Relatório Final de Projeto de Pesquisa em Unidade de Conservação

Autorização 45/22

Projeto: Análise genômica e mapeamento cromossômico da família multigênica das histonas em aves
Autor: Dr. Tiago Marafiga Degrandi

Resumo: O cluster de genes de histonas pode ser considerado um dos principais elementos do genoma eucariótico, uma vez que as proteínas codificadas por estes genes constituem a unidade básica de compactação do DNA, nucleossomo. Os recentes avanços no conhecimento genômico em aves podem contribuir para a compreensão da arquitetura do cluster, distribuição cromossômica e evolução desses importantes elementos em diferentes espécies. Neste projeto, foi realizado uma extensa análise do cluster histonas em aves com genomas montados ao nível cromossômico. Ao todo, foram analisadas 127 espécies, representantes de 33 ordens e 75 famílias. Observamos que as aves no geral possuem um único cluster de histonas, porém, genes das histonas H1, H2A, H2B e H3, podem ser encontrados em cópias únicas ou combinadas, dispersas em diferentes cromossomos. A exceção da histona H4 que sempre esteve associada ao cluster e não apresentou nenhuma variante. Para a maioria das espécies, o cluster está localizado no cromossomo 1 e sua posição intracromossômica é variável. Estas mudanças na posição intracromossômica sugerem eventos de inversões, com pontos de quebra distintos. Além disso, em algumas espécies o cluster foi visto em cromossomos menores (2º ao 34º) e podem ser atribuídas a quebras cromossômicas que ocorreram no cromossomo 1 ancestral. Excepcionalmente, em duas espécies o cluster está localizado nos cromossomos Z e W, provavelmente originado por translocações com o cromossomo 1 ancestral. Estudos futuros podem agora considerar análises de expressão e compensação de dosagem, especialmente em machos (ZZ) e fêmeas (ZW) apresentam números de cópias gênicas distintos.

Atividades realizadas e resultados alcançados

Neste projeto, foi realizado a análise *in silico* da localização cromossômica do cluster de genes histonas (H1, H2A, H2B, H3 E H4) em aves. A inclusão no estudo foi restrita às espécies que possuíam genomas montados em nível cromossômico, disponíveis no National Center for Biotechnology Information (NCBI) até janeiro de 2024. Ao todo, foram analisadas 127 espécies, representantes de 33 ordens e 75 famílias (Figura 1). É importante destacar, que este foi o primeiro estudo a realizar uma ampla análise do cluster histonas em aves, o qual incluiu uma seleção de espécies que contempla quase que completamente a filogenia das aves.

Os resultados demonstram, que as aves no geral possuem um único cluster histonas onde são encontrados todos os 5 tipos de genes de histonas, incluindo suas variantes. No entanto, genes das histonas H1, H2A, H2B, H3 também foram encontrados fora do cluster, em cópias isoladas no genoma ou em combinações aleatórias, dispersas entre diferentes cromossomos. Para todas as espécies analisadas, foi observado que a histona H4 sempre esteve localizada no cluster e nenhuma variante foi encontrada.

A análise comparativa entre as espécies foi realizada considerando apenas o cluster, caracterizado por apresentar todos os genes de histonas no mesmo cromossomo. Foi observado que para a maioria das espécies este cluster está localizado no cromossomo 1 do cariótipo (37,01% dos casos). Embora também tenha sido observado em cromossomos menores, ranqueados entre o 2º (2,36% dos casos), como em *Pterocles gutturalis* (Pterocliformes) ao 34º cromossomo (0,79% dos casos) como em *Accipiter gentilis* (Accipitriformes). Além disso, em duas espécies, *Podargus strigoides* (Podargiformes) e *Poecile atricapillus* (Passeriformes), o cluster histonas está localizado em ambos cromossomos sexuais, Z e W.

A posição do cluster no cromossomo também foi analisada. Para isso, o cromossomo portador foi dividido em quatro regiões de igual tamanho, que chamamos de regiões A, B, C, D, permitindo assim realizar uma classificação qualitativa. Essas regiões foram delimitadas por linhas em traço no ideograma, e orientado no sentido 5'-3' (esquerda para direita) (Figura 1, 2, 3). A partir disso, foi observado que a posição do cluster é bastante variável, mesmo em espécies com uma estreita relação filogenética. Em Falconiformes por exemplo, a posição do cluster foi divergente entre as espécies do mesmo gênero. Por exemplo, em *Falco rusticolus*, *Falco biarmicus*, e *Falco peregrinus* o cluster encontra-se na região definida como B, enquanto que em *Falco cherrug, Falco naumanni,* e *Falco punctatus* encontra-se na posição região C. Por outro lado, em Anseriformes observou-se que o cluster localizado na região A, encontra-se conservado entre espécies de diferentes gêneros (*Anas platyrhynchos*, *Aythya baeri*, *Aythya fuligula*, *Nettapus auratus*, *Somateria molíssima*, *Stictonetta naevosa*, *Cygnus atratus*, e *Cygnus olor*). Em *Cairina moschata* (Anseriformes), os genes histonas, formam dois agrupamentos no cromossomo 1, que são espaçados entre sí por 0,56 megabases. Do mesmo modo em *Podargus strigoides* (Podargiformes), os cromossomos Z e W, apresentam dois agrupamentos igualmente separados por 2,5 megabases. E em *Sturnus vulgaris* (Passeriformes), foi observado que os genes histonas localizados no cromossomo 1A, formam dois agrupamentos espaçados por 14,71 megabases.

A análise comparativa entre os cromossomos portadores do cluster histonas, também permitiu identificar que as variações de cromossomos portadores e da localização cromossômica, são resultados de rearranjos cromossômicos como fissões, inversões e translocações. Além disso, nossos resultados demonstraram que o cluster histonas ocupa uma região altamente conservada no cromossomo 1, e que este cromossomo foi mantido inteiramente conservado entre diversas espécies de aves, enquanto em outras ocorreram

inversões e fissões cromossômicas, com pontos de quebras em diferentes regiões. Os resultados preliminares desta primeira etapa do projeto foram apresentados na VII Reunião Brasileira de Citogenética. Os dados completos foram utilizados para a elaboração do primeiro artigo científico que está sendo finalizado.

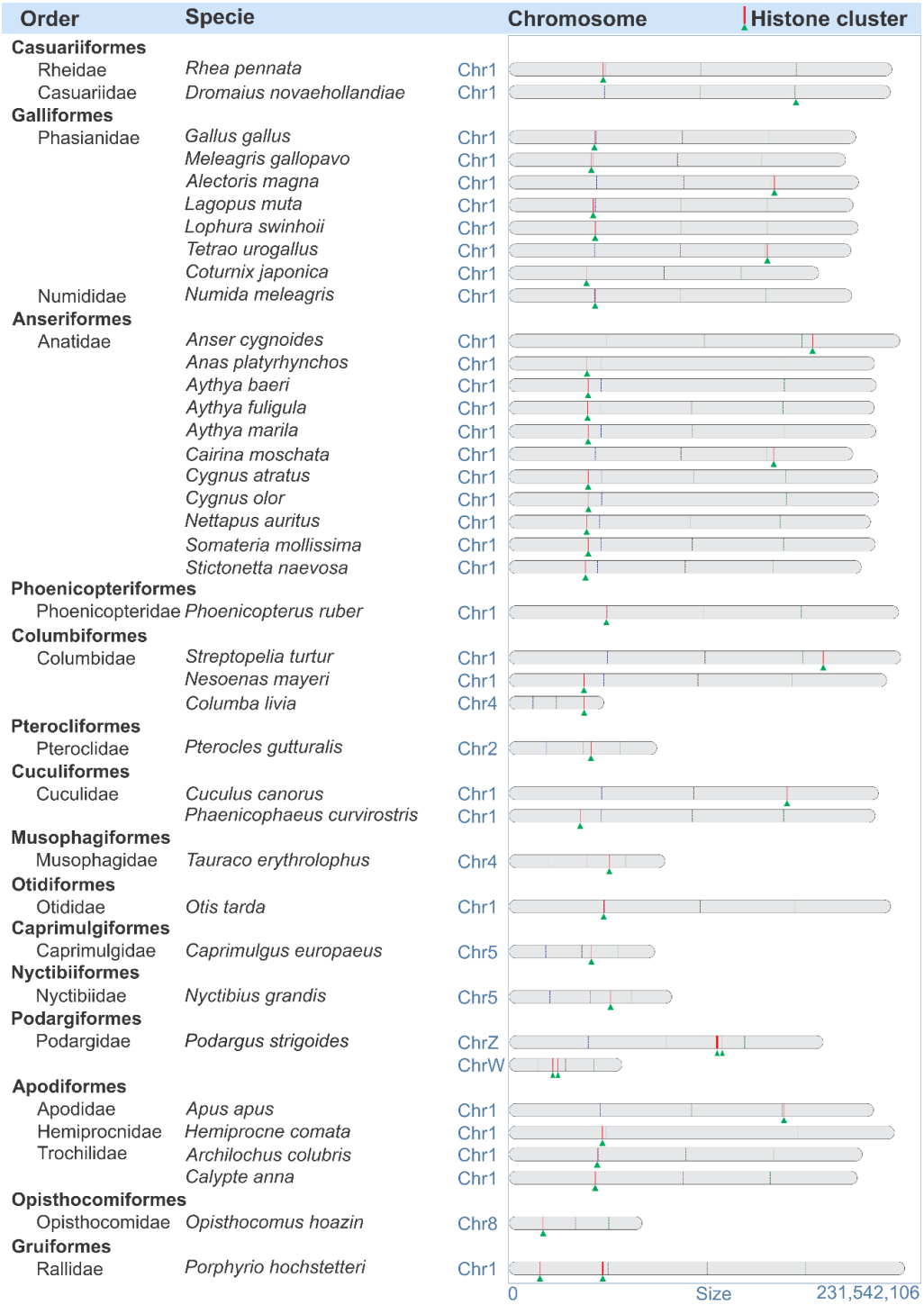

Figura 1: Localização cromossômica do cluster de histonas em aves (parte 1 de 3).

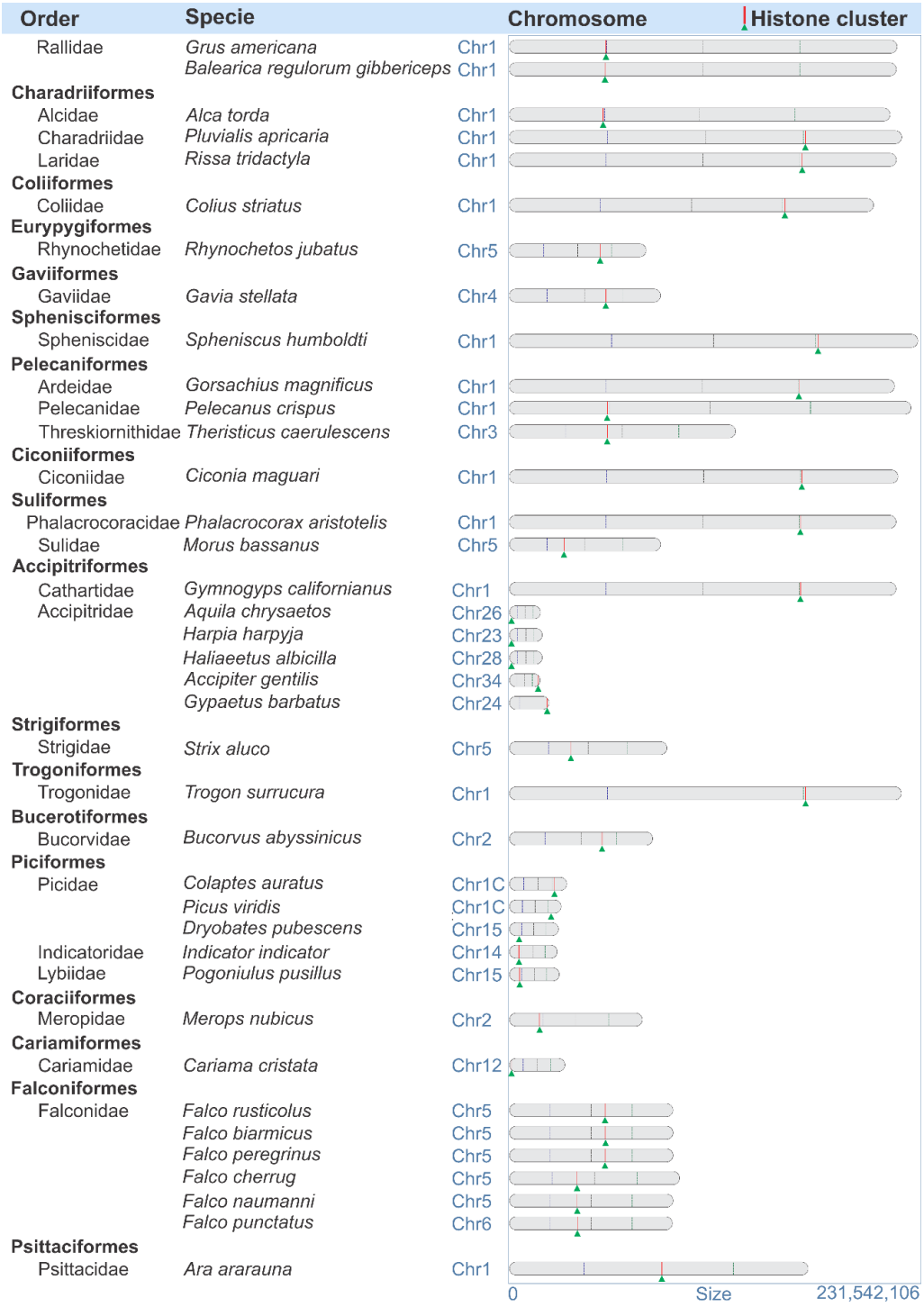

Figura 1: Localização cromossômica do cluster de histonas em aves (parte 2 de 3).

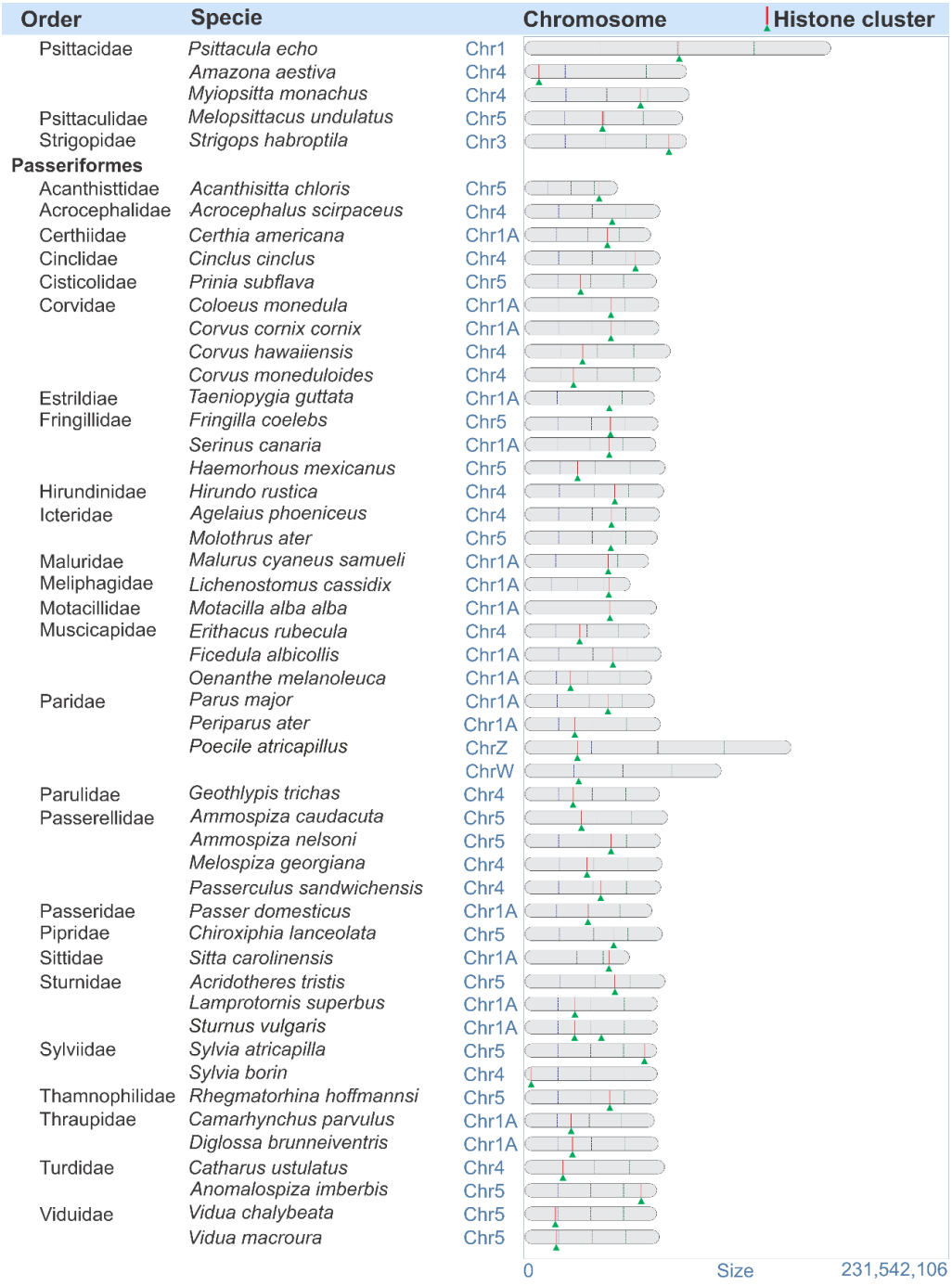

Figura 1: Localização cromossômica do cluster de histonas em aves (parte 3 de 3).

Neste projeto também foi realizado a produção de sondas de DNA específicas para os genes das histonas H1 e H4, em aves. Nesta etapa, o genoma da espécie *Gallus gallus* foi utilizado como molde. Para as reações de PCR foram selecionados, os primers H1 (5'-ATGGCAGAARYCGMCCAG-3'; 5'-TACTTCTTCTTGGGSGCTGC-3')

(HASHIMOTO et al., 2011), e H4 (5′-TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC-3', 5'-CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT-3') (PINEAU et al., 2005). A histona H1 produziu dois fragmentos, um com 100 pares de base e outro com 600 pares de base, aproximadamente. A sonda H4, amplificou um único fragmento com aproximadamente 200 pares de base.

Para realizar mapeamento *in situ* do cluster foi utilizado as sondas das histonas H1 e H4. As preparações cromossômicas de (Galliformes- *Gallus gallus, Meleagris gallopavo*), (Columbiformes- *Columbina picui*, *Columba livia*), (Caprimulgiformes- *Streptoprocne zonaris*), (Trogoniformes- *Trogon surrucura*), (Cuculiformes*, Guira guira*), (Piciformes- *Melanerpes candidus*), (Passeriformes- *Taeniopygia guttata*, *Schiffornis virescens*) foram selecionadas para realizar a técnica de FISH. Diferentes métodos de marcação das sondas foram utilizados, incluindo: marcação direta por PCR, com incorporação do dUTP-Cy3, método de marcação por Nick Translation utilizando kits para Biotina e Atto 550. Diversas adaptações técnicas também foram empregadas. No entanto não foram obtidos resultados das hibridizações, evidenciando que é necessário realizar adaptações na técnica de FISH para uso destas sondas. Esta etapa ainda continua em andamento mesmo o fim do projeto e continuaremos desenvolvendo o estudo.

Também avançamos para a criação de um banco de DNA de espécies de aves Brasileiras, atividade considerada importante para a colaboração com o projeto B10K, que visa sequenciar o genoma de todas as espécies de aves no mundo. Nesta fase do projeto, buscamos nos laboratórios associados a este projeto espécies com tecidos coletados, preservados em álcool e também amostras de espécies que vem sendo coletadas nas atividades de rotina de campo. Ao todo foram selecionadas amostras de 83 espécies e novas espécies ainda serão adicionadas a cada atividade de campo realizada.

Outras atividades realizadas

Além das atividades específicas do projeto de pesquisa, também foram desenvolvidas atividades relacionadas ao ensino, viabilizadas por meio do vínculo estabelecido com o programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da UEPG. Entre estas atividades, destacam-se, colaborações em disciplinas, coorientação de trabalhos de conclusão de curso de graduação, participação em eventos e bancas de defesa.

Disciplinas ministrada no Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva (PPGBioEvol)

- Disciplina "Fonte de Variabilidade". Carga horária 45 horas. Em colaboração com a professora Drª. Mara C.de Almeida (UEPG).
- Disciplina "Seminários em Biologia Evolutiva". Carga horária 45 horas. Em colaboração com o professor Dr. Paulo Roberto da Silva (UNICENTRO).

Coorientação de Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação em Ciências Biológicas

- Trabalhos de Conclusão de Curso da acadêmica Iasmin Ieteka. Título: Caracterização citogenética do Andorinhão de Coleira Branca (*Streptoprocne zonaris,* Apodidae). Orientador: Roberto Ferreira Artoni
- Trabalhos de Conclusão de Curso da acadêmica Letícia Nascimento. Título: Cultivo celular como método não-invasivo para obtenção de cromossomos mitóticos em peixes modelo. Orientador: Roberto Ferreira Artoni

Participação em bancas

- Participação em banca de Vanessa Isabel Batista De Morais. Título: o paradoxo da variação cariotípica em pequenas populações de peixes neotropicais: O modelo dos Rineloricaria (Siluriformes: Loricariidae). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

- Participação em banca de Jesús María Hernández Gómez. Título: Drive meiótico do cromossomo B em fêmeas de *Psalidodon scabripinnis* (Teleostei: Characidae). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa.
- Participação em banca de Hallana Cristina Menezes da Silva. Título: Caracterização do Transcriptoma de fígado do Tambaqui Amazônico (*Colossoma macropomum*) de cativeiro exposto ao antiparasitário Triclorfon. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.
- Participação em banca de Suziane Alves Barcellos. Título: Padrões de organização dos microcromossomos em espécies da Família Picidae e novo método de obtenção de cromossomos de aves. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa.

Participação em Eventos

- Participação na "7º Reunião Brasileira de Citogenética", organizada pela Sociedade Brasileira de Genética.
- Participação na "Mostra de Laboratório de Ensino em Ciências e Biologia 14ª Edição", organizada pela Universidade Estadual de Ponta Grossa.
- Participação no Curso de Extensão universitária "Capacitação em ética, cuidado e manejo de animais para pesquisa, ensino e extensão", organizado pela Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, Brasil.

Resumos publicados em congressos

- Degrandi, T. M.; Ieteka, I.; Gunski, R. J.; Garnero, A. V.; De Oliveira, E. H. C.; Artoni, R. F. Chromosomal mapping of the histone cluster in birds: A evolution not-so-parsimonious. VIIª Reunião Brasileira de Citogenética e Citogenômica, SBG, 2023.
- Ieteka, I.; Castro, Jonathan P.; Ferreira Junior, A. L.; Garnero, A. V.; Gunski, R. J.; Artoni, R. F.; Degrandi, T. M. Karyotype characterization of white-collared swift (*Streptoprocne zonaris*) and distribution of telomeric sequence and

ribosomal gene 5s and 18s. VIIª Reunião Brasileira de Citogenética e Citogenômica, SBG, 2023.

Artigos em fase de finalização

- *In silico* chromosomal mapping of the histone cluster in birds: A evolution not-so-parsimonious. Tiago Marafiga Degrandi, Ricardo José Gunski, Analía del Valle Garnero, Edivaldo Herculano Correia de Oliveira, Roberto Ferreira Artoni
- Chromosome evolution across whole vertebrates: The ancestral karyotypes and dynamics of chromosome rearrangements. Martin Knytl, Lívia do Vale Martins, Tiago Degrandi, Radka Symonová, Lukáš Kratochvíl
- Genética de Populações na prática. Tiago Marafiga Degrandi, Iasmin Ieteka, Mara Cristina de Almeida, Roberto Ferreira Artoni

Conclusão

Este foi o primeiro estudo a realizar uma ampla análise do cluster histonas em aves. O conjunto de espécies analisadas abrange praticamente toda a filogenia das aves, proporcionando uma visão detalhada das características estruturais do cluster dos genes histonas, da sua organização no genoma e da localização cromossômica. A preservação de um único cluster de histonas reforça uma característica ancestral do grupo e sua natureza monofilética. No entanto, apesar de muitas espécies manterem um único cluster, observaram-se rearranjos cromossômicos associados, como inversões, que podem ocorrer e modificar a posição cromossômica do cluster, mesmo em espécies com uma estreita relação filogenética. Além disso, eventos mais raros, como translocações, podem alterar a localização do cluster de autossomos para os cromossomos sexuais Z e W. Em tais casos específicos, estudos futuros devem considerar a compensação de dosagem, uma vez que machos (ZZ) e fêmeas (ZW) devem apresentar números diferentes de cópias gênicas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por apoiar esta pesquisa e pela bolsa de PDJ concedida;

A Universidade Estadual de Ponta Grossa, por todo apoio e estrutura disponibilizada para execução do projeto;

Ao Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, pela confiança, incentivo e por todos os ensinamentos que vão além de questões científicas.

Ao Prof. Dr. Ricardo José Gunski, a Profª. Drª Analía Del Valle Garnero e Prof. Dr. Edivaldo de Oliveira, pelos anos de amizade, por todos os ensinamentos, e principalmente pelo apoio nos projetos que desenvolvi desde o início da graduação.

A Prof. Drª. Mara Cristina de Almeida Matiello, pelas contribuições científicas, oportunidades de aprendizado acadêmico, incentivo e amizade.

Ao técnico de Laboratório Miguel Airton Carvalho, pelo suporte técnico, apoio nas atividades de campo, pela confiança e amizade que construímos;

Agradeço também a todos colegas de laboratório doutores, mestres e jovens pesquisadores do Laboratório de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa, do Grupo de Pesquisa em Diversidade Genética Animal da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) e do Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética

(SAMAM) do Instituto Evandro Chagas (IEC). Pessoas cujas parcerias profissionais estabelecidas proporcionaram boas vivências, troca de conhecimentos que enriquecem nossas vidas e formação.

Muito obrigado