

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

**Chamada CNPq 25/2021 – Bolsas no País**

**Projeto de Pesquisa de Pós-Doutorado Júnior (PDJ)**

**ANÁLISE GENÔMICA E MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DA FAMÍLIA MULTIGÊNICA  
DAS HISTONAS EM AVES**

**Candidato:** Dr. Tiago Marafiga Degrandi

**Supervisor:** Dr. Roberto Ferreira Artoni

**Ponta Grossa**

**2022**

**Título:** Análise genômica e mapeamento cromossômico da família multigênica das histonas em aves

**Resumo:** As histonas pertencem a uma família multigênica composta pelos genes H1, H2A, H2B, H3 e H4. As proteínas codificadas por estes genes compõem o nucleossomo, unidade básica de compactação do DNA no núcleo da célula comum a todos os eucariotos. Estudos tem demonstrado que uma série de modificações pós-traducionais e genéticas originam variantes de histonas, e funções adicionais como na regulação da transcrição, na replicação, no reparo do DNA, e na manutenção da estabilidade cromossômica. Apesar desta importância, a origem e a função destas variantes em alguns grupos de vertebrados são pouco exploradas. Nas aves por exemplo, apenas o galo doméstico tivera o cluster histonas completamente caracterizado. Em geral, as aves possuem características únicas no cariótipo, a maioria das espécies preserva número diploide ( $2n$ ) de 80 cromossomos. No entanto, algumas espécies evoluíram para redução e outras para o aumento do  $2n$  e apesar de diversos estudos citogenéticos terem sido realizados, ainda não está claro por que alguns grupos apresentam esta variação no cariótipo. Em vista disso, é possível que variantes histonas estejam associadas a instabilidade da cromatina e a alterações cromossômicas numéricas e estruturais em aves. Para responder estas questões este projeto inclui uma abordagem genômica, onde será realizado a análise comparativa das histonas e suas variantes em espécies de aves com genomas disponíveis em bancos de dados. E citogenética, na qual serão construídas sondas de DNA para os genes de histonas, que serão mapeados no cariótipo de 12 espécies de aves. Com isso, espera-se que esta pesquisa possa contribuir para o entendimento evolutivo e funcional das histonas e suas variantes, para o desenvolvimento de novas metodologias, bem como aprofundar o conhecimento sobre biodiversidade de aves que ocorrem no território nacional. Além de oportunizar ao bolsista integrar-se a novas ferramentas de pesquisa.

**Palavras-chave:** Genética Animal, Citogenética, Evolução Cariotípica, DNAs Repetitivos, FISH.

**Title:** Genomic analysis and chromosomal mapping of histones multigenic family in birds

**Abstract:** Histones belong to a multigene family composed of the H1, H2A, H2B, H3 and H4 genes. The proteins encoded by these genes make up the nucleosome, the basic unit of DNA compaction in the cell nucleus common to all eukaryotes. Studies have shown that a series of post-translational and genetic modifications give rise to histone variants, and additional functions such as transcriptional regulation, replication, DNA repair, and maintenance of chromosomal stability. Despite this importance, the origin and function of these variants in some vertebrate groups are poorly explored. In birds, for example, only the domestic chicken had the histone cluster fully characterized. In general, birds have unique characteristics in the karyotype, where most species preserve a diploid number ( $2n$ ) of 80 chromosomes. However, some species evolved to decrease and others to increase  $2n$  and despite several cytogenetic studies have been performed, it is still unclear why some groups show this variation in karyotype. In view of this, it is possible that histone variants are associated with chromatin instability and numerical and structural chromosomal alterations in birds. To answer these questions, this project includes a genomic approach, where a comparative analysis of histones and their variants will be carried out in bird species with genomes available in databases. And cytogenetics, in which DNA probes will be built for histone genes, which will be mapped in the karyotype of 12 bird species. With this, it is expected that this research can contribute to the evolutionary and functional understanding of histones and their variants, to the development of new methodologies, as well as to deepen the knowledge about the biodiversity of birds that occur in the national territory. In addition to providing opportunities for the scholarship holder to integrate with new research tools.

**Keywords:** Animal Genetics, Cytogenetics, Karyotype Evolution, Repetitive DNAs, FISH.

## Introdução

As histonas pertencem a uma família multigênica composta por cinco genes (H2A, H2B, H3, H4 e H1) que podem estar dispostos em clusters no genoma ou dispersos em diferentes loci cromossômicos (NEI e ROONEY, 2005). As proteínas histonas, codificadas por estes genes, compõem o nucleossomo, que é a unidade básica de compactação do DNA no núcleo da célula comum a todos os eucariotos (TALBERT e HENIKOFF, 2010). Estruturalmente, o nucleossomo consiste em ~ 147 pares de bases de DNA envolvidos em um octâmero de proteínas histonas (um tetrâmero de H3/H4 e dois dímeros de H2A/H2B) (RAMÍREZ et al., 2005). Cada nucleossomo está ligado um ao outro, por um segmento de DNA ligante de 20-80 pb que interage com histonas ligantes (H1), formando uma matriz de nucleossomos (LUGER et al., 1997; BUSTIN et al., 2005).

Além de compactar o DNA em cromatina, as histonas também exercem funções na regulação da transcrição, na replicação, no reparo do DNA, e na manutenção da estabilidade cromossômica (RAMÍREZ et al., 2005). Estas funções podem ser conferidas por uma série de modificações pós-traducionais como metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitilação, e também modificações genéticas, originando as variantes de histonas (TALBERT e HENIKOFF, 2010; ÖZTÜRK et al., 2018). Sendo assim, os nucleossomos também constituem um importante elemento do epigenoma, pois limitam o acesso ao DNA das “máquinas” celulares que requerem DNA como molde (TALBERT e HENIKOFF, 2010).

Quanto a classificação, as histonas são geralmente categorizadas em "canônicas" e "não canônicas". As histonas canônicas, são também definidas como isoformas de histonas, e estão localizadas em agrupamentos de genes e são expressas exclusivamente na fase S do ciclo celular com organização de haste-alça 3' (WANG et al., 2012). Enquanto as histonas não canônicas ou também chamadas de variantes histonas são genes

solitários, expressos de maneira independente da replicação ao longo do ciclo celular com cauda poli-A. As isoformas variam entre si apenas por alguns aminoácidos, enquanto as variantes diferem significativamente das histonas canônicas, bem como entre si (SHAH et al., 2020).

As variantes genéticas das histonas têm especial importância, pois são codificadas no genoma e assim podem ser herdadas. A origem destas variantes no genoma, tem sido debatida no âmbito de estudos de evolução das famílias multigênicas (KOWALSKI e PALYGA, 2011). Uma família multigênica é caracterizada por um grupo de genes que descendem de um gene ancestral comum e, portanto, possuem funções semelhantes e sequências de DNA semelhantes. Estes estudos têm demonstrado que a sequência nucleotídica dos genes de histona são altamente conservadas entre as espécies, e dois modelos evolutivos foram propostos. No modelo de “nascimento e morte” (Birth-and-Death) postula-se que após a duplicação destes genes, alguns tornam-se pseudogenes ou mesmo são deletados do genoma, no entanto para as histonas, devido sua importante função, eles são fortemente selecionados (PIONTKIVSKA et al., 2002). Enquanto que no modelo de evolução em concerto, explica que a semelhança observada entre as sequências é dada por mecanismos de conversão gênica, que tende a homogeneizar estas sequências (KOWALSKI e PALYGA, 2011).

Evolutivamente a histona H4 é a mais conservada e não há evidências de variantes para essa histona em eucariotos superiores. Enquanto a histona H3 já apresenta algumas variantes e está associada principalmente a regiões centroméricas em diversos organismos. A histona H2A é a que possui o maior número de variantes entre as histonas e está envolvida em processos distintos, podendo atuar tanto na ativação como no silenciamento gênico, compactação da cromatina e na viabilidade celular. Variantes de H2B, são menos frequentes, possuem mínimas variações e aparentemente não causam

alterações estruturais na cromatina. A histona H1 contém mais variantes sendo a menos conservada entre as histonas. Em humanos, por exemplo, há 11 variantes de H1, e seis delas são consideradas tecido-específicas (SEVERO, 2018).

No genoma do *Gallus gallus* (frango doméstico) por exemplo, o cluster das histonas compreende 110 kb, onde são encontrados 39 genes de histonas repetidos em tandem, sendo 6 de H1, 9 de H2A, 8 de H2B, 8 de H3, e 8 de H4 (TAKAMI et al., 1996). Destes 39 genes, três são variantes de H1, quatro são variantes H2A, três variantes H3 e nenhuma variante tem sido observada em H2B e H4 (DRAIZEN et al., 2016). No entanto, as funções e o estado de conservação destas variantes entre espécies de aves filogeneticamente relacionadas ainda permanecem desconhecidas.

As aves em geral, constituem um importante modelo biológico de estudos de diversidade, comportamentais e também genéticos (STILLER e ZHANG, 2019). Nos últimos anos, um grande número de espécies de aves (754 espécies) tivera seu genoma completamente sequenciado no projeto B10K coordenado pelo prof. Dr. Guojie Zhang. As análises destes genomas, evidenciaram características únicas das aves, como uma baixa fração de DNA repetitivos (menos de 10%), e uma impressionante conservação no tamanho total do genoma entre espécies de diferentes grupos, variando de 1,0 pg em *Amadina fasciata* a 2.2 pg *Struthio camelus* (JARVIS et al., 2014).

Esta conservação genômica também se estende as características citogenéticas (os cromossomos), nas quais é visto que a 50,7 % das aves cariotipadas preservam o formato bimodal do cariótipo, composto por macrocromossomos e microcromossomos, e o número diploide ( $2n$ ) variando entre 78 e 82 cromossomos (DEGRANDI et al., 2020a). No entanto, ao considerar toda a diversidade da classe aves, é observado uma ampla variação, incluindo tanto espécies com número reduzido de cromossomos ( $2n= 40$ ), quanto um número mais elevado, com até 142 cromossomos (DEGRANDI et al., 2020a).

Interessantemente, para algumas ordens, é observado que o número cromossômico é pouco variável entre as espécies (Tinamiformes) (GARNERO et al., 2006). Enquanto que para outras (Accipitriformes, Bucerotiformes, Charadriiformes, Coraciiformes, Falconiformes, Piciformes e Psittaciformes) existe uma grande variação interespecífica, ocorrendo tanto para redução quanto para o aumento do  $2n$  (DE OLIVEIRA et al., 2010; DEGRANDI et al., 2018).

Para entender a origem destas variações, estudos que envolvem a pintura cromossômica comparativa, utilizando as sondas cromossômicas do *Gallus gallus* vem sendo realizados em grupos alvos (GRIFFIN et al., 1999). Os resultados destes estudos sugerem que os macrocromossomos podem sofrer fissões resultando no aumento do  $2n$  e/ou fusões de macrocromossomos e microcromossomos, reduzindo o  $2n$  (DE OLIVEIRA et al., 2005; 2010; NISHIDA-UMEHARA et al., 2007; KRETSCHMER et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2015; DEGRANDI et al., 2017). Além disso, análises do cluster 45S rDNA, que também pertence a uma família multigênica, evidenciou que este cluster tem participado de múltiplos rearranjos cromossômicos como fusões, duplicações e inversões cromossômicas, sendo um elemento com bastante mobilidade dentro do genoma das aves (DEGRANDI et al., 2020b).

Considerando a organização estrutural do cluster das histonas no genoma, a presença de inúmeras variantes e os recursos genômicos disponíveis em aves, algumas questões agora podem ser abordadas tais como: O cluster das histonas é um *hotspot* para alterações cromossômicas numéricas e estruturais? Espécies filogeneticamente relacionadas podem compartilhar variantes de histonas? Estas variantes podem atuar como proteção em cariótipos conservados? E ainda caso sejam exclusivas, estas variantes poderiam ser utilizadas como características para a diagnose de espécies?

## Hipótese

Variantes de histonas estão relacionadas a instabilidade cromossômica e a variações no número e na morfologia dos cromossomos entre espécies de aves filogeneticamente relacionadas.

## Objetivos

### Objetivo geral

Analisar se variantes de histonas podem estar relacionadas a instabilidade da cromatina e a alterações cromossômicas numéricas e estruturais em aves.

### Objetivos específicos

- Analisar a correlação de variantes das histonas com alterações no número de cromossomos e no cariótipo entre espécies filogeneticamente relacionadas;
- Isolar e construir sondas para os genes das histonas para aplicações em experimentos de Hibridização *in situ* fluorescente;
- Realizar o mapeamento cromossômico dos genes das histonas, e identificar se o cluster é um *hotspot* para alterações cromossômicas numéricas e estruturais;
- Criar um banco de amostras de DNA, e contribuir para o sequenciamento do genoma das aves por meio de uma cooperação internacional com o projeto B10K;
- Integrar-se a novas ferramentas de pesquisas, e promover o desenvolvimento técnico e científico nacional por meio do treinamento de estudantes de graduação e pós-graduação;
- Contribuir para o conhecimento da biodiversidade de aves no Brasil;

## Metodologia

### Atividade 1: Análise *in silico* de variantes histonas

**Objetivo:** Analisar a correlação de variantes das histonas com alterações no número de cromossomos e no cariótipo entre espécies filogeneticamente relacionadas.

Na abordagem genômica, será realizado uma análise comparativa dos genes das histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) e suas variantes nos genomas das aves que se encontram disponíveis nos bancos de dados: HistoneDB 2.0 –*National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e *Avian Genomics Database*. As análises serão realizadas utilizando o supercomputador PARAM Shavak, personalizado para análises genéticas disponibilizado pelo projeto NAPI Bioinformática (Novos Arranjos de Pesquisa e Inovação em Bioinformática, Fundação Araucária), coordenado pelo supervisor desta proposta.

Os métodos desta análise serão realizados de acordo com Molaro and Drinnenberg, (2018), com modificações. Para realizar a busca nas bases de dados será utilizado a ferramenta BLAST utilizando como referência as sequências obtidas para o *G. gallus* (galo doméstico). Após serão adotados critérios eletivos tanto para as sequências quanto para as espécies que serão incluídas no estudo, considerando a qualidade da sequência, o tamanho e a espécie possuir número diploide de cromossomos conhecido. A informação do número cromossômico e do cariótipo das espécies serão obtidas no *Bird Chromosome Database* (DEGRANDI et al., 2020a). Após será realizado o download de todas sequências selecionadas.

Nas análises seguintes, as histonas serão divididas quanto aos grupos H1, H2A, H2B, H3 e H4 e o alinhamento destas será realizado com o Clustal W. A partir desta etapa será possível elaborar uma lista das variantes encontradas, estimar os índices de diversidade e similaridade entre as sequências, mutações, assim como observar os resíduos da variação. Nesta etapa contaremos com a parceria do Prof. Dr. Alexandre Rossi

Pascoal, pesquisador em Bioinformática da Universidade Tecnológica Federal do Paraná e integrante do NAPI-Bioinformática., com expertise em Inteligência Artificial e análises de sequências repetitivas do genoma.

Na etapa seguinte, serão realizadas análises filogenéticas. É importante destacar que o objetivo não é estabelecer relações filogenética entre as espécies de aves, e sim obter as relações entre as histonas e suas variantes. As relações filogenéticas entre as espécies serão observadas de acordo com a proposta de Jarvis et al., (2014) e Prun et al., (2015).

## **Atividade 2: Isolamento e construção das sondas das histonas**

**Objetivo:** Isolar e construir sondas para os genes das histonas para aplicações em experimentos de Hibridização *in situ* fluorescente;

Neste projeto também serão produzidas sondas de DNA para os genes das histonas H1, H2, H3 e H4, isolados do genoma do *G. gallus*. Para isso, o DNA genômico do *G. gallus* será extraído a partir de uma amostra de sangue e/ou tecido, utilizando kit de extração DNA QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QUIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. A reação em cadeia da polimerase (PCR), será realizada utilizando o DNA genômico e os *primers*: H1 (5'-ATGGCAGAARYCGMCCAG-3'; 5'-TACTTCTTCTTGGGSGCTGC-3') (HASHIMOTO et al., 2011), H2 (5'-AAGGGCTCCAAGAAGGCGG-3', 5'-GACGTGATGGTCGAGCGCTTG-3') (KRASIKOVA et al., 2012), H3 (5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3', 5'-ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC-3') (COLGAN et al., 1998), H4 (5'-TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC-3', 5'-CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT-3') (PINEAU et al., 2005).

As sequências isoladas serão clonadas em vetor plasmidial utilizando o kit pGEM (PROMEGA) no Laboratório de Genética e Evolução (LabGEv) da UEPG que possui

extensão de Certificado de Qualidade conferido pela CTNBio para esta finalidade (Processo SEI nº: 01245.013964/2021-41; 7848/2021, publicado no Diário Oficial da União em 25/08/2021), seguindo as instruções do fabricante. As sequências clonadas serão enviadas para o sequenciamento do DNA, e as leituras obtidas serão checadas por meio da ferramenta BLASTn no NCBI, onde será resgatada a homologia com o genoma do *G. gallus*. Ao final, os clones serão estocados em freezer -80°C para serem utilizados nos experimentos de hibridização *in situ* fluorescente.

### Atividade 3: Mapeamento cromossômico das histonas

**Objetivo:** Realizar o mapeamento cromossômico dos genes das histonas, e identificar se o cluster é um *hotspot* para alterações cromossômicas numéricas e estruturais.

Nesta etapa, será realizado o mapeamento cromossômico dos genes das histonas no cariótipo de doze espécies de aves previamente selecionadas (Tabela 1). Desta lista, sete espécies já possuem preparações cromossômicas disponíveis para o estudo e armazenadas no banco de preparações do LabGEv, enquanto outras devem ser coletadas em missões a campo.

**Tabela 2:** Espécies pré-selecionadas para os ensaios de hibridização *in situ* fluorescente com as sondas das histonas

Ordem	Família	Espécie	2n**
Galliformes	Phasianidae	<i>Gallus gallus</i> *	78
		<i>Meleagris gallopavo</i>	80
Apodiformes	Apodidae	<i>Streptoprocne zonaris</i> *	68
		<i>Streptoprocne biscutata</i>	66
Coraciiformes	Alcedinidae	<i>Chloroceryle americana</i> *	94
		<i>Megaceryle torquata</i>	84
Cuculiformes	Cuculidae	<i>Guira guira</i> *	76
		<i>Piaya cayana</i> *	90
Columbiformes	Columbidae	<i>Columba livia</i>	80
		<i>Columbina picui</i>	76
Passeriformes	Turdidae	<i>Turdus rufiventris</i> *	78
		<i>Turdus albicollis</i> *	78

\*preparação cromossômica já disponível para o estudo. \*\* fonte *Bird Chromosome Database*

Para a coleta das espécies serão realizadas missões a campo no parque Estadual de Vila Velha, localizado em Ponta Grossa/Paraná. A captura das espécies será realizada utilizando redes de neblina e todos os procedimentos de captura e coleta de amostras serão realizados conforme as regras estabelecidas na licença do SISBIO nº 44173-1 e no CEUA 019/2020. Durante estas missões, serão tomadas amostras de tecido/penas em crescimento para realizar o cultivo de fibroblastos e obter os cromossomos mitóticos.

Para a obtenção de cromossomos mitóticos, será realizado o cultivo de fibroblastos conforme Sasaki et al., (1968). Para cada espécime, será coletado uma biópsia de tecido, que será armazenada para transporte em meio de cultivo DMEM contendo antibióticos. No laboratório, esta biópsia será cortada em pedaços pequenos e transferida para um novo tubo contendo 3 ml de Colagenase tipo IV 1%, que será incubado por um tempo variável de 1 a 3 horas a 37°C. A suspensão celular obtida, será adicionada em garrafa de cultivo contendo 5 ml de meio de cultura suplementado com 20% de soro fetal bovino e antibióticos. Após as células serão incubadas a 37°C até obter-se um nível satisfatório de células em divisão. Ao final as células serão tratadas com Colchicina 0,05% por 1 hora, e os procedimentos de fixação das células serão realizados com solução hipotônica (KCl 0,75M) e metanol/ácido acético (3:1).

Para determinar o número diploide de cada espécie, serão produzidas lâminas em coloração convencional. Serão analisadas aproximadamente 40 metáfases em microscópio óptico, observando a morfologia e número de cromossomos. O cariótipo será montado ordenando os cromossomos em ordem decrescente de tamanho. O comprimento do braço curto, do braço longo e comprimento total de cada par de macrocromossomos serão estimados no *software* Image J. Estes valores serão utilizados para calcular o valor do índice centromérico (razão entre o braço curto e o comprimento

total do cromossomo) e determinar a morfologia dos cromossomos conforme método proposto por Guerra, (1986).

As sondas dos genes de histonas, produzidas na atividade 2 deste projeto, serão utilizadas para mapeamento cromossômico pela técnica de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). A marcação destas sondas será realizada através de uma reação de PCR, na qual o dUTP-Cy3, Biotina, ou fluoresceína são adicionados ao mix da PCR, e incorporadas ao DNA durante a síntese. Os procedimentos da FISH serão realizados de acordo com de Oliveira et al., (2005), como segue: As preparações cromossômicas serão fixadas no centro da lâmina e tratadas com solução de Pepsina 1% e RNase 10mg. Logo será realizado os procedimentos de desidratação em séries de etanol 70%, 90% e 100%. Após, as lâminas serão incubadas *over night* a 37°C em estufa. Para a hibridização os cromossomos serão desnaturados em Formamida 70% a 65°C. Logo será produzido o mix de hibridização contendo 1µl da sonda sintetizada em 14 µL de tampão de hibridização. A solução de hibridização será desnaturada a 75°C em Banho Maria, aplicada na lâmina e selada com lamínula para incubação em câmara úmida a 37°C por 24 horas. Após, as lâminas serão submetidas a uma série de lavagens em Formamida 50%, 2xSSC e 4xSSC Tween. Ao final será realizada a coloração dos cromossomos com 10µL de DAPI/antifade.

A análise das lâminas será feita em Microscópio de fluorescência. Em cada espécie, será observado o número de sítios cromossômicos marcados pela sonda, e também caracterizado a posição e localização do cromossomo portador no cariótipo. Quando a localização da sonda for em macrocromossomos, será possível determinar a homologia cromossômica com o cariótipo do *G. gallus*, utilizando os dados de pintura cromossômica comparativa, disponíveis no *Bird Chromosome Database*. Para caracterizar os rearranjos observados, serão realizadas análises comparativas ancoradas nas relações filogenéticas, proposta por Jarvis et al., (2014) e Prun et al., (2015).

#### **Atividade 4: Cooperação internacional para o sequenciamento do genoma das aves**

**Objetivo:** Criar um banco de amostras de DNA, e contribuir para o sequenciamento do genoma das aves por meio de uma cooperação internacional com o projeto B10K.

Este projeto também inclui um acordo de cooperação internacional para o sequenciamento do genoma das aves que foi previamente estabelecido com o professor Guojie Zhang da University of Copenhagen. Assim, o proponente deste projeto também irá fornecer suporte ao projeto B10K atuando na extração de DNA e preparo de amostras de diversas espécies de aves para o sequenciamento do genoma. Para isso será criado um banco de amostras de DNA de aves que incluirá todas as espécies de aves coletadas nas missões de campo em anos anteriores e também amostras que se encontram depositadas no Museu de História Natural Capão da Imbuia/Curitiba-Paraná. O DNA será extraído utilizando tampão salino de acordo com Aljanabi e Martinez, (1997). Após o DNA extraído será armazenado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e uma alíquota será enviada para o sequenciamento. Destaca-se ainda que o custeio para o sequenciamento do genoma será oriundo do projeto B10K.

#### **Originalidade e contribuição do projeto para a genética de aves**

O projeto apresenta vários aspectos inovadores, destacando-se a aplicação de bioinformática para análise de genes das histonas integrando genoma e citogenética. Ambas as metodologias visam elucidar questões ainda obscuras relacionadas a evolução cariotípica das aves, assim como suportar o entendimento amplo de rearranjos cromossômicos em vertebrados, possivelmente associados ao cluster das histonas no DNA e suas variantes.

Além disso, este projeto conta com uma iniciativa pioneira para criação de um banco de DNA para espécies de aves brasileiras, que irá fornecer suporte técnico tanto

para o desenvolvimento de pesquisas nacionais quanto internacionais, como por exemplo uma cooperação para o sequenciamento do genoma das aves que será realizada junto ao projeto B10K, fundamental para a conservação destes animais. É importante salientar que no Brasil ainda existe uma grande lacuna de pesquisadores capacitados em análises genômicas e de bioinformática. Assim a possibilidade de participar dessas ações cooperando internacionalmente oportunizará uma formação diferenciada ao proponente e a equipe envolvida, e colocará a genética de aves do Brasil em destaque no cenário mundial.

### **Resultados esperados**

Espera-se, com as análises do cluster das histonas no genoma das aves, contribuir para o entendimento evolutivo desta família multigênica e também encontrar evidências de outras funções que as histonas podem desempenhar na cromatina. Estes resultados serão importantes para desenvolver novas abordagens no futuro, como por exemplo, estudos de imunolocalização de variantes de histonas e análises de expressão em diferentes tecidos. Com a abordagem do mapeamento cromossômico do cluster das histonas, espera-se cobrir uma importante lacuna nos estudos cromossômico evolutivo das aves, visto que estes cluster não tem sido estudado no grupo e podem constituir um importante *hotspot* para rearranjos cromossômicos.

Com a criação do banco de DNA de aves brasileiras, são esperadas muitas oportunidades de cooperação, tanto pelo fornecimento de material quanto no apoio técnico científico. No Brasil esta demanda é crescente e visa também atender o ministério público e polícia ambiental no que se refere a genética forense de aves oriundas de caça e/ou contrabando. Além disso, esta atividade também é importante para o acordo de

cooperação internacional que objetiva o sequenciamento do genoma das aves, estabelecido com o professor Dr. Guojie Zhang.

Do ponto de vista da formação científica, espera-se que o pós-doutorando possa ampliar suas experiências profissionais integrando-se a novas ferramentas de pesquisa, como a genômica e assim melhorar consideravelmente a qualidade e o impacto das publicações em sua linha de pesquisa, dando continuidade à formação qualificada de recursos humanos na área.

### **Infraestrutura disponível no LabGEv-UEPG**

O Laboratório de Genética e evolução (LabGEv) da UEPG possui área de 150 m<sup>2</sup> distribuídos em seis ambientes cobertos por rede elétrica limpa com gerador elétrico de emergência e estabilizadores *nobreak*. Os principais equipamentos disponibilizados são: Microscópio confocal de varredura a laser Leica MDi8 TCS SP8; Microscópio de epifluorescência Olympus BX41 com câmera de captura DP71; Microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 com captura de imagem monocromática AxioCam MRm; Microscópio invertido com contraste de fase e epifluorescência Olympus IX 51-II equipado com micromanipulador Narishigui; Microscópio Esteroscópio Leica M205C motorizada com captura digital de alta resolução; 02 microscópios estereoscópios; 05 microscópios para análise de rotina; Ultrafreezer -80C com *back up* de CO<sub>2</sub>; 02 freezers -20C vertical; 02 refrigeradores; Sistema de água ultrapura; Balança eletrônica de precisão; pHmetro de bancada; Plataforma *shaker*; Forno de hibridação; 02 estufas bacteriológicas; Banho Maria com agitação; Estufa CO<sub>2</sub>; Termobloco para lâminas de hibridação; Estação para microarranjos de DNA; Estação para *western blot*; 04 termocicladores; Termociclador para PCR em Tempo Real; Espectrofotômetro; Transiluminador UV visível; Digitalizador de imagem ImageQuant; Eletroforese

microfluídica LabChip GXII Touch HT; Centrífuga refrigerada com vários rotores; Centrífuga para microtubos; duas capelas de fluxo laminar e equipamentos de rotina. Para o trabalho de Campo, o LabGEv conta com uma caminhonete S10 cabine dupla turbodiesel 4x4. Para as análises de bioinformática, conta com um HPC PARAM Shavak alimentado com duas CPUs multicore com 24 núcleos e 2 placas aceleradoras, capazes de desenvolver uma potência de 3 Tera-Flops com 8 TB de armazenamento, personalizado para análises genéticas.

### PLANO DE ATIVIDADES E CRONOGRAMA

Descrição da atividade	Mês											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Atividade 1:</b> Análise <i>in silico</i> de variantes histonas												
Triagem de seqüências de histonas anotadas	*	*	*	*	*	*						
Análises de bioinformática	*	*	*	*	*	*						
<b>Atividade 2:</b> Isolamento e construção das sondas das histonas												
Extração de DNA	*											
PCR dos genes de histonas	*											
Clonagem		*										
Sequenciamento dos genes de histonas			*									
<b>Atividade 3:</b> Mapeamento cromossômico da família multigênica das histonas												
Coleta das espécies	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cultivo Celular	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Análise do cariótipo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Síntese e marcação das sondas				*								
FISH				*								
Análise dos resultados				*	*							
<b>Atividade 4: Cooperação internacional para o sequenciamento do genoma das aves</b>												
Coleta das espécies	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Extração de DNA	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Envio das amostras para o sequenciamento						*	*					
Análise e tratamento dos resultados					*	*	*	*				
Adaptação de experimentos adicionais								*	*	*	*	
Redação de artigos científicos								*	*	*	*	
Outras colaborações científicas	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Submissão de artigos												*

## ACTIVITY PLAN AND SCHEDULE

Activity description	Month											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Activity 1:</b> <i>In silico</i> analysis of histone variants												
Screening of histones sequences in genome	*	*	*	*	*	*						
Bioinformatics analysis	*	*	*	*	*	*						
<b>Activity 2:</b> Isolation and construction of histone probes												
DNA extraction	*											
PCR of histone genes	*											
Cloning		*										
Sequencing of histone genes			*									
<b>Activity 3:</b> Chromosomal mapping of the multigenic histone family												
Species collection	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cell Culture	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Karyotype analysis	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Synthesis and labeling of probes				*								
FISH				*								
Analysis of results				*	*							
<b>Activity 4: International cooperation for bird genome sequencing</b>												
Species collection	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DNA extraction	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sending samples for sequencing						*	*					
Analysis and treatment of results					*	*	*	*	*			
Adaptation of additional experiments									*			
Writing scientific articles								*	*	*	*	
Other scientific collaborations	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Submission of articles												*

## Referências

- ALJANABI S, MARTINEZ I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692–4693.
- B10K <https://b10k.genomics.cn/index.html> acessado em 29 de setembro de 2019.
- BIRD CHROMOSOME DATABASE <https://sites.unipampa.edu.br/birdchromosomedatabase/>, acessado em 08 de janeiro de 2022.
- BUSTIN M, CATEZ F, LIM J-H. (2005). The dynamics of histone H1 function in chromatin. *Mol Cell*, 17:617–620.
- COLGAN D, MCLAUCHLAN A, WILSON G, LIVINGSTON S. (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust J Zool*, 46: 419–43.
- DE OLIVEIRA EHC, HABERMANN F, LACERDA O, SBALQUEIRO IJ, WIENBERG J, et al. (2005). Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotypes of the world's

- largest eagle (*Harpy eagle, Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). *Chromosoma*, 114: 338-343.
- DE OLIVEIRA EHC, TAGLIARINI MM, RISSINO JD, PIECZARKA JC, NAGAMACHI CY, et al. (2010). Reciprocal chromosome painting between white hawk (*Leucopternis albicollis*) and chicken reveals extensive fusions and fissions during karyotype evolution of Accipitridae (Aves, Falconiformes). *Chromosome Res*, 18: 349-355.
- DEGRANDI TM, BARCELOS SA, COSTA AL, GARNERO ADV, HASS I, et al. (2020a). Introducing the Bird Chromosome Database: an overview of cytogenetic studies on birds. *Cytogenet Genome Res*, 160(4):199-205.
- DEGRANDI TM, GARNERO ADV, O'BRIEN PCM, FERGUSON-SMITH MA, KRETSCHMER R, et al. (2017). Chromosome painting in *Trogon s. surrucura* (Aves, Trogoniformes) reveals a karyotype derived by chromosomal fissions, fusion, and inversions. *Cytogenetic and Genome Research*, 151: 208-215.
- DEGRANDI TM, GUNSKI RJ, GARNERO ADV, DE OLIVEIRA EHC, KRETSCHMER R, et al. (2020b). The distribution of 45S rDNA sites in bird chromosomes suggests multiple evolutionary histories. *Genet Mol Biol*, 43(2):e20180331.
- DOS SANTOS MD, KRETSCHMER R, SILVA FAO, LEDESMA MA, O' BRIEN PMC, et al. (2015). Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. *Genetica*, 143: 535-543.
- DRAIZEN EJ, SHAYTAN AK, MARIÑO-RAMÍREZ L, TALBERT PB, LANDSMAN D, PANCHENKO AR. (2016). Histone DB 2.0: a histone database with variants--an integrated resource to explore histones and their variants. *Database (Oxford)*. Mar 17; PMID: 26989147.
- GARNERO ADV, LEDESMA MA, GUNSKI RJ. (2006). Alta homeologia cariotípica na família Tinamidae (Aves: Tinamiformes). *Revista Brasileira de Ornitologia*, 14(1): 53-58.
- GRIFFIN DK, HABERMAN F, MASABANDA J, O'BRIEN P, BAGGA M, et al. (1999). Micro- and macrochromosome paints generated by flow cytometry and microdissection: tools for mapping the chicken genome. *Cytogenet Cell Genet*, 87: 278-281.
- GUERRA MS. (1986). Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Rev Bras Genet*, 9(4):741-743.
- HASHIMOTO DT, FERGUSON-SMITH MA, RENS W, FORESTI F, PORTO-FORESTI F. (2011). Chromosome mapping of H1 histone and 5S RNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei: Characiformes). *Cytogenet Genome Res*, 134: 64-71.
- HISTONE DB 2.0 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/HistoneDB2.0/> acessado em 08 de janeiro de 2022.
- JARVIS ED, MIRARAB S, ABERER AJ, LI B, HOUDE P, et al. (2014). Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346: 1320-1331.
- KOWALSKI A, PALYGA J. (2011). Chromatin compaction in terminally differentiated avian blood cells: the role of linker histone H5 and non-histone protein MENT. *Chromosome Research*, 19: 579-590.
- KRASIKOVA A, KHODYUCHENKO T, MASLOVA A, VASILEVSKAYA E. (2012). Three-dimensional organisation of RNA-processing machinery in avian growing oocyte nucleus. *Chromosome Res*, 20:979-994.
- KRETSCHMER R, GUNSKI RJ, GARNERO ADV, FURO IDO, O'BRIEN PCM, et al. (2014). Molecular cytogenetic characterization of multiple intrachromosomal

- rearrangements in two representatives of the genus *Turdus* (Turdidae, Passeriformes). PLoS ONE, 9: p.e103338.
- LUGER K, MADER AW, RICHMOND RK, SARGENT DF, RICHMOND TJ. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389:251–260.
- MARIÑO-RAMÍREZ L, KANN MG, SHOEMAKER BA, LANDSMAN D. (2005). Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics*, 2:719–29.
- MOLARO A, DRINNENBERG IA. (2028). Studying the Evolution of Histone Variants Using Phylogeny. *Methods Mol Biol*. 1832: 273-291.
- NEI M, ROONEY AP. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Ann Rev Genetics*, 39:121-152.
- NISHIDA-UMEHARA C, TSUDA Y, ISHIJIMA J, ANDO J, FUJIWARA A, et al. (2007). The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. *Chromosome Research*, 15: 721-734.
- ÖZTÜRK MA, COJOCARU V, WADE RC. (2018). Dependence of Chromatosome Structure on Linker Histone Sequence and Posttranslational Modification. *Biophysical Journal*, 114(10):2363-2375.
- PAUL B, TALBERT PB, HENIKOFF S. (2010). Histone variants — ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 264–275.
- PINEAU P, HENRY M, SUSPÈNE R, MARCHIO A, DETTAI A, et al. (2005). A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. *Mol Biol Evol*, 22: 582–588.
- PIONTKIVSKA H, ROONEY AP, NEI M. (2002). Purifying selection and birth-and-death evolution in the Histone H4 gene family. *Mol Biol Evol*, 19(5):689-697.
- PRUM RO, BERV JS, DORNBURG A, FIELD DJ, TOWNSEND JP, et al. (2015). A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526: 569–573.
- SASAKI M, IKEUCHI T, MAKINO S. (1968). A feather pulp culture technique for avian chromosomes, with notes on the chromosomes of the peafowl and the ostrich. *Experientia*, 24:1292-1293.
- SEVERO RV. (2018). Identificação de uma possível histona-linker em *Toxoplasma gondii*. Dissertação Instituto Carlos Chagas, 78p.
- SHAH, S.G., MANDLOI, T., KUNTE, P. et al. (2020). HISTome2: a database of histone proteins, modifiers for multiple organisms and epidrugs. *Epigenetics & Chromatin* 13, 31.
- STILLER J, ZHANG G. (2019). Comparative Phylogenomics, a Stepping Stone for Bird Biodiversity Studies. *Diversity*, 11: 115.
- TAKAMI Y, HIGASHIO M, FUKUOKA T, TAKECHI S, NAKAYAMA T. (1996). Organization of the Chicken Histone genes in a major gene cluster and generation of an almost complete set of the core Histone protein sequences. *DNA Research*, 3: 95-99.
- TALBERT PB, HENIKOFF S. (2010). Histone variants — ancient wrap artists of the epigenome. *Nature Reviews*, 11(4): 264–275.
- WANG Y, XIAO J, SUZEK TO, ZHANG J, WANG J, ZHOU Z, et al. (2012). PubChem's BioAssay Database. *Nucleic Acids Res*, 40: D400-12.