

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MARCELO SANTOS DE SOUZA

**DISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS REPETITIVOS NO GENOMA DE NYCTIBIIDAE
E CAPRIMULGIDAE (AVES: CAPRIMULGIFORMES) E A EVOLUÇÃO DO
CROMOSSOMO W**

**São Gabriel
2018**

MARCELO SANTOS DE SOUZA

**DISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS REPETITIVOS NO GENOMA DE NYCTIBIIDAE
E CAPRIMULGIDAE (AVES: CAPRIMULGIFORMES) E A EVOLUÇÃO DO
CROMOSSOMO W**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Gunski

**São Gabriel
2018**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

S719d Souza, Marcelo Santos de
Distribuição de Elementos Repetitivos no Genoma de
Nyctibiidae e Caprimulgidae (Aves: Caprimulgiformes) e a
Evolução do Cromossomo W / Marcelo Santos de Souza.
56 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2018.

"Orientação: Ricardo José Gunski".

1. Citogenética. 2. Caprimulgiformes. 3. Cromossomo
W. 4. FISH. 5. Microssatélites. I. Título.

MARCELO SANTOS DE SOUZA

**DISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS REPETITIVOS NO GENOMA DE NYCTIBIIDAE
E CAPRIMULGIDAE (AVES: CAPRIMULGIFORMES) E A EVOLUÇÃO DO
CROMOSSOMO W**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: 04 abril, de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ricardo José Gunski
Orientador
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
(UEPG)

Prof. Dra. Analía Del Valle Garnero
(UNIPAMPA)

Á minha esposa Flávia e meu filho
Vinícius, meu amor eterno a vocês.

AGRADECIMENTO

Agradeço, em primeiro lugar, ao Pai Celestial e seu filho, o Salvador Jesus Cristo por minha existência e por saber que pela fé cheguei até aqui.

Agradeço por minha família, pelo amor de minha esposa Flávia e de meu filho Vinícius, por tudo que suportaram em meu apoio e o carinho que sempre demonstraram como uma fonte inesgotável, mesmo nos momentos mais difíceis de cansaço e desilusão. Serei eternamente grato a vocês pelos momentos de alegria e amor vividos em nosso lar.

Agradeço a minha mãe Clenir com todo meu amor, minha irmã Sabrina e meu cunhado Mário pela atenção, apoio, compreensão e incentivo em tantos momentos.

À memória de meu pai Valdemar Polini de Souza um grande exemplo de generosidade e compaixão, que com a sua firmeza sempre me incentivou aos estudos, sei que eu estaria lhe dando um grande presente. Saudade sempre.

Agradeço ao Prof. Ricardo primeiramente pela orientação e por incontáveis horas de conversas e trocas de ideias, fosse a campo, laboratório ou na estrada. Obrigado por toda compreensão em minhas questões profissionais, por acreditar na minha capacidade e sem dúvida pela amizade nutrida desde meu ingresso no DGA. De todo meu coração minha mais profunda gratidão.

À Prof.^a Analía por me apresentar o fascinante mundo da citogenética me aceitando na primeira vez que fui conversar e pedir para trabalhar no grupo. Obrigado por toda contribuição neste trabalho, seus conselhos sempre foram muito valiosos.

Obrigado minhas amigas e incentivadoras Suziane e Alice. Eu não tenho palavras para agradecer toda ajuda e amizade incondicional que vocês me proporcionaram durante todo esse tempo. O apoio de vocês foi uma alavanca para grandes decisões, principalmente para a conclusão desse trabalho. Sou grato a vocês também, pelos momentos de alegrias e desafios que compartilhamos, encorajando-nos mutuamente a seguirmos em busca de nossos sonhos. Os dias, por mais árduos sempre pareceram mais leves quando estávamos trabalhando juntos. Acho que “damos” tão certo por que compartilhamos uma riqueza: a importância de nossas famílias, tudo isso é por eles.

Ao Rafael pelo conhecimento que sempre dividiu comigo sem hesitar, por me ajudar em toda parte molecular dessa pesquisa, bem como na interpretação destes dados. Também pela amizade e pelos ponderados conselhos sobre essa pesquisa e outros trabalhos!

Aos colegas Tiago, Vanusa, Nairo, Jéssica, Cassiane, Êmila, Darlise, Lílian, Bruna, Fabiola, Vivi e Allan mesmo que por poucos momentos nos ocupadíssimos “dias do mestrado” no lab, pelos corredores, no RU ou em alguma cadeira... sempre foi bom encontra-los! Obrigado pela amizade, troca de conhecimentos e momentos de descontração.

Ao Prof. Edivaldo, Instituto Evandro Chagas e o Prof. Marcelo Cioffi pelas sondas microssatélites e as contribuições para esse trabalho.

Ao Prof. Fabiano pelas ideias, conselhos e incentivo durante esse tempo.

Ao Técnico Adriano de Paula por sua disposição incansável. Muito Obrigado!

A todos componentes do Grupo de Pesquisa Diversidade Genética Animal. E aos queridos colegas de “profissões” (professores) nas escolas Mondrian Fundamental e Dr. Fernando Abbott e da Santa Casa de Caridade (atendentes e técnicos de enfermagem).

E finalmente agradeço ao CHIMARRÃO - famoso mate “amargo”, meu companheiro de infindáveis horas (desde a graduação), graças a ti mesmo dormindo uma noite sim outra não, eu me mantive acordado durante as aulas e pude absorver o máximo de conhecimento que me era ofertado, chegando até aqui! Obrigado fiéis companheiros de mate, porque “matear” é bem melhor acompanhado!

*“Eu acredito na **intuição** e na **inspiração**. A **imaginação** é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado, enquanto a imaginação abraça o mundo [...]. Ela é, rigorosamente falando, um **fator real** na pesquisa científica.” [sem grifos no original]*

Albert Einstein

RESUMO

Recentemente a citogenética de aves tem apresentado grandes avanços com o advento de técnicas moleculares como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH). As aves possuem características evolutivas interessantes, principalmente pelo seu tamanho de genoma reduzido e cariótipo em formato bimodal. A ordem Caprimulgiformes é uma das menos conhecidas do ponto de vista citogenético. Nesse trabalho duas espécies de famílias distintas foram analisadas *Nyctibius griseus* (Nyctibiidae) e *Hydropsalis torquata* (Caprimulgidae), com $2n= 86$ e 74 cromossomos respectivamente. A citogenética clássica contribuiu para a identificação das regiões ricas em heterocromatina constitutiva, com o uso de bandeamento CBG nas duas espécies, apresentando grande acúmulo no cromossomo W em ambas e em alguns pares de microcromossomos de *N. griseus*. O bandeamento GTG estabeleceu o padrão de bandas positivas e negativas de *N. griseus*, reiterando as diferenças dos cromossomos Z e W desta espécie, um peculiar elemento deste cariótipo, que apresenta características diferentes de outras aves e até mesmo de *H. torquata* sendo homomórfico ao cromossomo Z. Utilizando técnicas moleculares de hibridização com sondas de sequências rDNA 18S foram encontrados sinais positivos em apenas um par de microcromossomos na mesma região onde também foi hibridizada a sonda $(CGG)_{10}$ em ambas espécies. Dentre as seguintes sequências repetitivas $(CA)_{15}$, $(CAA)_{10}$, $(CAC)_{10}$, $(CAG)_{10}$, $(CAT)_{10}$, $(CGG)_{10}$, $(GA)_{15}$, $(GAA)_{10}$, $(GAG)_{10}$, $(GC)_{15}$ e $(TA)_{15}$, somente $(CA)_{15}$ e $(TA)_{15}$ não hibridizaram no cromossomo W de *N. griseus*, em contraste, o W de *H. torquata* não apresentou nenhum sinal de hibridização. Em relação aos cromossomos autossômicos, *H. torquata* exibiu sinais de hibridização de quatro sequências repetitivas $(CA)_{15}$, $(CAC)_{10}$, $(CGG)_{10}$, e $(TA)_{15}$, todas em cromossomos autossômicos, ao passo que, em *N. griseus* somente as sequências $(CA)_{15}$, $(CAC)_{10}$ e $(CGG)_{10}$, hibridizaram, sendo todas elas em microcromossomos. Esses dados indicam que, no decorrer da história evolutiva desse grupo o genoma de *H. torquata* acumulou menos sequências microssatélites que o genoma de *N. griseus* diferenciando essas duas linhagens na ordem Caprimulgiformes. Por fim é possível inferir que o cromossomo W de *N. griseus* reagiu a pressões evolutivas utilizando mecanismos singulares que permitiram a obtenção de características que o difere do W de outras aves neognatas. Estes resultados revelam a importância deste tipo de sequência na

evolução e diferenciação do cromossomo sexual W.

Palavras-Chave: Aves, FISH, Citogenética, Microsatélites, Cromossomo W.

ABSTRACT

Recently, the avian cytogenetics has presented great advances with the advent of molecular techniques such as fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Birds have interesting evolutionary characteristics, mainly due to their reduced genome size and bimodal karyotype. The order Caprimulgiformes is one of less known from the cytogenetic point of view. In this work two species of distinct families were analyzed *Nyctibius griseus* (Nyctibiidae) and *Hydropsalis torquata* (Caprimulgidae), with $2n = 86$ and 74 chromosomes respectively. Classical cytogenetics contributed to the identification of the regions rich in constitutive heterochromatin with CBG banding in this two species, presenting large accumulation in the W chromosome in both and in some pairs of *N. griseus* microchromosomes. The GTG banding established the pattern of positive and negative bands in *N. griseus*, reiterating the differences of the Z and W chromosomes from this species, a peculiar element in its karyotype, which presents different characteristics from other birds and even from *H. torquata* being homomorphic to Z chromosome. Using *in situ* hybridization with 18S rDNA sequences probes, positive signals were found in only one pair of microchromosomes in the same region where the (CGG)₁₀ probe was also hybridized, thus both species present the same condition. Among the repetitive sequences (CA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, (CAG)₁₀, (CAT)₁₀, (CGG)₁₀, (GA)₁₅, (GAA)₁₀, (GAG)₁₀, (GC)₁₅ and (TA)₁₅, only (CA)₁₅ and (TA)₁₅ did not hybridize in the W chromosome of *N. griseus*, in contrast, the W of *H. torquata* has not present any signal of hybridization. Regarding to autosomal chromosomes, *H. torquata* showed signals of hybridization of four repetitive sequences (CA)₁₅, (CAC)₁₀, (CGG)₁₀, and (TA)₁₅, all on autosomal macrochromosomes, whereas in *N. griseus* only sequences (CA)₁₅, (CAC)₁₀ and (CGG)₁₀ hybridized, all of them in microchromosomes. These data indicate that during the evolutionary history of this group *H. torquata* genome accumulated less microsatellites sequences than the *N. griseus* genome, differentiating these two lineages in the order Caprimulgiformes. In conclusion, it is possible to infer that W

chromosome of *N. griseus* reacted to evolutionary pressures using unique mechanisms which allowed to obtain distinguishing features from the W of other neognathae birds. These results reveal the importance of this kind of sequence in the evolution and differentiation of the W sex chromosome.

Keywords: Aves, FISH, Cytogenetics, Microsatellite, W Chromosome

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Principais divisões de sequências de DNA repetitivas no genoma eucariótico, adaptado de Biscotti, Olmo e Heslop-Harrison, 2015.21

Figura 2- As mudanças no processo de recombinação do par cromossômico sexual das aves. As avestruzes representam os estágios iniciais da diferenciação do cromossomo sexual surgindo de um par ancestral de cromossomos sexuais, com recombinação (barras verdes) ocorrendo ao longo da maior parte dos cromossomos e apenas uma pequena deleção diferenciando o W do Z. Com a divergência de tinamídeos e avestruzes, a recombinação cessou (barras em preto) em uma porção maior dos cromossomos. Outras partes do cromossomo W foram eliminadas, embora a quantidade precisa varie entre as espécies de Tinamiformes. Z e W de aves neognatas só se recombinam em uma pequena região pseudo-autossômica restrita, com o W sofrendo uma redução significativa de seu tamanho se comparado ao Z. Adaptado de Mank e Ellegren, 2007.24

Figura 3 - Mapa mostrando a distribuição da ordem Caprimulgiformes. Fonte: Cooke e Bruce, (2011).....25

Figura 4 - Mapa de distribuição das Família Nyctibiidae e Caprimulgidae no continente Americano. Adaptado de Costa, (2014).....26

Figura 5 - Exemplos de Urutau (A) e Bacurau-tesoura (B). Fonte: arquivo pessoal de Jussara Gruber e Gustavo Gomes respectivamente.....27

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 6 - Mapa do Rio Grande do Sul evidenciando o local de coleta dos espécimes. Adaptado de Google Maps, (2018)32

RESULTADOS

Figura 7 - Metáfases, cariótipo parcial e banda CBG de uma fêmea da espécie *Nyctibius griseus* (A-C) e uma fêmea de *Hydropsalis torquata* (D-F). Cromossomos Z e W em detalhe.38

Figura 8 - Bandeamento GTG em metáfase de *N. griseus*, setas indicam os cromossomos sexuais que também estão em detalhe (A). Esquema de bandas nos cromossomos mostrando a diferença no padrão de Z e W (B).40

Figura 9: Metáfases hibridizadas com rDNA 18S em *N. griseus* (A) e *H. torquata* (B). A metáfase de *H. torquata* (B) apresenta o par de microcromossomos portador do sítio ribossomal em associação com apenas uma marcação entre os dois cromossomos.....41

| | |
|--|----|
| Figura 10 - Metáfases com hibridizações de 10 sondas microssatélites em <i>N. griseus</i> | 42 |
| Figura 11 - Esquema com a localização hipotética das sondas que mostraram sinais positivos no cromossomo W de <i>N. griseus</i> | 43 |
| Figura 12 - Metáfases com hibridizações de quatro sondas microssatélites em <i>H. torquata</i> | 44 |

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Número diplóide ($2n$) e morfologia dos macrocromossomos e cromossomos sexuais das espécies de Caprimulgiformes estudadas citogeneticamente. M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, T = telocêntrico, A = acrocêntrico. Adaptado de Nieto et al. 2012.....29

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 2 - Informações sobre os espécimes, número de exemplares e local de coleta.....32

RESULTADOS

Tabela 3 - Morfologia dos 14 maiores pares cromossômicos de *N. griseus* e *H. torquata*. AR= arm ratio/relação do braço, IC= Centromeric Index/Índice Centromérico.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - micrograma

µl - microlitro

°C - Celsius

2n - Número diplóide

a - Acrocêntrico

A-T - adenina (A) e timina (T)

Ba(OH)₂ - Hidróxido de bário

CBG - C-bands using barium hydroxide and Giemsa

CBRO - Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

C-G - citosina (C) e guanina (G)

CI - Índice Centromérico

cm - centímetro

Cy3 - Cianina 3

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

FISH - Fluorescence *in situ* hybridization

Gb - Gigabytes

GTG - G-bands using Trypsin and Giemsa

HBSS - Hank's Balanced Salt Solution

HCl - ácido clorídrico

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IUCN - International Union for Conservation of Nature

KCl - Cloreto de potássio

m - Metacêntrico

ml - mililitro

NF - Número fundamental

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pH - Potencial Hidrogeniônico

rDNA - DNA ribossômico

RPM - rotação por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute Medium

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

sm - Submetacêntrico

st - Subtelocêntrico

SSC - Solução Salina de Citrato de Sódio

SSRs - Repetições de Sequências Simples

t - Telocêntrico

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 Classe Aves e a Citogenética | 18 |
| 1.2 O genoma das aves e as sequências repetitivas..... | 19 |
| 1.3 Cromossomos sexuais em aves: origem e evolução | 22 |
| 1.4 Características da ordem caprimulgiformes..... | 25 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 30 |
| 3 OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 31 |
| 3.2 Objetivos específicos | 31 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 4.1 Coleta de espécimes | 32 |
| 4.2 Preparações cromossômicas..... | 32 |
| 4.3 Citogenética clássica | 34 |
| 4.4 Preparação das sondas..... | 36 |
| 4.5 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)..... | 36 |
| 5 RESULTADOS | 37 |
| 6 DISCUSSÃO | 45 |
| 6.1 Experimentos de FISH..... | 46 |
| 6.2 O Cromossomo W de <i>N. griseus</i> | 47 |
| 7 CONCLUSÃO | 50 |
| REFERÊNCIAS | 51 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Classe Aves e a Citogenética

Do ponto de vista biológico as aves são geralmente vistas como um grupo bem estudado, estimando-se que mais de 95% da diversidade universal de espécies já foi descrita. Admite-se hoje cerca de 10.000 espécies de aves no mundo. Estudos recentes que consideram o “conceito biológico de espécie” obsoleto, sugerem que esse número pode ser quase o dobro do atual (BARROWCLOUGH et al., 2016), contudo dados como esses ainda são pouco aceitos no meio científico. É fato, portanto, que esse é um grupo monofilético, com distribuição por toda a esfera global e que ocupa inumeráveis ambientes sejam terrestres ou aquáticos.

A América do Sul abriga a maior diversidade reconhecida de aves, cerca de 2.700 espécies residentes e 300 migratórias. Em nosso país a diversidade de espécies de aves é uma das mais ricas no mundo, de acordo com a última lista do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO) são 1.919 espécies com distribuição no território nacional (PIACENTINI et al., 2015), todavia esse número ainda aumentará pelas constantes pesquisas realizadas nessa área.

Infelizmente muitas espécies de aves brasileiras estão ameaçadas de extinção devido a diversos fatores, porém pode se listar como principais a perda do habitat, a caça predatória e o tráfico ilegal. O desmatamento desenfreado, as grandes construções em ambientes frágeis e a monocultura extensiva acabam diminuindo as áreas de alimentação e reprodução, além de expô-las a possíveis predadores (BRASIL, 2017) desencadeando inestimáveis perdas para o meio ambiente.

O conhecimento da biologia básica das aves é ainda incompleto no que se refere a sua genética e evolução (PIGOZZI, 1999). Assim é fundamental a conservação da avifauna, já que também são pouco conhecidas as características citogenéticas desse grupo. A caracterização cromossômica desses animais pode representar uma importante ferramenta para planos de conservação, fornecendo valiosas informações cladísticas sobre a filogenia e evolução dessa classe (DE OLIVEIRA et al., 2006).

O complemento cromossômico das aves apresenta algumas características peculiares, tais como um alto número cromossômico, em média $2n=80$ e um formato bimodal, ou seja, um cariótipo com dois grupos cromossômicos definidos:

macrocromossomos e microcromossomos (TEGELSTRÖM; RYTTMAN, 1981; SANTOS; GUNSKI, 2006).

Com o desenvolvimento de estudos citogenéticos nas aves já foram registrados números cromossômicos que variam de $2n=40$ para *Falco columbarius* à $2n=136-142$ para *Corythaixoides concolor* (CHRISTIDIS, 1990; NISHIDA et al., 2008). Assim, a citogenética de aves demonstra como o material genético pode ser versátil e dinâmico entre espécie.

1.2 O Genoma das Aves e as Sequências Repetitivas

A evolução do genoma das Aves levou a redução sistemática de seu conteúdo, dados indicam que o tamanho desse genoma é extremamente pequeno se comparado com outros grupos como os répteis e mamíferos (TIERSCH; WACHTEL, 1991; GREGORY et al., 2006; HUGHES; FRIEDMAN, 2008). De acordo com Kapusta e Suh (2016), o tamanho do genoma das aves pode variar de 0,89 Gb a 2,11 Gb, enquanto que em mamíferos essa variação pode ir de 1,59 Gb a 8,22 Gb, ou seja, o maior genoma descrito para uma ave tem apenas 25% mais conteúdo que o menor genoma relatado para um mamífero. No entanto, a partir dessa redução, o referido genoma se mostra conservado em todo o grupo havendo poucas variações no que se refere a tamanho (STEVENS, 1997).

Observou-se que a redução não ocorreu somente no material genético das aves, há estudos que indicam que o tamanho geral das células destes animais também é reduzido em relação às células dos mamíferos (ZHANG; EDWARDS, 2012; WRIGHT; GREGORY; WITT, 2014). Dessa forma, o tamanho reduzido das células e genoma das aves é uma adaptação às altas taxas oxidativas do metabolismo desses animais, exigência gerada principalmente pela demanda de voo, pois as aves que não apresentam a característica do voo têm genomas maiores do que as que apresentam essa característica (HUGHES; HUGHES, 1995; VENTON, 2012).

Desse modo, esse reduzido genoma é motivado principalmente à custa de perda de elementos repetitivos. Deleções de grandes segmentos e até mesmo, perda de genes inteiros são alguns dos eventos relatados no genoma das aves, sendo considerados como algumas das consequências dessa redução (SCHMID; BURT; NAZIONALE, 2000).

Os resultados de sequenciamento de representantes de outros Amniotas quando confrontado com o sequenciamento de 48 espécies de aves, abrangendo espécimes de toda a filogenia dessa classe, mostrou que a quantidade de sequências repetitivas nesse grupo é bem menor que em mamíferos e répteis. A eliminação desse material torna o genoma das aves distinto de outros genomas do grupo dos tetrápodes, sendo que as aves possuem apenas cerca de 4 a 10% de sequências repetitivas em todo seu genoma, um número extremamente intrigante se comparados com a quantidade destas sequências em mamíferos, podendo chegar até 52% do genoma (SCHMID et al., 2000; HUGHES; PIONTKIVSKA, 2005; KOEPFLI et al., 2015).

No entanto, existem casos como o de *Picooides pubescens* (Piciformes), que apresenta cerca de 22% dessas sequências em seu genoma (ZHANG et al., 2014), o que é um valor significativamente alto se comparado com outras aves. No mesmo sentido a hibridização com sondas de diversas sequências microssatélites em três espécies da família Picidae mostrou também um relevante acúmulo nesses genomas (DE OLIVEIRA et al., 2017), assim esse grupo parece ser uma exceção dentro da classe Aves.

As sequências repetitivas são responsáveis por causar variações genéticas entre espécies e até mesmo em indivíduos de uma mesma população, além de contribuir com diferentes funções no genoma, porém chama atenção suas funções na diferenciação de cromossomos sexuais (CIOFFI et al., 2010; POKORNÁ; KRATOCHVÍL; KEJNOVSKÝ, 2011; YANO et al., 2014).

No entanto, apesar de ser pequena a quantidade de elementos repetitivos em aves, as sequências como os microssatélites mostram-se muito importantes na evolução deste grupo. Muitos rearranjos cromossômicos podem estar envolvidos com a presença delas, sendo possíveis responsáveis por deleções, duplicações, inversões e translocações, sendo assim, responsabilizadas por algumas alterações cariotípicas observadas em vários *taxa* (KIDWELL, 2002).

As sequências repetitivas apresentam-se copiadas centenas ou milhares de vezes no genoma nuclear, são uma parte abundante de todos os genomas eucarióticos, em algumas espécies podem representar mais da metade do conteúdo total do DNA genômico (BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015). Os DNAs repetitivos são compostos geralmente por elementos não codificantes no genoma, porém também é possível encontrar entre essa classe de elementos aqueles que

possuem seqüências funcionais. Além de microssatélites fazem parte do grupo de DNAs repetitivos os elementos transponíveis, famílias multigênicas, satélites e minissatélites (Figura 1) (JURKA et al., 2005; BERTOCCHI et al., 2017.).

As famílias multigênicas são genes com alta similaridade estrutural e funcional que dentre outros são responsáveis pelos genes de RNA ribossômico (rRNA) atuando na formação da estrutura básica das subunidades maior e menor dos ribossomos, possuindo assim, importância estrutural e catalítica nas células (MARTINS et al., 2007). Os genes de rRNA em vertebrados superiores são organizados em *tandem* e constituídos por duas famílias gênicas, denominadas 45S DNA ribossômico (45S rDNA) e 5S DNA ribossômico (5s rDNA). A família 45S rDNA contém genes que codificam 18S, 5S, 8S, e 28S rRNA, enquanto a segunda família codifica apenas 5S rRNA (MARTINS et al., 2010).

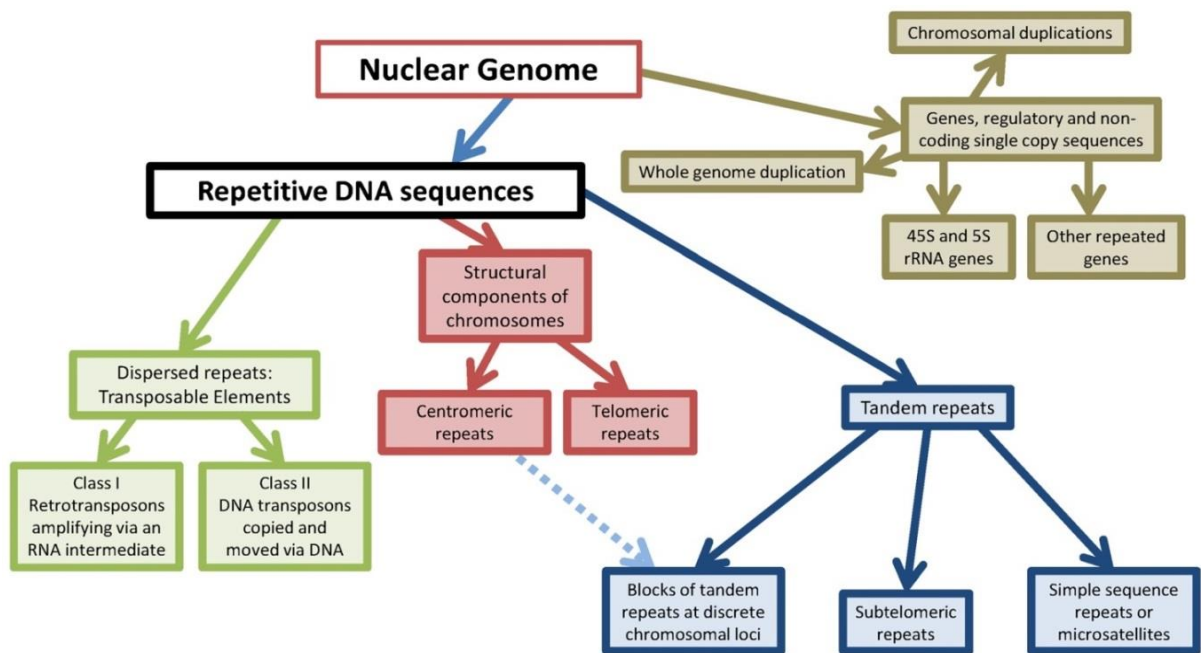


Figura 1 - Principais divisões de seqüências de DNA repetitivas no genoma eucariótico, adaptado de Biscotti, Olmo e Heslop-Harrison, 2015.

Com cerca de 100 a 300 pares de bases, os DNAs satélites são seqüências nucleotídicas diversificadas e altamente repetidas. São organizadas em *tandem* e variam no número de cópias nos genomas que estão presentes. Essas seqüências estão organizadas principalmente nas regiões pericentroméricas e teloméricas dos cromossomos, sendo estas a principal composição da heterocromatina (MARTINS, 2007). Os minissatélites são repetições com cerca de 10 – 100 pares de bases agrupadas geralmente próximos às regiões teloméricas.

Há relatos que esses elementos poderiam influenciar a diferenciação dos cromossomos sexuais deste e de outros grupos como peixes e répteis (MATSUBARA et al., 2016, DE OLIVEIRA FURO et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2017).

Por fim, microssatélites ou repetições de sequências simples (SSRs) são uma classe de elementos repetitivos de pequenas sequências (de 1 a 6 pares de bases) repetidos em *tandem* e espalhados pelo genoma (ELLEGREN, 2004), podendo apresentar-se associadas à heterocromatina ou em regiões eucromáticas (MARTINS, 2007). Pode-se elencar como um exemplo destas sequências os telômeros, pois estão dispostos como uma sequência simples de DNA repetida em *tandem*. Através da utilização de sondas marcadas, foram identificados telômeros contendo a sequência (TTAGGG)_n em representantes de diversos clados do grupo das aves, desde paleognatas até neognatas. Em algumas aves, esta sequência não foi encontrada apenas nos telômeros, como em *Rhea americana* (Ema) e *Gallus gallus* (Galinha doméstica) entre outras, onde marcações intersticiais se apresentaram em vários cromossomos (NANDA et al., 2002), dado que pode denotar rearranjos intracromossômicos como inversões.

1.3 Cromossomos sexuais em Aves: origem e evolução

As aves possuem o sistema de determinação sexual tipo ZZ/ZW, onde os machos portam o par de cromossomos homomórficos ZZ, e as fêmeas o par de cromossomos heteromórficos ZW. Esse sistema sexual que evoluiu de um par de cromossomos autossômicos homólogos, possivelmente à cerca de 60–100 milhões de anos, surgindo de um evento independente e específico para o genoma desse grupo (FRIDOLFSSON et al., 1998; OHNO, 2013). Esses cromossomos teriam se diferenciado a partir da fixação do gene *dmrt1*, ou seja, gene ancestral de determinação do sexo nas aves tornando-se o par de cromossomos proto-sexuais (VICOSO;KAISER;BACHTROG,2013).

Os cromossomos sexuais são reconhecidos por alguns aspectos peculiares, que incluem a recombinação meiótica reduzida entre Z e W. E a supressão da recombinação em torno da região heteróloga para preservar a ligação dos genes sexualmente incompatíveis (MATSUBARA et al., 2016; ABBOTT et al., 2017), pode explicar a falta de recombinação entre esses cromossomos nas aves

(CHARLESWORTH et al., 2005). Assim a diferenciação do sistema sexual nas aves passou por vários eventos evolutivos que permitiram o acúmulo de mutações gênicas no cromossomo sexual específico, levando a numerosas deleções de genes funcionais inativados e concomitante acúmulo de DNA repetitivo (CHARLESWORTH; CHARLESWORTH, 2000; MATSUBARA, 2006).

A hipótese de que o surgimento do par sexual ZW em aves se deu a partir de um par de autossomos homólogos foi ratificada com a hibridização de sondas do cromossomo Z de *Gallus gallus*, em metáfases de *Dromaius novaehollandiae* (Casuariiformes), onde demonstraram que ambos cromossomos (ZW) produziram sinais positivos de hibridização, sendo que apenas uma pequena região próxima ao centrômero do cromossomo W não produziu sinal de hibridização, o que confirma a alta homologia desse par (SHETTY; GRIFFIN; GRAVES, 1999).

As aves paleognatas do grupo das ratitas são consideradas basais para o grupo. Possuem o par sexual ZW idênticos morfologicamente e sem presença de heterocromatina constitutiva detectável (GUNSKI; GIANNONI, 1998; STIGLEC; EZAZ; GRAVES, 2007). Aves mais derivadas conhecidas como neognatas apresentam, geralmente diferenças significativas de tamanho e morfologia entre os cromossomos sexuais ZW (GUNSKI et al., 2000; STIGLEC; EZAZ; GRAVES, 2007; CORREIA et al., 2009). Ratificando os diferentes estágios de evolução dos cromossomos sexuais (ZHOU et al., 2014).

O cromossomo Z é altamente conservado ao longo de toda linhagem das aves (NANDA; SCHMID, 2002; BERLIN; ELLEGREN, 2006), é provável que os antepassados de todas as aves modernas possuíssem um cromossomo proto-Z que foi transmitido por linhagem para palaeognatas e neognatas (MATSUBARA et al., 2006; MANK; ELLEGREN, 2007). Este cromossomo apresenta-se geralmente com tamanho que equivale ao quarto ou quinto par de macrocromossomos, contudo, sua morfologia varia possivelmente devido a rearranjos intracromossomais que são comuns para esse componente do genoma (NANDA; SCHMID, 2002).

O cromossomo W é bem menos conservado por ter passado por elevada pressão evolutiva, tornando-se degenerado e altamente heterocromático, principalmente nas neognatas. Possui, no entanto, um número substancial de genes ativos em sua estrutura (NANDA; SCHMID, 2002; ZHOU et al., 2014). No tocante a

morfologia do cromossomo W, pode-se relatar uma alta variabilidade inclusive no tamanho, entretanto esse elemento geralmente apresenta-se menor que o cromossomo Z (SCHMID et al., 2005; STIGLEC; EZAZ; GRAVES, 2007).

Em suma, podemos elencar o processo evolutivo dos cromossomos sexuais das aves em três fases distintas (Figura 2): um grande e indiferenciado par cromossômico como em Avestruzes e Emus, passando por um distinto par de

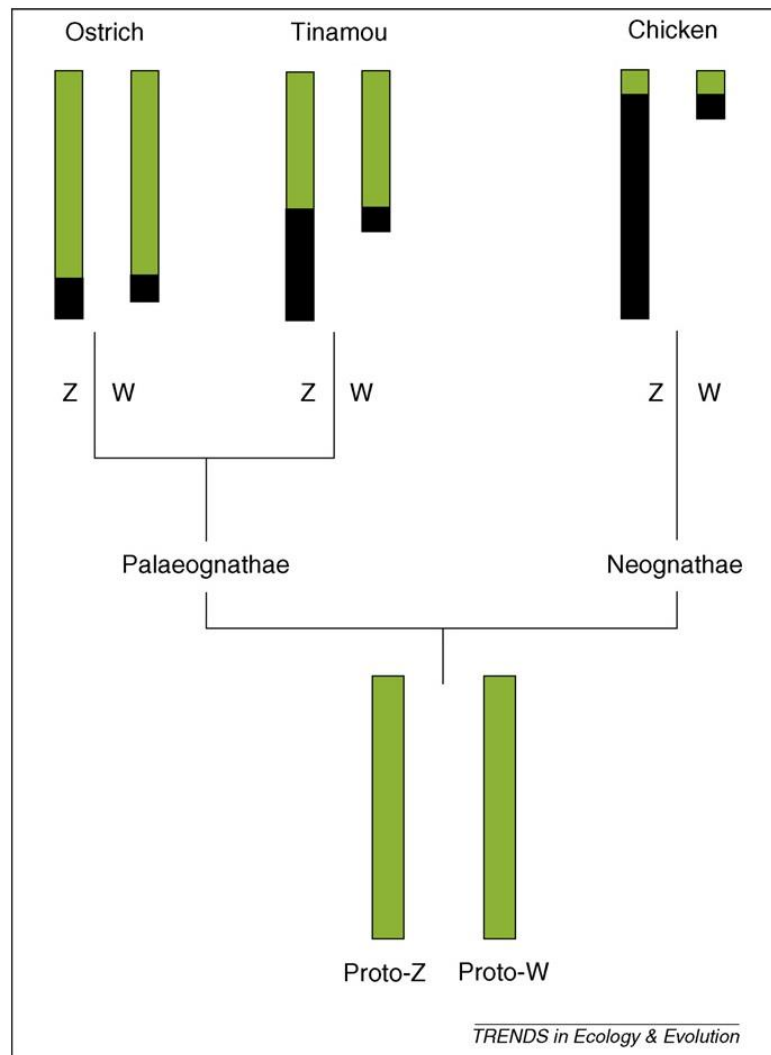


Figura 2- As mudanças no processo de recombinação do par cromossômico sexual das aves. As avestruzes representam os estágios iniciais da diferenciação do cromossomo sexual surgindo de um par ancestral de cromossomos sexuais, com recombinação (barras verdes) ocorrendo ao longo da maior parte dos cromossomos e apenas uma pequena deleção diferenciando o W do Z. Com a divergência de tinamídeos e avestruzes, a recombinação cessou (barras em preto) em uma porção maior dos cromossomos. Outras partes do cromossomo W foram eliminadas, embora a quantidade precisa varie entre as espécies de Tinamiformes. Z e W de aves neognatas só se recombinam em uma pequena região pseudo-autossômica restrita, com o W sofrendo uma redução significativa de seu tamanho se comparado ao Z. Adaptado de Mank e Ellegren, 2007.

cromossomos sexuais intermediários nos Tinamiformes até os terminais pares de cromossomos ZW das aves neognatas que se recombina apenas em uma pequena porção da região pseudo-autossômica altamente restrita (MANK; ELLEGREN, 2007).

1.4 Características da Ordem Caprimulgiformes

Caprimulgiformes é uma ordem de aves neognatas que estão representados em todos os continentes (Figura 3), exceto nas regiões polares, na Nova Zelândia e maioria das ilhas oceânicas. Essa ordem é tradicionalmente composta pelas famílias Nyctibiidae, Steatornithidae, Caprimulgidae, Aegothelidae e Podargidae (COSTA, 2014), das quais possuem distribuição mais limitada. A maior diversidade do grupo encontra-se em regiões tropicais e semi-tropicais.

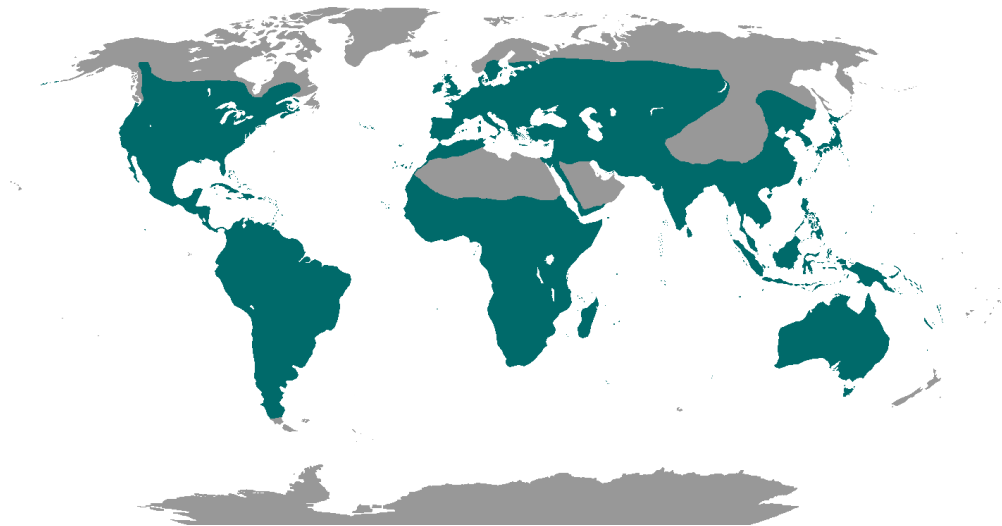


Figura 3 - Mapa mostrando a distribuição da ordem Caprimulgiformes. Fonte: Cooke e Bruce, (2011).

O nome da ordem é oriundo do latim *caprimulgus* que significa “sugador” de leite de cabras, esse nome deriva de mitos da Europa medieval onde se acreditava que esses animais alimentavam-se do leite das cabras no período noturno, ou seja, é um termo que sugere uma ideia errônea a respeito dos seus hábitos alimentares.

Os Caprimulgiformes são aves de hábitos crepusculares e noturnos, possuem bico pequeno que se abre em uma boca muito larga, apresentam olhos grandes e adaptados à visão com pouca luz. Possuem tarsos muito curtos sendo as patas e pés pequenos e aparentemente frágeis. As asas são relativamente grandes e alongadas e adaptadas a um voo rápido, porém silencioso. A cauda tem comprimento médio a longo, que varia conforme a espécie. Sua plumagem é macia e

frouxa, bastante diversa dentro do grupo, no entanto é normalmente escura com padrões de coloração críptica (MAYR, 2002), o que proporciona uma extraordinária camuflagem durante o período diurno.

Nyctibiidae é uma pequena, porém distinta família membro da ordem Caprimulgiformes, suas espécies são conhecidos como Urutau ou Mãe-da-lua. Essa família é endêmica da região neotropical das Américas que ocorre na maioria das áreas de floresta úmida se estendendo desde o México até o sul do Brasil e norte da Argentina (Figura 4-A). Seus hábitos crípticos os tornam extremamente difíceis de estudar, conseqüentemente, os nictibídeos estão entre os menos conhecidos de todos os pássaros. Sua plumagem mimética, sempre mais escura na região dorsal, permite a estas aves passarem totalmente despercebidas quando descansam à luz do dia empoleirada em postura vertical (SIGRIST, 2013). Os Urutaus não descem ao solo, pousam geralmente na ponta de troncos mortos, parecendo um prolongamento do local onde estão pousados, ou também em posição transversal a galhos mais grossos (STRAUB, 2004).

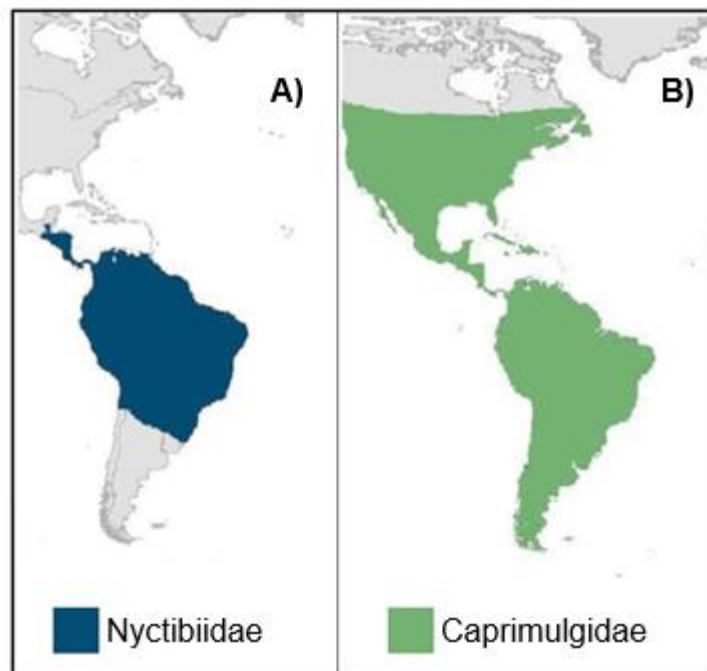


Figura 4 - Mapa de distribuição das Famílias Nyctibiidae e Caprimulgidae no continente Americano. Adaptado de Costa, (2014).

Das espécies que ocorrem no Brasil, a mais comum é o *Nyctibius griseus*, seu ambiente perpassa tanto pelas florestas densas quanto nas bordas de mata, capoeiras e até mesmo em árvores isoladas das grandes cidades.

Esses animais têm o hábito peculiar de se alimentarem em pleno voo capturando grandes insetos noturnos, porém podem comer outros animais de pequeno porte, como morcegos, lagartos e pequenos pássaros.

Na ordem Caprimulgiformes a família Caprimulgidae é a mais diversificada, reúne aves noturnas de características morfológicas uniformes, são popularmente conhecidos por Bacuraus, Curiangos ou Dorminhocos. Essas aves ocorrem em todos os continentes, exceto nas regiões mais frias do globo (Figura 3 e 4-B), e nos mais variados habitats: desde áreas de floresta a desertos semi-áridos, de altas altitudes até o nível do mar. Como os Urutaus, apresentam hábitos crepusculares e noturnos e são ativos principalmente em noites de lua cheia (COSTA, 2014) .

Todas as espécies que compõem a família Caprimulgidae apresentam hábitos alimentares estritamente insetívoros, forrageando em voo. Durante o forrageamento, podem capturar insetos por meio de voos constantes ou também em voos curtos a partir do chão ou de galhos, para onde retornam após capturar a presa (MAYR, 2002; COSTA, 2014).

Dentre aproximadamente 120 espécies que compõem a ordem Caprimulgiformes (SCHWARTZ, 2008), até o momento foram caracterizadas citogeneticamente apenas 10 espécies (Tabela 1) (FRANCISCO et al., 2006; NIETO et al., 2012), não havendo dados de citogenética molecular para nenhuma espécie dessa ordem, elencando este grupo como um dos menos conhecidos para a citogenética.

Para esse trabalho foram utilizadas as espécies *Nyctibius griseus* – Urutau e *Hydropsalis torquata* – Bacurau-tesoura (Figura 5- A e B respectivamente), por serem representantes com ampla distribuição e encontrarem-se em um estado pouco

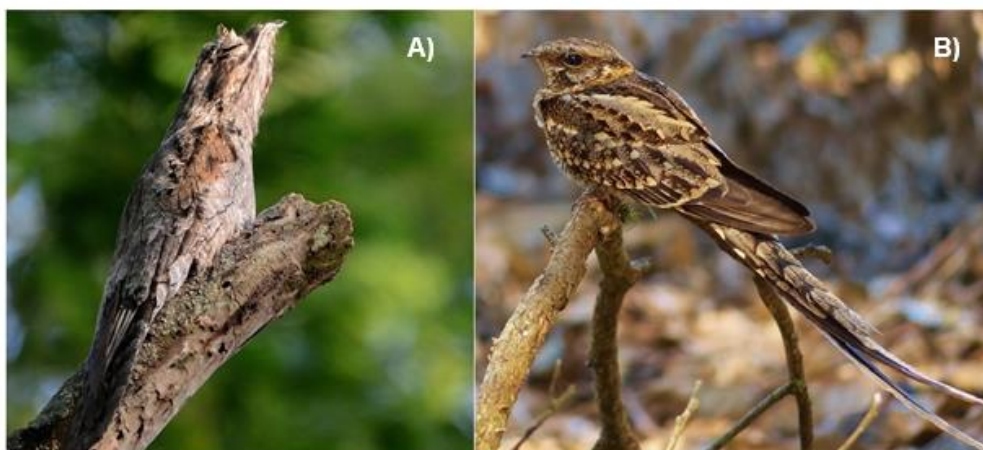


Figura 5 - Exemplos de Urutau (A) e Bacurau-tesoura (B). Fonte: arquivo pessoal de Jussara Gruber e Gustavo Gomes respectivamente.

preocupante no que se refere a risco de extinção de acordo com a The IUCN Red List of Threatened Species, causando o menor impacto possível a vida silvestre.

Tabela 1 - Número diplóide (2n) e morfologia dos macrocromossomos e cromossomos sexuais das espécies de Caprimulgiformes estudadas citogeneticamente. **m** = metacêntrico, **sm** = submetacêntrico, **st** = subteloentríco, **t** = telocêntrico, **a** = acrocêntrico. Adaptado de Nieto et al. 2012.

| Família / Espécie | 2n | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | Z | W |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| PODARGIDAE | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Podargus strigoides</i> (BELTERMAN; DE BOER 1984) | 72 | sm | t | t | t | t | t | t | t | t | t | t | t | t | - | - |
| NYCTIBIIDAE | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Nyctibius griseus</i> (NIETO et al., 2012) | 86 | st | sm | a | a | sm | sm | st | m | m | a | a | a | a | sm | sm |
| CAPRIMULGIDAE | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Nictidromus albicollis</i> (DE LUCCA; WALDRIGUES, 1986) | 78 | st | st | st | st | st | st | sm | t | t | t | t | t | t | m | m |
| <i>Hidropsalis torquata</i> (NIETO; GUNSKI, 1998) | 74 | t | st | t | st | st | sm | sm | m | sm | m | t | t | t | st | m |
| <i>Chordeiles pusillus</i> (NIETO; GUNSKI, 1998) | 68 | st | t | t | sm | t | t | st | m | st | t | - | - | - | sm | t |
| <i>Caprimilgus aegyptius arenicolor</i> (BULATOVA et al., 1971) | 70 | st | a | a | a | a | sm | sm | st | a | a | - | - | - | sm | - |
| <i>Caprimilgus indicus</i> (BIAN et al., 1988) | 76 | st | t | t | st | t | m | m | t | t | t | - | - | - | m | - |
| <i>Caprimilgus parvulus</i> (NIETO; GUNSKI, 1998) | 72 | m | sm | sm | sm | m | m | sm | m | m | m | - | - | - | sm | t |
| <i>Caprimilgus rufus</i> (NIETO; GUNSKI, 1998) | 78 | st | st | t | st | st | st | st | m | st | st | - | - | - | m | m |
| <i>Lurocalis semitorquatus</i> (FRANCISCO et al., 2006) | 82 | sm | st | t | st | st | sm | m | m | sm | m | sm | t | m | - | - |

2 JUSTIFICATIVA

Estudos citogenéticos clássicos e moleculares principalmente na área de genômica têm fornecido novas evidências quanto a muitas características importantes dos cromossomos sexuais e determinação do sexo em vertebrados. As sequências repetitivas têm sido amplamente utilizadas como ferramenta de estudos genômicos, em grupos como peixes, répteis e mais recentemente em aves. Um fato relevante é que muitas sequências repetitivas são encontradas associadas a processos de diferenciação sexual. Assim, o estudo citogenético das famílias Nyctibiidae e Caprimulgidae (Aves: Caprimulgiformes) é necessário, pois esse grupo apresenta características cromossômicas peculiares, o que torna um grupo interessante no que se refere a evolução e diferenciação dos cromossomos sexuais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a distribuição de sequências repetitivas em cromossomos de representantes das famílias Nyctibiidae e Caprimulgidae (Aves: Caprimulgiformes), com ênfase na diferenciação dos cromossomos sexuais.

3.2 Objetivos específicos

- Confirmar o número diplóide, e o cariótipo para uma espécie da família Nyctibiidae (*Nyctibius griseus*) e uma espécie da família Caprimulgidae (*Hidropsalis torquata*) utilizando coloração convencional;
- Determinar os padrões de bandeamento cromossômico (bandeamento CBG e GTG) e proceder às análises comparativas;
- Mapear sequências repetitivas (microsatélites e rDNA 18s) no genoma das espécies estudadas;
- Comparar os padrões de organização cromossômica dos DNAs repetitivos entre as duas espécies, principalmente relativo aos cromossomos sexuais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de espécimes

Os exemplares foram coletados com redes de neblina como descrito por Nieto et al. (2012) “foram capturados do crepúsculo ao anoitecer, período de maior atividade das espécies, usando redes instaladas sobre troncos e ramos de árvores” conforme indicado na tabela 2, no município de Porto Vera Cruz, Estado do Rio Grande do Sul (Figura 6) de acordo com a autorização do IBAMA/SISBIO nº 33860-1 e 44173-1 e Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/UNIPAMPA.

Tabela 2 - Informações sobre os espécimes, número de exemplares e local de coleta.

| Espécies | Nº de indivíduos e sexo | Município |
|-----------------------------|--------------------------------|----------------------|
| <i>Nyctibius griseus</i> | 2♀ | Porto Vera Cruz - RS |
| <i>Hidropsalis torquata</i> | 2♀ + 2♂ | Porto Vera Cruz - RS |

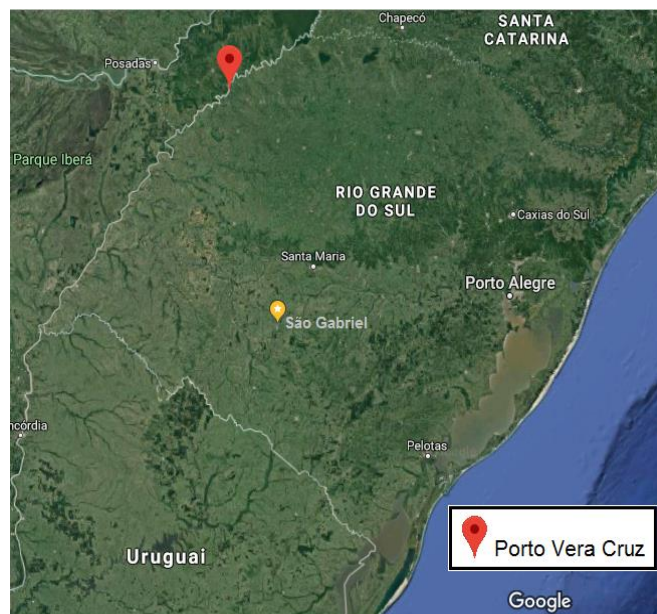


Figura 6 - Mapa do Rio Grande do Sul evidenciando o local de coleta dos espécimes. Adaptado de Google Maps, (2018).

4.2 Preparações cromossômicas

As preparações citológicas foram obtidas a partir de cultura direta de medula óssea de curta duração e cultura de fibroblastos. A cultura de medula óssea foi realizada de acordo com Garner e Gunski (2000), foi retirada a medula óssea do fêmur do exemplar com o auxílio de uma seringa hipodérmica com agulha, em meio RPMI em placa de *Petri*, a medula foi dissociada com auxílio de seringa sem a agulha, o material foi transferido para um tubo de centrifuga e incubado com colchicina (0,05%) por 1h em banho maria a 37°C, logo após o material foi centrifugado por 8 minutos a 1000 rpm, descartou-se o sobrenadante e as células sedimentadas foram tratadas com solução hipotônica (KCl, 0,075M) por 15 minutos a 37°C, em seguida foram acrescentadas algumas (3-5) gotas de fixador (metanol e ácido acético na proporção 3:1) ao tubo. O material foi ressuscitado cuidadosamente e centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi retirado, acrescentou-se 5-8ml de fixador e ressuscitou-se o material seguido de centrifugação por 10 minutos a 1000 rpm, este processo foi realizado 3 vezes e o *pellet* armazenado em freezer até o momento do uso.

Para obtenção cromossômica através de cultura de fibroblastos, primeiramente se realizou uma biópsia de tecido dos espécimes segundo Sasaki, Ikeuchi e Makino (1968), onde as amostras foram lavadas com solução Hank's e fracionadas em uma placa de *petri* e em seguida incubadas em solução de colagenase (0,186g em 4ml de meio DMEM), por um período de 1 hora, em estufa a 37°C, para ocorrer a total dissociação das células. Após, foi acrescentado 5ml de meio DMEM e centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm. O material sedimentado foi transferido para garrafas de cultura contendo 5ml de meio DMEM acrescido de antibióticos e fungicida e enriquecido com soro bovino fetal. Quando as garrafas apresentavam um nível ótimo de crescimentos celular, a partir de análises no invertoscópio, foram adicionados 100µl de colchicina. Após incubação por 1 hora em estufa a 37°C, as células foram soltas da garrafa com auxílio de solução de tripsina EDTA 0,25% e transferidas para um tubo de centrifuga. Posteriormente, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, descartou-se o sobrenadante e as células sedimentadas foram tratadas com solução hipotônica (KCl, 0,075M) por 10 minutos a 37°C, em seguida foram acrescentadas 3-5 gotas de fixador (metanol e ácido acético na proporção 3:1) ao tubo. O material foi ressuscitado

cuidadosamente e centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, e o sobrenadante foi retirado, acrescentou-se 5-8ml de fixador e após ressuspensão o material foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, este processo foi realizado 3 vezes e o *pellet* armazenado em freezer até o momento do uso.

4.3 Citogenética clássica

Os esfregaços foram realizados com lâminas novas lavadas, as amostras foram ressuspensas em seus devidos tubos com o auxílio de pipetas de *Pasteur*, foram pingadas uma ou duas gotas de material a cerca de 30 - 40 cm de altura da lâmina deixando secar a temperatura ambiente.

As lâminas foram coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato por 5 minutos, lavadas com água destilada e secadas ao ar, foram observadas em microscópio óptico, contado o número diplóide e desenhadas cerca de 30 metáfases de cada exemplar. As melhores metáfases foram fotografadas, a partir destas imagens foi realizada a biometria cromossômica com o auxílio do *software* Micromeasure e realizada a montagem dos cariótipos com o *software* Corel PhotoPaint®.

A detecção das regiões de heterocromatina foi realizada de acordo com Ledesma et al. (2002) com modificações. Essa técnica consiste em um tratamento com soluções ácidas e alcalinas, seguindo o tratamento com solução salina concentrada (2SSC) e coloração com Giemsa (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2001). O intuito dessa técnica é corar diferencialmente regiões específicas em que o cromossomo apresenta DNA altamente condensado, como nas regiões dos centrômeros e em outras regiões do genoma como cromossomos heteromórficos dos sistemas sexuais, que correspondem à heterocromatina constitutiva, motivo de sua denominação.

Assim, primeiramente as melhores metáfases foram fotografadas em coloração com Giemsa, removeu-se o óleo de imersão com o auxílio de Xilol e o Giemsa com auxílio de Fixador (3:1), e então, as lâminas foram submetidas ao tratamento com HCl e Ba(OH)₂.

Incubar a lâmina em HCl 0,2 N à temperatura ambiente por 10 minutos, logo lavar em água destilada. Mergulhar a lâmina em Hidróxido de Bário (50%) à

40 °C por 13 minutos. Mergulhar a lâmina em HCl 0,01 N à temperatura ambiente por 2 minutos, lavar em água destilada e em seguida, incubar em 2 x SSC à 60 °C por 1 hora. Corar com Giemsa por 10 minutos, lavar com água destilada e analisar em microscópio óptico.

Melhores resultados foram obtidos com lâminas envelhecidas por mais de sete dias à temperatura ambiente. As metáfases foram fotografadas e convertidas para preto e branco com o *software* Corel PhotoPaint®.

Para obtenção de padrão de bandeamento GTG se utilizou o protocolo de Howe, Umrigar e Tsien (2014). Nessa técnica faz-se uso de tripsina, que é uma enzima proteolítica que desnatura as histonas em regiões de eucromatina no DNA que possuem maior atividade transcricional. Após a coloração de Giemsa, essas regiões aparecerão como bandas claras. A cromatina altamente condensada com pouca ou nenhuma atividade transcricional (heterocromatina) terá uma grande porção de suas histonas protegidas da tripsina e, portanto, aparecerão com manchas escuras após a coloração com Giemsa. Assim se obtém bandas escuras ricas em A-T e bandas claras ricas em C-G.

Utilizar tripsina a 10x (0,05%) com o pH ajustado entre 7-8. Adicione as seguintes soluções a 4 frascos Coplin:

- Frasco # 1 = 30 ml de 1x HBSS e 4 ml de tripsina 10x (0,5%)
- Frasco # 2 = 50 ml de 1x HBSS
- Frasco # 3 = 45 ml de 1x HBSS e 5 ml de soro bovino fetal
- Frasco # 4 = 50 ml de 1x HBSS

Mergulhar a lâmina no frasco # 1 por 3 segundos, enxaguar rapidamente no frasco # 2, logo, mergulhar e deixe a lâmina no frasco # 3 por pelo menos 30 segundos, enxaguar rapidamente no Frasco # 4, lavar com água destilada e deixar secar a temperatura ambiente.

Preparar a solução nova de coloração Giemsa (proporção 9: 1 de Tampão fosfato pH 6,8 e Giemsa). Colocar a lâmina em uma prateleira de coloração. Cobrir toda a lâmina na solução de coloração de Giemsa. Deixar a lâmina permanecer na solução de coloração por 5 min. Enxaguar em água destilada e deixar secar por cerca de 10 min. Após, analisar em microscópio ótico e fotografar as melhores metáfases.

Para as análises biométricas foram escolhidas as 10 melhores fotos de metáfases de coloração convencional (Giemsa). A biometria cromossômica foi realizada obtendo-se os valores da razão entre os braços (r) e o índice centromérico (ic), onde a razão entre os braços (braço $q=l$ e braço $p=c$) define a posição do centrômero ($r=l/c$). Para o índice centromérico ($ic= c.100/c+l$), divide-se o tamanho do braço curto multiplicado por 100 pelo mesmo comprimento total do cromossomo. Os cromossomos foram classificados de acordo com Guerra, (1986).

4.4 Preparação das sondas

Na preparação da sonda utilizada para detectar a localização do cluster do gene ribossomal 18S para o experimento de FISH, foram utilizados os *primers* NS1 5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3', NS8 5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3' e DNA genômico de *Ocyurus chrysurus* (Perciformes, Lutjanidae) para amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) (WHITE et al., 1990). Posteriormente, os fragmentos amplificados foram marcados com digoxigenina *by nick translation* (Roche) e detectados com Anti-Digoxigenina-Rhodamina, seguindo as instruções do fabricante.

As sondas contendo os oligonucleotídeos enriquecidos com sequências microssatélites (CA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, (CAG)₁₀, (CAT)₁₀, (CGG)₁₀, (GA)₁₅, (GAA)₁₀, (GAG)₁₀, (GC)₁₅ e (TA)₁₅ foram marcadas diretamente durante a síntese com avidina-Cy3 (Sigma, St. Louis, MO, USA), como descrito por Kubat et al. (2008).

4.5 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Para a realização dos experimentos com sonda ribossomal foi utilizado o protocolo de Daniels e Delany (2003) com modificações. As lâminas com os cromossomos fixados foram tratadas com ribonuclease e incubadas em solução de pepsina 1% por 5 minutos e 2 vezes em 2xSSC por 5 minutos cada, em seguida foram desidratadas em uma série de etanol 70%, 90% por 2 minutos e 100% por 4 minutos. Após as lâminas foram envelhecidas em estufa a 37°C *overnight*.

As amostras foram desnaturadas em formamida 70% a 70°C por 1 minuto e

20 segundos, transferidas imediatamente para etanol 70% a -4°C por 4 minutos, logo após, incubar em etanol 70%, 90% por 2 minutos e 100% por 4 minutos todos em temperatura ambiente.

As sondas foram desnaturadas por 10 minutos a 72°C e aplicadas sobre as lâminas, em seguida foram incubadas em câmara úmida e escura a 37°C *overnight*.

Para a detecção as lâminas foram incubadas 2 vezes em formamida 50% a 40°C por 5 minutos e depois 2 vezes em 2xSSC a 40°C por 5 minutos, com a lâmina ainda molhada foi adicionada a solução de detecção (marcador fluorescente) e incubadas em estufa por 30 minutos a 37°C. Logo após as lâminas foram incubadas 3 vezes com 4xSSC+Tween por 5 minutos e as lâminas foram montadas com 15µl de DAPI+anti-fade.

Para os experimentos de microssatélites foi utilizado o protocolo de Kubat et al. (2008) com modificações. As lâminas com os cromossomos fixados foram envelhecidas em estufa a 37°C por 1 hora e em estufa a 60°C por 30 minutos. Logo após as lâminas foram tratadas com 200µL de ribonuclease (10µg/ml) em câmara úmida por 1 hora a 37°C e incubadas 3 vezes em 2xSSC por 5 minutos cada, em seguida incubadas em pepsina 0,005% por 10 minutos em temperatura ambiente repetindo-se o tratamento em 2xSSC. Prontamente foram incubadas em formaldeído 1% por 10 minutos e novamente 3 vezes em 2xSSC. Posteriormente foram desidratadas em uma série de etanol 70%, 90% e 100% por 2 minutos em cada, foram secas em temperatura ambiente. Depois de secas foram desnaturadas em formamida 70% por 3 minutos a 72°C, imediatamente desidratadas em etanol 70%, 90% e 100% por 2 minutos cada.

As sondas foram desnaturadas à 80°C por 10 minutos e transferidas imediatamente para o gelo. Após aspergiu-se 15µl de sonda sobre cada lâmina, foram vedadas com lamínula e cola sintética e incubou-se em câmara úmida e escura em estufa a 37°C *overnight*.

Foi retirada cuidadosamente a lamínula e as lâminas foram incubadas 2 vezes em 2xSSC por 5 minutos e 2 vezes em 1xSSC por 5 minutos, logo após lavadas em PBS e desidratadas em etanol 70%, 90% e 100% por 2 minutos cada. Após as lâminas foram montadas com 20µl de DAPI+anti-fade.

5 RESULTADOS

O número cromossômico relatado em publicações anteriores foi confirmado sendo para *N. griseus* $2n=86$ e *H. torquata* $2n=74$. O cariótipo foi dividido em dois grupos: macrocromossomos e microcromossomos e para as duas espécies foi confirmada a presença de 12 pares de macrocromossomos incluindo os cromossomos sexuais, observou-se uma predominância de cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos dentre os macrocromossomos de ambos os cariótipos e morfologia telocêntrica nos grupos de microcromossomos (Figura 7-B,E).

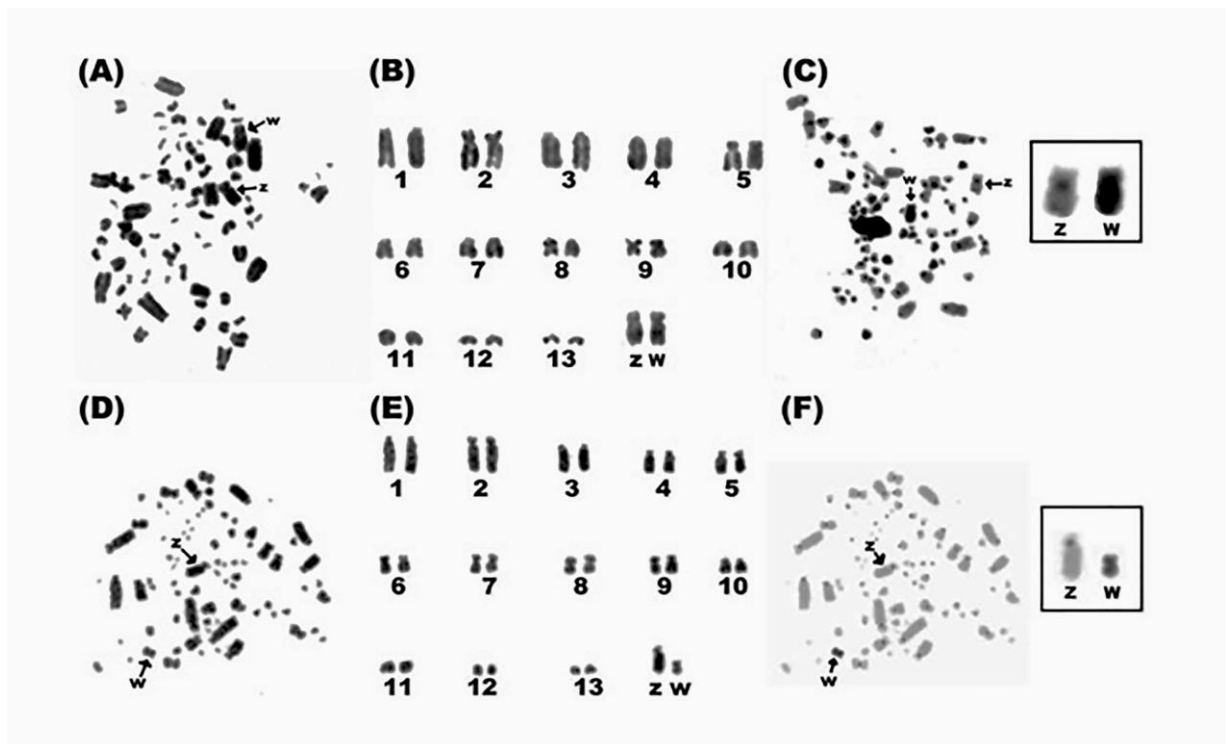


Figura 7 - Metáfases, cariótipo parcial e banda CBG de uma fêmea da espécie *Nyctibius griseus* (A-C) e uma fêmea de *Hydropsalis torquata* (D-F). Cromossomos Z e W em detalhe.

A morfologia dos 14 maiores pares cromossômicos incluindo os pares de cromossomos sexuais de cada espécie está descrita na tabela 3. O número fundamental (NF) para *N. griseus* é 98 e para *H. torquata* é 86. O número de cromossomos bi-braquiais nas duas espécies é igual a 12.

O bandeamento CBG revelou as regiões do genoma ricas em heterocromatina constitutiva em metáfases de ambas às espécies destacando-se as regiões centroméricas e o cromossomo sexual W. Em *N. griseus* observou-se que o cromossomo W tem morfologia submetacêntrica e apresenta tamanho similar ao

cromossomo Z (Tabela 3), ambos localizados entre o 4^o e 5^o pares autossômicos. Assim morfológicamente os cromossomos Z e W dessa espécie apresentam-se similares em coloração convencional, no entanto, com o uso do bandeamento CBG é possível observar uma notável diferença entre Z e W, pois o cromossomo Z possui apenas uma marcação na região pericentromérica, enquanto que o cromossomo W é quase completamente heterocromático (Figura 7 A-C).

Tabela 3 - Morfologia dos 14 maiores pares cromossômicos de *N. griseus* e *H. torquata*. AR= arm ratio/relação do braço, IC= Centromeric Index/Índice Centromérico.

| <i>Nictibius griseus</i> | | | | | |
|-----------------------------|----------------|----------------|-----------|-----------|-------------------|
| Cromossomo | Braço p | Braço q | AR | IC | Morfologia |
| 1 | 1,72 | 11,74 | 6,83 | 12,78 | a |
| 2 | 4,36 | 9,26 | 2,12 | 32,01 | sm |
| 3 | 1,86 | 10,58 | 5,69 | 14,95 | a |
| 4 | 1,19 | 10,32 | 8,67 | 10,34 | a |
| 5 | 3,44 | 6,61 | 1,92 | 34,23 | sm |
| 6 | 2,25 | 4,63 | 2,06 | 32,70 | sm |
| 7 | 2,52 | 5,05 | 2,00 | 33,29 | sm |
| 8 | 2,91 | 3,18 | 1,09 | 47,78 | m |
| 9 | 2,88 | 3,19 | 1,11 | 47,45 | m |
| 10 | 0,79 | 4,76 | 6,03 | 14,23 | a |
| 11 | 0 | 5,56 | 55600,00 | 0,00 | t |
| 12 | 0 | 3,7 | 37000,00 | 0,00 | t |
| 13 | 0 | 3,18 | 31800,00 | 0,00 | t |
| Z | 3,97 | 7,41 | 1,87 | 34,89 | sm |
| W | 3,7 | 7,41 | 2,00 | 33,30 | sm |
| <i>Hydropsalis torquata</i> | | | | | |
| 1 | 2,65 | 15,48 | 5,84 | 14,62 | a |
| 2 | 4,49 | 13,75 | 3,06 | 24,62 | a |
| 3 | 3,04 | 11,37 | 3,74 | 21,10 | a |
| 4 | 3,31 | 9 | 2,72 | 26,89 | sm |
| 5 | 3,7 | 8,47 | 2,29 | 30,40 | sm |
| 6 | 3,57 | 5,95 | 1,67 | 37,50 | sm |
| 7 | 4,1 | 5,69 | 1,39 | 41,88 | m |
| 8 | 4,76 | 4,89 | 1,03 | 49,33 | m |
| 9 | 4,13 | 6,62 | 1,60 | 38,42 | sm |
| 10 | 3,04 | 5,16 | 1,70 | 37,07 | sm |
| 11 | 0 | 6,61 | 60610,00 | 0,00 | t |
| 12 | 0 | 6,09 | 60900,00 | 0,00 | t |
| 13 | 0 | 4,23 | 42300,00 | 0,00 | t |
| Z | 3,44 | 10,58 | 3,08 | 24,54 | a |
| W | 3,7 | 3,44 | 0,93 | 51,82 | m |

O bandeamento CBG revelou ainda a presença de alguns pares de microcromossomos com grande acúmulo de heterocromatina constitutiva na espécie *N. griseus*.

O cromossomo W de *H. torquata* apresentou morfologia metacêntrica e altamente heterocromático localizando-se entre o 10^o e o 11^o pares autossômicos, um dos menores macrocromossomos. Em contraste, o cromossomo Z dessa espécie apresenta um pequeno bloco de heterocromatina na região centromérica em um cromossomo de morfologia acrocêntrica localizado entre o 3^o e 4^o pares autossômicos (Figura 7 D-F).

Com o bandeamento GTG de *N. griseus* foi possível visualizar o padrão de bandas principalmente nos cromossomos sexuais, havendo variação no número e distribuição de bandas em cada cromossomo (Z=14 bandas e W= 12 bandas). O cromossomo Z possui em seu braço p as bandas 1 e 3 negativas e as bandas 2 e 4 positivas, no braço q desse cromossomo se intercalam as bandas 1, 3, 5, 7 e 9 sendo negativas e 2, 4, 6, 8 e 10 bandas positivas. Os resultados para o cromossomo W mostram para o braço p, bandas 1, 3 e 5 negativas e bandas 2 e 4 positivas. Para o braço q do referido cromossomo observou-se as bandas 1, 3, 5 e 7 negativas e 2, 4 e 6 positivas (Figura 8).

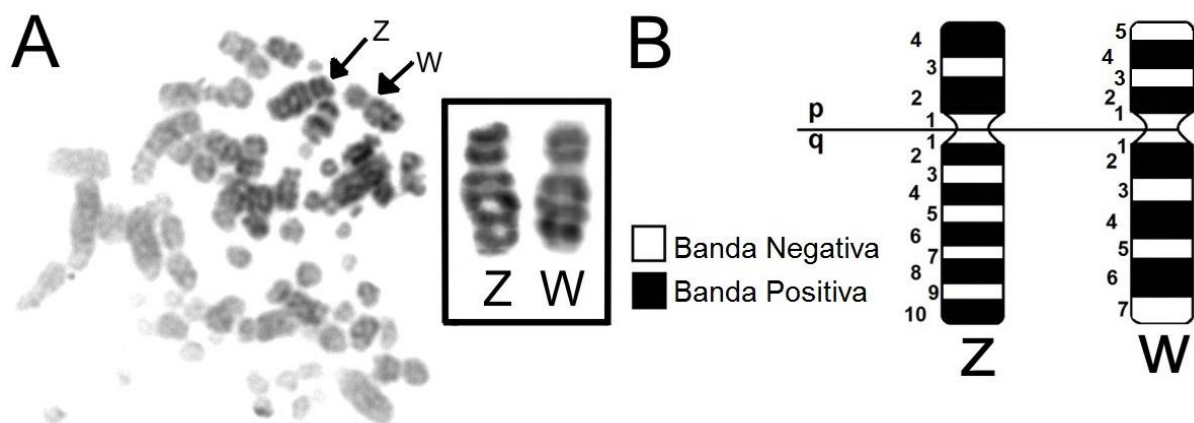


Figura 8 - Bandeamento GTG em metáfase de *N. griseus*, setas indicam os cromossomos sexuais que também estão em detalhe (A). Esquema de bandas nos cromossomos mostrando a diferença no padrão de Z e W (B).

Em ambas as espécies os resultados do experimento de FISH com sondas de 18S rDNA marcaram somente um par de microcromossomos portadores deste *cluster*. Em *N. griseus* e *H. torquata* a sequência microssatélite (CGG)₁₀ apresenta-se no mesmo cromossomo onde está a região do *cluster* 18S rDNA (Figura 9-A e B).

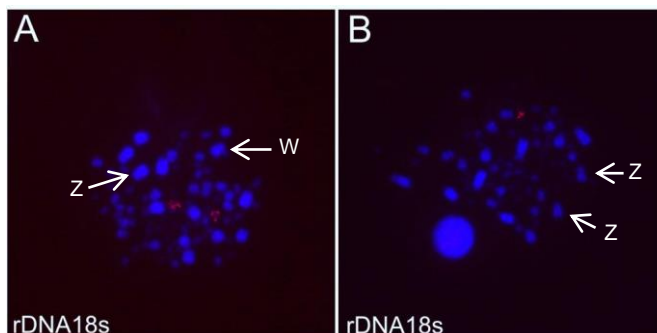


Figura 9: Metáfases hibridizadas com rDNA 18S em *N. griseus* (A) e *H. torquata* (B). A metáfase de *H. torquata* (B) apresenta o par de microcromossomos portador do sítio ribossomal em associação com apenas uma marcação entre os dois cromossomos.

A hibridização de sequências microssatélites nos genomas de *N. griseus* e *H. torquata* apresentaram diferenças significativas com relação à quantidade, sinal e local das hibridizações. Nesses experimentos foram utilizadas 11 diferentes sondas de sequências microssatélite (CA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, (CAG)₁₀, (CAT)₁₀, (CGG)₁₀, (GA)₁₅, (GAA)₁₀, (GAG)₁₀, (GC)₁₅ e (TA)₁₅, destas, sete sondas exibiram sinais exclusivamente no genoma de *N. griseus* (CAA)₁₀, (CAG)₁₀, (CAT)₁₀, (GA)₁₅, (GAA)₁₀, (GAG)₁₀, (GC)₁₅, (Figura 10 A-J). A sonda (TA)₁₅ não apresentou hibridizações no genoma de *N. griseus* sendo somente hibridizada em *H. torquata* (Figura 12 D), que apresentou pequenos blocos na região distal do braço q do 5º par do complemento cromossômico dessa espécie, bem como alguns microcromossomos.

As sequências (CA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, e (CGG)₁₀, acumularam-se preferencialmente em microcromossomos, de *N. griseus*. Nenhum microssatélite foi detectado em macrocromossomos dessa espécie exceto no cromossomo sexual W. As sequências (CA)₁₅, (CAC)₁₀, e (CGG)₁₀ apresentaram marcações em ambos os genomas estudados.

No cromossomo W de *N. griseus* foram hibridizadas nove das 11 sondas (Figura 11), somente (CA)₁₅, (TA)₁₅, não apresentaram sinal de hibridizações, porém (CA)₁₅, acumulou-se em microcromossomos nessa espécie. Observaram-se ainda grandes blocos de microssatélites acumulados exclusivamente no cromossomo W, é

o caso das sequências $(CAG)_{10}$, $(CAT)_{10}$, $(GA)_{15}$, $(GAA)_{10}$, $(GAG)_{10}$, $(GC)_{15}$ (Figura 10- D,E,G,H,I e J) que não foram detectadas nos cromossomos autossômicos dessa espécie e tão pouco no genoma de *H. torquata*. A sequência e o local de acúmulo de microsatélites no cromossomo W de *N. griseus* está descrito na figura 11.

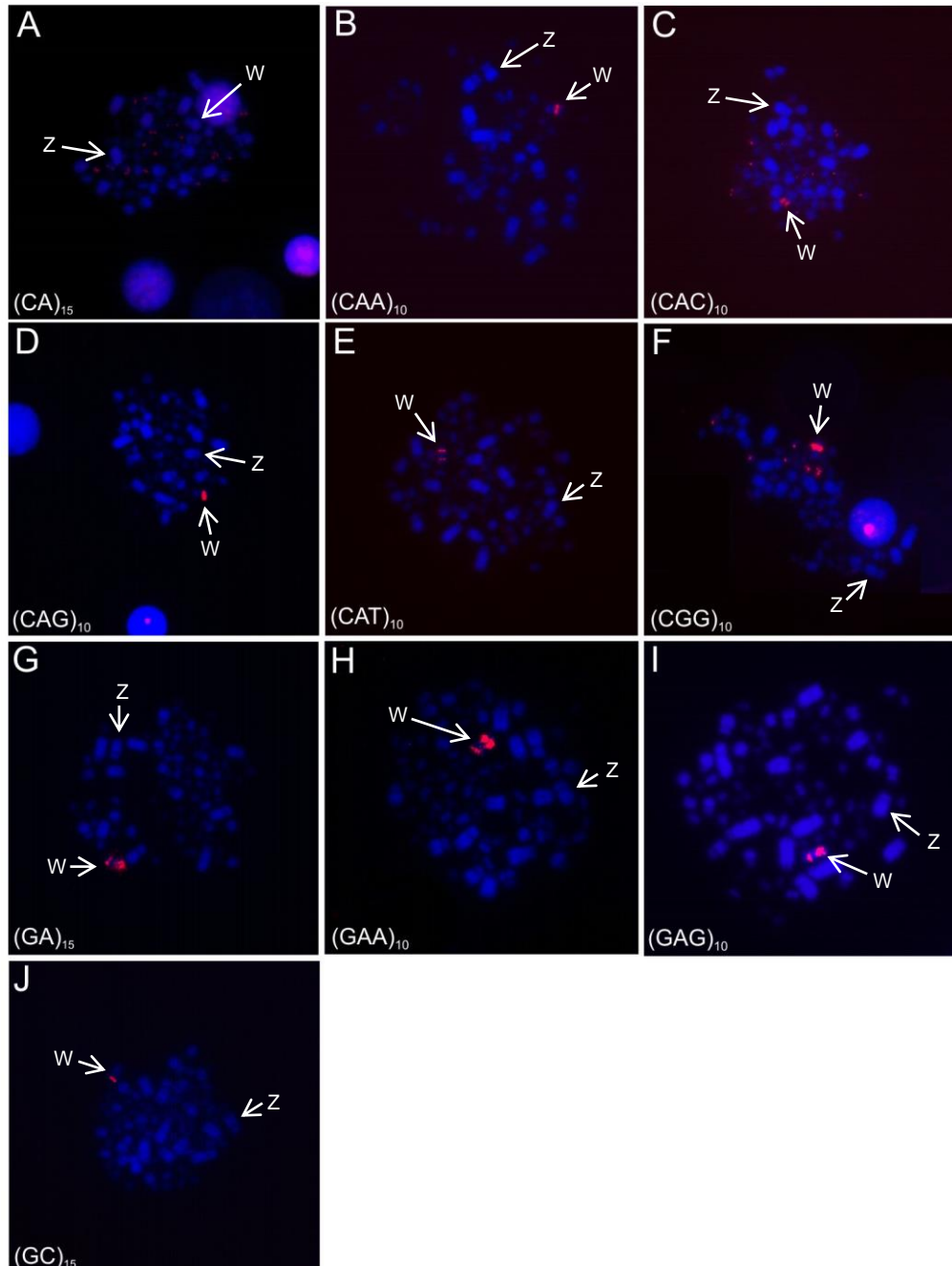


Figura 10 - Metáfases com hibridizações de 10 sondas microsatélites em *N. griseus*.

As sondas $(GA)_{15}$, $(GAA)_{10}$, $(GAG)_{10}$, acumularam-se em blocos tanto do braço q quanto do braço p do cromossomo W de *N. griseus* (Figura 10G, H e I). As sequências $(CAA)_{10}$ e $(CAC)_{10}$ e $(CGG)_{10}$ além de marcações no cromossomo W

também marcaram vários pares de microcromossomos desse genoma. Não houve hibridizações de microssatélites em macrocromossomos autossômicos de *N. griseus*, também não houve hibridizações no cromossomo Z dessa espécie.

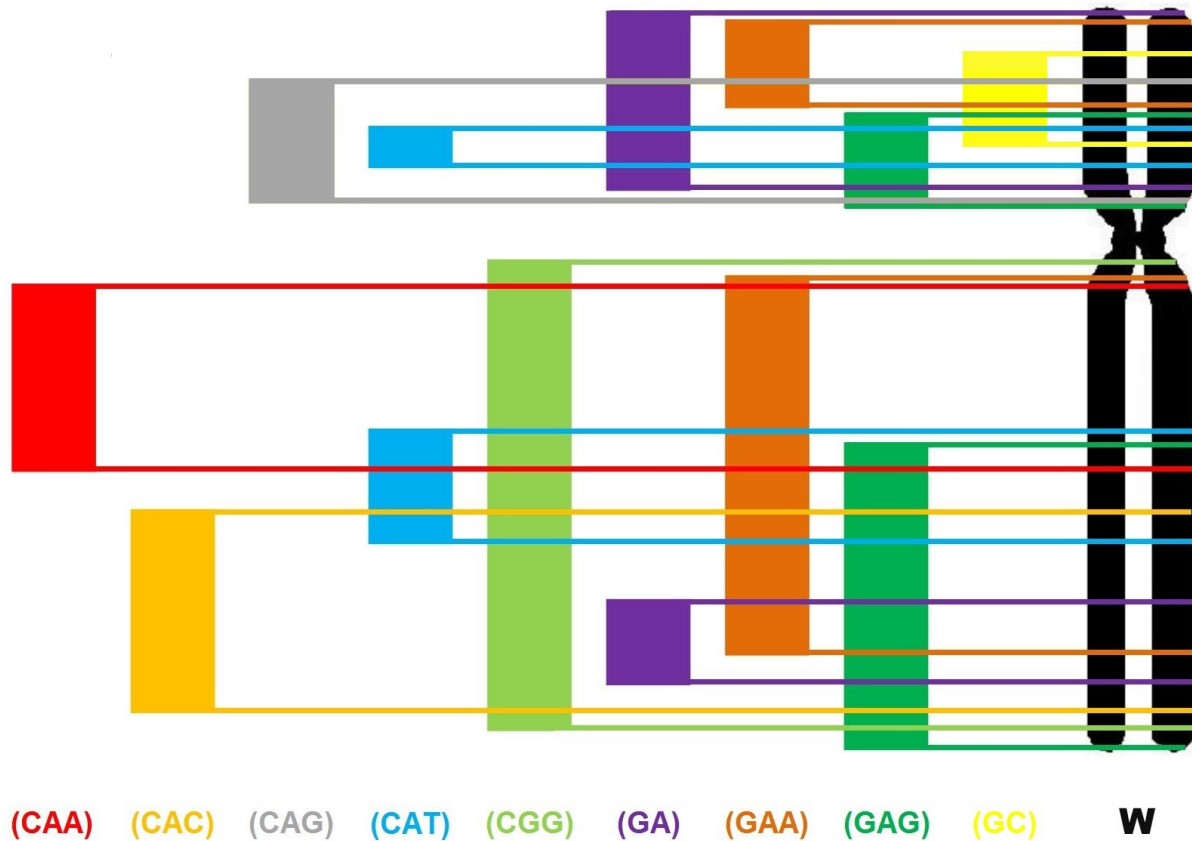


Figura 11 - Esquema com a localização hipotética das sondas que mostraram sinais positivos no cromossomo W de *N. griseus*.

No genoma de *H. torquata*, foram hibridizadas apenas quatro das 11 sondas de sequências microssatélites, $(CA)_{15}$, $(CAC)_{10}$, $(TA)_{15}$ e $(CGG)_{10}$ (Figura 12 A-D), sendo que todas apresentaram marcações em macrocromossomos autossômicos, bem como em alguns microcromossomos. $(CA)_{15}$, acumulou-se na região distal do braço p do 5º par cromossômico, $(CAC)_{10}$ na região distal do braço q do 1º e 2º pares cromossômicos e na região distal do braço p do 6º par autossômico. A sonda $(CGG)_{10}$ além do par de microcromossomos portadores dos sítios ribossomais, também acumulou-se em um bloco da região distal do braço q do 1º par. E por fim $(TA)_{15}$ que gerou marcações na região intersticial e distal do braço p do 6º par autossômico.

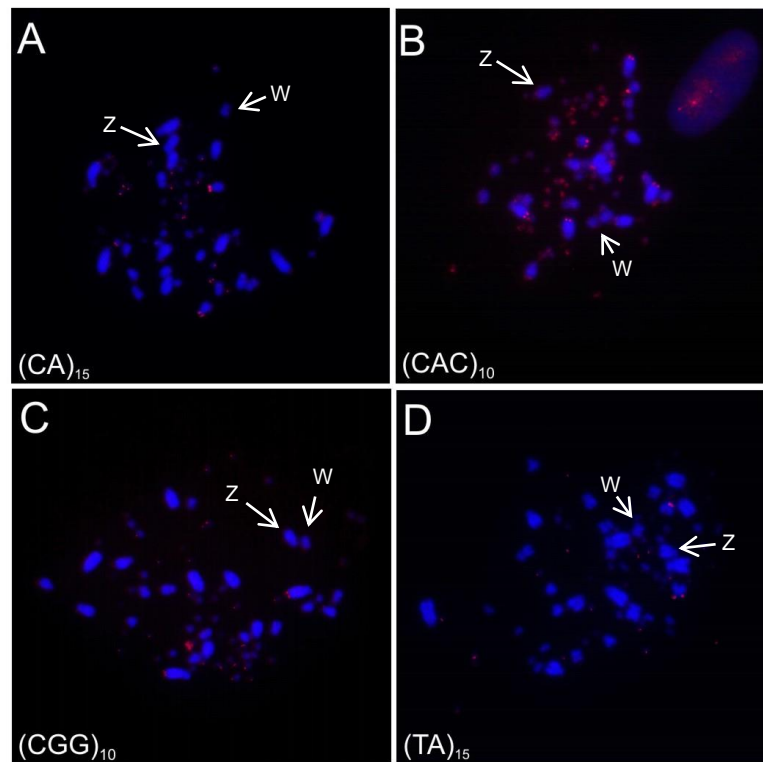


Figura 12 - Metáfases com hibridizações de quatro sondas microssatélites que apresentaram sinais positivos em *H. torquata*.

A despeito dos resultados do cromossomo W de *N. griseus* não houve hibridizações no cromossomo W de *H. torquata*.

6 DISCUSSÃO

De acordo com a morfologia dos macrocromossomos, incluindo os pares de cromossomos sexuais de cada espécie podemos afirmar que existem algumas diferenças na comparação dos cariótipos principalmente no que se refere à quantidade de microcromossomos.

Ressaltam-se as diferenças morfológicas de cinco pares de macrocromossomos (Figura 7 B-E). Pode-se ainda, inferir sobre possíveis rearranjos intracromossômicos como inversões pericêntricas, paracêntricas ou reposição centromérica, sendo que o número fundamental se mantém para esses pares, e ainda é possível incluir nessa mesma linha de raciocínio o cromossomo Z que possui morfologia submetacêntrica em *N. griseus* e acrocêntrica em *H. torquata* (Tabela 3).

Apesar de *H. torquata* apresentar um número diploide menor que o de *N. griseus* não foi possível identificar nenhum tipo de rearranjo intercromossômico, uma vez que o número de cromossomos bi-braquiais nas duas espécies é o mesmo. Dessa forma, a diferença de 12 no NF e no número diplóide das espécies tratadas nesse estudo, sugerem que os rearranjos ocorreram nos microcromossomos. Sendo possíveis fusões entre microcromossomos e ainda alguma eventual deleção desses elementos no decorrer da evolução do cariótipo de *H. torquata*.

Nesse sentido, a hipótese mais razoável é que o acúmulo de heterocromatina observado nos microcromossomos de *N. griseus*, pode ter ocorrido também em microcromossomos do ancestral de *H. torquata*. Estes elementos altamente heterocromáticos podem, devido a diferentes pressões evolutivas, terem sido descartados do genoma ancestral de *H. torquata* (BRANDSTRÖM; ELLEGREN 2007). No entanto, a plasticidade evolutiva permite admitir que, deleção não é necessariamente a única explicação para essas evidências.

As duas espécies possuem regiões ricas em heterocromatina constitutiva específicas em seus genomas, nota-se porém, que *N. griseus* possui alguns pares de microcromossomos que se apresentam quase totalmente heterocromáticos, essa característica não foi observada em *H. torquata* (Figura 7 C-F).

O cromossomo W de *H. torquata* apresentou morfologia metacêntrica e amplamente heterocromático localizando-se entre o 10º e o 11º pares autossômicos, um dos menores macrocromossomos como destacado por NIETO; GUNSKI (1998). Em contraste, o cromossomo Z dessa espécie apresenta um pequeno bloco de

heterocromatina na região pericentromérica com morfologia acrocêntrica e localizado entre o 3º e 4º pares autossômicos (Figura 7 D-F).

Sobre o cromossomo W de *N. griseus*, observou-se o mesmo descrito por Nieto et al. (2012), um cromossomo W de morfologia submetacêntrica similar ao Z ambos localizados entre o 4º e 5º pares autossômicos. Dessa forma, os cromossomos Z e W de *N. griseus* parecem ser homomórficos quando analisados em coloração convencional de Giemsa. Embora, com o bandeamento CBG seja possível observar uma notável diferença entre ambos os cromossomos sexuais, pois no cromossomo Z existe apenas uma marcação heterocromática na região do centrômero, enquanto que o cromossomo W é marcadamente heterocromático (Figura 7 A-C). A diferença no padrão de bandeamento GTG dos cromossomos sexuais Z e W de *N. griseus* indicam que o W dessa espécie passou por um processo de diferenciação relação a composição e organização de bases no cromossomo o que fica mais evidente quando hibridizado com sondas de sequências repetitivas.

6.1 Experimentos de FISH

A maioria das aves mostra apenas um par cromossômico compartilhando a sequência rDNA 18S, como o avestruz (Struthioniformes) e a ema (Rheiformes) que são aves paleognatas consideradas mais basais na filogenia. Da mesma forma aves mais derivadas como a galinha doméstica (Galiformes) e pica-paus (Piciformes) mantém esta característica como uma plesiomorfia para o grupo (NISHIDA-UMEHARA et al., 2007; DYOMIN et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2017).

Ambas as espécies analisadas neste trabalho conservaram o caráter ancestral plesiomórfico com apenas um único par de macrocromossomos portadores de rDNAs 18S. Curiosamente, a sequência microssatélite (CGG)₁₀ foi encontrada associada ao cluster de rDNAs 18S em *N. griseus* e em *H. torquata*, apresentando-se muitas vezes, o par de cromossomos portadores de sítios ribossomais em associação (Figura 9-B). Resultados semelhantes foram descritos para três espécies de pica-paus (DE OLIVEIRA et al., 2017) e uma espécie de peixe, *Triporthus trifurcatus* (Characiformes) (YANO et al., 2014). Esse resultado indica certa afinidade entre o cluster rDNA 18S e a sequência microssatélite (CGG)₁₀ o que pode ser uma

característica interessante em questões evolutivas, dado sua abrangência filogenética, que pode indicar um estado conservado deste caractere no genoma.

A hibridização de sequências microssatélites nos complementos cromossômicos de *N. griseus* e *H. torquata* apresentaram diferenças no que tange a quantidade, local e intensidade das hibridizações. No decorrer dos experimentos de FISH sete sondas exibiram sinais exclusivamente em *N. griseus* (CAA)₁₀, (CAG)₁₀, (CAT)₁₀, (GA)₁₅, (GAA)₁₀, (GAG)₁₀, (GC)₁₅, não apresentando sinais positivos em *H. torquata*. Esse fato demonstra uma grande diferença no que se refere à diversidade de sequências microssatélite quando se compara dos dois cariótipos.

Destaca-se que nos cromossomo autossômicos de *N. griseus* as sequências (CA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, e (CGG)₁₀, apresentaram sinal somente em alguns microcromossomos sendo que, nos macrocromossomos autossômicos dessa espécie não houve marcação. Essas sondas, com exceção de (CAA)₁₀ hibridizaram também no genoma de *H. torquata* em micro e macrocromossomos, o que pode ser levado em consideração do ponto de vista filogenético como características de sinapomorfia entre as duas espécies. Contudo, em *H. torquata* ainda há hibridizações da sonda (TA)₁₅, que não apresentou marcações em *N. griseus*.

É relevante notar ainda que as sondas (CA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, e (CGG)₁₀, apresentaram sinais positivos no genoma de Columbiformes e Piciformes tanto em macro como em microcromossomos autossômicos (DE OLIVEIRA et al., 2017; KRETSCHMER et al., 2018) esses dados indicam que esses microssatélites, presentes em regiões de eucromatina, são partes importantes de regiões funcionais do genoma das aves pois, em sua maioria não estão associados a heterocromatina constitutiva. Ainda é possível inferir que (CA)₁₅, (CAC)₁₀, e (CGG)₁₀, poderiam estar presentes já no ancestral comum dos Caprimulgiformes.

Portanto, com os resultados dos experimentos de FISH é razoável afirmar que na espécie *N. griseus* há um maior acúmulo de sequências microssatélites, dessa forma, esses resultados podem indicar que no decorrer da história evolutiva desse grupo o genoma do ancestral de *N. griseus* acumulou mais sequências microssatélites que o ancestral de *H. torquata* diferenciando essas duas linhagens na ordem Caprimulgiformes.

6.20 Cromossomo W de *N. griseus*

É singular a quantidade e diversidade de microssatélites no cromossomo W de *N. griseus*. Esse fato particular poderia explicar o tamanho incomum do W dessa espécie, como afirmado por Nieto, et al. (2012), essa característica poderia representar mais um passo na diferenciação do cromossomo heteromórfico do sistema ZW que surgira de um par homomórfico tornando-se com o passar das eras, morfologicamente diferenciado.

Assim levanta-se a seguinte questão: o genoma dessas espécies estaria depositando sequências repetitivas nesse cromossomo de modo a silenciar através da heterocromatização e no decorrer da evolução às eliminar, como parte da diferenciação cromossômica do W? A resposta não é tão clara, porém é possível inferir que isso esteja acontecendo e a hipótese de haver um cromossomo W em um distinto estado de diferenciação por acúmulo de sequências repetitivas microssatélites estaria sim em consonância com os presentes resultados. Porém, não se trata de um representante intermediário na diferenciação do sistema sexual ZW para a classe Aves como proposto por Nieto, et al. (2012), mas sim que o genoma dessa espécie estaria utilizando mecanismos de diferenciação do cromossomo W diferentes dos utilizados pela maioria dos genomas do grupo e assim fica clara a importância do acúmulo ou amplificação de sequências repetitivas na diferenciação morfológica e sequencial dos cromossomos sexuais das aves (DE OLIVEIRA FURO et al., 2017).

Portanto, é admissível que o cromossomo W de *N. griseus* reagiu a pressões evolutivas utilizando mecanismos não usuais para as aves, o que possibilitou a aquisição de características que o distingue do W de *H. torquata* ou da maioria das aves neognatas. Estes resultados permitem destacar a importância das sequências repetitivas como os microssatélites na evolução e diferenciação do cromossomo sexual W.

Todavia, ainda é muito importante o estudo de sequências repetitivas no genoma desse grupo, pois, durante o processo evolutivo e do desenvolvimento do voo esse genoma ancestral reduzido deve ter sido selecionado como proposto por alguns autores: o tamanho reduzido do genoma das aves representa uma adaptação às altas taxas metabólicas desses animais em consequência das demandas energéticas do voo, pois, aves que não apresentam o voo como característica possuem maiores genomas do que as aves que voam (HUGHES; HUGHES 1995; VENTON 2012). Vários trabalhos indicam que essa redução ocorreu com a perda de

elementos repetitivos do genoma (SCHMID et al., 2000; HUGHES; PIONTKIVSKA 2005). Entretanto há outros mecanismos que podem atuar na formação e expansão do acúmulo de microssatélites como replicação, inserção ou deleção de uma ou mais sequências (ELLEGREN 2000; DE OLIVEIRA FURO et al., 2017).

Finalmente, é possível inferir que esse genoma tenha transferido grande parte desses elementos repetitivos incluindo os microssatélites para o cromossomo W que em seu processo de diferenciação se tornaria heterocromático e degeneraria “expulsando” de seu genoma grande parte dessas sequências devido a deleções, mesmo essa perda sendo bem mais vagarosa do que a taxa natural de acúmulo ou replicação desse tipo de elementos (PETROV et al., 2000). Todavia, não fica claro por que especificamente em *N. griseus* ou *Myiopsitta monachus* o processo de degeneração, ou seja, a redução do tamanho desse cromossomo acabou sendo convertido para um processo de acúmulo de sequências repetitivas (DE OLIVEIRA FURO et al., 2017).

7 CONCLUSÃO

Esse trabalho foi realizado alcançando todos os objetivos elencados de forma apropriada, demonstrando que a escolha e o uso das técnicas foram adequados e levaram a resultados satisfatórios.

A sequência (CGG)₁₀ está estreitamente associada ao sítio ribossomal desses genomas, assim esse carácter pode ser uma plesiomorfia dentro do grupo das aves.

As sequências (CA)₁₅, (CAC)₁₀ e (CGG)₁₀ são as únicas compartilhadas pelos dois genomas estudados e se encontram em cromossomos autossômicos em ambas as espécies, sugerindo seu acúmulo desde o ancestral comum dos dois genomas.

Os significativos blocos de microssatélites e heterocromatina no cromossomo W de *N. griseus* podem ser resultado de diferentes mecanismos de resposta a pressões evolutivas que levaram esse genoma a reagir acumulando sequências repetitivas, como parte da diferenciação dos cromossomos sexuais.

Por fim, o notável cromossomo W do Urutau encontra-se em um incomum estado de acúmulo de sequências microssatélites e heterocromatina por toda sua extensão, contribuindo para diferenciação física desse cromossomo, se comparado com o que é comumente encontrado em outras neognatas. Essas características devem incluir a espécie *N. griseus* em um patamar de espécie modelo para estudos de diferenciação dos cromossomos sexuais do sistema ZW, sendo ainda necessário aprofundamento sobre esse tema.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, Jessica K.; NORDÉN, Anna K.; HANSSON, Bengt. Sex chromosome evolution: historical insights and future perspectives. In: **Proc. R. Soc. B**. The Royal Society, 2017. p. 20162806.
- BARROWCLOUGH, G. F., CRACRAFT, J., KLICKA, J., ZINK, R. M. How many kinds of birds are there and why does it matter?. **PloS one**, v. 11, n. 11, p.e0166307, 2016.
- BERLIN, Sofia; ELLEGREN, Hans. Fast accumulation of nonsynonymous mutations on the female-specific W chromosome in birds. **Journal of molecular evolution**, v. 62, n. 1, p. 66, 2006.
- BERTOCCHI, Natasha Avila et al., Evolutionary history of the mariner element galluhop in avian genomes. **Mobile DNA**, v. 8, n. 1, p. 11, 2017.
- BISCOTTI, Maria Assunta; OLMO, Ettore; HESLOP-HARRISON, JS Pat. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, V. 23, n 3, p 415–420, 2015.
- BRANDSTRÖM, Mikael; ELLEGREN, Hans. The genomic landscape of short insertion and deletion polymorphisms in the chicken (*Gallus gallus*) genome: a high frequency of deletions in tandem duplicates. **Genetics**, v. 176, n. 3, p. 1691-1701, 2007.
- CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. São Paulo: Ed. Manole. p. 287, 2001.
- CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, n. 2, p. 118, 2005.
- CHRISTIDIS, Les. **Aves**. Balogh Scientific Books, 1990.
- CIOFFI, M. B. et al., Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae): unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. **Sexual Development**, v. 4, n. 3, p. 176-185, 2010.
- COOKE, F.; BRUCE J. Map showing the range of the Nightjar and allies. The **Encyclopedia of Animals: a complete visual guide**, (page 306), 2011. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18306975>> Acesso em: 11 mar. 2018.
- CORREIA, C.V.S. et al., Alta similaridade cariotípica na família Emberezidae (Aves: Passeriformes). **Journal of Biosciences**, v. 25, n. 2, p. 99–111. 2009.
- COSTA, Thiago Vernaschi Vieira da. **Osteologia e filogenia das Aves Caprimulgiformes, com ênfase em Nyctibiidae e Caprimulgidae**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DE OLIVEIRA FURO, Ivanete et al., Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Myiopsitta monachus* and *Amazona aestiva* (Psittaciformes, Psittacidae) with Emphasis on the Sex Chromosomes. **Cytogenetic and genome research**, v. 151, n. 3, p. 151-160, 2017.

DE OLIVEIRA, Edivaldo Herculano Corrêa et al., Comparação genômica em aves através de sondas cromossomo-específicas. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 14, n. 1, p. 47-52, 2006.

DE OLIVEIRA, Thays Duarte et al., Genomic Organization of Repetitive DNA in Woodpeckers (Aves, Piciformes): Implications for Karyotype and ZW Sex Chromosome Differentiation. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0169987, 2017.

DNANIELS L.M.; DELANY M.E. Molecular and cytogenetic organization of the 5S ribosomal DNA array in chicken (*Gallus gallus*). **Chromosome Res.** 11: 305-317. PMID: 12906126, 2003.

DYOMIN, Alexander G. et al., Chicken rRNA gene cluster structure. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0157464, 2016.

ELLEGREN, Hans. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature reviews genetics**, v. 5, n. 6, p. 435, 2004.

FRANCISCO, Mercival Roberto et al., Karyotype description of the Semicollared nighthawk, *Lurocalis semitorquatus* (Caprimulgidae). **Revista Brasileira de Ornitologia-Brazilian Journal of Ornithology**, v. 14, n. 24, p. 3, 2006.

FRIDOLFSSON, Anna-Karin et al., Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 14, p. 8147-8152, 1998.

GARNERO, Analia Del V.; GUNSKI, Ricardo J. BOOK REVIEW- Comparative analysis of the karyotypes of *Nothura maculosa* and *Rynchotus rufescens* (Aves: Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. **Nucleus-Calcutta-International Journal of Cytology**, v. 43, n. 3, p. 64-70, 2000.

GREGORY, T. Ryan et al., Eukaryotic genome size databases. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl_1, p. D332-D338, 2006.

GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al., **Rev. Bras. Genet.**, v. 9, p. 741-743, 1986.

GUNSKI, R. J. et al., Análisis cariotípico de siete especies de Tiránidos (Tyrannidae). **El Hornero**, v. 15, n. 02, p. 103-109, 2000.

GUNSKI, Ricardo José; GIANNONI, Miriam Luz. Nucleolar organizer regions and a new chromosome number for *Rhea americana* (Aves: Rheiformes). **Genetics and molecular biology**, v. 21, n. 2, p. 207-210, 1998.

HOWE, B; UMRIGAR, A; TSIEN, F. Chromosome Preparation From Cultured Cells. **J. Vis. Exp.** (83), e50203, doi:10.3791/50203, 2014.

HUGHES, A. L.; FRIEDMAN, R. Genome size reduction in the chicken has involved massive loss of ancestral protein-coding genes. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 12, p. 2681-2688, 2008.

HUGHES, A. L.; HUGHES, M. K. Small genomes for better flyers. **Nature**, v. 377, n. 6548, p. 391-391, 1995.

HUGHES, A. L.; PIONTKIVSKA, H. DNA repeat arrays in chicken and human genomes and the adaptive evolution of avian genome size. **BMC evolutionary biology**, v. 5, n. 1, p. 12, 2005.

HUGHES, Austin L.; HUGHES, Marianne K. Small genomes for better flyers. **Nature**, v. 377, n. 6548, p. 391-391, 1995.

HUGHES, Austin L.; PIONTKIVSKA, Helen. DNA repeat arrays in chicken and human genomes and the adaptive evolution of avian genome size. **BMC evolutionary biology**, v. 5, n. 1, p. 12, 2005.

JURKA, Jerzy et al., Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and genome research**, v. 110, n. 1-4, p. 462-467, 2005.

KAPUSTA, Aurélie; SUH, Alexander; FESCHOTTE, Cédric. The hidden elasticity of avian and mammalian genomes. **bioRxiv**, p. 081307, 2016.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, n. 1, p. 49-63, 2002.

KOEPFLI, Klaus-Peter et al., The Genome 10K Project: a way forward. **Annu. Rev. Anim. Biosci.**, v. 3, n. 1, p. 57-111, 2015.

KRETSCHMER, Rafael et al., Repetitive DNAs and shrink genomes: A chromosomal analysis in nine Columbidae species (Aves, Columbiformes). **Genetics and molecular biology**, n. AHEAD, p. 0-0, 2018.

KUBAT, Zdenek et al., Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, v. 51, n. 5, p. 350-356, 2008.

LEDESMA, M,A.; MARTINEZ P, A.; CALDERÓN, O,S.; BOERIS, J,M and MERILES, J,M. Descrição do cariótipo e padrões de bandas C e NOR em *Pheucticus aureoventris* (Emberizidae:Cardinalinae). **Revista Brasileira de Ornitologia** 14 (1) 5962, 2002.

MANK, Judith E.; ELLEGREN, Hans. Parallel divergence and degradation of the avian W sex chromosome. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 8, p. 389-391, 2007.

MARTINS, Cesar. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. **Fish cytogenetics**, p. 421-453, 2007.

MARTINS, Cesar et al., Cytogenetic mapping and contribution to the knowledge of animal genomes. **Advances in genetics research**, v. 4, p. 1-81, 2011.

MATSUBARA, Kazumi et al., Amplification of microsatellite repeat motifs is associated with the evolutionary differentiation and heterochromatinization of sex chromosomes in Sauropsida. **Chromosoma**, v. 125, n. 1, p. 111-123, 2016.

MATSUBARA, Kazumi et al., Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 48, p. 18190-18195, 2006.

MAYR, Gerald. Osteological evidence for paraphyly of the avian order Caprimulgiformes (nightjars and allies). **Journal für Ornithologie**, v. 143, n. 1, p. 82-97, 2002.

NANDA, I.; SCHMID, M. Conservation of avian Z chromosomes as revealed by comparative mapping of the Z-linked aldolase B gene. **Cytogenetic and genome research**, v. 96, n. 1-4, p. 176-178, 2002.

NANDA, Indrajit et al., Distribution of telomeric (TTAGGG) n sequences in avian chromosomes. **Chromosoma**, v. 111, n. 4, p. 215-227, 2002.

NIETO, L. M.; GUNSKI, R. J. Estudios cromossomicos em Atajacaminos (Aves, Caprimulgidae). **Bolletine Societe Biologique Concepción**, v. 69, p. 161-169, 1998.

NIETO, Leonardo Martin et al., Karyotype morphology suggests that the *Nyctibius griseus* (Gmelin, 1789) carries an ancestral ZW-chromosome pair to the order Caprimulgiformes (Aves). **Comparative cytogenetics**, v. 6, n. 4, p. 379, 2012.

NISHIDA, Chizuko et al., Characterization of chromosome structures of Falconinae (Falconidae, Falconiformes, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation. **Chromosome research**, v. 16, n. 1, p. 171-181, 2008.

NISHIDA-UMEHARA, Chizuko et al., The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. **Chromosome Research**, v. 15, n. 6, p. 721-734, 2007.

OHNO, Susumu. **Sex chromosomes and sex-linked genes**. Springer Science & Business Media, 2013.

PETROV, Dmitri A. et al., Evidence for DNA loss as a determinant of genome size. **Science**, v. 287, n. 5455, p. 1060-1062, 2000.

PIACENTINI, Vítor de Q. et al., Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee/Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia-Brazilian Journal of Ornithology**, v. 23, n. 2, p. 90-298, 2015.

PIGOZZI, M. I.; SOLARI, A. J. The ZW pairs of two paleognath birds from two orders show transitional stages of sex chromosome differentiation. **Chromosome Research**, v. 7, n. 7, p. 541-551, 1999.

POKORNÁ, Martina; KRATOCHVÍL, Lukáš; KEJNOVSKÝ, Eduard. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: Coleonyx elegans and Lacertidae: Eremias velox). **BMC genetics**, v. 12, n. 1, p. 90, 2011.

SASAKI, M.; IKEUCHI, T.; MAKINO, S. A feather pulp culture technique for avian chromosomes, with notes on the chromosomes of the peafowl and the ostrich. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 24, n. 12, p. 1292-1293, 1968.

SCHMID, Michael et al., First report on chicken genes and chromosomes 2000. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 90, n. 3-4, p. 169-218, 2000.

SCHMIDT, M. Second report on chicken genes and chromosomes. **Cytogenet Genome Research**, v. 109, p. 415-479, 2005.

SCHWARTZ, P. A. Caprimulgiform: Order of Birds. **The Encyclopaedia Britannica** London, 2008.

SHETTY, Swathi; GRIFFIN, Darren K.; GRAVES, Jennifer A. Marshall. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. **Chromosome Research**, v. 7, n. 4, p. 289-295, 1999.

SIGRIST, T. Guia de campo avis brasiliis: Avifauna brasileira. **Avis brasiliis editora**. 3 edição, Vinhedo, SP 2013

STEVENS, Lewis. Sex chromosomes and sex determining mechanisms in birds. **Science progress**, v. 80, p. 197-216, 1997.

STIGLEC, Rami; EZAZ, Tariq; GRAVES, JA Marshall. A new look at the evolution of avian sex chromosomes. **Cytogenetic and genome research**, v. 117, n. 1-4, p. 103-109, 2007.

STRAUBE, F. C. Urutau: ave-fantasma. **Atualidades Ornitológicas** V.122, p. 11-12, 2004.

TEGELSTRÖM, H.; RYTTMAN, H. Chromosomes in birds (Aves): evolutionary implications of macro-and microchromosome numbers and lengths. **Hereditas**, v. 94, n. 2, p. 225-233, 1981.

TIERSCH, T. R.; WACHTEL, S. S. On the evolution of genome size of birds. **Journal of Heredity**, v. 82, n. 5, p. 363-368, 1991.

VENTON. Highlight—Small Genomes for the Swift: Of Flight and Intron Size. **Genome biology and evolution**, v. 4, n. 10, p. 1044-1045, 2012.

VICOSO, Beatriz; KAISER, Vera B.; BACHTROG, Doris. Sex-biased gene expression at homomorphic sex chromosomes in emus and its implication for sex chromosome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 16, p. 6453-6458, 2013.

WHITE, Thomas J. et al., Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WRIGHT, A.; GREGORY, T. R.; WITT, C. C. Metabolic 'engines' of flight drive genome size reduction in birds. In: **Proc. R. Soc. B**. The Royal Society. p. 20132780, 2014.

YANO, Cassia Fernanda et al., Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): insights into the differentiation of the Z and W chromosomes. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90946, 2014.

ZHANG, Guojie et al., Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. **Science**, v. 346, n. 6215, p. 1311-1320, 2014.

ZHANG, Qu; EDWARDS, Scott V. The evolution of intron size in amniotes: a role for powered flight?. **Genome biology and evolution**, v. 4, n. 10, p. 1033-1043, 2012.

ZHOU, Qi et al., Complex evolutionary trajectories of sex chromosomes across bird taxa. **Science**, v. 346, n. 6215, p. 1246338, 2014.