

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

SUZIANE ALVES BARCELLOS

**PADRÕES DE ORGANIZAÇÃO DOS MICROCROMOSSOMOS EM ESPÉCIES DA
FAMÍLIA PICIDAE E NOVO MÉTODO DE OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS DE
AVES.**

**SÃO GABRIEL
2022**

SUZIANE ALVES BARCELLOS

**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, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Analía del Valle Garnero

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

**São Gabriel
2022**

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).

Barcellos, Suziane Alves

Padrões de organização dos microcromossomos em espécies da família Picidae e novo método de obtenção de cromossomos de aves / Suziane Alves Barcellos. p_71.

Defesa (Doutorado) -- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2022.

“Orientação: Analía del Valle Garnero”.

1. Cariótipo 2. FISH 3. Cultivo celular 4. Picidae 5. Evolução.

I. Título.

SUZIANE ALVES BARCELLOS

**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, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Dissertação defendida e aprovada em: 12, dezembro de 2022.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Analía del Valle Garnero

Orientador

UNIPAMPA

Prof. Dr. Rafael Kretschmer

UFPeI

Prof. Dr. Tiago Marafiga Degrandi

IIFPG

Prof. Dr. Ricardo José Gunski

UNIPAMPA



Assinado eletronicamente por **ANALIA DEL VALLE GARNERO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 13/12/2022, às 13:39, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **RAFAEL KRETSCHMER, PESSOAL VOLUNTÁRIO**, em 13/12/2022, às 13:47, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Tiago Marafiga Degrandi, Usuário Externo**, em 13/12/2022, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **RICARDO JOSE GUNSKI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 13/12/2022, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1001928** e o código CRC **63A82E37**.

Dedico esta tese aos meus pais Sônia e Amilton, e aos meus avós Márcia e Gabriel.

AGRADECIMENTOS

Gratidão é a palavra que define minha trajetória durante o doutorado.

Agradeço a minha família, principalmente aos meus pais por todo amor, apoio e compreensão.

Agradeço à professora Analía por ter me apresentado ao mundo da citogenética, pela confiança, incentivo, orientação, apoio e amizade.

Ao professor Ricardo pela motivação, disponibilidade de ajudar, pelas inúmeras saídas de campo e por todos os conselhos que só acrescentaram na minha trajetória como pesquisadora.

Ao Marcelo e Victoria, amigos e companheiros de todas as horas, irmãos de coração que a vida me deu.

Ao Tiago, pela amizade, ensinamentos, incentivo, pela disponibilidade ímpar em sempre me ajudar, por tudo que fez e ainda faz por mim.

Ao Rafael, pela amizade, por compartilhar seu conhecimento, pelos incentivos, pela disponibilidade e imensurável ajuda.

Ao Professor Fabiano pelos conselhos e ensinamentos.

Agradeço também pelo apoio dos meus colegas e amigos do Laboratório de Diversidade Genética Animal.

Ao Professor Roberto Artoni, pela co-orientação, por abrir as portas de seu laboratório e possibilitar a aprendizagem de novas técnicas.

À CAPES e ao CNPq pelos auxílios financeiros.

À Lauren e Simona pela amizade, apoio e incontáveis conselhos.

Ao Dr. Erich Jarvis por me receber em seu laboratório, por todo apoio e amizade.

Ao Giulio pela paciência e disponibilidade em me ensinar bioinformática.

Ao Leandro pela amizade e auxílio no projeto de doutorado sanduíche.

À Gabi e Carol pelo apoio, amizade e por deixar mais leve a solidão de viver fora do meu país.

Aos integrantes do VGL e do Laboratório de Neurogenética que me acolheram e fizeram sentir parte dos grupos desde o primeiro dia de trabalho.

“I was taught that the way of progress
was neither swift nor easy”

Marie Curie

RESUMO

Nas últimas décadas, a citogenética vem agregando importantes resultados no estudo evolutivo do cariótipo das aves. A família Picidae, que inclui os pica-paus, compreende cerca de 217 espécies distribuídas em quase todos os ambientes terrestres do planeta. Apesar dos poucos estudos citogenéticos em espécies de pica-paus, foram observados resultados interessantes, como o cromossomo sexual Z sendo o maior elemento do cariótipo, alta variação do número diplóide e da proporção de sequências repetitivas. Estas características influenciaram na escolha da família Picidae para o desenvolvimento desta Tese. Considerando que os estudos citogenéticos necessitam de preparações cromossômicas de alta qualidade, no Capítulo I foi desenvolvido um novo método de obtenção de cromossomos a partir de embriões de aves, do qual propõe uma técnica barata e rápida para a produção de amostras de alta qualidade para a utilização na citogenética clássica e molecular. No Capítulo II, foi realizada a caracterização do complemento cromossômico de quatro pica-paus, sendo descrita pela primeira vez a espécie *Picumnus nebulosus*. Além disso, descreveu-se a organização dos microcromossomos dessas espécies através de análises de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de microcromossomos de *Gallus gallus*, onde pode ser observado um rearranjo inédito em *Veniliornis spilogaster*, uma fusão de um microcromossomo, seguida de uma quebra e inversão. Múltiplas fusões envolvendo microcromossomos em *Melanerpes candidus*, a conservação desses elementos em *Picumnus nebulosus* e poucas fusões em *Colaptes campestris*. E por último, no Capítulo III, foram descritas as contribuições e experiências vivenciadas durante o estágio de doutorado sanduíche no exterior.

Palavras-Chave: Cariótipo; FISH; Cultivo celular; Picidae; Evolução.

ABSTRACT

In the last decades, cytogenetics has added important results for the evolutionary study of the karyotype of birds. The Picidae family, which includes woodpeckers, comprises about 217 species distributed in almost all terrestrial environments on the planet. Despite the few cytogenetic studies in woodpecker species, interesting results were observed, such as the Z sex chromosome being the largest element of the karyotype, high variation in the diploid number and in the proportion of repetitive sequences. These characteristics influenced the choice of the Picidae family for the development of this thesis. Considering that cytogenetic studies require high quality chromosomal preparations, in Chapter I a new method for chromosome harvesting from avian embryos was developed, which proposes a cheap and fast technique for the production of high quality samples for classical and molecular cytogenetics. In Chapter II was carried out the characterization of the chromosomal complement of four woodpeckers, and *Picumnus nebulosus* species was described for the first time. In addition, the organization of microchromosomes of these species was described through Fluorescent in situ Hybridization (FISH) analysis with microchromosome probes from *Gallus gallus*, where an unprecedented rearrangement can be observed in *Veniliornis spilogaster*, a fusion of a microchromosome followed by a break and inversion. Multiple fusions involving microchromosomes in *Melanerpes candidus*, the conservation of these elements in *Picumnus nebulosus* and a few fusions in *Colaptes campestris*. In the last one, Chapter III, were described contributions and experiences during the internship doctoral abroad.

Keywords: Karyotype; FISH; Cell culture; Picidae; Evolution.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figure 1 – Some of the steps in preparing embryos for short-term culture. The embryo was replaced to a sterile petri dish and dissect the head, then it was macerated using sterile scissors and tweezers (A); 2ml trypsin 0.25% EDTA was transferred into the petri dish using a sterile pipette (B); The embryo and the solution were mixed by a 5ml syringe with needle (C); After incubation and washes, the sample was ready to be stored (D).25

Figure 2 – Conventional staining with Giemsa 5%. *S. caerulescens* (a); *E. astrild* (b); *B. striata* (c).....26

Figure 3 – Fluorescent *in situ* hybridization analysis using BAC probes. (a) GGAZ (TGMCBA-27019 Texas red) in *T. musculus*. (b) GGA12 (60P3 Texas red and 4M5 Fluorescein isothiocyanate) in *B. striata*.....27

CAPÍTULO II

Figura 1 – Cariótipos das espécies: *Colaptes campestris* (A), *Veniliornis spilogaster* (B), *Melanerpes candidus* e *Picumnus nebulosus* (D).42

Figura 2 – Esquema dos rearranjos ocorridos no 2° par cromossômico da espécie *Veniliornis spilogaster*.43

Figura 3 – FISH de BACs nas espécies *Colaptes campestris* (A-B), *Veniliornis spilogaster* (C-D), *Melanerpes candidus* (E-F) e *Picumnus nebulosus* (G-H). GGA14 69D20 FITC e 122H14 Texas Red (A); GGA17 42P16 FITC e 375I5 Texas Red (B); GGA13 115I12 FITC e 321B13 Texas Red (C); GGA19 50H12 FITC e 10F1 Texas Red (D); GGA13 115I12 FITC e 321B13 Texas Red (E); GGA21 122K8 FITC e 83I20 Texas Red (F); GGA12 4M5 FITC e 60P3 Texas Red (G); GGA17 375I5 FITC e 42P16 Texas Red (H).45

Figura 4 – Representação esquemática das fusões entre microcromossomos de *Gallus gallus* (GGA) e macrocromossomos das espécies de pica-paus. GGA14 e CCA2 (A); GGA13 e VSP1, GGA12 e VSP2, GGA19 e um macrocromossomo não identificado de VSP, respectivamente (B); GGA13 e MCA3 (C).
.....46

Figura 5 – Experimentos de FISH evidenciando os rearranjos intercromossômicos envolvendo microcromossomos em *Colaptes campestris* (A), *Veniliornis spilogaster* (B) e *Melanerpes candidus* (C-D). GGA13 115I12 FITC e 321B13 Texas Red (A); GGA23 191G17 FITC e 49F3 Texas Red (B); GGA19 50H12 FITC e 10F1 Texas Red (C); GGA24 103F4 FITC e 65O4 Texas Red (D).47

CAPÍTULO III

Figura 1 – Prédio onde está localizado o laboratório de neurogenética.....56

Figura 2 – Parte ampliada demonstra algumas das regiões aceleradas encontradas no gene *MAPT* em *Dryobates pubescens*.61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1 – Comparison table between cell culture methods for bird cytogenetics.....28

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Descrição da morfologia cromossômica de quatro espécies de pica-paus.....40

Tabela 2 – Padrões de organização dos microcromossomos em quatro espécies de pica-paus.....43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ l - Microlitro

2n - Número diplóide

BACs - Cromossomos artificiais bacterianos

BWA - Burrows-Wheeler Aligner

Braço p - Braço curto

Braço q - Braço longo

cm² - centímetro quadrado

°C - Celsius

CCA - *Colaptes campestris*

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CNTNAP2 - Contactin Associated Protein 2

Cot-1 DNA - Supressor de sequências repetitivas de DNA

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

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

FISH - Hibridização *in situ* Fluorescente

FITC - Fluorescein isothiocyanate

GGA - *Gallus gallus*

Hank's - balanced salt solution

IGV - Integrative Genomics Viewer

KCl - Cloreto de potássio

LAL - *Leucopternis albicollis*

MAFFT - Multiple Alignment using Fast Fourier Transform

MAPT - Microtubule Associated Protein Tau

MCA - *Melanerpes candidus*

ml - Mililitro

NCBI - National Center for Biotechnology Information

PAK - Putative Avian Ancestral Karyotype

RPM - Rotação por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SSC - Solução Salina de Citrato de Sódio

UCSC - University of California Santa Cruz

VSP - *Veniliornis spilogaster*

ZAU - *Zenaida auriculata*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A Classe Aves.....	16
1.2 Cultivo celular para estudos de citogenética em aves	16
1.3 Citogenética de aves	17
1.4 Cromossomos sexuais	18
1.5 Microcromossomos.....	18
1.6 Citogenética molecular.....	19
1.7 Sondas de cromossomos artificiais bacterianos (BACs)	19
1.8 A Ordem Piciformes e a família Picidae	20
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3 CAPÍTULO I - Direct chromosome preparation method for avian embryos for cytogenetic studies: quick, easy and cheap	22
4 CAPÍTULO II - Organização de microcromossomos em espécies de pica-paus através de Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente com BACs	34
5 CAPÍTULO III - Estágio no exterior: Experiências e contribuições do doutorado sanduíche na trajetória acadêmica	55
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
7 REFERÊNCIAS	66
8 OUTRAS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Classe Aves

As aves pertencem ao clado Archosauriformes e representam um dos grupos de vertebrados mais bem sucedidos, sendo representadas por aproximadamente 10.770 espécies divididas em 40 ordens (PINHEIRO; SIMÃO-OLIVEIRA; BUTLER, 2020; GILL; DONSKER; RASMUSSEN, 2020). De acordo com a classificação atual, os Neornithes (aves modernas) são representadas por três grupos monofiléticos: Paleognatas, Galloanserae e as Neoaves (JARVIS et al., 2014).

Os membros dessa Classe são consideradas excelentes modelos animais para pesquisas de diversas áreas: neurobiologia, conservação, genética populacional, especiação, filogeografia, biogeografia e macroecologia (JUNG et al., 2019; WILEY; MILLER, 2020). Nos últimos anos, o mandarim (*Taeniopygia guttata*) vem sendo utilizado em estudos de aprendizagem vocal para tentar desvendar os mecanismos envolvidos na linguagem humana (JUNG et al., 2019). Outro exemplo, são os membros da família Picidae (pica-paus), que possuem várias adaptações anatômicas evolutivas para mitigar os impactos no cérebro enquanto bicam, servindo como modelo de investigação para o desenvolvimento de equipamentos de segurança (FARAH; SIWEK; CUMMINGS, 2018; SMOLIGA; WANG, 2019).

Embora a Classe Aves apresente uma grande diversidade de espécies e seja objeto de estudo de diversas pesquisas, pouco se sabe sobre a organização genômica e evolução cariotípica desta classe (DEGRANDI et al., 2020). Desse modo, cientistas têm utilizado distintas abordagens, tais como a citogenética, com o objetivo de mitigar essa lacuna nos estudos da área. A citogenética possui foco no estudo dos cromossomos e cariótipos, na observação do número diplóide, padrões de bandas cromossômicas, morfologia e também nas homologias. Essas características quando analisadas em conjunto podem fornecer importantes informações relacionadas a questões evolutivas (DOBIGNY et al., 2004).

1.2 Cultivo celular para estudos de citogenética em aves

Para o estudo da citogenética de aves é necessário a obtenção de preparações cromossômicas de alta qualidade, devido a grande quantidade de microcromossomos presentes no cariótipo desses animais. Amostras ideais para estudos citogenéticos devem ter um grande número de metáfases, cromossomos

com morfologia distinguíveis e pouca quantidade de citoplasma (KRETSCHMER et al., 2022). Os cromossomos podem ser obtidos através de vários métodos e de diferentes tecidos, tais como pulmões, bulbo de pena, pele, medula óssea, embriões e também por meio de cultivo de linfócitos (MOORHEAD et al., 1960; SASAKI; IKEUCHI; MAKINO, 1968; GARNERO; GUNSKI, 2000; BARCELLOS et al., 2022; KRETSCHMER et al., 2022). Atualmente, o método mais utilizado para as preparações cromossômicas de aves é o cultivo de fibroblastos, no entanto essa técnica demanda muitos reagentes, equipamentos e vários dias de manutenção até a extração (SASAKI; IKEUCHI; MAKINO, 1968).

1.3 Citogenética de aves

Atualmente, existe uma escassez muito grande relacionada a estudos citogenéticos, onde apenas 1.067 espécies de aves, dentre mais de 10.000, possuem cariótipos descritos. Em relação a citogenética molecular, esses números são ainda mais baixos, onde menos de 1% de todas as espécies pertencentes à Classe Aves possuem estudos com pintura cromossômica (DEGRANDI et al., 2020).

Através da citogenética clássica é possível identificar o número diplóide, padrões de bandeamentos cromossômicos e morfologia dos cromossomos, fatores importantes para a organização e descrição cariotípica das espécies (LIEHR, 2022). As aves são consideradas peculiares quanto a sua estrutura cariotípica, sendo o grupo que apresenta o maior número de cromossomos (em geral $2n=80$) dentre todos os vertebrados (DAMAS et al., 2019). O cariótipo dos membros desse grupo possui formato bimodal, composto por muitos pares de microcromossomos e poucos pares de macrocromossomos (KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018a; DAMAS et al., 2019; DEGRANDI et al., 2020). O número cromossômico elevado está relacionado à presença dos microcromossomos, elementos que surgiram no ancestral desses animais, originados pelos eventos de fissões de macrocromossomos e cromossomos médios (GRIFFIN; LARKIN; O'CONNOR, 2019). Além disso, estudos cromossômicos sugerem que o cariótipo é mais conservado entre as linhagens de aves do que entre outros grupos (DE OLIVEIRA et al., 2017; KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018a). Como consequência, pressupõe-se um modelo de evolução genômico onde existe uma baixa taxa de mudanças evolutivas em genomas menores, como observado no genoma das aves (ELLEGRÉN, 2010). No entanto, nas últimas décadas, através da

citogenética foi possível observar variações no complemento cromossômico, fato que demonstra que o genoma das aves não é tão conservado como acreditava-se anteriormente (KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018a).

1.4 Cromossomos sexuais

Os membros da Classe aves exibem um sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW, onde a fêmea é heterogamética (ZW) e o macho homogamético (ZZ) (SCHARTL; SCHMID, 2016). O cromossomo Z possui tamanho relativamente conservado (equivalente em tamanho ao terceiro ou quarto par autossômico), enquanto o cromossomo W possui uma variação significativa, é usualmente pequeno e heterocromático (DAMAS et al., 2019). Porém, existem exceções como *Gallinula melanops*, *Myiopsitta monachus*, *Nyctibius griseus* e algumas espécies de andorinhas, que apresentam um cromossomo W maior do que o normalmente observado (NIETO et al., 2012; FURO et al., 2017; BARCELLOS et al., 2019; GUNSKI et al., 2019). Em contraste, na família Picidae as espécies apresentam um enorme cromossomo Z, que apresenta um acúmulo de sequências repetitivas (DE OLIVEIRA et al., 2017).

1.5 Microcromossomos

Os microcromossomos são importantes elementos do genoma e altamente conservados que estão presentes na história evolutiva em linhagens de mamíferos, répteis e aves. No passado, esses pequenos cromossomos eram vistos somente como acessórios, ou elementos de heterocromatina (NEWCOMER, 1955). No entanto, com estudos citogenéticos juntamente com genômica, foi possível determinar a importância fundamental dos microcromossomos no genoma (WATERS et al., 2021).

Em geral, as aves possuem aproximadamente 30 pares de microcromossomos extremamente pequenos e indistinguíveis morfológicamente (CHRISTIDIS, 1990; GRIFFIN et al., 2007). Outra característica dos microcromossomos é a alta densidade de genes e taxa de recombinação. Apesar da importância no cariótipo das aves, os estudos envolvendo microcromossomos ainda são escassos. Um dos motivos para essa lacuna de dados é a falta de técnicas adequadas para as análises, pois devido ao seu tamanho reduzido é praticamente impossível distingui-los através das de citogenética clássica (CHRISTIDIS, 1990).

1.6 Citogenética molecular

A citogenética molecular auxilia na compreensão da organização e estrutura cromossômica, bem como nas funções evolutivas e de hereditariedade. Nos últimos anos, estudos de pintura cromossômica comparativa em aves utilizando hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem sido feitos para identificar homologias cromossômicas em espécies próximas ou distantemente aparentadas (KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018a). Esta técnica destaca-se pela sua eficácia em estudos de biologia evolutiva (FERGUSON-SMITH et al., 2005; ELLEGREN, 2010). Atualmente, as sondas de cromossomos inteiros mais utilizadas em pintura cromossômica são: *Gallus gallus* (GGA) e *Leucopternis albicollis* (LAL) (GRIFFIN et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2010). Em 2018, desenvolveu-se um novo conjunto de sondas a partir da espécie *Zenaida auriculata* (ZAU), que possui um alto grau sintênico com os macrocromossomos do ancestral hipotético das aves (PAK) e de *G. gallus*, além de demonstrar sinais mais claros de hibridização quando utilizadas em espécies derivadas (KRETSCHMER et al., 2018b).

A pintura cromossômica com sondas de cromossomos inteiros cobre principalmente os macrocromossomos das aves, criando uma lacuna nos estudos dos microcromossomos (KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018a). Além disso, dentre os trabalhos com pintura cromossômica, espécies de Picidae ainda não tiveram seu complemento cromossômico analisado através dessa técnica.

1.7 Sondas de cromossomos artificiais bacterianos (BACs)

Com os avanços da citogenética molecular juntamente com a genômica foi possível desenvolver técnicas para analisar os microcromossomos das aves, como o BAC-FISH. As sondas de microcromossomos de *G. gallus* permitem a identificação de possíveis rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução cariotípica da classe Aves (LITHGOW et al., 2014; DAMAS et al., 2017).

Estudos recentes demonstraram que, apesar de conservados, os microcromossomos também sofreram rearranjos cromossômicos em 7 ordens de aves, apresentando-se como fusões entre microcromossomos e também fusões entre macro e microcromossomos. No entanto, nenhuma fissão desses elementos foi observada (O'CONNOR et al., 2019; KRETSCHMER et al., 2021; DOS SANTOS et al., 2022).

1.8 A Ordem Piciformes e a família Picidae

Os piciformes compreendem uma grande variedade de espécies, dentre elas estão os pica-paus, João-bobos, capitães, arirambas e tucanos (MOOREA; MIGLIAB, 2009; JARVIS et al., 2014). Os pica-paus (Picidae) constituem um grupo muito diverso e intrigante de aves, pertencendo ao clado Coraciimorphae, do qual incluem também as ordens Trogoniformes, Bucerotiformes e Coraciiformes (JARVIS et al., 2014). Essas aves estão dispersas por quase todo o globo terrestre, exceto na Antártica e Australasia (SCHUPPE et al., 2021). A família Picidae, compreende aproximadamente 217 espécies distribuídas em 33 gêneros (DICKINSON; RENSEM, 2013). Apesar dos esforços recentes para clarificar a filogenia dessa família, ainda existem dúvidas sobre como essas espécies se relacionam, principalmente no gênero *Picumnus*, pois esses indivíduos geralmente são mais raros e várias espécies não estão presentes em estudos filogenéticos (SHAKYA et al., 2017).

Do ponto de vista citogenético, os Piciformes costumam apresentar cariótipos atípicos, como por exemplo, mais de 100 cromossomos em tucanos (CASTRO; RECCO-PIMENTEL; ROCHA, 2002; KRETSCHMER et al., 2020). Essa variação pode ocorrer até mesmo entre espécies da mesma família, como no caso dos Picidae, onde *M. candidus* possui $2n=64$, enquanto espécies do gênero *Colaptes* e *Veniliornis* possuem 80 cromossomos ou mais (DE OLIVEIRA et al., 2017; BERTOCCHI et al., 2018). Além disso, apresentam o cromossomo Z como o maior elemento do cariótipo e um acúmulo de sequências repetitivas incomum para as aves, podendo conter mais de 25% dessas sequências em seus genomas (ZHANG et al., 2014; WILEY; MILLER, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir na expansão dos estudos citogenéticos em espécies da família Picidae e desenvolver um novo método para obtenção de cromossomos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um novo método para a obtenção de cromossomos a partir de embriões de aves para estudos citogenéticos;
- Identificar a ocorrência de rearranjos cromossômicos através de hibridização *in situ* fluorescente com sondas de microcromossomos (BACs) de *G. gallus* nas espécies: *Melanerpes candidus*, *Colaptes campestris*, *Veniliornis spilogaster* e *Picumnus nebulosus*.
- Adquirir conhecimento na área de genômica e bioinformática por meio de estágio de doutorado no exterior.

Capítulo I

DIRECT CHROMOSOME PREPARATION METHOD FOR AVIAN EMBRYOS FOR CYTOGENETIC STUDIES: QUICK, EASY AND CHEAP

Suziane Barcellos¹, Marcelo de Souza², Victoria Tura³, Larissa Pereira⁴, Rafael Kretschmer⁵, Ricardo Gunski⁶, Analía Garnero⁷

ABSTRACT

Avian cell culture is widely applied for cytogenetic studies, the improvement of which increasingly allows for the production of high quality chromosomes, essential to perform both classical and molecular cytogenetic studies. Among these approaches, there are two main types: fibroblast and bone marrow culture. Despite its high cost and complexity, fibroblast culture is considered the superior approach due to the quality metaphases produced. Short-term bone marrow cultivation provides more condensed chromosomes but nonetheless is quicker and easier. In the search for a quicker, cheaper way to prepare metaphases without losing quality, the present work developed a novel, widely applicable protocol for avian chromosome preparation. Twenty-one bird embryos from distinct families were sampled: Icteridae, Columbidae, Furnariidae, Estrildidae, Thraupidae, Troglodytidae and Ardeidae. The protocol was based on a combination of modified fibroblast culture and bone marrow cultivation, taking the advantages of both. The results show that all species consistently presented good mitotic indexes and high quality chromosomes. Overall, the application of this protocol for bird cytogenetics can optimize the time, considering that most fibroblast cultures take at least 3 days and often much longer. However, our protocol can be performed in 3 hours with much reduced cost of reagents and equipment.

Keywords Aves; Cell cultivation; Chromosomes; Metaphases; Method.

Journal: DNA (mdpi)

Submission: 05/11/2021.

Acceptance date: 17/01/2022.

DOI: 10.3390/dna2010002

INTRODUCTION

Since the early 1900s bird chromosomes have been investigated by classical and molecular approaches. In spite of avian cytogenetics playing an important role in evolutionary studies, less than 10% of all bird species have a karyotype description so far and nearly all of these are only partial karyotypes [1]. Birds have a bimodal karyotype and a ZZ/ZW sex chromosome system [2]. One of the most remarkable characteristics in their karyotypes is the large number of microchromosomes, which encode a high rate of important genes [3]. Regarding diploid numbers, they display a wide range, from 40 to 142. Despite this variation, more than 50% of birds have between 78 and 82 chromosomes [1].

Working with wild birds is always challenging, due to the limitations associated with animal sampling [4]. Even though some samples can be collected from birds in captivity, it is still hard to do this in some species without negatively affecting their health [5].

Avian cytogenetic studies require cell cultures that provide high quality metaphases for chromosomes analysis, as well as the application of classical and molecular techniques, such as karyotyping, chromosome banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). In recent years, FISH analysis has played an important role in evolutionary studies, revealing chromosomal homologies and rearrangements [6]. Due to the large amount of microchromosomes and the difficulty in distinguishing them, cells need to be free from residual content such as cytoplasm, which could cause analysis issues. In general, fibroblast culture is the most applied protocol to get high quality avian metaphases [7-12]. However, some authors use short-term bone marrow cultivation to perform cytogenetic experiments [13-16].

In 1968, Sasaki, Ikeuchi and Makino [17] developed a fibroblast cell culture protocol in order to get bird metaphases. Although this protocol has been widely used, there are limiting factors for its application, such as expensive reagents and equipment, contamination risk and long-term culture, which can last several weeks. In addition, cell culture protocols with a few modifications such as temperature and time of cultivation have also been used [7-10]. On the other hand, the short-term bone marrow culture is a low cost technique in comparison, however, the metaphase quality is typically poorer due to the accumulation of residual content such as cytoplasm and typically short, condensed chromosomes [18]. Another short-term cell

culture that can be applied for this approach is the colchicized embryo technique developed by Bloom and Buss (1966) [19] and Bloom (1969) with modifications [20].

The purpose of this study was to develop a low cost, short-term cell culture for avian cytogenetic studies that combined the ease of bone marrow culture with the quality of fibroblast culture using fertilized eggs as a starting material.

MATERIALS AND METHODS

BIRD-EMBRYO CELL CULTURE PREPARATION

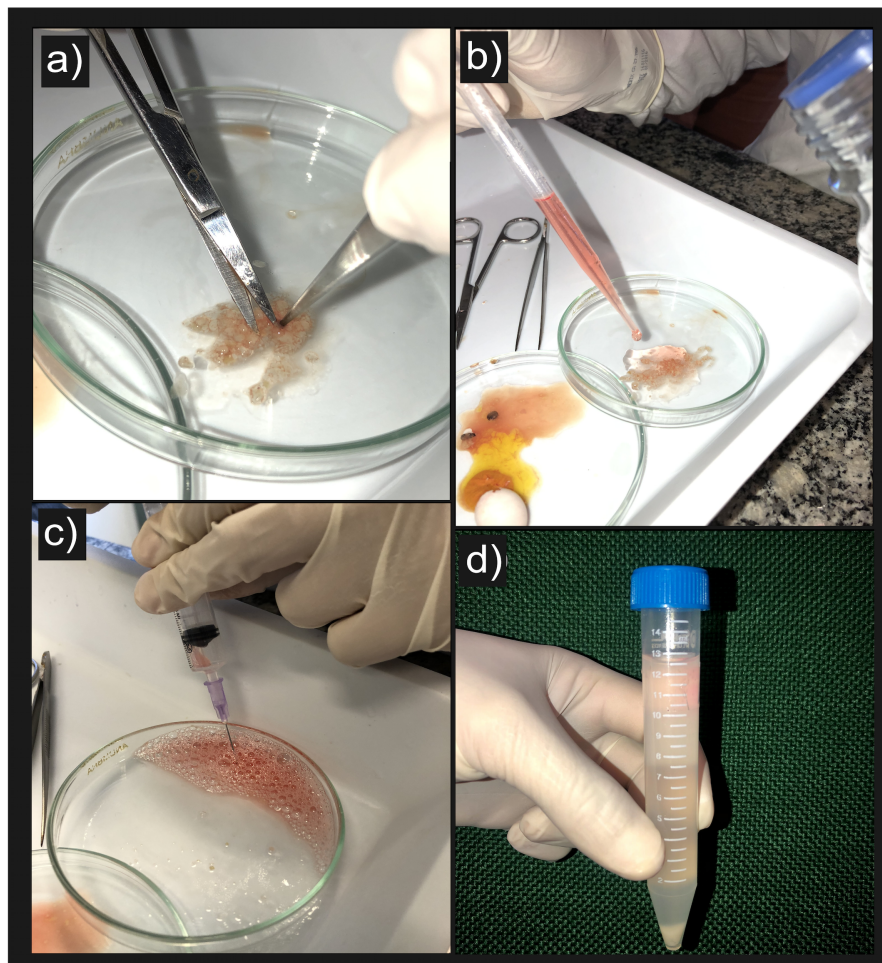
For this technique, it was used 3 fertile bird eggs from individuals of distinct families of birds i.e. Icteridae (*Molothrus bonariensis*), Columbidae (*Columbina picui*), Furnariidae (*Synallaxis frontalis*), Estrildidae (*Estrilda astrild*), Thraupidae (*Sporophila caerulescens*), Troglodytidae (*Troglodytes musculus*), and Ardeidae (*Butorides striata*), ranging from 10 to 15 days old. All samples were collected following the protocols approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA 019/2020) and Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO 61047-3/33860-2).

To begin with, the eggs were examined by candling, holding them in front of a bright light. Shells were cleaned wiping with 70% ethanol and allowing it to air-dry. Then, the egg air sac was found and marked with a pencil. Subsequently, the shell above the air sac was removed with sterile forceps, without touching the egg membrane. Then, the membrane was removed, exposing the embryo, which was placed into a sterile petri dish with egg content. After that, the embryo was removed to another sterile petri dish. To prepare cell suspension, the embryo was washed with 2 ml of Hanks' balanced salt solution 1x and then we dissected the embryo head using a sterile scissor. The Hanks' solution was discarded, and it was macerated (shown in Figure 1a). Subsequently, a 5 ml syringe with a needle and pipette were used in order to help mixing the embryo with the 2 ml of trypsin 0.25% EDTA (shown in Figures 1b, c). Using a sterile pipette, the sample was placed into a 15 ml conical tube with 2 ml of trypsin 0.25% EDTA and mixed until the complete tissue disaggregation, for approximately 10 minutes. Afterwards, it was added 1 ml of fetal bovine serum to inactivate the trypsin solution. The content was placed into a new tube containing 10 ml of RPMI 1640 medium pre warmed at 37°C and mixed. Then, 3

drops of colchicine 0.01% was added. The sample was incubated at 37°C for 1 hour, and then subsequently centrifuged for 10 minutes at 1000 rpm (room temperature). The supernatant was removed and suspended the cell pellet into 10 ml of hypotonic solution (0.075 M KCl) at 37°C for 20 minutes. Finally, 1 ml of methanol and acetic acid (3:1) solution was added in order to fix the samples. The process was repeated 3 times with 10 ml of methanol and acetic acid (3:1) each at 1000 rpm for 10 minutes before storage at -20°C (shown in Figure d). From start to finish, the whole protocol took less than 3 hours.

Metaphases were stained with Giemsa 5% in phosphate buffer pH 6.8 for 5 min. Figures were photographed with an optical microscope (OLYMPUS DP53) and cellSens Imaging software (OLYMPUS).

Figure 1 – Some of the steps in preparing embryos for short-term culture. The embryo was replaced to a sterile petri dish and dissect the head, then it was macerated using sterile scissors and tweezers (A); 2ml trypsin 0.25% EDTA was transferred into the petri dish using a sterile pipette (B); The embryo and the solution were mixed by a 5ml syringe with needle (C); After incubation and washes, the sample was ready to be stored (D).



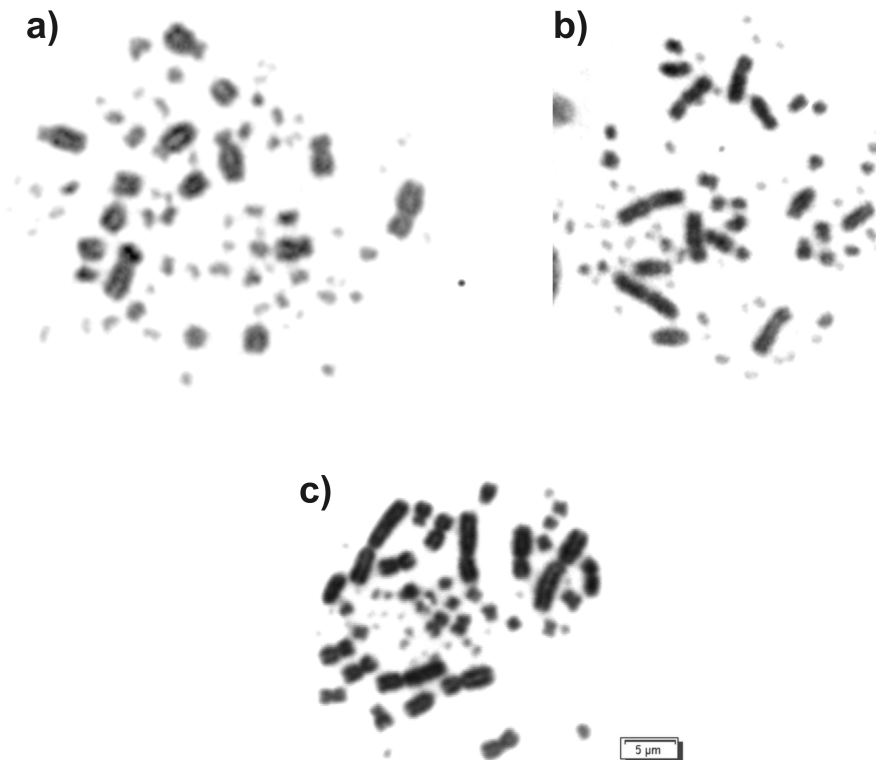
FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION (FISH)

In order to test the effectiveness of FISH analysis in these chromosomal preparations, we chose two sets of probes. Bacterial artificial chromosomes (BACs) from *G. gallus* microchromosomes (GGA12) and the sex chromosome Z (GGAZ) were respectively applied in the *B. striata* and *T. musculus* species. FISH experiments were performed according to O'Connor et al. (2019). The results were photographed using an epifluorescence microscope (Olympus BX61).

RESULTS

Overall, all bird species sampled by this new embryo short-term protocol presented high quality metaphases. Figure 2 displays three individuals sampled by this protocol. The chromosomal number found in these species was the same as previously cited in literature, *S. caerulescens* $2n= 78$, *E. astrild* $2n= 78$ and *B. striata* $2n= 60$ [22-26].

Figure 2 – Conventional staining with Giemsa 5%. *S. caerulescens* (a); *E. astrild* (b); *B. striata* (c).

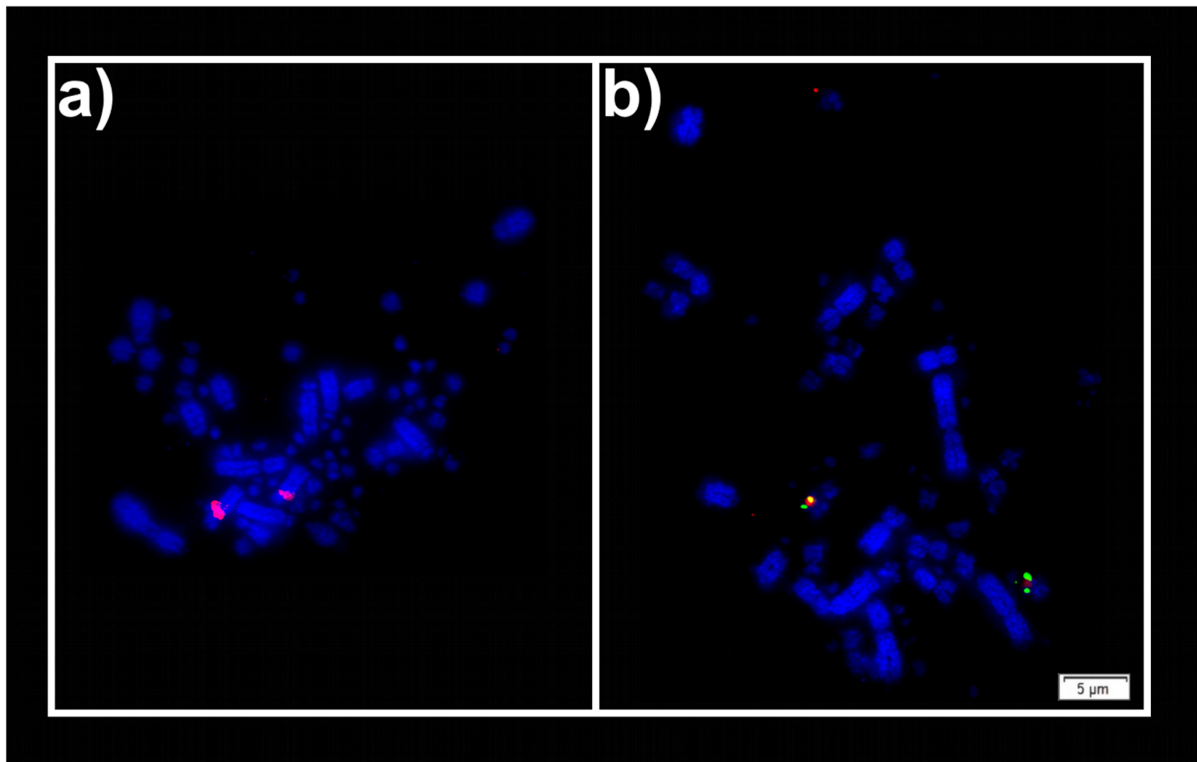


Although we did not perform specific statistical analysis of mitotic indexes, they were nonetheless high in all samples and more than good enough for our purposes. Several metaphases were present in each field of view for all samples.

The estimated time for all process, from the embryo disassociation to slide preparation was less than 3 hours with extra time necessary for staining, FISH and microscopy.

The BAC probes were successfully hybridized, GGA12 in one microchromosome pair of *B. striata*, as well as GGAZ in the Z chromosome of *T. musculus*. FISH results are shown in Figure 3.

Figure 3 – Fluorescent *in situ* hybridization analysis using BAC probes. (a) GGAZ (TGMCBA-27019 Texas red) in *T. musculus*. (b) GGA12 (60P3 Texas red and 4M5 Fluorescein isothiocyanate) in *B. striata*.



DISCUSSION

Generating suitable quality metaphases in a reasonable time frame is the basis for all cytogenetic experiments. In this study, we combined the benefits of bone marrow cultivation techniques with fibroblast culture.

Long-term fibroblast culture, from embryonic and non-embryonic cells such as muscle, liver, skin, and lungs have been the most applied technique to getting bird chromosomes [7,8,27,29]. However, these protocols require extensive time

cultivation, large quantity of reagents and specific equipment, for instance a CO₂ incubator [9,10]. The colchicized embryo technique is also a good option for obtaining bird metaphases, however as the bone marrow cell culture, it contains residual cytoplasm, which can cause hybridization issues for FISH analysis [19, 20, 30, 31].

This new method presents several benefits when compared to other types of cell cultures used for avian cytogenetics: (1) it is easier, cheaper and quicker than fibroblast cell culture protocols. Most of the previous fibroblast culture methods take more than 3 days, some of them more than 2 weeks, to obtain good quality metaphases [7-9, 27,28]. By contrast, the method described here takes around 3 hours in total; (2) One bird embryo provides numerous metaphases of high quality; (3) The method requires only a few equipment and reagents; (4) Low contamination rate. For fibroblast cultures, one of the major challenges is to avoid the contamination that can cause the lost of the samples. In contrast, our protocol can cope this issue due to the short amount of cultivation time. A comparison table (Table 1) shows more closely the advantages and disadvantages of most common cell culture techniques.

Table 1- Comparison table between cell culture methods for bird cytogenetics.

Techniques	Advantages	Disadvantages
Colchicized embryo technique developed by Bloom and Buss (1966)[19]	<ul style="list-style-type: none"> - Good quality chromosomes - Short-term cultivation (approximately 2h) - Requires only a few reagents 	<ul style="list-style-type: none"> - Accumulation of residual content in the metaphases
Fibroblast cell culture developed by Sasaki, Ikeuchi and Makino (1968)[17]	<ul style="list-style-type: none"> - High quality chromosomes - Metaphases free of cytoplasm 	<ul style="list-style-type: none"> - Long term cultivation (weeks) - Requires many equipment and reagents - Risk of contamination
Colchicized embryo technique developed by Bloom (1969)[20]	<ul style="list-style-type: none"> - Good quality chromosomes - Short-term cultivation (approximately 1h) - Requires only a few reagents 	<ul style="list-style-type: none"> - Accumulation of residual content in the metaphases - Limited number of metaphases per embryo due to the absence of passages
Bone marrow developed by Garnero and Gunski (2000)[18]	<ul style="list-style-type: none"> - Short-term cultivation (approximately 1h) - Requires only a few reagents 	<ul style="list-style-type: none"> - Accumulation of residual content in the metaphases - Condensed chromosomes - Limited number of metaphases per individual

		due to the absence of passages
Fibroblast (skin and liver) developed by Itoh and Arnold (2005)[9]	<ul style="list-style-type: none"> - High quality chromosomes - Possibility of increasing the metaphases amount by the passages 	<ul style="list-style-type: none"> Long term cultivation (one week) - Requires many equipment and reagents - Risk of contamination
Cell culture developed by Tsuda and Umehara (2007)[10]	<ul style="list-style-type: none"> - High quality chromosomes - Possibility of increasing the metaphases amount by the passages 	<ul style="list-style-type: none"> Long term cultivation (more than 48h) - Requires many equipment and reagents - Risk of contamination
Method described in this paper	<ul style="list-style-type: none"> - Short-term cultivation (1h) - Requires only a few reagents and equipment - High quality chromosomes - Contamination issues don't affect the quality of the culture 	<ul style="list-style-type: none"> -Limited number of metaphases per embryo due to the absence of passages

Bone marrow or fibroblast cultures that use organs of adult individuals need to sacrifice the bird, which can be problematic if these animals were in the reproductive season [8-16]. Considering that more than 80% of all bird species both parents provide care, if one of the parents were sacrificed its progeny will probably die [29,32]. Furthermore, there is no guarantee that the offspring will survive until adulthood, due to nest predation and all difficulties in the growing process [33-35]. Besides the high energy expenditure during reproduction, most females are still able to re-lay eggs in the same season, in case of the first attempt didn't succeed [33,35-37]. Thus, this is another advantage for bird embryo short-term culture protocol that tries to mitigate the environmental impact. Furthermore, the metaphases present better quality than those obtained by short-term bone marrow culture [18].

Avian cytogenetics is concerned with genome reconstruction and comparative genomics [6]. Molecular cytogenetics has to keep pace with the number of species that are being sequenced and rapid methods such as this for chromosome preparation are increasingly essential [38,39]. High quality preparations with longer chromosomes allow for the mapping of predicted chromosome fragments (PCFs)

more accurately and cleaner preparations mean that cross species hybridizations are more likely to work.

Towards this end, the present study provided a new method for cell culture that can be widely applied for cytogenetic studies in bird species

Author Contributions: Conceptualization, S.B.; methodology, S.B.; M.S. and R.K.; software, S.B.; validation, S.B., R.J. and A.G.; formal analysis, S.B. and R.J.; investigation, S.B. and M.S.; resources, S.B., R.J. and A. G.; data curation S.B.; writing—original draft preparation, S. B.; writing—review and editing, S.B., M.S., V.T., L. P., R. K., R.J. and A.G.; visualization, S.B. and M.S.; supervision, R.J. and A.G.; project administration, R.J. and A.G.; funding acquisition, S.B., R.J. and A.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA/SISBIO 61047-1) and approved by the Ethics Committee on the use of animals of Universidade Federal do Pampa (CEUA 019/2020, November 30th, 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank all members of the “Grupo de Pesquisa Diversidade Genética Animal” from UNIPAMPA and the professor Darren K. Griffin who kindly provided the BAC probes.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Degrandi, T.M.; Barcellos, S.A.; Costa, A.L.; Garnerio, A.D.V; Hass, I.; Gunski, R.J. Introducing the Bird Chromosome Database: An Overview of cytogenetic studies in birds. *Cytogenet. Genome Res.* **2020**, *160*, 199-205. <https://doi.org/10.1159/000507768>
2. Scharl, M.; Schmid, M.; Nanda, I. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. *Chromosoma.* **2016**, *125*, 553–571. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0569-y>
3. Schmid, M. et al. First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenet. Genome Res.* **2000**, *90*, 169-218.
4. Romero, L.M; Romero, R.C. Corticosterone responses in wild birds: the importance of rapid initial sampling. *The Condor* **2002**, *104*, 129-135. <https://doi.org/10.1159/000056772>
5. Brown, M.B; Brown, C.R. Blood sampling reduces annual survival in cliff swallows (*Petrochelidon pyrrhonota*). *The Auk* **2009**, *126*, 853-861. <https://doi.org/10.1525/auk.2009.09048>
6. Kretschmer, R.; Ferguson-Smith, M.A.; De Oliveira, C.H.E. Karyotype evolution in birds: From conventional staining to chromosome painting. *Genes* **2018**, *9*, 1-19. <https://doi.org/10.3390/genes9040181>
7. Habermann, F.A. et al. Arrangements of macro-and microchromosomes in chicken cells. *Chromosome Research* **2001**, *9*, 569-584. <https://doi.org/10.1023/A:1012447318535>
8. Indrajit, N.; Schrama, D.; Feichtinger, W.; Haaf, T.; Scharl, M.; Schmid, M. Distribution of telomeric (TTAGGG) in sequences in avian chromosomes. *Chromosoma* **2002**, *111*, 215-227. <https://doi.org/10.1007/s00412-002-0206-4>
9. Itoh, Y.; Arnold, A.P. Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the zebra finch. *Chromosome Research* **2005**, *13.1*, 47-56. <https://doi.org/10.1007/s10577-005-6602-x>
10. Tsuda, Y.; Nishida-Umehara, C.; Ishijima, J.; Yamada, K.; Matsuda, Y. Comparison of the Z and W sex chromosomal architectures in elegant crested tinamou (*Eudromia elegans*) and ostrich (*Struthio camelus*) and the process of sex chromosome differentiation in palaeognathous birds. *Chromosoma* **2007**, *116*, 159-173. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0088-y>
11. Degrandi, T.M. et al. Comparative chromosome painting in hummingbirds (Trochilidae). *Genet* **2020**, *43*, 1-7. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2020-0162>
12. Rodrigues, B.S. et al. Chromosome painting in Tyrant Flycatchers confirms a set of inversions shared by Oscines and Suboscines (Aves, Passeriformes). *Cytogenet. genome res.* **2017**, *153*, 205-212. <https://doi.org/10.1159/000486975>

13. Pigozzi, M.I.; Solari, A.J. Germ cell restriction and regular transmission of an accessory chromosome that mimics a sex body in the zebra finch, *Taeniopygia guttata*. *Chromosome Research* **1998**, *6*, 105-113. <https://doi.org/10.1023/A:1009234912307>
14. Degrandi, T.M. et al. The distribution of 45S rDNA sites in bird chromosomes suggests multiple evolutionary histories. *Genet* **2020**, *43*, 1-10. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2018-0331>
15. Poignet, M. et al. Comparison of karyotypes in two hybridizing passerine species: conserved chromosomal structure but divergence in centromeric repeats. *Frontiers in genetics* **2021**, *12*, 768987-76898. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.768987>
16. Pinheiro, M.L.S. et al. Chromosomal painting of the sandpiper (*Actitis macularius*) detects several fissions for the Scolopacidae family (Charadriiformes). *BMC Ecology and Evolution* **2021**, *21*, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12862-020-01737-x>
17. 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. *Experientia*. **1968**, *24*, 1292–1293. <https://doi.org/10.1007/BF02146680>
18. Garnero, A.D.V.; Gunski, R.J. Comparative analysis of the karyotype of *Nothura maculosa* and *Rhynchotus rufescens* (Aves: Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. *The Nucleus*. **2000**, *43*, 64–70.
19. Bloom, S.E., Buss, E.G. Triploid-diploid mosaic chicken embryo. *Science*, **1966**, *153*, 759-760.
20. Bloom, S.E. Chromosome abnormalities in early chicken (*Gallus domesticus*) embryos. *Chromosome* **1969**, *28*, 357-369.
21. O'Connor, R.E. et al. Patterns of microchromosome organization remain highly conserved throughout avian evolution. *Chromosoma* **2019**, *128*, 21-29. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0685-6>
22. Les Christidis. Chromosomal evolution within the family Estrildidae (Aves) III. The Estrildae (waxbill finches). *Genetica* **1987**, *72(2)*, 93-100. <https://doi.org/10.1007/BF00123167>
23. De Lucca E.J. Cariótipo de oito espécies de Aves. *Revista Brasileira de Biologia* **1974**, *34*, 387-392.
24. Carvalho M.W. Estudos Citogenéticos na Família Fringillidae (Passeriformes: Aves). Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 1989.
25. Les Christidis. Animal cytogenetics 4: Chordata 3 B: Aves. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Germany, 20-59, 1990.

26. Vielmo, P.G. Bandeamentos cromossômicos em *butorides striata* (aves: pelecániformes) revelam um padrão distinto para o cromossomo W. São Gabriel: Universidade Federal do Pampa, 2019.
27. Griffin, D.K. et al. Micro- and macrochromosome paints generated by flow cytometry and microdissection: tools for mapping the chicken genome. *Cytogenet Cell Genet* **1999**, 87, 278–281. <https://doi.org/10.1159/000015449>
28. Ahlroth, M.K. et al. Characterization and chromosomal localization of the chicken avidin gene family. *Animal genetics* **2000**, 31, 367–375. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2000.00681.x>
29. Cockburn A. 2006 Prevalence of different modes of parental care in birds. *Proc. R. Soc. B.* **2006**, 273, 1375–1383. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3458>
30. Bloom, S.E. Haploid chicken embryos: Evidence for diploid and triploid cell populations. *Heredity* **1970**, 61, 147-150.
31. Bloom, S.E. Chromosome abnormalities in the chicken (*Gallus domesticus*) embryos: Types, frequencies and phenotypic effects. *Chromosome* **1972**, 37, 309-326.
32. Goymann W.; Safari I.; Muck C.; Schwabl I. Sex roles, parental care and offspring growth in two contrasting coucal species. *R. Soc. open sci.* **2016**, 167, 413-425. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.160463>
33. Martin, T.E. Avian life history evolution in relation to nest sites, nest predation and food. *Ecol. Monogr.* **1995**, 65, 101–127. <https://doi.org/10.2307/2937160>
34. Cox, W.A.; Thompson III R.F.; Cox, A.S.; Faaborg, J. Post fledging survival in passerine birds and the value of post fledging studies to conservation. *J. Wildl. Manag.* **2014**, 78, 183-193. <https://doi.org/10.1002/jwmg.670>
35. Ibáñez-Álamo, J.D. et al. Nest predation research: recent findings and future perspectives. *Journal of Ornithology* **2015**, 156, 247-262. <https://doi.org/10.1007/s10336-015-1207-4>
36. Burger, J.R.; Loren, W. et al. Reproductive strategies, success, and mating systems of northern bobwhite in Missouri. *J. Wildl. Manag.* **1995**, 59, 417-426. <https://doi.org/10.2307/3802447>
37. Thompson, B.C.; Knadle, G.E.; Brubaker, D.L.; Brubaker, K.S. Nest Success Is Not an Adequate Comparative Estimate of Avian Reproduction (El Éxito al Anidar no es un Estimado Comparativo Adecuado de la Reproduccion en Aves). *J. Field. Ornithol.* **2001**, 72, 527-536. <http://www.jstor.org/stable/4514628>
38. Feng, S. et al. Dense sampling of bird diversity increases power of comparative genomics. *Nature* **2020** 587, 252-257. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2873-9>
39. Rhie, A. et al. Towards complete and error-free genome assemblies of all vertebrate species. *Nature* **2021**, 592, 737-746. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03451-0>

CAPÍTULO II

ORGANIZAÇÃO DE MICROCROMOSSOMOS EM ESPÉCIES DE PICA-PAUS ATRAVÉS DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE COM BACs

Artigo será submetido à revista Genes

RESUMO

Os pica-paus possuem características citogenéticas interessantes, tais como uma grande variação no número diplóide, onde algumas espécies podem ter mais de 100 cromossomos, além do incomum acúmulo de sequências repetitivas no genoma e o cromossomo Z sendo o maior elemento do cariótipo. Apesar da importância e diversidade de espécies existe uma enorme escassez relacionada aos estudos genômicos dos membros da família Picidae. Portanto, o objetivo desse trabalho foi descrever os padrões da organização dos microcromossomos das espécies *Colaptes campestris*, *Veniliornis spilogaster*, *Melanerpes candidus* e *Picumnus nebulosus* através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de cromossomos artificiais bacterianos (BACs) de microcromossomos de *Gallus gallus*. *P. nebulosus*, a espécie mais basal dentre as analisadas, teve seu cariótipo descrito pela primeira vez onde apresentou 110 cromossomos. Os resultados demonstraram que apesar da conservação dos microcromossomos ser observada em várias linhagens de aves, os Picidae apresentaram diversos rearranjos intercromossômicos envolvendo esses elementos. A espécie *V. spilogaster* apresentou um rearranjo único nunca observado em aves através de BAC-FISH, a fissão de um microcromossomo. Também foi possível observar que o baixo número diplóide de *M. candidus* ocorreu devido às fusões de microcromossomos. No entanto, *P. nebulosus* não apresentou nenhum tipo de rearranjo, sugerindo que possam ter ocorrido fissões de macrocromossomos ancestrais nessa espécie devido ao elevado número de microcromossomos. Em suma, o presente estudo caracterizou pela primeira vez a organização de microcromossomos por meio de BAC-FISH em de quatro espécies de Picidae. Adicionalmente, os resultados contribuíram para a expansão dos estudos na área de citogenômica de aves, revelando que os microcromossomos apesar de serem considerados conservados, podem estar envolvidos em rearranjos cromossômicos em distintas ordens de aves.

Palavras-Chave: Rearranjos; Citogenética; Evolução; Cromossomo, BAC-FISH.

1 INTRODUÇÃO

Os Piciformes representam um grupo de aves de pequeno e médio porte que habitam áreas arbóreas, utilizando este ambiente para sua sobrevivência, bem como para nidificação e esconderijo. Esta ordem é composta por oito famílias, das quais cinco podem ser encontradas no continente americano: Picidae (pica-paus), Buconidae (joão-bobo), Capitonidae (capitães), Galbulidae (arirambas) e Rhamphastidae (tucanos) (MOOREA; MIGLIAB, 2009). A família Picidae é altamente diversa e composta por 236 espécies amplamente distribuídas ao redor do mundo, possuindo importância em modelos de estudos nas áreas de filogeografia, macroecologia e biogeografia (BI et al., 2019; WILEY; MILLER, 2020). Apesar dos recentes avanços nos estudos filogenéticos, ainda existem algumas relações incertas em Picidae, especialmente na subfamília Picumninae (DUFORT, 2016; SHAKYA et al., 2017).

Do ponto de vista citogenético, apresentam uma grande variação no número diplóide, de 64 a 108 cromossomos, e também destacam-se devido a presença de um enorme cromossomo sexual Z, sendo o maior elemento do cariótipo (SHIELDS, 1982; DE OLIVEIRA et al., 2017). Em geral, possuem um número cromossômico elevado podendo ultrapassar de 100 cromossomos em algumas espécies. No entanto, existem exceções como a espécie *Melanerpes candidus* que possui $2n=64$. Além disso, espécies de Picidae como *Colaptes campestris*, *Colaptes melanochloros* e *Melanerpes candidus* apresentaram uma variabilidade morfológica dos macrocromossomos quando comparados com o cariótipo ancestral hipotético das aves (DE OLIVEIRA et al., 2017). Os membros dessa família possuem características genômicas peculiares quando comparados a outras espécies da classe Aves. Em relação a quantidade de DNA repetitivo, a família Picidae demonstra a maior proporção desses elementos entre o genoma das aves, com mais de 25,8% na espécie *Melanerpes aurifrons* (ZHANG et al., 2014; WILEY; MILLER, 2020). Além disso, apresentaram um acúmulo incomum de sequências repetitivas no cromossomo Z (DE OLIVEIRA et al., 2017).

A presença de microcromossomos é uma característica universal em todas as aves. Esses cromossomos também podem ser observados no cariótipo de várias

espécies de répteis e anfíbios primitivos (BURT, 2002; ELLEGREN, 2010; WATERS et al., 2021). Nas fêmeas da espécie *Gallus gallus*, 23% de seu genoma é constituído por microcromossomos (KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018). Durante muito tempo, os microcromossomos foram considerados componentes não essenciais do genoma das aves. No entanto, com o avanço dos trabalhos em organização genômica observou-se que esses cromossomos desempenham funções importantes, como a codificação de até 50% dos genes (SMITH et al., 2000). Além disso, possuem uma taxa de recombinação quase cinco vezes maior do que em mamíferos (BURT, 2002). Por esses motivos, estudos envolvendo os microcromossomos das aves são de extrema importância para compreender a organização e função desses elementos na evolução do genoma (GRAVES; SHETTY, 2000; ELLEGREN, 2010).

Uma alternativa para uma melhor cobertura nos estudos do complemento cromossômico é a utilização de ferramentas moleculares, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de cromossomos artificiais bacterianos (BACs) (DAMAS et al., 2017). Essa técnica permite identificar os microcromossomos ancestrais envolvidos nos rearranjos inter-microcromossômicos e até mesmo fusões entre micro e macrocromossomos. Como consequência, a aplicação de FISH com BACs vem sendo considerada um avanço para os estudos citogenéticos, visto que a identificação de rearranjos envolvendo microcromossomos não era possível de ser realizada devido à falta de ferramentas e protocolos adequados (LITHGOW et al., 2014).

De modo geral, a organização dos microcromossomos em aves demonstra um alto grau de conservação (LITHGOW et al., 2014; O'CONNOR et al., 2019; KRETSCHMER et al., 2021a). Dentre as ordens de aves analisadas através de BAC-FISH de microcromossomos de *G. gallus* (GGA) e até o presente momento, somente Falconiformes, Psittaciformes, Caprimulgiformes, Cuculiformes, Suliformes, Charadriiformes e Passeriformes apresentaram rearranjos envolvendo esses pequenos elementos genômicos (DOS SANTOS et al., 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar e compreender os rearranjos cromossômicos envolvendo microcromossomos que atuaram na evolução do cariótipo de quatro espécies da família Picidae.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar e comparar os cariótipos de 4 espécies: *Melanerpes candidus*, *Colaptes campestris*, *Veniliornis spilogaster* e *Picumnus nebulosus* visando compreender os processos de diferenciação cariotípica que atuaram no grupo durante a evolução;
- Identificar a ocorrência de rearranjos cromossômicos através de hibridização *in situ* fluorescente com sondas de microcromossomos (BACs) de *G. gallus* e sua contribuição para os eventos de especiação;
- Contribuir para a compreensão da organização dos microcromossomos em diferentes espécies da família Picidae.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem de espécies

Foram analisadas quatro espécies pertencentes a família Picidae: *Melanerpes candidus* (1 macho), *Colaptes campestris* (1 fêmea), *Veniliornis spilogaster* (1 fêmea) e *Picumnus nebulosus* (1 macho). Os indivíduos foram coletados por meio da utilização de redes do tipo *mist net*, nos municípios de Porto Vera Cruz e São Gabriel - Rio Grande do Sul, Brasil. Todos os procedimentos de captura e coleta de amostras foram realizados sob condições estabelecidas na licença do SISBIO previamente aprovada sob número 33860–1 e 44173–1 e também em conformidade ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - Universidade Federal do Pampa, 010/2018).

3.2 Obtenção dos cromossomos

Para obtenção dos cromossomos mitóticos, foram aplicados dois métodos

distintos: cultivo de fibroblastos (SASAKI; IKEUCHI; MAKINO, 1968) e cultura direta de medula óssea de curta duração (GARNERO; GUNSKI, 2000).

O cultivo de fibroblastos, realizou-se a partir da retirada de uma biópsia do pulmão e rins dos espécimes, que posteriormente foram lavadas com solução salina (Hank's) e fracionadas em uma placa de petri com auxílio de uma pinça e tesoura estéreis. Em seguida, colocou-se o tecido em um tubo de centrifuga de 15 ml com 2 ml de colagenase tipo IV, onde foram incubadas a 37°C por 1 hora em estufa. Após a dissociação dos tecidos foi acrescentado 5 ml de meio DMEM e centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, esta etapa repetiu-se por duas vezes. O *pellet* foi transferido para garrafas de cultivo celular (25 cm²) contendo 8ml de meio DMEM acrescido de antibióticos e fungicida e 2 ml soro bovino fetal, ambos em temperatura ambiente. Após alguns dias de cultivo, observou-se um ótimo nível de crescimento celular, e então foi dado início aos procedimentos para a extração dos cromossomos. Foram adicionados 100 µl de colchicina 0,05% em cada garrafa de cultivo, que foram incubadas por 4 horas a 37°C. Após incubação, adicionou-se 1 ml de solução salina (Hanks) que ficou em contato com a amostra por aproximadamente 5 minutos, em seguida verteu-se a solução para um tubo de centrifuga de 15 ml. Logo após, foram adicionadas 2 ml de solução de tripsina EDTA 0,25% e as células soltaram-se das garrafas sendo transferidas para o tubo. Posteriormente, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, descartou-se o sobrenadante e as células sedimentadas e iniciou-se o tratamento com solução hipotônica (KCl 0,075M) durante 9 minutos a 37°C, em seguida acrescentou-se 1 ml de fixador (metanol e ácido acético na proporção 3:1) ao tubo. As células foram ressuspensas cuidadosamente por 20 vezes e centrifugadas por 10 minutos a 1100 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado, adicionou-se 8 ml de fixador para dar início a etapa de fixação da amostra. Após a ressuspensão, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm, repetiu-se esse processo por mais 3 vezes e o *pellet* foi armazenado em freezer até o momento de sua utilização.

Para a realização da cultura direta de curta duração, retirou-se da medula óssea do fêmur do exemplar com o auxílio de uma seringa hipodérmica de 5ml com agulha estéril que foi colocado em uma placa de Petri com 5ml meio RPMI previamente aquecido a 37°C, a mesma foi dissociada com auxílio da seringa, o material foi transferido para um tubo de centrifuga de 15 ml e incubado com 3 gotas

de colchicina (0,05%) por 1h em banho maria a 37°C. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm, descartou-se o sobrenadante e as células sedimentadas foram tratadas com solução hipotônica (KCl, 0,075M) por 20 minutos a 37°C, após foi acrescentada 1 ml de solução fixadora. A amostra foi ressuspensa cuidadosamente e centrifugada por 10 minutos a 1100 rpm, o sobrenadante foi retirado, este processo foi realizado durante 3 vezes e posteriormente a amostra foi armazenada no freezer até o momento do uso.

3.3 Citogenética clássica

Para as análises foram utilizadas lâminas novas e lavadas. As amostras foram ressuspensas cuidadosamente várias vezes em seus tubos, com o auxílio de pipetas de Pasteur. Posteriormente, despejou-se uma gota de material por lâmina a cerca de 30 - 40 cm de altura da mesma, deixando-a secar em temperatura ambiente.

As amostras foram coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato por 5 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Depois de secas, as lâminas foram observadas em microscópio óptico onde foi identificado o número diplóide. As melhores metáfases foram fotografadas, a partir destas imagens foi realizada a biometria cromossômica com o auxílio do software Micromesure e realizada a montagem dos cariótipos utilizando o Paint Pro. Os cromossomos foram classificados de acordo com Guerra (2004).

3.4 Hibridização *in situ* fluorescente com BACs

Para a identificação das homologias cromossômicas entre as diferentes espécies de pica-pau, foram realizadas análises de FISH utilizando 36 clones de BACs para os cromossomos GGA10-28 (exceto cromossomo 16), os quais foram desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Darren Karl Griffin da University of Kent e sua equipe (DAMAS et al., 2017; O'CONNOR et al, 2019). Para o isolamento, amplificação e marcação dos clones (BACs) foi seguido o protocolo descrito em O'Connor et al. (2019). Os cromossomos foram fixados em lâminas e desidratados através de uma série de etanóis (2 minutos cada em 2 × SSC, 70%,

85% e 100% de etanol à temperatura ambiente). Para a dissolução das sondas, foi usado um tampão de hibridização (Cytocell) com Cot-1 DNA (Insight Biotech) e aplicadas em lâminas que posteriormente foram seladas com cola. A mistura da sonda foi desnaturada simultaneamente por 2 minutos em uma placa de aquecimento a 75° C. O processo de hibridização ocorreu em uma câmara úmida por 72 horas a 37° C. As lavagens das lâminas ocorreram após a hibridização, seguindo os seguintes passos: 30 segundos em 2×SSC com 0,05% de Tween 20 à temperatura ambiente, posteriormente contrastadas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). As lâminas dos experimentos de FISH foram fotografadas usando um microscópio de epifluorescência com câmera acoplada (Olympus BX61).

4 RESULTADOS

As espécies analisadas apresentaram os seguintes números cromossômicos: 84 em *C. campestris* (Figura 1A), 80 em *V. spilogaster* (Figura 1B), 64 em *M. candidus* (Figura 1C) e 110 em *P. nebulosus* (Figura 1D). A morfologia cromossômica está descrita na tabela 1. A partir do 18° par, todos os cromossomos restantes apresentaram morfologia telocêntrica em *C. campestris*, *V. spilogaster* e em *M. candidus*.

P. nebulosus apresenta morfologia acrocêntrica do 19° ao 30° par cromossômico, exceto nos pares 20° e 22°. A partir do 31° par até o 54°, todos os cromossomos apresentam-se telocêntricos.

O cromossomo Z apresentou o maior tamanho entre os cromossomos do complemento em todos os pica-paus analisados.

Tabela 1 - Descrição da morfologia cromossômica de quatro espécies de pica-paus.

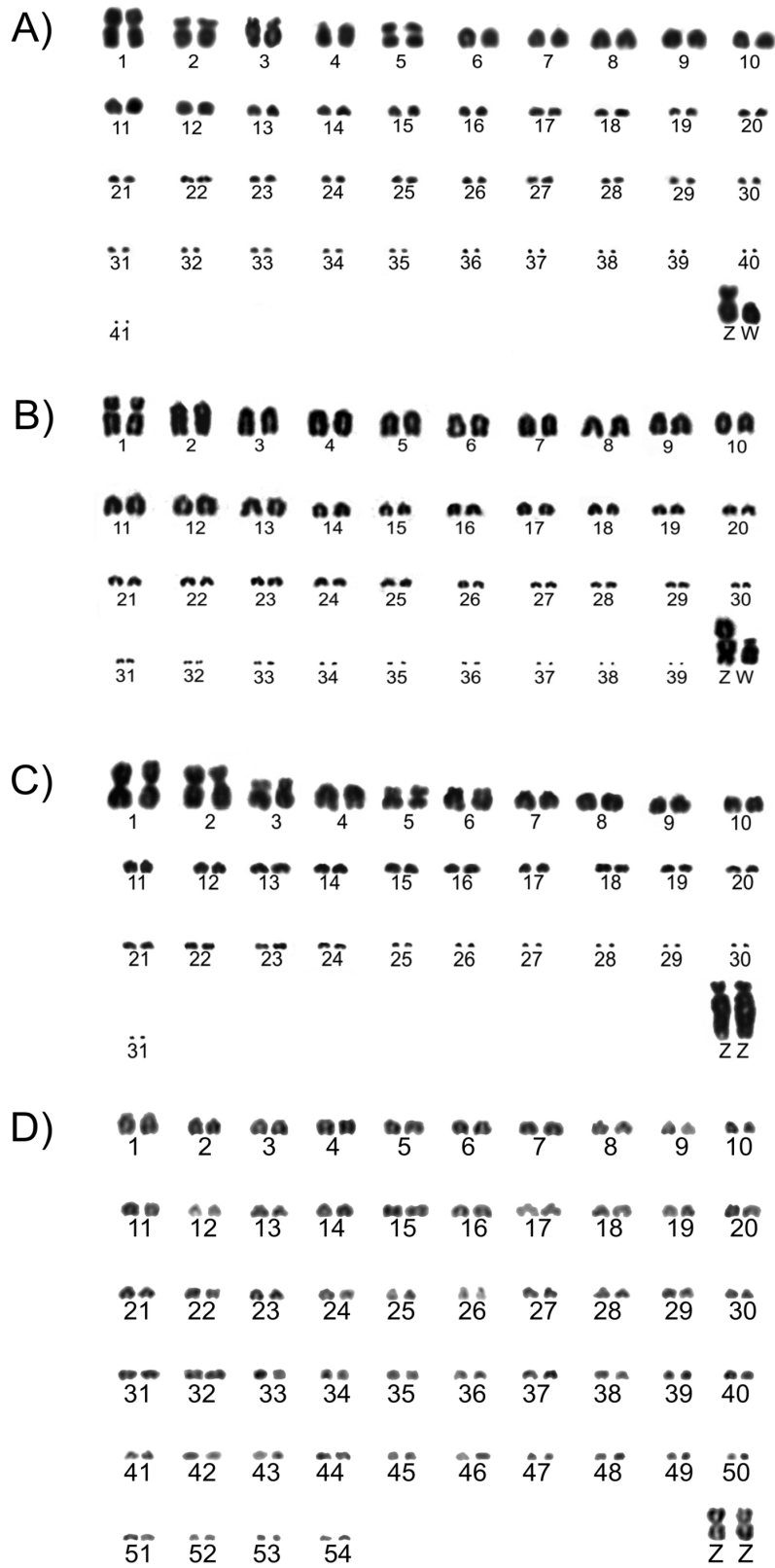
Cromossomos	<i>C. campestris</i>	<i>V. spilogaster</i>	<i>M. candidus</i>	<i>P. nebulosus</i>
1	Metacêntrico	Submetacêntrico	Metacêntrico	Acrocêntrico
2	Submetacêntrico	Acrocêntrico	Metacêntrico	Acrocêntrico
3	Submetacêntrico	Acrocêntrico	Submetacêntrico	Acrocêntrico

4	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Telocêntrico
5	Submetacêntrico	Acrocêntrico	Metacêntrico	Telocêntrico
6	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Submetacêntrico	Telocêntrico
7	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Telocêntrico
8	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico
9	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico
10	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico
11	Telocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Telocêntrico
12	Telocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico
13	Telocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico
14	Telocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico
15	Telocêntrico	Telocêntrico	Acrocêntrico	Telocêntrico
16	Telocêntrico	Telocêntrico	Acrocêntrico	Telocêntrico
17	Telocêntrico	Telocêntrico	Acrocêntrico	Acrocêntrico
18	Telocêntrico	Telocêntrico	Metacêntrico	Telocêntrico
Z	Acrocêntrico	Metacêntrico	Acrocêntrico	Metacêntrico
W	Acrocêntrico	Submetacêntrico	-	-

Sinal negativo (-) = ausência de dados.

Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

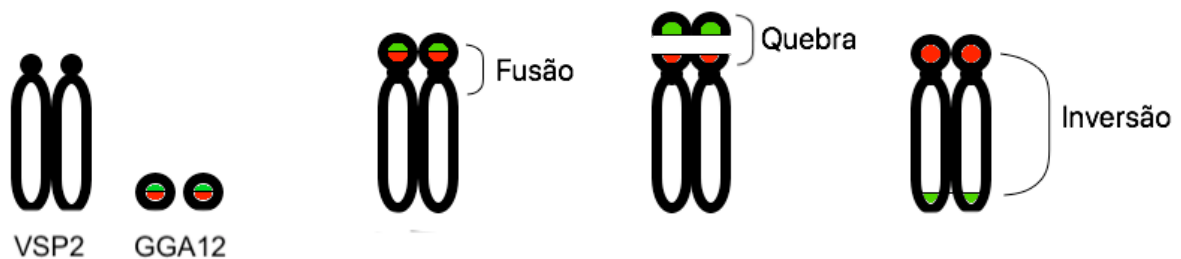
Figura 1 – Cariótipos das espécies: *Colaptes campestris* (A), *Veniliornis spilogaster* (B), *Melanerpes candidus* e *Picumnus nebulosus* (D).



Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

Todas as sondas de BACs utilizadas demonstraram sinais de hibridização nas quatro espécies de pica-paus. Na tabela 2 estão descritos os resultados dos experimentos de FISH. Em *C. campestris* observou-se uma fusão entre microcromossomos e outra fusão entre GGA14 e o braço p do 2° par de macrocromossomos (Figura 3A e Figura 5A). Em contraste, *V. spilogaster* apresentou 3 fusões entre macro e microcromossomos. Os rearranjos intercromossômicos ocorreram entre GGA12 e o 2° par de macrocromossomos de *V. spilogaster*, e após a fusão ocorreu uma quebra seguida de inversão (Figura 2 e Figura 4B).

Figura 2 – Esquema dos rearranjos ocorridos no 2° par cromossômico da espécie *Veniliornis spilogaster*.



VSP2: 2° par cromossômico da espécie *Veniliornis spilogaster*
 GGA 12: 12° par cromossômico da espécie *Gallus gallus*
 Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

GGA13 está fusionado com o 1° par de macrocromossomos (braço p) e o GGA19 fusionou-se com um par de macrocromossomos (braço q), o qual não foi possível ser identificado devido ao cariótipo uniforme de *V. spilogaster* (Figura 3C-D e 4B). Além das fusões entre macro e microcromossomos, essa espécie também apresentou uma fusão entre GGA23 e um par de microcromossomos (Figura 5C). A espécie *M. candidus* apresentou 10 fusões, sendo uma delas entre GGA13 e o braço p do 3° par cromossômico (Figura 3E). As 9 fusões restantes ocorreram entre microcromossomos (Figura 5D-E). *P. nebulosus* não apresentou nenhuma fusão.

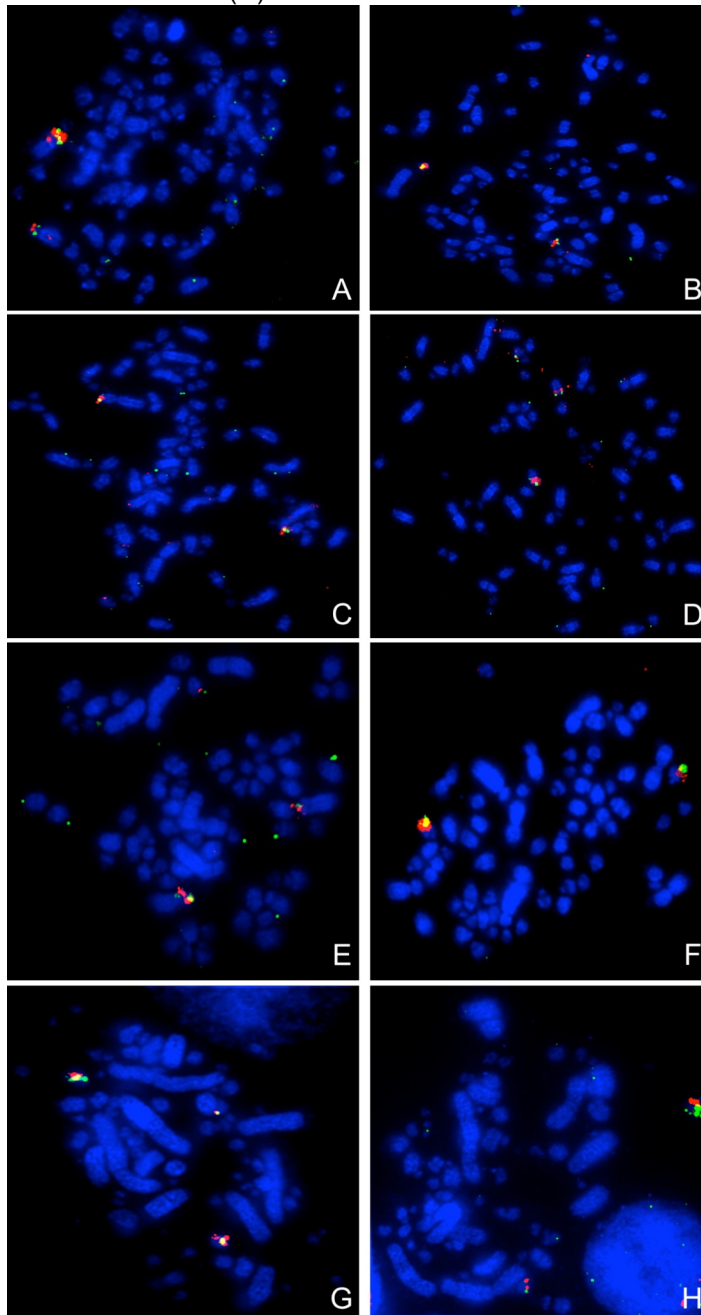
Tabela 2 – Padrões de organização dos microcromossomos em quatro espécies de pica-paus.

BACs de GGA (Cromossomo)	<i>Colaptes campestris</i>	<i>Veniliornis spilogaster</i>	<i>Melanerpes candidus</i>	<i>Picumnus nebulosus</i>

10	Conservado	Conservado	Fusão (Micro)	Conservado
11	Conservado	Conservado	Conservado	Conservado
12	Conservado	Fusão (Macro)	Conservado	Conservado
13	Conservado	Fusão (Macro)	Fusão (Macro)	Conservado
14	Fusão (Macro)	Conservado	Conservado	Conservado
15	Conservado	Conservado	Fusão (Micro)	Conservado
16	-	-	-	-
17	Conservado	Conservado	Conservado	Conservado
18	Conservado	Conservado	Conservado	Conservado
19	Conservado	Fusão (Macro)	Fusão (Micro)	Conservado
20	Conservado	Conservado	Conservado	Conservado
21	Conservado	Conservado	Fusão (Micro)	Conservado
22	Conservado	Conservado	Fusão (Micro)	Conservado
23	Conservado	Fusão (Micro)	Fusão (Micro)	Conservado
24	Conservado	Conservado	Fusão (Micro)	Conservado
25	Conservado	Conservado	Conservado	Conservado
26	Conservado	Conservado	Conservado	Conservado
27	Conservado	Conservado	Fusão (Micro)	Conservado
28	Conservado	Conservado	Fusão (Micro)	Conservado

BACs= Cromossomos artificiais bacterianos; GGA = *Gallus gallus*; Macro= Macrocromossomos; Micro= Microcromossomos; Sinal negativo (-) = ausência da sonda.
 Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

Figura 3 – FISH de BACs nas espécies *Colaptes campestris* (A-B), *Veniliornis spilogaster* (C-D), *Melanerpes candidus* (E-F) e *Picumnus nebulosus* (G-H). GGA14 69D20 FITC e 122H14 Texas Red (A); GGA17 42P16 FITC e 375I5 Texas Red (B); GGA13 115I12 FITC e 321B13 Texas Red (C); GGA19 50H12 FITC e 10F1 Texas Red (D); GGA13 115I12 FITC e 321B13 Texas Red (E); GGA21 122K8 FITC e 83I20 Texas Red (F); GGA12 4M5 FITC e 60P3 Texas Red (G); GGA17 375I5 FITC e 42P16 Texas Red (H).

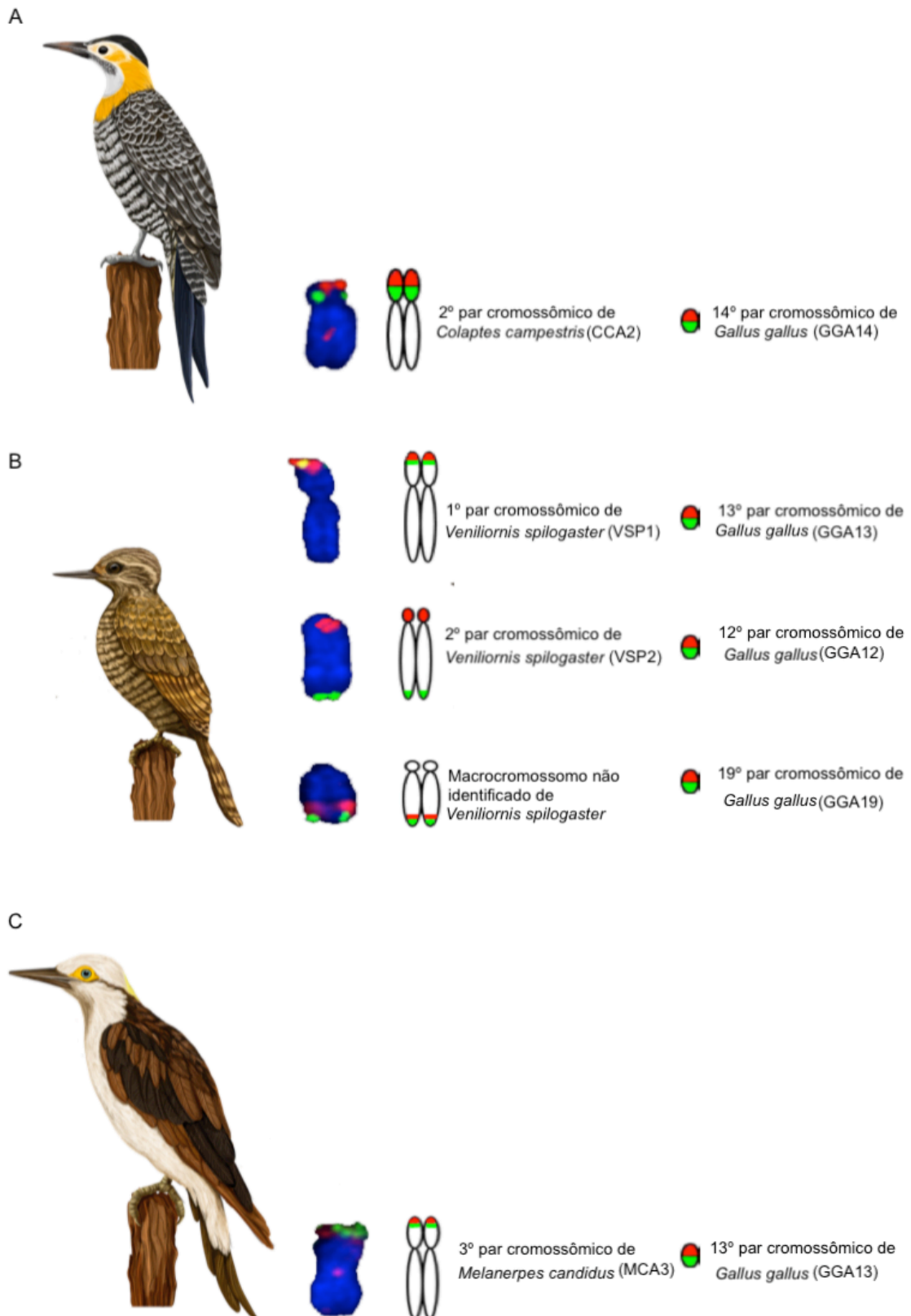


FITC= Fluorescein isothiocyanate.

GGA = *Gallus gallus*

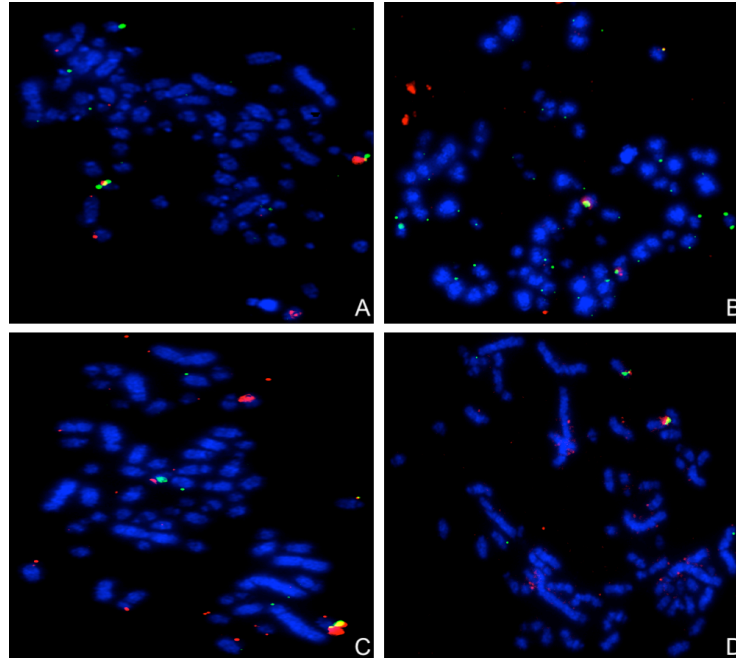
Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

Figura 4 – Representação esquemática das fusões entre microcromossomos de *Gallus gallus* (GGA) e macrocromossomos das espécies de pica-paus. GGA14 e CCA2 (A); GGA13 e VSP1, GGA12 e VSP2, GGA19 e um macrocromossomo não identificado de VSP, respectivamente (B); GGA13 e MCA3 (C).



Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

Figura 5 – Experimentos de FISH evidenciando os rearranjos intercromossômicos envolvendo microcromossomos em *Colaptes campestris* (A), *Veniliornis spilogaster* (B) e *Melanerpes candidus* (C-D). GGA13 115I12 FITC e 321B13 Texas Red (A); GGA23 191G17 FITC e 49F3 Texas Red (B); GGA19 50H12 FITC e 10F1 Texas Red (C); GGA24 103F4 FITC e 65O4 Texas Red (D).



FITC= Fluorescein isothiocyanate.

Fonte: Elaborada pela autora desta pesquisa.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo, relacionados ao número diplóide e morfologia cromossômica das espécies *C. campestris*, *V. spilogaster* e *M. candidus* corroboram com de Oliveira et al. (2017) e Bertocchi et al. (2018). No presente estudo, foi descrito pela primeira vez o cariótipo de *P. nebulosus*, $2n=110$. Essa espécie apresentou muitos pares de cromossomos acrocêntricos e telocêntricos, somente o cromossomo Z apresentou-se metacêntrico. Além disso, observou-se uma redução do tamanho dos macrocromossomos em comparação com as outras três espécies. Os pica-paus possuem uma grande variedade de números cromossômicos, podendo apresentar 64 ou até mais de 100 cromossomos, como no caso de duas espécies do gênero *Dendrocopos* ($2n=108$) (SHIELDS, 1982; de Oliveira et al. 2017). Portanto, pode-se afirmar que as quatro espécies de pica-paus analisadas apresentam uma variação de números diplóides já conhecida na família Picidae.

O cromossomo Z das espécies analisadas nesse estudo apresentou-se como

o maior elemento do cariótipo, resultado já esperado, tendo em vista que essa é a característica mais marcante dos Piciformes. Os possíveis motivos desse cromossomo ter se tornado o maior elemento do complemento são diversos, dentre eles estão o acúmulo de sequências repetitivas e/ou rearranjos cromossômicos, como fissões de macrocromossomos (DE OLIVEIRA et al., 2017; KRETSCHMER et al., 2020; KRETSCHMER et al., 2021a). O acúmulo de sequências repetitivas no cromossomo Z, apesar de ser muito incomum, foi reportado em espécies da família Rhampastidae (Piciformes) que também apresentaram fissões de macrocromossomos (KRETSCHMER et al., 2020). Através da utilização de sondas de microcromossomos de GGA em *C. campestris*, *V. spilogaster*, *M. candidus* e *P. nebulosus* foi possível descartar a hipótese de que o aumento do cromossomo Z poderia ter ocorrido através de fusões entre esse cromossomo e microcromossomos.

Os estudos de citogenética molecular usando BAC-FISH de microcromossomos de GGA em metáfases de quatro espécies de pica-paus confirmaram que a maioria dos microcromossomos são conservados, como já relatado em estudos prévios que demonstraram o alto grau de conservação de microcromossomos em aves (O'CONNOR et al., 2019; WATERS et al., 2021). No entanto, apesar da alta conservação, somente a espécie *P. nebulosus* apresentou-se conservada. As outras três espécies restantes ilustraram diferentes rearranjos envolvendo microcromossomos.

M. candidus, que possui o menor número diplóide dentre as espécies de pica-paus analisadas, apresentou grande número de fusões envolvendo microcromossomos. Através do estudo utilizando BAC-FISH nessa espécie, concluiu-se que o baixo número cromossômico é devido às fusões entre microcromossomos. Apesar de raros, rearranjos envolvendo microcromossomos podem ocorrer, como descrito em sete ordens de aves (O'CONNOR et al., 2019; KRETSCHMER et al., 2021a; KRETSCHMER et al., 2021b; DE SOUZA et al., 2022). O baixo número cromossômico pode estar relacionado a fusões envolvendo macrocromossomos, ou microcromossomos como observado em Falconiformes que apresentam cariótipos altamente rearranjados e com número de cromossomos relativamente baixo, assim como na espécie *Tolmomyias sulphurescens* (Passeriformes) (JOSEPH et al., 2018; O'CONNOR et al., 2019; KRETSCHMER et al., 2021b).

O presente trabalho demonstrou que ocorreu apenas uma fusão entre o microcromossomo ancestral GGA14 e o 2° par cromossômico de *C. campestris*, não sendo observado fusões de microcromossomos nos pares 1 e 3. No entanto, ocorreu uma fusão entre um par de microcromossomos. Dessa forma, podemos sugerir que a diminuição do número diploide dessa espécie em relação à espécie mais ancestral, *Colaptes auratus* ($2n=90$), não ocorreu devido às fusões de microcromossomos e os primeiros pares de macrocromossomos. Contudo, é importante ressaltar que não foi possível detectar possíveis fusões entre os microcromossomos GGA16, GGA29-38 devido à ausência de sondas cromossômicas para esses pares. Além disso, análises complementares utilizando sondas de macrocromossomos de GGA (1-9) são indicadas para verificar se existem outros rearranjos envolvendo macrocromossomos nessa espécie como sugerido na hipótese de Oliveira et al. (2017) que propôs que a espécie *C. campestris* poderia ter sofrido fusões devido ao acúmulo de sequências teloméricas intersticiais nas regiões centroméricas dos 3 primeiros pares de macrocromossomos.

V. spilogaster apresentou um rearranjo intercromossômico nunca descrito em espécies de aves por meio de BAC-FISH, sendo uma fusão entre um microcromossomo ancestral (GGA12) e um macrocromossomo (VSP2), seguida de uma quebra e inversão. Esse fenômeno pode ser observado no experimento de FISH onde as duas sondas de BACs de GGA12 hibridizam separadamente nas extremidades de um dos maiores macrocromossomos da espécie. Ao contrário das fusões, as inversões cromossômicas caracterizam um tipo mais comum, mas também muito importante de rearranjo que podem atuar nos mecanismos de segregação de polimorfismos, evolução dos cromossomos sexuais, formação de super genes e também no isolamento reprodutivo (HOOPER; PRICE, 2017). Esse tipo de rearranjo, já foi descrito em várias espécies de aves, como por exemplo em *Elaenia spectabilis* e duas espécies do gênero *Turdus* que caracterizaram as inversões ocorridas como apomorfias (SKINNER; GRIFFIN 2012; KRETSCHMER et al., 2015). Apesar de raras, fusões de microcromossomos com macrocromossomos foram relatadas em algumas espécies, como Falconiformes, no entanto os microcromossomos se mativeram intactos após a ocorrência dos eventos de fusões (O'CONNOR et al., 2019). Uma possível explicação para esse fato seria o alto percentual de genes nos microcromossomos e os poucos pontos de quebras. Diferentemente das outras aves, os Piciformes apresentam uma grande quantidade

de sequências repetitivas em seus genomas, o que poderia ter facilitado a ocorrência desse rearranjo incomum. Em suma, *V. spilogaster* demonstrou uma atípica reorganização cromossômica, evidenciando o importante papel dos mecanismos de rearranjos na evolução cariotípica dessa espécie.

Dentre os rearranjos intercromossômicos observados em pica-paus, apenas a fusão do GGA13 ocorreu em três espécies das quatro espécies observadas. Sugerindo que GGA13 está mais propenso a sofrer rearranjos cromossômicos do que os outros microcromossomos observados no presente estudo. Essa maior propensão de rearranjos envolvendo esse microcromossomo também foi observada em espécies das ordens Psittaciformes, Falconiformes, Passeriformes, Caprimulgiformes e Suliformes (JOSEPH et al., 2018; O'CONNOR et al., 2018; O'CONNOR et al., 2019; KRETSCHMER et al., 2021b; DE SOUZA et al., 2022).

De acordo com a filogenia descrita por Shakya et al. (2017), dentre as espécies analisadas no presente estudo, *P. nebulosus* é o mais basal seguido das *C. campestris*, *V. spilogaster* e *M. candidus* como a mais derivada. Baseado nessa informação, podemos observar que os Picidae possivelmente possuíam um ancestral com número elevado de cromossomos, tendo em vista que *Jynx torquilla* (2n=90) espécie mais basal do que *P. nebulosus* também apresenta essa característica. Um exemplo de espécie basal que não possui cariótipo similar ao do ancestral hipotético da Classe Aves (2n=80), é o *Casuarius casuarius* (Struthioniformes), aves Paleognatas que possuem 92 cromossomos. Uma das possíveis explicações para o elevado número diplóide dessa espécie seria a ocorrência de fissões envolvendo os microcromossomos (KRETSCHMER; FERGUSON-SMITH; DE OLIVEIRA, 2018). No entanto, na espécie *P. nebulosus* não foi identificado esse tipo de rearranjo, sugerindo que possam ter ocorrido fissões de macrocromossomos ancestrais devido ao elevado número de microcromossomos e também ao tamanho reduzido dos macrocromossomos. Adicionalmente, pode-se inferir que o ancestral dos Piciformes possivelmente apresentava esse mesmo padrão, elevado número diplóide, pois estudos de BAC-FISH na família Ramphastidae demonstraram a ausência de rearranjos envolvendo microcromossomos (KRETSCHMER et al., 2021a)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, o presente trabalho descreveu pela primeira vez a organização dos microcromossomos em espécies da família Picidae, o cariótipo da espécie *P. nebulosus* e também um rearranjo inédito através de experimentos de BAC-FISH na espécie *V. spilogaster*, fusão de um microcromossomo ancestral, seguida de uma fissão e uma inversão.

P. nebulosus demonstrou um cariótipo com um número diplóide elevado, 110 cromossomos, característica que é bastante comum em Piciformes. No entanto, o tamanho dos macrocromossomos dessa espécie, incluindo o cromossomo Z, é reduzido quando comparado com os outros pica-paus analisados nesse estudo. Essa redução de tamanho, juntamente com a ausência de rearranjos envolvendo microcromossomos e o alto número cromossômico pode estar associada à quebras de macrocromossomos.

Dessa forma, conclui-se que apesar de raros em espécies de aves, os rearranjos envolvendo microcromossomos desempenham um importante papel no processo evolutivo e de especiação, como observado em três das quatro espécies analisadas nesse estudo. Adicionalmente, estudos futuros envolvendo mais espécies de Picidae e também sondas de macrocromossomos de GGA (1-9) são necessários para expandir o conhecimento sobre os processos de evolução e diferenciação desses cromossomos.

REFERÊNCIAS

- BERTOCCHI, N. A. et al. Distribution of CR1-like transposable element in woodpeckers (Aves Piciformes): Z sex chromosomes can act as a refuge for transposable elements. **Chromosome Research**, v. 26, n. 4, p. 333-343, 2018.
- BI, D. et al. Two new mitogenomes of Picidae (Aves, Piciformes): sequence, structure and phylogenetic analyses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 683-692, 2019.
- BURT, D. W. Origin and evolution of avian microchromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 96, n. 1-4, p. 97-112, 2002.
- DAMAS, J. et al. Upgrading short-read animal genome assemblies to chromosome level using comparative genomics and a universal probe set. **Genome research**, v. 27, n. 5, p. 875-884, 2017.
- DE OLIVEIRA, T. 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.
- DE SOUZA, M. S.; BARCELLOS, S. A.; DOS SANTOS, M. S.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. V.; DE OLIVEIRA, E. H. C.; O'CONNOR, R. E.; GRIFFIN, D. K.; KRETSCHMER, R. Microchromosome BAC-FISH reveals different pattern of genome organization in three Charadriiformes species. **Animals**, 2022.
- DUFORT, M. J. An augmented supermatrix phylogeny of the avian family Picidae reveals uncertainty deep in the family tree. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 94, p. 313-326, 2016.
- ELLEGREN, H. Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 5, p. 283-291, 2010.
- GARNERO, A. D. V.; GUNSKI, R. J. Comparative analysis of the karyotypes of *Nothura maculosa* and *Rynchotus rufescens* (Aves, Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. **The Nucleus**, v. 43, p. 64-70, 2000.
- GUERRA, M. **FISH: Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

HOOPER, D. M.; PRICE, T. D. Chromosomal inversion differences correlate with range overlap in passerine birds. **Nature ecology & evolution**, v. 1, n. 10, p. 1526-1534, 2017.

JOSEPH, S.; O'CONNOR, R. E.; AL MUTERY, A. F.; WATSON, M.; LARKIN, D. M.; GRIFFIN, D. K. Chromosome level genome assembly and comparative genomics between three falcon species reveals an unusual pattern of genome organisation. **Diversity**, v.10, n. 4, 113-125, 2018.

KRETSCHMER, R. et al. Chromosome mapping of the large elaenia (*Elaenia spectabilis*): evidence for a cytogenetic signature for passeriform birds? **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 115, n. 2, p. 391-398, 2015.

_____; FERGUSON-SMITH, M. A.; DE OLIVEIRA, E. H. C. Karyotype Evolution in Birds: From Conventional Staining to Chromosome Painting. **Genes**, v. 9, n. 4, p. 181, 2018.

_____. et al. Extensive chromosomal fissions and repetitive DNA accumulation shaped the atypical karyotypes of two Ramphastidae (Aves: Piciformes) species. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 130, n. 4, p. 839-849, 2020.

_____. et al. Interspecies chromosome mapping in caprimulgiformes, piciformes, suliformes, and trogoniformes (aves): Cytogenomic insight into microchromosome organization and karyotype evolution in birds. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 826, 2021a.

_____. et al. Cytogenetic Evidence Clarifies the Phylogeny of the Family Rhyncocyclidae (Aves: Passeriformes). **Cells**, v. 10, n. 10, p. 2650, 2021b.

LITHGOW, P. E. et al. Novel tools for characterising inter and intra chromosomal rearrangements in avian microchromosomes. **Chromosome Research**, v. 22, p. 85–97, 2014, 2014.

MOOREA, W. S.; MIGLIAB, K. J. Woodpeckers, toucans, and allies(Piciformes). **The timetree of life**, p. 445, 2009.

O'CONNOR, R. E. et al. Patterns of microchromosome organization remain highly conserved throughout avian evolution. **Chromosoma**, v. 128, n. 1, p. 21-29, 2019.

_____. et al. Reconstruction of the diapsid ancestral genome permits chromosome evolution tracing in avian and non-avian dinosaurs. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2018.

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. **Experientia**, v. 24, n. 12, p. 1292-1293, 1968.

SHAKYA, S.; FUCHS, J.; PONS, J.; SHELDON, F. Tapping the woodpecker tree for evolutionary insight. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 116, p. 182-191, 2017.

SHIELDS, G. Comparative Avian Cytogenetics: A Review. **Condor**, v. 84, n. 1, p. 45–58, 1982.

SKINNER, B. M.; GRIFFIN, D. Intrachromosomal rearrangements in avian genome evolution: evidence for regions prone to breakpoints. **Heredity**. v. 108, p. 37-41, 2011.

SMITH, J. et al. Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes. **Animal Genetics**, v. 31, p. 96–103, 2000.

WATERS, D. et al. Microchromosomes are building blocks of bird, reptile, and mammal chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 45, p. e2112494118, 2021.

WILEY, G.; MILLER, M. J. A Highly Contiguous Genome for the Golden-Fronted Woodpecker (*Melanerpes aurifrons*) via Hybrid Oxford Nanopore and Short Read Assembly. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 10, n. 6, p. 1829-1836, 2020.

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

CAPÍTULO III

ESTÁGIO NO EXTERIOR: EXPERIÊNCIAS E CONTRIBUIÇÕES DO DOUTORADO SANDUÍCHE NA TRAJETÓRIA ACADÊMICA

1 INTRODUÇÃO

Este capítulo tem como propósito apresentar as contribuições do estágio de doutorado sanduíche no exterior na trajetória acadêmica. A experiência do estágio no exterior tem como objetivo possibilitar o aprofundamento da pesquisa de doutorado através da aprendizagem de novas metodologias e promover a internacionalização entre as instituições. As cooperações internacionais entre as universidades do exterior possibilitam o apoio aos grupos de pesquisa brasileiros, intercâmbio de docentes, bem como o intercâmbio de alunos através da concessão de bolsas de estudo. Os fomentos governamentais brasileiros, tais como Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) proporcionam anualmente a oportunidade para que estudantes brasileiros possam realizar estágios de pesquisa no exterior.

1.1 Universidade estrangeira

A escolha da universidade para a realização do estágio realizou-se devido ao prestígio da instituição e também à relação do coorientador no exterior com estudos em aves. A universidade Rockefeller possui um dos melhores programas de pesquisas do mundo, do qual conquistou 26 prêmios Nobel, sendo o último obtido no ano de 2020. A instituição também possui 23 prêmios Lasker e 20 medalhas nacionais de Ciência. Os estudos coordenados pelo Dr. Erich Jarvis (citações = 20,608; h-index = 65) são realizados em grande parte no campo da genômica e evolução das aves providenciando uma imensurável contribuição científica. Atualmente, o Dr. Jarvis e seus colaboradores almejam sequenciar o genoma completo de todas as espécies de aves existentes do planeta terra (Projeto B10K), e eventualmente todas ~70.000 espécies de vertebrados no programa Projeto de Genoma de Vertebrados (VGP). O grupo também tem interesse em estudos sobre aprendizagem vocal, componente da aquisição da fala humana. Adicionalmente, Dr. Jarvis tem trabalhado na área de evolução das aves por mais de 20 anos, onde em

2014 liderou o estudo que utilizou genomas completos para gerar a árvore da vida das aves modernas resolvendo muitos problemas filogenéticos. Adicionalmente, no ano de 2020, Dr. Jarvis e seus colaboradores publicaram um estudo com 363 genomas completos e de alta qualidade, do qual representa mais de 92% das famílias de aves (JARVIS et al., 2014; FENG et al., 2020).

1.2 Plano de atividades

O projeto desenvolvido durante o estágio no exterior objetivou analisar genomas de aves através de técnicas de bioinformática. Esse estudo também propôs uma colaboração inédita entre o Laboratório de Diversidade Genética Animal - DGA (UNIPAMPA) e o Laboratório de Neurogenética da Linguagem (Rockefeller University) (Figura 1).

Figura 1 – Prédio onde está localizado o laboratório de neurogenética.



Fonte: Elaborada pela autora.

Sob a supervisão do Prof. Dr. Erich Jarvis, foram aplicadas técnicas de bioinformática para o estudo da evolução dos genes *Microtubule Associated Protein Tau* (*MAPT*) e *Contactin-associated protein-like 2* (*CNTNAP2*) e suas mutações na tentativa de inferir os possíveis mecanismos que poderiam estar relacionados ao desenvolvimento de traços especializados nas aves, como espécies de pica-paus.

Os genes escolhidos para a realização do projeto de estágio foram selecionados devido sua importância e relevância para estudos em doenças que acometem humanos. O mapeamento genético de *locus* gênicos polimórficos é uma ferramenta extraordinária para identificar doenças genéticas nessas regiões, como mutações patológicas que podem estar associadas a condições clínicas como demência (NAKAMURA et al., 1987; PONOMARENKO et al., 2016). Os médicos têm enfrentado dificuldades no diagnóstico, devido às semelhanças entre as manifestações clínicas das demências, incluindo o Alzheimer, que exige um exame clínico e neuropsicológico metuculoso do paciente por meio de testes bioquímicos e de neuroimagem. Portanto, com o objetivo de auxiliar no diagnóstico de doenças neurológicas, marcadores genéticos distintos têm sido testados nos últimos anos. O gene *MAPT* atua na estabilização de microtúbulos e codifica a proteína Tau (JOSVIK et al., 2015). O acúmulo dessa proteína está associado a distúrbios neurocognitivos, como demência frontotemporal (DFT) e também tem sido associado à encefalopatia traumática crônica (CTE) (FORNARI et al., 2010; MCKEE et al., 2016). Assim, a identificação de mutações neste gene pode auxiliar no diagnóstico devido à associação de taupatia na neurodegeneração.

Mutações no fator de transcrição Forkhead *FOXP2*, que pertence à família *FOX* altamente conservada, estão relacionadas a deficiências específicas de fala e linguagem. O *FOXP2* desempenha um papel importante na fala humana e contribui para o aprendizado do canto das aves (DAY et al., 2019). Devido às diversas semelhanças entre o aprendizado vocal e a fala, as aves canoras são consideradas um modelo excepcional de organismo para estudos de neurobiologia e análises moleculares de genes envolvidos na comunicação vocal (JARVIS, 2004; BOLHUIS; OKANOYA; SCHARFF, 2010; MENDOZA; SCHARFF, 2017). O gene *CNTNAP2* liga-se ao *FOXP2* e, considerando que as mutações no gene *CNTNAP2* estão ligadas a distúrbios específicos de fala e linguagem, análises genéticas são necessárias para esclarecer a dinâmica dessas mutações e como esses genes

evoluem em espécies distintas, como por exemplo, no grupo das aves (MENDOZA; SCHARFF, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Realizar treinamento e desenvolver conhecimento na área de genômica e bioinformática em espécies de aves.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e comparar a diversidade intragênica (mutações) dos genes *MAPT* e *CNTNAP2* na espécie *Dryobates pubescens* em relação a outras espécies de aves;
- Treinamento nas metodologias utilizadas na The Rockefeller University;
- Fortalecimento das relações entre pesquisadores do DGA/UNIPAMPA e da Rockefeller University;
- Troca de conhecimentos técnicos entre as Instituições.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Na primeira fase do projeto, foi feito o levantamento das espécies disponíveis contendo os genes de interesse para que fosse realizado o alinhamento múltiplo. Para o alinhamento dos genes foram utilizadas as sequências de 71 espécies de aves para o gene *MAPT* e 66 para o gene *CNTNAP2*, das quais foram extraídas através das plataformas NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), GenomeArk (<https://vgp.github.io/genomeark/>) e UCSC (<https://genome.ucsc.edu>). As espécies que continham sequências com tamanhos muito desproporcionais foram alinhadas com a sequência referência, *Dryobates pubescens*, através do programa Minimap2. Subsequentemente essas sequências foram recortadas com os *softwares* Samtools e Bedtools. Somente após esse processo foram feitos os alinhamentos.

Para o alinhamento múltiplo de genes foi utilizado o *software* ClustalOmega. Foram feitos alinhamentos do gene *MAPT* inteiro, dos éxons, da isoforma 1 e

também das sequências de aminoácidos. Para o gene *CNTNAP2*, foram feitos os alinhamentos dos éxons e também das sequências de aminoácidos. Todos os alinhamentos foram visualizados no programa SeaView.

O alinhamento múltiplo do gene *MAPT* inteiro também foi feito com o programa MAFFT, do qual foi utilizado para as análises de regiões conservadas e aceleradas.

As árvores filogenéticas que foram utilizadas para as análises de regiões neutras no programa PhyloFit foram geradas pela Timetree, uma árvore para o gene *MAPT* e outra para o gene *CNTNAP2*. O gráfico referente aos resultados dessas análises foi visualizado no programa IGV 2.14.1.

Para a ancoragem dos genes foi utilizado o programa Liftoff e a visualização foi feita no Geneious Prime. A espécie *D. pubescens* (pica-pau) foi utilizada como referência para a ancoragem do gene *MAPT* em relação a 70 espécies de aves. Posteriormente, foi feita a extração e alinhamento dos éxons.

Foram analisados os genomas de três espécies de pica-paus: *Melanerpes formicivorus*, *Campera cardi* e *Campephilus melanoleucos* produzidos através do consórcio B10K através do software BWA e MUMMER para a identificação dos genes *MAPT* e *CNTNAP2*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experiências de estágio na Rockefeller University

O estágio ocorreu pelo o período de 12 meses (Setembro de 2021 a Setembro de 2022). Durante o doutorado sanduíche as atividades propostas foram realizadas em dois laboratórios de pesquisa: *Neurogenetics of Language* e *Vertebrate Genome Lab*, ambos liderados pelo Dr. Erich Jarvis. Além disso, ocorriam reuniões semanais em ambos os laboratórios. Nas sextas-feiras, também eram realizadas reuniões de montagem de genomas do *Vertebrate Genome Project*.

4.1.2 DESAFIOS

Os desafios do estágio no exterior, começam desde a chegada no país estrangeiro devido às diferenças culturais, clima e inserção em um novo grupo de pesquisa. Após o período de adaptação, do qual foi primordial o apoio do Dr. Jarvis,

os desafios ficam mais evidentes em relação ao aprofundamento teórico e atividades práticas.

Com relação a execução do projeto, inúmeros desafios foram enfrentados. O primeiro deles foi a ausência de dados genomas de diferentes espécies pica-paus. Os genomas de espécies de Picidae disponibilizados, através do consórcio B10K, estavam muito fragmentados não sendo possível a extração dos genes de interesse. Desse modo as análises tiveram apenas uma espécie de pica-pau, *Dryobates pubescens*, disponível para ser comparada em relação a outras espécies de aves.

As sequências dos genes de interesse, em sua maioria, tiveram que ser obtidas através do banco de dados NCBI, pois apenas alguns genomas de alta qualidade gerados pelo projeto *Vertebrate Genome* possuíam anotações dos genes *MAPT* e *CNTNAP2*. Após, o download das sequências, ocorreram problemas para o alinhamento múltiplo desses genes, devido às anotações erradas para o gene *MAPT* e pelo tamanho elevado do gene *CNTNAP2*. Somente, após inúmeras tentativas, mapeamento e recorte do gene *MAPT* foi possível obter o alinhamento. Já no caso do gene *CNTNAP2* não foi possível alinhá-lo, e dessa forma alinhou-se somente os éxons e as sequências de aminoácidos.

Outro obstáculo que impactou o desenvolvimento do projeto foi a pandemia. Durante o mês de Dezembro, os números de contaminados pela COVID-19 aumentaram, e a universidade fechou por quase dois meses (Janeiro e Fevereiro de 2022). Dessa forma as coordinações ocorriam de maneira remota, o que dificultava muito o aprendizado. Somente em meados de março de 2022 as atividades puderam ser retomadas e os laboratórios retornaram com capacidade máxima de alunos.

O ancoramento dos genes, teve que ser refeito. Inicialmente foram utilizadas as coordenadas dos genes disponibilizadas no arquivo de anotação. No entanto, somente ao final das análises percebeu-se que as coordenadas não estavam de acordo com o esperado, foi nesse momento que as análises foram refeitas usando as coordenadas do *scaffold* onde os genes estavam localizados.

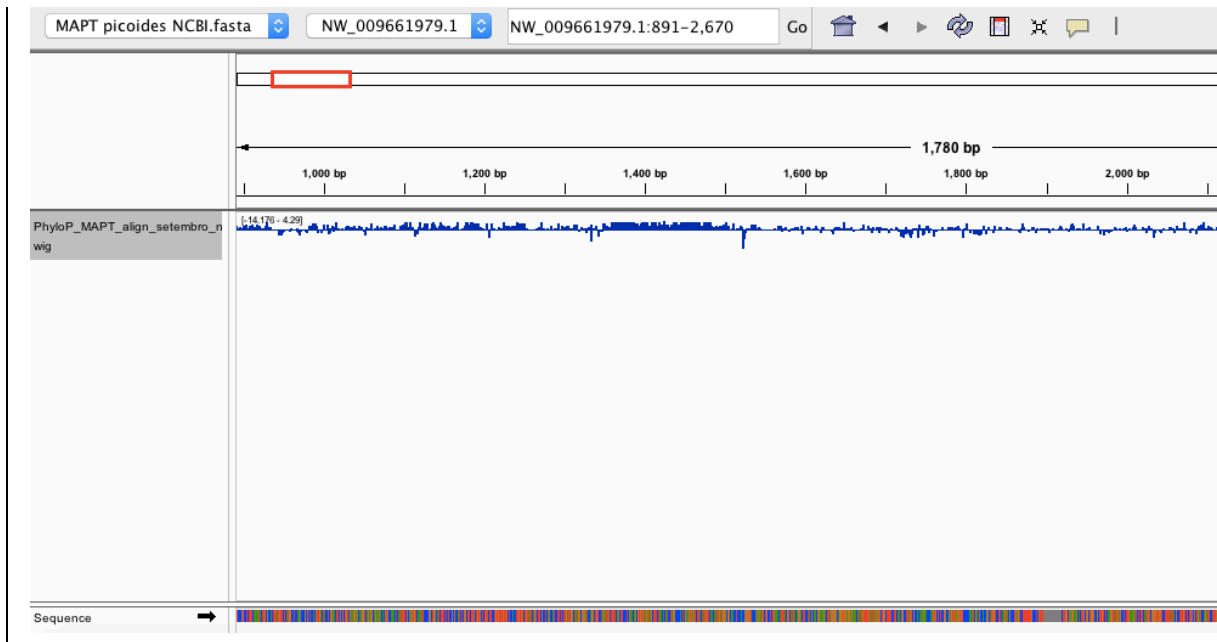
Para as análises de regiões aceleradas e conservadas no genoma também ocorrem problemas, pois o alinhamento múltiplo feito no programa Clustal Omega não pôde ser utilizado para esse tipo de análise. Dessa forma foi feito outro alinhamento utilizando MAFFT do qual pode gerar alinhamentos com sequência de referência. No entanto, para performar as análises no programa PhyloFit ocorreram

dificuldades para gerar o modelo neutro, pois os comandos usados não estavam de acordo com as análises. Somente em Setembro de 2022 que o problema foi parcialmente resolvido e foi possível obter resultados parciais para os estudos de evolução do gene *MAPT*. Dessa forma, análises complementares serão feitas para a finalização do projeto.

4.1.3 Resultados parciais

Os resultados demonstraram 17,439 regiões aceleradas no gene *MAPT* em *Dryobates pubescens* em comparação com outras 70 espécies de aves, sugerindo que a seleção positiva está atuando e que talvez essas regiões possam estar associadas as adaptações relacionadas aos traços específicos cognitivos dos pica-paus. No entanto, testes estatísticos complementares serão feitos para polir os resultados. O gráfico referente aos resultados dessas análises foi visualizado no programa IGV 2.14.1. e está representado na Figura 2.

Figura 2 – Parte ampliada demonstra algumas das regiões aceleradas encontradas no gene *MAPT* em *Dryobates pubescens*.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.4 Outras atividades realizadas

Em 3 de novembro de 2021 realizou-se o evento “Quarterly”, onde participaram todos os integrantes dos laboratórios coordenados pelo Dr. Jarvis.

Nessa reunião, foram apresentados os trabalhos desenvolvidos durante o ano de 2021, resultados alcançados e também as perspectivas para pesquisas futuras.

No mês de abril de 2022, foi feita uma saída a campo no *Field Center* da Rockefeller University localizado em Millbrook, onde foram realizadas atividades científicas variadas.

Juntamente com seu supervisor Dr. Jarvis foi revisado um artigo submetido à revista BMC Biology.

Em Julho de 2022, foram realizados o workshop “**Manual curation and submission**” e o curso “**Preventing Workplace Harassment (Annual)**” na Rockefeller University.

Ocorreu a participação no evento “**Student/Postdoc Summer Seminars**” nas apresentações do Dr. Giulio Formenti (*High-quality reference genomes and pangenomes for a new era in biology*) e Cesar Vargas (*Influence of Mouse Motor Cortex on Vocal Musculature*).

Em 10 de junho de 2022, atendeu-se a palestra intitulada “Natalia Pasternak: Trajetória da sua defesa pela democracia e a ciência brasileira” organizada pelo PubNY (grupo de pesquisadores brasileiros que moram em Nova Iorque - Estados Unidos) no Consulado Brasileiro.

5 CONSIDERAÇÕES

O período de estágio no exterior foi muito favorável para a trajetória acadêmica, pois através das atividades pode-se ampliar experiências profissionais, pessoais e a rede de contatos acadêmicos. Além disso, o treinamento em genômica e bioinformática foi enriquecedor, possibilitando a aplicação dessas técnicas em projetos futuros.

Com relação a internacionalização das instituições, o período de estágio proporcionou uma excelente parceria internacional e inédita entre os pesquisadores do laboratório de Diversidade Genética Animal - UNIPAMPA e a Rockefeller University.

Em suma, conclui-se que são incontáveis contribuições que o estágio no exterior pode proporcionar para a construção da carreira de um pesquisador. Determinação, resiliência, paciência e coragem são os pilares para o melhor aproveitamento dessa experiência única.

6 SUPORTE FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

REFERÊNCIAS

DAY, N. F. et al. Beyond critical period learning: Striatal *FoxP2* affects the active maintenance of learned vocalizations in adulthood. **Eneuro**, v. 6, n. 2, 2019.

FENG, S. et al. Dense sampling of bird diversity increases power of comparative genomics. **Nature**, v. 587, p. 252–257, 2020.

JARVIS, Erich D. Learned birdsong and the neurobiology of human language. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1016, p. 749, 2004.

JARVIS, E. D. et al. Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. **Science**, v. 346, n. 6215, p. 1320-1331, 2014.

JOSVIK, N. D. et al. Revisão dos principais genes e proteínas associadas à demência frontotemporal tau-positiva. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 18, n. 1, p. 201-211, 2015.

MCKEE, A. C. et al. The first NINDS/NIBIB consensus meeting to define neuropathological criteria for the diagnosis of chronic traumatic encephalopathy. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 1, p. 75-86, 2016.

MENDOZA, E.; SCHARFF, C. Protein-Protein interaction among the *FoxP* family members and their regulation of two target genes, *VLDLR* and *CNTNAP2* in the Zebra Finch Song System. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 112, 2017.

NAKAMURA, Y. et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, v. 235, n. 4796, p. 1616-1622, 1987.

PONOMARENKO, P. et al. Candidate SNP markers of chronopathologies are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. **BioMed research international**, v. 2016, 2016

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo apresentado no capítulo I demonstra o desenvolvimento de uma técnica para a obtenção de cromossomos a partir de embriões de aves. Esse novo método foi testado em distintas espécies e demonstrou-se ser muito eficiente para a obtenção de metáfases de alta qualidade, das quais poderão ser utilizadas posteriormente em estudos de citogenética clássica e molecular. Além disso, essa metodologia apresenta-se mais barata e rápida do que as outras comumente utilizadas, como por exemplo, o cultivo de fibroblastos.

O capítulo II destacou a importância da utilização das técnicas de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de BAC-FISH, pois elas permitiram identificar vários rearranjos de microcromossomos que ocorreram durante a evolução cariotípica de quatro espécies da família Picidae. Neste capítulo é levantada a hipótese de que o ancestral dos pica-paus sofreu fissões de macrocromossomos ocasionando o alto número diplóide, pois não foram encontrados nenhum rearranjo envolvendo microcromossomos na espécie mais basal analisada nesse capítulo, *P. nebulosus*. Além disso, *V. spilogaster* demonstrou uma fusão de um microcromossomo em um macrocromossomo, seguida de uma quebra e inversão, rearranjo inédito em estudos que utilizaram BAC-FISH em aves. Adicionalmente, conclui-se que a redução do $2n$ de *M. candidus* está relacionada ao grande número de fusões de microcromossomos.

No capítulo III está descrito o relato de experiências do estágio de doutorado sanduíche no exterior, do qual foi extremamente enriquecedor e proporcionou o desenvolvimento de atividades na área de genômica utilizando espécies de aves.

REFERÊNCIAS

BARCELLOS, S. A. et al. Karyotype evolution and distinct evolutionary history of the W chromosomes in swallows (Aves, Passeriformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 158, n. 2, p. 98-105, 2019.

_____; DE SOUZA, M. S., TURA, V., PEREIRA, L. R., KRETSCHMER, R., GUNSKI, R. J., GARNERO, A. V. Direct Chromosome Preparation Method in Avian Embryos for Cytogenetic Studies: Quick, Easy and Cheap. **DNA**, v. 2, n. 1, p. 22-29, 2022.

BERTOCCHI, N. A. et al. Distribution of CR1-like transposable element in woodpeckers (Aves Piciformes): Z sex chromosomes can act as a refuge for transposable elements. **Chromosome Research**, v. 26, n. 4, p. 333-343, 2018.

CASTRO, M. S.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; ROCHA, G. T. Karyotypic characterization of Ramphastidae (Piciformes, Aves). **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 147-150, 2002.

DAMAS, J. et al. Upgrading short-read animal genome assemblies to chromosome level using comparative genomics and a universal probe set. **Genome research**, v. 27, n. 5, p. 875-884, 2017.

_____; O'CONNOR, R; GRIFFIN, D; LARKIN, D. Avian chromosomal evolution. **Avian Genomics in Ecology and Evolution**. ed. Springer, p. 69-92, 2019.

DE OLIVEIRA E. H. C et al. Reciprocal chromosome painting between white hawk (*Leucopternis albicollis*) and chicken reveals extensive fusions and fissions during karyotype evolution of Accipitridae (Aves, Falconiformes). **Chromosome Research**, v. 18, p. 349–355, 2010.

DE OLIVEIRA T. 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.

DEGRANDI, T. M.; BARCELLOS, S. A.; COSTA, A. L.; GARNERO, A. D.; HASS, I.; GUNSKI, R. J. Introducing the Bird Chromosome Database: An Overview of Cytogenetic Studies in Birds. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 4, p. 199-205, 2020.

DICKINSON, E. C.; REMSEN JR, E. C. The Howard and Moore complete checklist of the birds of the World.—4th Edition, Vol. 1. 2013.

DE SOUZA, M. S.; BARCELLOS, S. A.; SANTOS, M. S.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. V.; DE OLIVEIRA E. H. C.; O'CONNOR, R.; GRIFFIN, D. K.; KRETSCHMER, R. Microchromosome BAC-FISH reveals different pattern of genome organization in three Charadriiformes species. **Animals**, v.12, p. 3052, 2022.

DOBIGNY, G.; DUCROZ, J. F.; ROBINSON, T. J.; VOLOBOUEV, V. Cytogenetics and cladistics. **Systematic Biology**, v. 53, n. 3, p. 470-484, 2004.

ELLEGREN, H. Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 5, p. 283-291, 2010.

FARAH, G.; SIWEK, D.; CUMMINGS, P. Tau accumulations in the brains of woodpeckers. **PLoS one**, v. 13, n. 2, p. e0191526, 2018.

FERGUSON-SMITH, M. A. et al. The impact of chromosome sorting and painting on the comparative analysis of primate genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 108, n. 1-3, p. 112-121, 2005.

FURO, 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.

GARNERO, A. D. V.; GUNSKI, R. J. Comparative analysis of the karyotypes of *Nothura maculosa* and *Rynchotus rufescens* (Aves, Tinamidae). A case of chromosomal polymorphism. **The Nucleus**, v. 43, p. 64–70, 2000.

GILL, F.; DONSKER, D.; RASMUSSEN, P. **IOC World Bird List**. v. 10.1, 2020.
GRAVES J.; SHETTY, S. Comparative genomics of vertebrates and the evolution of sex chromosomes. **Comparative Genomics**, p. 153–206, 2000.

GRIFFIN, D. K. et al. The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetic. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 117, p. 64–77, 2007.

_____; D. K.; LARKIN, D. M.; O'CONNOR, R. E. Jurassic Park: What Did the Genomes of Dinosaurs Look Like?. **Avian Genomics in Ecology and Evolution**. ed. Springer, p. 331-348, 2019.

GUNSKI, R. J. et al. Evolution of bird sex chromosomes narrated by repetitive sequences: unusual W chromosome enlargement in *Gallinula melanops* (Aves: Gruiformes: Rallidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 158, n. 3, p. 152-159, 2019.

JARVIS, E. D. et al. Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life

of modern birds. **Science**, v. 346, n. 6215, p. 1320-1331, 2014.

JUNG, K. M. et al. Identification and characterization of primordial germ cells in a vocal learning Neoaves species, the zebra finch. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 12, p. 13825-13836, 2019.

KRETSCHMER, R.; FERGUSON-SMITH, M. A.; DE OLIVEIRA, E. H. C. Karyotype Evolution in Birds: From Conventional Staining to Chromosome Painting. **Genes**, v. 9, n. 4, p. 181, 2018a.

_____. et al. Comparative chromosome painting in Columbidae (Columbiformes) reinforces divergence in Passerea and Columbea. **Chromosome Research**, v. 26, n. 3, p. 211-223, 2018b.

_____. et al. Extensive chromosomal fissions and repetitive DNA accumulation shaped the atypical karyotypes of two Ramphastidae (Aves: Piciformes) species. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 130, n. 4, p. 839-849, 2020.

_____, DOS SANTOS, M. S.; DE OLIVEIRA FURO, I.; DE OLIVEIRA, E. H. C.; CIOFFI, M. B. FISH—in Birds. In: **Cytogenetics and Molecular Cytogenetics**. CRC Press. p. 263-279.

LIEHR, T. (Ed.). **Cytogenetics and Molecular Cytogenetics**. CRC Press, 2022.

LITHGOW, P. E. et al. Novel tools for characterising inter and intra chromosomal rearrangements in avian microchromosomes. **Chromosome Research**, v. 22, p. 85–97, 2014, 2014.

MOOREA, W. S.; MIGLIAB, K. J. Woodpeckers, toucans, and allies(Piciformes). **The timetree of life**, p. 445, 2009.

MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, v. 20, p. 613–616, 1960.

NIETO, L. M.; KRETSCHMER, R.; LEDESMA, M. A.; GARNERO, A. V.; GUNSKI, R. J. 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.

O'CONNOR, R. E. et al. Patterns of microchromosome organization remain highly conserved throughout avian evolution. **Chromosoma**, v. 128, n. 1, p. 21-29, 2019.

_____. et al. Reconstruction of the diapsid ancestral genome permits chromosome evolution tracing in avian and non-avian dinosaurs. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2018.

PINHEIRO, F. L.; SIMÃO-OLIVEIRA, D.; BUTLER, R. J. Osteology of the archosauromorph *Teyujagua paradoxa* and the early evolution of the archosauriform skull. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 189, n. 1, p. 378-417, 2020.

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. **Experientia**, v. 24, n. 12, p. 1292-1293, 1968.

SCHARTL, M.; SCHMID, M. I. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. **Chromosoma**, v. 125, n. 3, p. 553-571, 2016.

SCHUPPE, E. R.; RUTTER, A. R.; ROBERTS, T. J.; FUXJAGER, M. J. Evolutionary and biomechanical basis of drumming behavior in woodpeckers. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, p. 649146, 2021.

SMOLIGA, J. M.; WANG, L. Woodpeckers don't play football: implications for novel brain protection devices using mild jugular compression. **British Journal of Sports Medicine**, v. 53, n. 20, p. 1262-1263, 2019.

WATERS, D. et al. Microchromosomes are building blocks of bird, reptile, and mammal chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 45, p. e2112494118, 2021.

WILEY, G.; MILLER, M. J. A Highly Contiguous Genome for the Golden-Fronted Woodpecker (*Melanerpes aurifrons*) via Hybrid Oxford Nanopore and Short Read Assembly. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 10, n. 6, p. 1829-1836, 2020.

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

8 OUTRAS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

Publicado como: DE SOUZA, M. S.; BARCELLOS, S. A.; SANTOS, M. S.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. V.; DE OLIVEIRA E. H. C.; O'CONNOR, R.; GRIFFIN, D. K.; KRETSCHMER, R. Microchromosome BAC-FISH reveals different pattern of genome organization in three Charadriiformes species. **Animals**, v.12, p. 3052, 2022.

Publicado como: COSTA, A. L.; FURLAN, C.; DE SOUZA, M. S.; BARCELLOS, S. A.; GIORDANI, P.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. V. Comparative cytogenetics in three species of Wood-Warblers (Aves: Passeriformes: Parulidae) reveal divergent banding patterns and chromatic heterogeneity for the W chromosome. **Caryologia**, v. 74, p. 43-51, 2021.

Publicado como: KRETSCHMER, R.; RODRIGUES, B. S.; BARCELLOS, S. A.; COSTA, A. L.; CIOFFI, MARCELO, B. C.; GARNERO, A. V.; GUNSKI, R. J.; DE OLIVEIRA, E. H. C.; GRIFFIN, DARREN, K. Karyotype Evolution and Genomic Organization of Repetitive DNAs in the Saffron Finch, *Sicalis flaveola* (Passeriformes, Aves). **Animals**, v. 11, p. 1456, 2021.

Publicado como: KRETSCHMER, R.; SOUZA, M. S.; BARCELLOS, S. A.; DEGRANDI, T. M.; PEREIRA, JORGE, C.; O'BRIEN, P. C. M.; FERGUSON-SMITH, M. A.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. V.; OLIVEIRA, E. H. C.; FREITAS, THALES, R. O. Novel insights into chromosome evolution of Charadriiformes: extensive genomic reshuffling in the wattled jacana (*Jacana jacana*, Charadriiformes, Jacanidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, p. e20190236, 2020.

Publicado como: BARCELLOS, S. A.; KRETSCHMER, R.; SOUZA, M. S.; COSTA, ALICE, L. C.; DEGRANDI, T. M.; FURLAN, C. L.; FERGUSON-SMITH, M. A.; PEREIRA, J.; OLIVEIRA, E. H. C.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. V. Comparative analyses of three swallow species (Aves, Passeriformes, Hirundinidae): Insights on karyotype evolution and genomic organization. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, p. e20190232, 2020.

Publicado como: DEGRANDI, T. M.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. V.; OLIVEIRA, E. H. C.; KRETSCHMER, R.; SOUZA, M. S.; BARCELLOS, S. A.; HASS, I. The distribution of 45S rDNA sites in bird chromosomes suggests multiple evolutionary histories. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, p. e20180331, 2020.

Publicado como: COSTA, A. L.; BARCELLOS, S. A.; DE SOUZA, M. S.; GARNERO, A. V. Da teoria à prática: a utilização de oficinas didáticas no processo de ensino e aprendizagem para alunos do ensino médio. **Revista Brasileira de Ensino de Ciência e Tecnologia**, v. 13, p. 240, 2020.

Publicado como: DEGRANDI, T. M.; BARCELLOS, S. A.; COSTA, A. L.; GARNERO, A. D.; HASS, I.; GUNSKI, R. J. Introducing the bird chromosome database: An overview of cytogenetic studies in birds. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 4, p. 199-205, 2020.

Publicado como: COSTA, A. L.; FURLAN, C.; GIORDANI, P.; BARCELLOS, S. A.; GUNSKI, R.; GARNERO, A. V. MONITORIA ACADÊMICA DE GENÉTICA: UM PERCURSO DE REFLEXÕES NO PROCESSO DE ENSINO E APRENDIZAGEM. **Experiências em Ensino de Ciências (UFRGS)**, v. 15, p. 631-643, 2020.

Publicado como: DE SOUZA, M. S.; KRETSCHMER, R. ; BARCELLOS, S. A.; Costa, A. L. ; CIOFFI, M. ; OLIVEIRA, E. ; GARNERO, A. V. ; GUNSKI, R. . Repeat Sequence Mapping Shows Different W Chromosome Evolutionary Pathways in Two Caprimulgiformes Families. **Birds**, v. 1, p. 19-34, 2020.

Publicado como: FURLAN, C.; BARCELLOS, S. A.; COSTA, A. L.; GARNERO, A. V.; RIBEIRO, J.; GUNSKI, R. J. *Belostoma estevezae* Ribeiro and Alecrim (Heteroptera: Belostomatidae) reveals a new karyotype complement in *Belostoma Latreille* from mitotic metaphases. **Revista Chilena de Entomologia**, v. 45, p. 31-36, 2019.

Publicado como: SOUZA, M. S. D., BARCELLOS, S. A., COSTA, A. L., KRETSCHMER, R., GARNERO, A. D. V., GUNSKI, R. J. Polymorphism of Sooty-fronted Spinetail (*Synallaxis frontalis* Aves: Furnariidae): Evidence of chromosomal rearrangements by pericentric inversion in autosomal macrochromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, p. 62-67, 2019.

Publicado como: BARCELLOS, S. A.; KRETSCHMER, R.; DE SOUZA, M. S.; COSTA, A. L.; DEGRANDI, T. M.; DOS SANTOS, M. S.; DE OLIVEIRA, E. H. C.; CIOFFI, M. B.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. V. Karyotype Evolution and Distinct Evolutionary History of the W Chromosomes in Swallows (Aves, Passeriformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 157, p. 1-8, 2019.

Publicado como: GUNSKI, R. J.; KRETSCHMER, R.; SANTOS, M. S.; FURO, I.; BARCELLOS, S. A.; COSTA, A. L.; CIOFFI, M. B.; DE OLIVEIRA, E. H. C.; GARNERO, A. V. Evolution of Bird Sex Chromosomes Narrated by Repetitive Sequences: Unusual W Chromosome Enlargement in *Gallinula melanops* (Aves: Gruiformes: Rallidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 157, p. 1-8, 2019.

Submetido como: TURA, V.; KRETSCHMER, R.; SASSI, F.; BARCELLOS, S. A.; DE SOUZA, M. S.; GUNSKI, R. J.; CIOFFI, M. B.; GARNERO, A. V. Chromosomal evolution of Suboscines: Karyotype diversity and evolutionary trends in Ovenbirds (Passeriformes, Furnariidae). **Cytogenetic and Genome Research**.