 specific repetitive DNA. **Chromosoma**, v. 103, n. 1, p. 40–45, mar. 1994.

- 1594 PASQUESI, Giulia I. M. *et al.* Squamate reptiles challenge paradigms of genomic repeat
1595 element evolution set by birds and mammals. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2774, 17
1596 jul. 2018.
- 1597 PEONA, Valentina *et al.* Satellite DNA evolution in Corvoidea inferred from short and long
1598 reads. **Molecular Ecology**, v. 32, n. 6, p. 1288–1305, mar. 2023.
- 1599 PERRIN, Nicolas. SEX REVERSAL: A FOUNTAIN OF YOUTH FOR SEX
1600 CHROMOSOMES? **Evolution**, v. 63, n. 12, p. 3043–3049, dez. 2009.
- 1601 PERRIN, Nicolas. Sex-chromosome evolution in frogs: what role for sex-antagonistic genes?
1602 **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 376, n. 1832, p.
1603 20200094, 30 ago. 2021.
- 1604 PICARD, Marion A. L. *et al.* Evolution of gene dosage on the Z-chromosome of schistosome
1605 parasites. **eLife**, v. 7, p. e35684, 25 jul. 2018.
- 1606 PIGOZZI, M. I.; SOLARI, A. J. Equal frequencies of recombination nodules in both sexes of
1607 the pigeon suggest a basic difference with eutherian mammals. **Genome**, v. 42, n. 2, p. 315–
1608 321, 1 abr. 1999.
- 1609 PIGOZZI, María Inés. Diverse stages of sex-chromosome differentiation in tinamid birds:
1610 evidence from crossover analysis in *Eudromia elegans* and *Crypturellus tataupa*. **Genetica**, v.
1611 139, n. 6, p. 771–777, jun. 2011.
- 1612 PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-
1613 sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.
1614 83, n. 9, p. 2934–2938, maio 1986.
- 1615 PISCHEDDA, Alison *et al.* Sexual selection has minimal impact on effective population sizes
1616 in species with high rates of random offspring mortality: An empirical demonstration using
1617 fitness distributions: SEXUAL SELECTION AND EFFECTIVE POPULATION SIZES.
1618 **Evolution**, v. 69, n. 10, p. 2638–2647, out. 2015.
- 1619 POKORNÁ, Martina *et al.* Differentiation of sex chromosomes and karyotypic evolution in the
1620 eye-lid geckos (Squamata: Gekkota: Eublepharidae), a group with different modes of sex
1621 determination. **Chromosome Research**, v. 18, n. 7, p. 809–820, nov. 2010.
- 1622 POKORNÁ, Martina Johnson; KRATOCHVÍL, Lukáš. What was the ancestral sex-determining
1623 mechanism in amniote vertebrates? **Biological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 1–12, fev. 2016.
- 1624 POKORNÁ, Martina; KRATOCHVÍL, Lukáš; KEJNOVSKÝ, Eduard. Microsatellite
1625 distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and
1626 heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and
1627 Lacertidae: *Eremias velox*). **BMC Genetics**, v. 12, n. 1, p. 90, dez. 2011.
- 1628 PRADO-FRANCESCHI, Julia; HYSLOP, Stephen. SOUTH AMERICAN COLUBRID
1629 ENVENOMATIONS. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 21, n. 1–2, p. 117–158, jan.
1630 2002.

- 1631 PRUM, Richard O. *et al.* A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-
1632 generation DNA sequencing. **Nature**, v. 526, n. 7574, p. 569–573, out. 2015.
- 1633 PŠENIČKA, Tomáš *et al.* Sex Chromosome Turnovers and Stability in Snakes. **Molecular**
1634 **Biology and Evolution**, v. 42, n. 1, p. msae255, 6 jan. 2025.
- 1635 PYRON, R. Alexander *et al.* Effectiveness of phylogenomic data and coalescent species-tree
1636 methods for resolving difficult nodes in the phylogeny of advanced snakes (Serpentes:
1637 Caenophidia). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 81, p. 221–231, dez. 2014.
- 1638 PYRON, R. Alexander; REYNOLDS, R. Graham; BURBRINK, Frank T. A Taxonomic
1639 Revision of *Boas* (Serpentes: Boidae). **Zootaxa**, v. 3846, n. 2, 1 ago. 2014.
- 1640 PYRON, R.; BURBRINK, Frank T.; WIENS, John J. A phylogeny and revised classification of
1641 Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n.
1642 1, p. 93, 2013.
- 1643 RAY-CHAUDHURI, S. P.; PATHAK, S.; SHARMA, T. Karyotypes of Five Indian Species of
1644 Microchiroptera. **Caryologia**, v. 24, n. 2, p. 239–245, jan. 1971.
- 1645 RICE, William R. Sex Chromosomes and the Evolution of Sexual Dimorphism. **Evolution**, v.
1646 38, n. 4, p. 735, jul. 1984.
- 1647 ROMANENKO, Svetlana A. *et al.* The Cytogenetic Map of the Nile Crocodile (*Crocodylus*
1648 *niloticus*, Crocodylidae, Reptilia) with Fluorescence In Situ Localization of Major Repetitive
1649 DNAs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 13063, 27 out. 2022.
- 1650 ROMIGUIER, J. *et al.* Comparative population genomics in animals uncovers the determinants
1651 of genetic diversity. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. 261–263, nov. 2014.
- 1652 ROVATSOS, M.; VUKIĆ, J.; KRATOCHVÍL, L. Mammalian X homolog acts as sex
1653 chromosome in lacertid lizards. **Heredity**, v. 117, n. 1, p. 8–13, jul. 2016.
- 1654 ROVATSOS, Michail *et al.* Cretaceous park of sex determination: sex chromosomes are
1655 conserved across iguanas. **Biology Letters**, v. 10, n. 3, p. 20131093, mar. 2014a.
- 1656 ROVATSOS, Michail *et al.* CONSERVED SEX CHROMOSOMES ACROSS ADAPTIVELY
1657 RADIATED *ANOLIS* LIZARDS: BRIEF COMMUNICATION. **Evolution**, v. 68, n. 7, p. 2079–
1658 2085, jul. 2014b.
- 1659 ROVATSOS, Michail *et al.* Evolutionary stability of sex chromosomes in snakes. **Proceedings**
1660 **of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1821, p. 20151992, 22 dez. 2015.
- 1661 ROVATSOS, Michail *et al.* Cytogenetics of the Javan file snake (*Acrochordus javanicus*) and
1662 the evolution of snake sex chromosomes. **Journal of Zoological Systematics and**
1663 **Evolutionary Research**, v. 56, n. 1, p. 117–125, fev. 2018.
- 1664 RUIZ-RUANO, Francisco J. *et al.* High-throughput analysis of the satellitome illuminates
1665 satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28333, 7 jul. 2016.
- 1666 RUSSELL, DW. **Molecular cloning: a laboratory manual**. [S.l.]: Cold Spring Harb, 2001.

- 1667 S. OHNO. **Sex chromosomes and sex-linked genes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin, 1967.
- 1668 SACKTON, Timothy B. *et al.* **Convergent regulatory evolution and the origin of**
 1669 **flightlessness in palaeognathous birds**. *Evolutionary Biology*, , 8 fev. 2018. Disponível em:
 1670 <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/262584>>. Acesso em: 14 abr. 2025
- 1671 SAIFITDINOVA, A. F. *et al.* Centromeric tandem repeat from the chaffinch genome: Isolation
 1672 and molecular characterization. **Genome**, v. 44, n. 1, p. 96–103, 1 fev. 2001.
- 1673 SCHMIEDER, Robert; EDWARDS, Robert. Fast Identification and Removal of Sequence
 1674 Contamination from Genomic and Metagenomic Datasets. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17288, 9
 1675 mar. 2011.
- 1676 SEMBER, Alexandr *et al.* Sex Chromosome Evolution and Genomic Divergence in the Fish
 1677 *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 71, 5 mar.
 1678 2018.
- 1679 SETTI, Príncia Grejo *et al.* Evolution of bird sex chromosomes: a cytogenomic approach in
 1680 Palaeognathae species. **BMC Ecology and Evolution**, v. 24, n. 1, p. 51, 23 abr. 2024.
- 1681 SHARMA, O. P.; KOUR, Gurpreet. On the Chromosomes of Four Species of Indian Snakes.
 1682 **CYTOLOGIA**, 2005.
- 1683 SHETTY, S. *et al.* DMRT1 in a ratite bird: evidence for a role in sex determination and
 1684 discovery of a putative regulatory element. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 99, n. 1–4,
 1685 p. 245–251, 2002.
- 1686 SHETTY, Swathi; GRIFFIN, Darren K.; GRAVES, Jennifer A. Marshall. Comparative painting
 1687 reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. **Chromosome**
 1688 **Research**, v. 7, n. 4, p. 289–295, 1999.
- 1689 SINGH, L. Evolution of karyotypes in snakes. **Chromosoma**, v. 38, n. 2, p. 185–236, 1972.
- 1690 SINGH, L. Chromosomes of Six Species of Indian Snakes. p. 419–429, 1974.
- 1691 SINGH, L.; PURDOM, I. F.; JONES, K. W. Satellite DNA and evolution of sex chromosomes.
 1692 **Chromosoma**, v. 59, n. 1, p. 43–62, 1976.
- 1693 SINGH, L.; SHARMA, T.; RAY-CHAUDHURI, S. P. W chromosome in the Indian water snake
 1694 (checkered keel back) *Natrix piscator* (colubridae). **Experientia**, v. 24, n. 1, p. 79–80, jan. 1968.
- 1695 SINGH, Lalji; PURDOM, I. F.; JONES, K. W. Sex chromosome associated satellite DNA:
 1696 Evolution and conservation. **Chromosoma**, v. 79, n. 2, p. 137–157, jun. 1980.
- 1697 SINGH, Lalji; PURDOM, Ian F.; JONES, Kenneth W. Behaviour of sex chromosome
 1698 associated satellite DNAs in somatic and germ cells in snakes. **Chromosoma**, v. 71, n. 2, p.
 1699 167–181, 1979.
- 1700 SLAMOVITS, Claudio H. *et al.* Recurrent Amplifications and Deletions of Satellite DNA
 1701 Accompanied Chromosomal Diversification in South American Tuco-tucos (Genus *Ctenomys*,
 1702 Rodentia: Octodontidae): A Phylogenetic Approach. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18,
 1703 n. 9, p. 1708–1719, 1 set. 2001.

- 1704 SMITH, Jillian D. L.; BICKHAM, John W.; GREGORY, T. Ryan. Patterns of genome size
1705 diversity in bats (order Chiroptera). **Genome**, v. 56, n. 8, p. 457–472, ago. 2013.
- 1706 SMITH, Jillian D. L.; GREGORY, T. Ryan. The genome sizes of megabats (Chiroptera:
1707 Pteropodidae) are remarkably constrained. **Biology Letters**, v. 5, n. 3, p. 347–351, 23 jun. 2009.
- 1708 SOUZA, Guilherme Mota *et al.* Satellitome analysis on the pale-breasted thrush *Turdus*
1709 *leucomelas* (Passeriformes; Turdidae) uncovers the putative co-evolution of sex chromosomes
1710 and satellite DNAs. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 20656, 4 set. 2024.
- 1711 STEINEMANN, M.; STEINEMANN, S. Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*:
1712 a trap for retrotransposons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 16, p.
1713 7591–7595, 15 ago. 1992.
- 1714 STEINEMANN, Sigrid; STEINEMANN, Manfred. Y chromosomes: born to be destroyed.
1715 **BioEssays**, v. 27, n. 10, p. 1076–1083, out. 2005.
- 1716 STIGLEC, R.; EZAZ, T.; GRAVES, J. A. M. A new look at the evolution of avian sex
1717 chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 117, n. 1–4, p. 103–109, 2007.
- 1718 STREICHER, Jeffrey W.; WIENS, John J. Phylogenomic analyses reveal novel relationships
1719 among snake families. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 100, p. 160–169, jul. 2016.
- 1720 SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.
1721 **Experimental Cell Research**, v. 75, n. 1, p. 304–306, nov. 1972.
- 1722 TAKAGI, N.; ITOH, M.; SASAKI, M. Chromosome studies in four species of Ratitae (Aves).
1723 **Chromosoma**, v. 36, n. 3, 1972.
- 1724 TALBERT, Paul B.; HENIKOFF, Steven. What makes a centromere? **Experimental Cell**
1725 **Research**, v. 389, n. 2, p. 111895, abr. 2020.
- 1726 THAKUR, Jitendra; PACKIARAJ, Jenika; HENIKOFF, Steven. Sequence, Chromatin and
1727 Evolution of Satellite DNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4309,
1728 21 abr. 2021.
- 1729 THONGCHUM, Ratchaphol *et al.* Diversity of PBI-DdeI satellite DNA in snakes correlates
1730 with rapid independent evolution and different functional roles. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1,
1731 p. 15459, 29 out. 2019.
- 1732 TOMA, Gustavo Akira *et al.* Cytogenetics of the small-sized fish, *Copeina guttata*
1733 (Characiformes, Lebiasinidae): Novel insights into the karyotype differentiation of the family.
1734 **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, p. e0226746, 19 dez. 2019.
- 1735 TSUDA, Yayoi *et al.* Comparison of the Z and W sex chromosomal architectures in elegant
1736 crested tinamou (*Eudromia elegans*) and ostrich (*Struthio camelus*) and the process of sex
1737 chromosome differentiation in palaeognathous birds. **Chromosoma**, v. 116, n. 2, p. 159–173,
1738 13 mar. 2007.

- 1739 TURA, Victoria *et al.* Chromosomal Evolution of Suboscines: Karyotype Diversity and
 1740 Evolutionary Trends in Ovenbirds (Passeriformes, Furnariidae). **Cytogenetic and Genome**
 1741 **Research**, v. 162, n. 11–12, p. 644–656, 2022.
- 1742 UETZ, Peter. **The reptile database.** , 30 jan. 2025. Disponível em: <[http://www.reptile-
 database.org](http://www.reptile-

 1743 database.org)>
- 1744 UTSUNOMIA, Ricardo *et al.* Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus*
 1745 (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the
 1746 heteromorphic sex chromosome. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5856, 10 abr. 2019.
- 1747 VEYRUNES, Frédéric *et al.* Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of
 1748 mammal sex chromosomes. **Genome Research**, v. 18, n. 6, p. 965–973, jun. 2008.
- 1749 VIANA, Patrik F. *et al.* Revisiting the Karyotype Evolution of Neotropical Boid Snakes: A
 1750 Puzzle Mediated by Chromosomal Fissions. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 2268, 10 out. 2020.
- 1751 VICOSO, Beatriz *et al.* Comparative Sex Chromosome Genomics in Snakes: Differentiation,
 1752 Evolutionary Strata, and Lack of Global Dosage Compensation. **PLoS Biology**, v. 11, n. 8, p.
 1753 e1001643, 27 ago. 2013.
- 1754 VIDAL, Nicolas *et al.* The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from
 1755 seven nuclear protein-coding genes. **Comptes Rendus. Biologies**, v. 330, n. 2, p. 182–187, 30
 1756 out. 2006.
- 1757 VOURC'H, Claire; BIAMONTI, Giuseppe. Transcription of Satellite DNAs in Mammals. *In:*
 1758 UGARKOVIC, Durdica (Org.). **Long Non-Coding RNAs**. Progress in Molecular and
 1759 Subcellular Biology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. v. 51 p. 95–118.
- 1760 WANG, Zongji *et al.* Temporal genomic evolution of bird sex chromosomes. **BMC**
 1761 **Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, p. 250, dez. 2014.
- 1762 XU, Luohao *et al.* Evolutionary Dynamics of Sex Chromosomes of Paleognathous Birds.
 1763 **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 8, p. 2376–2390, 1 ago. 2019.
- 1764 XU, Luohao; ZHOU, Qi. The Female-Specific W Chromosomes of Birds Have Conserved
 1765 Gene Contents but Are Not Feminized. **Genes**, v. 11, n. 10, p. 1126, 25 set. 2020.
- 1766 YAMADA, Kazuhiko *et al.* Characterization and chromosomal distribution of novel satellite
 1767 DNA sequences of the lesser rhea (*Pterocnemia pennata*) and the greater rhea (*Rhea americana*).
 1768 **Chromosome Research**, v. 10, n. 6, p. 513–523, 2002.
- 1769 YAMADA, Kazuhiko; NISHIDA-UMEHARA, Chizuko; MATSUDA, Yoichi. A new family of
 1770 satellite DNA sequences as a major component of centromeric heterochromatin in owls
 1771 (Strigiformes). **Chromosoma**, v. 112, n. 6, p. 277–287, 1 mar. 2004.
- 1772 YANO, Cassia Fernanda; BERTOLLO, Luiz Antônio Carlos; CIOFFI, Marcelo De Bello. Fish-
 1773 FISH: Molecular Cytogenetics in Fish Species. *In:* LIEHR, Thomas (Org.). **Fluorescence In**
 1774 **Situ Hybridization (FISH)**. Springer Protocols Handbooks. Berlin, Heidelberg: Springer
 1775 Berlin Heidelberg, 2017. p. 429–443.

- 1776 YAZDI, Homa Papoli *et al.* The evolutionary maintenance of ancient recombining sex
1777 chromosomes in the ostrich. **PLOS Genetics**, v. 19, n. 6, p. e1010801, 30 jun. 2023.
- 1778 YAZDI, Homa Papoli; ELLEGREN, Hans. Old but Not (So) Degenerated—Slow Evolution of
1779 Largely Homomorphic Sex Chromosomes in Ratites. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31,
1780 n. 6, p. 1444–1453, jun. 2014.
- 1781 YAZDI, Homa Papoli; SILVA, Willian T. A. F.; SUH, Alexander. Why Do Some Sex
1782 Chromosomes Degenerate More Slowly Than Others? The Odd Case of Ratite Sex
1783 Chromosomes. **Genes**, v. 11, n. 10, p. 1153, 30 set. 2020.
- 1784 YONEZAWA, Takahiro *et al.* Phylogenomics and Morphology of Extinct Paleognaths Reveal
1785 the Origin and Evolution of the Ratites. **Current Biology**, v. 27, n. 1, p. 68–77, jan. 2017.
- 1786 YURCHENKO, Alona *et al.* Cytogenetic Analysis of Satellitome of Madagascar Leaf-Tailed
1787 Geckos. **Genes**, v. 15, n. 4, p. 429, 28 mar. 2024.
- 1788 ZAHER, Hussam *et al.* Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia)
1789 with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions
1790 of new taxa. **Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)**, v. 49, n. 11, p. 115–153, 2009.
- 1791 ZHANG, Qu; EDWARDS, Scott V. The Evolution of Intron Size in Amniotes: A Role for
1792 Powered Flight? **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 10, p. 1033–1043, 2012.
- 1793 ZHANG, Zong Hong *et al.* A Comparative Study of Techniques for Differential Expression
1794 Analysis on RNA-Seq Data. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e103207, 13 ago. 2014.
- 1795 ZHOU, Qi *et al.* Complex evolutionary trajectories of sex chromosomes across bird taxa.
1796 **Science**, v. 346, n. 6215, p. 1246338, 12 dez. 2014.
- 1797 ZWICK, Michael S. *et al.* A rapid procedure for the isolation of $C_0 t^{-1}$ DNA from plants.
1798 **Genome**, v. 40, n. 1, p. 138–142, 1 fev. 1997.
- 1799