



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA  
EVOLUTIVA-PPG GCBEv

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS  
RETROTRANSPONÍVEIS NO GENOMA DE ESPÉCIES DE ECHIMYIDAE  
(MAMMALIA: RODENTIA)**

SIMONE CARDOSO SOARES

Manaus – Amazonas  
Dezembro, 2023

SIMONE CARDOSO SOARES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS  
RETROTRANSPONÍVEIS NO GENOMA DE ESPÉCIES DE ECHIMYIDAE  
(MAMMALIA: RODENTIA)**

Orientadora: Dra ELIANA FELDBERG

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Doutora em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, Amazonas  
Dezembro, 2023

# ATA DA DEFESA



## ATA DE DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

No dia 13 de dezembro de 2023, às 08h00 (Horário Manaus), reuniu-se a Banca Julgadora da DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO, composta pelos seguintes Doutores, membros titulares: Renata Coelho Rodrigues Noronha; Camila do Nascimento Moreira; Marlyson Jeremias Rodrigues da Costa; Marcelo Ricardo Vicari e Josiane Baccarin Traidi, tendo como membro suplente: Leonardo Gussó Goll, afim de proceder a arguição pública da TESE da discente SIMONE CARDOSO SOARES, intitulada: "IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS RETROTRANSPONÍVEIS NO GENOMA DE ESPÉCIES DE ECHIMYDAE (MAMMALIA: RODENTIA)". O estudo foi conduzido sob a orientação da Profa. Dra. Eliana Feldberg, do INPA.

Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:

- Aprovado por unanimidade  Reprovado  
 Aprovado por maioria

#### Menção (se meritória)

- Aprovado com "Distinção" (por maioria)  
 Aprovado com "Distinção e Louvor" (por unanimidade)

A ATA Foi lavrada e assinada pelos Professores Doutores, membros presentes da Banca Julgadora.

#### MEMBROS DA BANCA

Renata Coelho Rodrigues Noronha (UFPA)

Camila do Nascimento Moreira (UFMS)

Marlyson Jeremias Rodrigues da Costa (UFPA)

Marcelo Ricardo Vicari (UEPG)

Josiane Baccarin Traidi (UFAM)

Leonardo Gussó Goll (UFAM)

#### ASSINATURAS



RENATA COELHO RODRIGUES NORONHA  
Data: 12/13/2023 08:00:24 AM  
URL: https://cert.br.gov.br



CAMILA DO NASCIMENTO MOREIRA  
Data: 12/13/2023 08:00:40 AM  
URL: https://cert.br.gov.br



MARLYSON JEREMIAS RODRIGUES DA COSTA  
Data: 12/13/2023 08:00:05 AM  
URL: https://cert.br.gov.br



MARCELO RICARDO VICARI  
Data: 12/13/2023 07:59:50 AM  
URL: https://cert.br.gov.br

ELIANA FELDBERG, Dra.

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética,  
Conservação e Biologia Evolutiva - PPG GCBEV.  
PD, Nº 162 - 23.08.2021 - INPA/MCTI

Esta Ata não tem efeito de conclusão de curso ou diplomação do estudante. Conforme Regulamento PPG GCBEV Art. 52 "Será conferido ao discente o título de MESTRE ou DOUTOR em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, desde que atenda às exigências das Agências de Fomento, das regulamentações do PPG-INPA e do PPG GCBEV. Para obtenção do título, o estudante deve cumprir, ainda, o exigido nos Arts. 52 ao 55 do Regulamento Geral do INPA e Arts. 52 a 64 do Regulamento PPG GCBEV.

At  
Ac

## FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Publicação (CIP-Brasil)

S676i Soares, Simone Cardoso

Identificação e caracterização de elementos retrotransponíveis no genoma de espécies de Echimyidae (Mammalia: Rodentia) / Simone Cardoso Soares; orientadora Eliana Feldberg. - Manaus: [s.l.], 2023.

2,011 KB

138p. : il. color.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2024.

1. Echimyidae. 2. Mammalia. 3. Rodentia. I. Feldberg, Eliana. II. Título

CDD 599.35

### **Sinopse:**

Neste trabalho foi analisada a presença e associação dos elementos retrotransponíveis (TEs) LINE-L1, SINE-B1, SINE-B4, SINE-MAR, SINE-THER na evolução cariotípica de espécies de sete gêneros da família Echimyidae: *Dactylomys* sp. (Dactylomyinae); *Isothrix* spp., *Makalata* sp. (Echimyinae); *Proechimys* spp., *Mesomys* sp., *Thrichomys* sp. e *Trynomys* spp. (Eumysopinae). A distribuição comparativa de L1 e B1 no genoma das espécies de Echimyidae permitiu verificar homeologias cromossômicas fixadas, principalmente em sítios heterocromáticos de regiões centromérica e/ou pericentromérica. Em *Proechimys*, o sinal dos SINEs-B4, MAR e THER foi mais abundante e ocorreu de forma variada e específica. Assim, inferimos que estes TEs acompanham a história evolutiva desse táxon.

**Palavras-chave:** LINE, SINE, evolução cariotípica, rearranjos cromossômicos, homeologia de sinal, história evolutiva.

À minha família. Em especial ao meu irmão Márcio Soares (*In memoriam*). E ao meu companheirinho de vida Tobias Barreto - a vida teve mais cor durante sua jornada comigo.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Senhor, por estar comigo me guiando e erguendo em todos os momentos que precisei, mostrando que não seria fácil, mas mesmo diante das adversidades eu conseguiria.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, pela disponibilização de estrutura física e recursos técnicos/científicos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva – PPG GCBEv, por oportunizar um doutorado tão almejado, pelos profissionais do programa, e apoio financeiro para o desenvolvimento do meu projeto. Em Especial à Dra. Jacqueline Batista por não ter medido esforços para proporcionar minha matrícula no programa.

À minha orientadora Dra. Eliana Feldberg, por ter possibilitado meu retorno à pesquisa, quando pensei que não tinha mais forças, ela me desafiou a desenvolver um projeto tão gratificante sobre “Elementos Transponíveis”. Muito obrigada por ter me recebido no laboratório como orientanda e em sua vida como amiga, presente nos momentos mais difíceis. Sou grata profissionalmente e no pessoal pelos ensinamentos em citogenética, pelo suporte, colaboração e amizade.

Aos meus pais José (*In memoriam*) e Maria Divina pela vida, aos meus irmãos Sandra, Silvana, Silvia e Márcio (*In memoriam*) por estarem presentes em um dos momentos mais difíceis da vida, bem como pelo incentivo perante os desafios, aos sobrinhos pelo carinho e respeito, enfim pelo amor de todos ao longo da vida.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Animal (LGA) - INPA, Milena Ferreira, Alber Campos, Ramon Favarato, Eduardo Eler, Carlos Faresin, Marcelle Amorim, Vanessa Figliuolo, Francijara Araújo, Leandro Marajó, Patrik Viana, Alex Ferreira, Erika Guimarães, Sandro Tonello, Esteban Koch, Chrystian Haerter, Natália Lira pelas discussões de protocolos e colaboração em técnicas, e em especial aos nobres amigos José Souza, Juliana Moraes, Alan Gomes, Ana Júlia Alegria e Raissa Moura, pelo incentivo, boas risadas e amizade. Ao Arlindo Batista e à Helita Cardoso pela disponibilidade e competência como servidores do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologias do DNA – UFAM, Enedina de Assunção, Elen Bethleen e Kerollen Pinto pela incansável colaboração no protocolo de clonagem, sem dúvida não seria possível.

Aos colegas do Laboratório Temático de Biologia Molecular – INPA, pelo auxílio nos momentos mais difíceis para compreensão nos protocolos de Biologia Molecular e Bioinformática, Kyara Formiga, Alyne Farias, Giselle Moura e Fabrício Barros.

A Dra. Marta Svartman por oportunizar o aprendizado que obtive no Laboratório de Citogenômica Evolutiva – UFMG com a amiga e Dra. Naiara Araújo, onde começou minha paixão pela clonagem.

Enfim, gratidão a todos os verdadeiros amigos que me incentivaram a persistir, e que nos momentos mais difíceis me apoiaram com uma palavra de apoio, Milena Ferreira, Alber Campos, Isac de Jesus, Carla Nogueira e Rizi Campêlo.

### **A realização deste estudo foi possível devido:**

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG GCBEv).

Ao laboratório de Genética Animal (LGA), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.

À Coleção de Mamíferos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.

Ao Laboratório Temático de Biologia Molecular, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.

Ao Laboratório de Tecnologias do DNA, Centro de Apoio Multidisciplinar (CAN), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.

Ao Laboratório de Citogenômica Evolutiva, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Aos financiamentos fornecidos pela Rede de Pesquisa para ampliação do conhecimento sobre a biodiversidade de vertebrados da Amazônia brasileira (SISBIOTA BRASIL) - Edital MCT/CNPq/MEC/CAPES/FNDCT nº47/2010; Programa Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade, Edital Nº 047/2012, CAPES, Área Temática Contemplada: Recursos (produtos) naturais – “Estudos citogenéticos e citogenômicos da biodiversidade da Amazônia, com implementação de avanços técnicos”.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) - Programa Institucional de Apoio à Pós-Graduação Stricto Sensu (FAPEAM-POSGRAD). Taxa da bolsa de produtividade de Eliana Feldberg, CNPq - Processo Nº 302421/2014-9.

A vida é um simples processo de  
tomar consciência de si mesmo,  
cultivar o silêncio e evitar a todo  
custo julgamentos precipitados.  
Simone Soares

## RESUMO

Elementos Transponíveis (TEs) têm sido considerados como de fundamental importância para a divergência evolutiva em mamíferos. Desse modo, para o desenvolvimento desta pesquisa foi selecionado, como material de estudo, roedores da família Echimyidae (Gray 1825), em virtude de sua diversidade em termos taxonômicos, ecológicos, morfológicos, adaptativos e citogenéticos. Foram utilizadas técnicas citogenéticas e moleculares para isolar, purificar, clonar e caracterizar, por meio de sequenciamento, as sequências dos retroelementos LINE-L1, SINE-B1, SINE-B4, SINE-MAR e SINE-THER que foram usadas como sondas para hibridização nos cromossomos metafásicos. O objetivo foi avaliar a dinâmica evolutiva de elementos retrotransponíveis entre espécies, representantes das diferentes subfamílias de Echimyidae, a saber: *Dactylomys* sp. (Dactylomyinae); *Isothrix* sp., *Makalata* sp. (Echimyinae); *Proechimys* sp., *Mesomys* sp., *Thrichomys* sp. e *Trynomys* sp. (Eumysopinae). O mapeamento de LINE-L1 e SINE-B1 no genoma das espécies demonstrou que estes retroelementos mantiveram-se nos cariótipos, em cromossomos não homeólogos. As similaridades dos sinais de L1 e B1 nos pares cromossômicos não homeólogos, principalmente em regiões centroméricas e/ou pericentroméricas, indicam que rearranjos ocorreram durante a diversificação dos cariótipos. Estes dados revelaram homeologia de sinal das sequências de L1 e B1 em *Proechimys* compreendendo quatro grupos: (1) *P. longicaudatus* (2n = 28/FN = 46) e *P. cuvieri* (2n = 28/FN = 46), (2) *P. guyannensis* (2n = 46/FN = 50) e *P. guyannensis* (2n = 38/FN = 52), (3) *P. gardneri* (2n = 40/FN = 54), e (4) *P. echinothrix* (2n = 32/FN = 58). O cladograma proposto para as sequências de L1 e B1, composto por cinco subgrupos com diferentes graus de similaridade, reflete algumas das relações taxonômicas propostas na literatura, para Echimyidae: *D. dactylinus* (2n = 94/FN = 134) e *M. didelphoides* (2n = 72/FN = 132) (ratos espinhosos arbóreos) foram agrupados, assim como *M. hispidus* (2n = 60/FN = 116) e *I. pagurus* (2n = 22/FN = 38) (ratos espinhosos arbóreos), *T. paratus* (2n = 58/FN = 112), *T. apereoides* (2n = 28/FN = 50), e *P. guyannensis* (2n = 46/FN = 50) (ratos espinhosos terrestres). A distribuição de L1 e B1 na *fiber*-FISH confirmou possíveis rearranjos, devido à diversificação encontrada nas fibras das diferentes espécies. Blocos de L1 e/ou B1 foram coincidentes com heterocromatina constitutiva (HC), em regiões intersticiais, terminais e/ou centroméricas de alguns pares cromossômicos. A alternância de L1 e/ou B1 nos sítios heterocromáticos centroméricos dos cromossomos sexuais pode estar associada à competição entre cópias de TEs no genoma. A presença de blocos de L1 e/ou B1 coincidente com HC pode estar associada à plasticidade do genoma e remodelamento da cromatina. Já, TEs em regiões regulatórias podem ter sido cooptados para potencializar este efeito, como demonstrando neste estudo com sítios da região organizadora do nucléolo (RON) no genoma de *Proechimys*, assim como em todas as espécies, blocos do DNAr 18S foi coincidente com blocos de L1 em um dos homólogos. A ampla distribuição dos diferentes SINEs nos cromossomos demonstrou diferenciação destes retroelementos nas espécies de *Proechimys*. O sinal dos SINEs B4 e MAR foi mais explosivo que dos SINEs B1 e THER, e envolveu regiões centroméricas/pericentroméricas e terminais, na maioria dos cromossomos. Esta explosão de SINEs é explicada pelo fato destes elementos surgirem *de novo* muitas vezes na evolução. O sinal dos SINEs foi distribuído de forma variada e específica no genoma das espécies de *Proechimys* e podem estar relacionados com a evolução cariotípica deste gênero. Os clusters formados a partir das sequências de LINE-L1 e SINE-B1 sugere que estes retroelementos podem estar correlacionados com padrões de diferenciação nessa família e pode fornecer *insights* sobre as relações evolutivas entre táxons e TEs.

## ABSTRACT

Transposable Elements (TEs) have been considered to be of fundamental importance for evolutionary divergence in mammals. Therefore, for the development of this research, rodents from the Echimyidae family (Gray 1825) were selected as study material, due to their diversity in taxonomic, ecological, morphological, adaptive and cytogenetic terms. Cytogenetic and molecular techniques were used to isolate, purify, clone and characterize, through sequencing, the sequences of the retroelements LINE-L1, SINE-B1, SINE-B4, SINE-MAR and SINE-THER that were used as probes for hybridization in metaphase chromosomes. The objective was to evaluate the evolutionary dynamics of retrotransposable elements between species, representatives of the different subfamilies of Echimyidae, namely: *Dactylomys* sp. (Dactylomyinae); *Isothrix* sp., *Makalata* sp. (Echimyinae); *Proechimys* sp., *Mesomys* sp., *Thrichomys* sp. and *Trynomys* sp. (Eumysopinae). The mapping of LINE-L1 and SINE-B1 in the genome of the species demonstrated that these retroelements remained in the karyotypes, in non-homeologous chromosomes. The similarities of L1 and B1 signals in non-homeologous chromosome pairs, mainly in centromeric and/or pericentromeric regions, indicate that rearrangements occurred during the diversification of karyotypes. These data revealed signal homeology of L1 and B1 sequences in *Proechimys* comprising four groups: (1) *P. longicaudatus* ( $2n = 28/FN = 46$ ) and *P. cuvieri* ( $2n = 28/FN = 46$ ), (2) *P. guyannensis* ( $2n = 46/FN = 50$ ) and *P. guyannensis* ( $2n = 38/FN = 52$ ), (3) *P. gardneri* ( $2n = 40/FN = 54$ ), and (4) *P. echinothrix* ( $2n = 32/FN = 58$ ). The cladogram proposed for the L1 and B1 sequences, composed of five subgroups with different degrees of similarity, reflects some of the taxonomic relationships proposed in the literature, for Echimyidae: *D. dactylinus* ( $2n = 94/FN = 134$ ) and *M. didelphoides* ( $2n = 72/FN = 132$ ) (tree spiny rats) were grouped together, as were *M. hispidus* ( $2n = 60/FN = 116$ ) and *I. pagurus* ( $2n = 22/FN = 38$ ) (tree spiny rats), *T. paratus* ( $2n = 58/FN = 112$ ), *T. apereoides* ( $2n = 28/FN = 50$ ), and *P. guyannensis* ( $2n = 46/FN = 50$ ) (spiny land rats). The distribution of L1 and B1 in fiber-FISH confirmed possible rearrangements, due to the diversification found in the fibers of different species. L1 and/or B1 blocks were coincident with constitutive heterochromatin (HC), in interstitial, terminal and/or centromeric regions of some chromosome pairs. The alternation of L1 and/or B1 in the centromeric heterochromatic sites of sex chromosomes may be associated with competition between copies of TEs in the genome. The presence of L1 and/or B1 blocks coinciding with HC may be associated with genome plasticity and chromatin remodeling. Already, TEs in regulatory regions may have been co-opted to enhance this effect, as demonstrated in this study with sites in the nucleolus organizing region (RON) in the *Proechimys* genome, as well as in all species, blocks of 18S rDNA were coincident with blocks of L1 in one of the homologues. The wide distribution of different SINEs in chromosomes demonstrated differentiation of these retroelements in *Proechimys* species. The signal from SINEs B4 and MAR was more explosive than that from SINEs B1 and THER, and involved centromeric/pericentromeric and terminal regions in most chromosomes. This explosion of SINEs is explained by the fact that these elements appear again many times in evolution. The SINEs signal was distributed in a varied and specific way in the genome of *Proechimys* species and may be related to the karyotypic evolution of this genus. The clusters formed from the LINE-L1 and SINE-B1 sequences suggest that these

retroelements may be correlated with differentiation patterns in this family and may provide insights into the evolutionary relationships between taxa and TEs.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xviii
1.Introdução Geral	01
1.1 Elementos Transponíveis	02
1.1.1. Elementos de classe I ou Retrotransposons	02
a) Retrotransposons de repetições terminais longas (LTR)	03
b) Retrotransposon <i>Penelope</i> (PLP)	03
c) Retrotransposon <i>Dictyostelium intermediate repeat sequence</i> (DIRS)	04
d) Elementos intercalados longos autônomos não-LTR ou LINEs	04
e) Elementos intercalados curtos (SINE) não autônomos não-LTR	06
1.1.2. Elementos de classe II ou Transposons	07
1.1.3 Elementos Transponíveis e Dinâmica do genoma	07
1.2. Organismo modelo	10
1.2.1 A família Echimyidae	10
2.Objetivos	16
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3.Material e Métodos	18
3.1. Material	19
3.2. Métodos	20
3.2.1. Extração de DNA – Wizard Genomic DNA Purification kit (PROMEGA)	21
3.2.2. Isolamento dos Retrotransposons pela técnica de PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )	22
3.2.3. Purificação do produto de PCR em Gel de agarose - Kit GE Healthcare	23
3.2.4. Clonagem das Sequências de Retrotransposons	24
3.2.4.1. Ligação das sequências de interesse purificadas ao vetor de clonagem pGEM-T Easy	24
3.2.4.2. Preparação dos meios de cultura para plaqueamento e crescimento das bactérias eletrocompetentes TOP10 (Thermo Fisher) transformadas	24
3.2.4.3. Transformação da bactéria <i>E. coli</i> - células competentes TOP10 (Thermo Fisher) com os Plasmídeos recombinantes pGEM-T Easy (Promega)	25
3.2.4.4. Plaqueamento das bactérias eletrocompetentes TOP10 (Thermo Fisher) transformadas – uso de luz Ultravioleta - U.V (Fluxo)	26

3.2.4.5 Seleção dos clones para extração dos Plasmídeos recombinantes a partir das bactérias eletrocompetentes TOP10 (Thermo Fisher) - uso de luz Ultravioleta - UV (Fluxo)	27
3.2.4.6. Amplificação dos Plasmídeos recombinantes através da técnica de PCR ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> – Saiki <i>et al.</i> 1988) para verificação de positividade	27
3.2.4.7. Extração dos Plasmídeos recombinantes das bactérias eletrocompetentes TOP10 (Thermo Fisher) - uso de luz Ultravioleta - U.V (Fluxo) – Miniprep - <i>kit Wizard Plus</i>	28
3.2.5. Reação de sequenciamento das Sequências de DNA plasmidial com kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 – Applied Biosystems (Sanger <i>et al.</i> 1977)	30
3.2.6. Confirmação das Sequências – LINE- L1, SINE-B1, SINE-B4, SINE-MAR e SINE-THER-BlastN	31
3.2.7. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) dos Retrotranspos LINE-L1, SINE-B1, SINE-B4, SINE-MAR e SINE-THER (Pinkel <i>et al.</i> 1986).	32
3.2.8. <i>Fiber-FISH</i> - protocolo de <u>Barros <i>et al.</i> (2011)</u>	35
3.2.9. Análises cromossômicas	35
3.2.10. Análise de Bioinformática	36
4. Resultados e Discussão	37
Capítulo 1	38
Soares, S.C.; Eler, E.S.S.; Silva, C.E.F.; da Silva, M.N.F.; Araújo, N.P.; Svartman, M.; Feldberg, E. 2022. Mapeamento e diversificação de LINE-1 and SINE-B1 no genoma de espécies de <i>Proechimys</i> (Rodentia: Echimyidae). <i>Life Science Alliance</i> , 5(6): 1-11	
Capítulo 2	57
Soares, S.C.; Eler, E.S.S.; Silva, C.E.F.; da Silva, M.N.F.; Araújo, N.P.; Svartman, M.; Feldberg, E. 2023. Mapeamento de LINE-1 and SINE-B1 e diversificação genômica em espécies de Echimyidae. (Mammalia: Rodentia)	
Capítulo 3	80
Soares, S.C.; Eler, E.S.S.; Silva, C.E.F.; Souza-Sousa, J.F; da Silva, M.N.F.; Araújo, N.P.; Svartman, M.; Feldberg, E. 2023. Mapeamento de diferentes SINEs no genômica de espécies de <i>Proechimys</i> . (Mammalia: Rodentia).	
Conclusões Gerais	91
Referências Bibliográficas	92
Apêndices	113

## LISTAS DE TABELAS

### Material e Métodos

Tabela 1. Espécies de Echimyidae analisadas neste estudo e código de identificação dos exemplares	20
<b>Capítulo 1</b>	38
Tabela 1. Espécies de <i>Proechimys</i> analisadas. 2n=número diploide; NF= número fundamental; INPA=Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.	42
Tabela 2. Prováveis rearranjos nos cromossomos de <i>Proechimys</i> spp. a partir da distribuição dos retroelementos LINE-1 como mostrado na figura 1.	46
Tabela 3. Prováveis rearranjos nos cromossomos de <i>Proechimys</i> spp. a partir da distribuição dos retroelementos SINE-B1 como mostrado na figura 2.	48
Tabela 4. Similaridade Jaccard obtida na comparação entre espécies.	50
Tabela 5. Hibridização correspondente entre LINE-1, SINE-B1, Ag-RONs e heterocromatina constitutiva (CH) em cromossomos de <i>Proechimys</i> como mostrado na figura 5.	52
<b>Capítulo 2</b>	58
Tabela 1. Espécies da família Echimyidae analisadas. 2n = número diploide, NF = número fundamental.	63
Tabela 2. Prováveis rearranjos cromossômicos em Echimyidae a partir da distribuição dos retroelementos LINE-1 (Figura 1). DAC = <i>D. dactylinus</i> (2n=94), MAK = <i>M. didelphoides</i> (2n=72), MES = <i>M. hispidus</i> (2n=60), TRI = <i>T. paratus</i> (2n=58), PRO = <i>P. guyannensis</i> (2n=46), THR = <i>T. apereoides</i> (2n=28), ISO = <i>I. pagurus</i> (2n=22), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico.	66
Tabela 3. Prováveis rearranjos cromossômicos em Echimyidae a partir da distribuição dos retroelementos SINE-B1 (Figura 2). DAC = <i>D. dactylinus</i> (2n=94), MAK = <i>M. didelphoides</i> (2n=72), MES = <i>M. hispidus</i> (2n=60), TRI = <i>T. paratus</i> (2n=58), PRO = <i>P. guyannensis</i> (2n=46), THR = <i>T. apereoides</i> (2n=28), ISO = <i>I. pagurus</i> (2n=22), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico.	69
Tabela 4. Concenso de LINE-L1 das espécies da família Echimyidae com variantes estruturais de retrotransposons não LTRs. <sup>1,3,7</sup> Wichman <i>et al.</i> 2005; <sup>2</sup> Bao e Jurka 2009; <sup>4,6</sup> Kojima 2019; <sup>5</sup> Soares <i>et al.</i> 2022.	70
Tabela 5. Consenso de SINE-B1 das espécies da família Echimyidae com variantes estruturais de retrotransposons não LTRs. <sup>1,2,7</sup> Veniaminova <i>et al.</i> 2007; <sup>6</sup> Jurka 2010; <sup>3,4,5</sup> Soares <i>et al.</i> 2022.	70
Tabela 6. Hibridização correspondente entre LINE-1, SINE-B1, DNAr 18S e Heterocromatina constitutiva (HC) em cromossomos de Echimyidae. DAC = <i>D. dactylinus</i> (2n=94), MAK = <i>M. didelphoides</i> (2n=72), MES = <i>M. hispidus</i> (2n=60), TRI = <i>T. paratus</i> (2n=58), PRO = <i>P. guyannensis</i> (2n=46), THR = <i>T. apereoides</i> (2n=28), ISO = <i>I. pagurus</i> (2n=22) como mostrado na fig 4. m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico.	75

<b>Capítulo 3</b>	81
Tabela 1. Espécies de <i>Proechimys</i> analisadas. 2n=número diploide; NF= número fundamental; INPA=Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.	84
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados na amplificação dos retrotransposons não-LTR-SINEs.	85

## LISTAS DE FIGURAS

### Introdução

Figura 1. Mapa de distribuição para todos os gêneros de Echimyidae e correspondência entre suas distribuições e as províncias biogeográficas dos Neotrópicos (Fabre <i>et al.</i> 2017).	12
Figura 2. Topologia bayesiana obtida a partir da concatenação do conjunto de dados de nucleotídeos (NT) da codificação de 13 proteínas e dos 5 genes nucleares para os principais clados de equimídeos (Fabre <i>et al.</i> 2017).	14

### Capítulo 1

Figura 1. Distribuição dos retroelementos LINE-1 em <i>Proechimys</i> ssp. PS1 = <i>P. guyannensis</i> (2n=46), PG = <i>P. gardneri</i> (2n=40), PS2 = <i>P. guyannensis</i> (2n=38), PE = <i>P. echinothrix</i> (2n=32), PL = <i>P. longicaudatus</i> (2n=28), PC = <i>P. cuvieri</i> (2n=28), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico. As setas indicam regiões onde os possíveis rearranjos nos cromossomos das diferentes espécies ocorreram. (Apêndice 3). Barra=10,0µm.	45
Figura 2. Distribuição dos retroelementos SINE B1 em <i>Proechimys</i> spp. PS1 = <i>P. guyannensis</i> (2n=46), PG = <i>P. gardneri</i> (2n=40), PS2 = <i>P. guyannensis</i> (2n=38), PE = <i>P. echinothrix</i> (2n=32), PL = <i>P. longicaudatus</i> (2n=28), PC = <i>P. cuvieri</i> (2n=28), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico. As setas indicam a região dos possíveis rearranjos nos cromossomos das diferentes espécies. (Apêndice 4). Barra=10,0µm.	47
Figura 3. Cladograma obtido após a análise em PAST 4.3 das espécies PS1 = <i>P. guyannensis</i> (2n=46), PG = <i>P. gardneri</i> (2n=40), PS2 = <i>P. guyannensis</i> (2n=38), PE = <i>P. echinothrix</i> (2n=32), PL = <i>P. longicaudatus</i> (2n=28), PC = <i>P. cuvieri</i> (2n=28), usando os possíveis rearranjos de cromossomos, gerados pelos retroelementos L1 e B1 como caracteres únicos (Apêndices 1 e 2). Barra=10,0µm	49
Figura 4. <b>Fiber-FISH mostrando cluster de LINE-L1 (vermelho) e SINE-B1 (verde) adjacente e sobreposto em <i>Proechimys</i> spp.</b> PS1 = <i>P. guyannensis</i> (2n=46), PG = <i>P. gardneri</i> (2n=40), PS2 = <i>P. guyannensis</i> (2n=38), PE = <i>P. echinothrix</i> (2n=32), PL = <i>P. longicaudatus</i> (2n=28), PC = <i>P. cuvieri</i> (2n=28). (A) SINE-B1, (B) SINE-B1+DAPI, (C) LINE-L1, (D) LINE -L1 + DAPI, (E) SINE-B1+LINE-L1+ DAPI. Barra=10,0µm.	50
Figura 5. <b>Hibridização correspondente entre LINE-1, SINE-B1, Ag-RONs e heterocromatina constitutiva (CH) em cromossomos de <i>Proechimys</i>.</b> PS1 = <i>P. guyannensis</i> (2n=46), PG = <i>P. gardneri</i> (2n=40), PS2 = <i>P. guyannensis</i> (2n=38), PE = <i>P. echinothrix</i> (2n=32), PL = <i>P. longicaudatus</i> (2n=28), PC = <i>P. cuvieri</i> (2n=28). (A) LINE-1 à esquerda e CH à direita. (B) SINE-B1 à esquerda e CH à direita. (C) LINE-1 à esquerda e Ag-RON à direita. m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico, q = braço longo. Barra=10,0µm.	51

## Capítulo 2 58

Figura 1. **Distribuição do retroelemento LINE-1 em espécies da família Echimyidae.** DAC = *D. dactylinus* (2n=94), MAK = *M. didelphoides* (2n=72), MES = *M. hispidus* (2n=60), TRI = *T. paratus* (2n=58), PRO = *P. guyannensis* (2n=46), THR = *T. apereoides* (2n=28), ISO = *I. pagurus* (2n=22), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtlocêntrico, a = acrocêntrico. As setas indicam as regiões onde, provavelmente, ocorreram rearranjos. Barra = 10,0µm. (Apêndice 6) 65

Figura 2. **Distribuição do retroelemento SINE-B1 em espécies da família Echimyidae.** DAC = *D. dactylinus* (2n=94), MAK = *M. didelphoides* (2n=72), MES = *M. hispidus* (2n=60), TRI = *T. paratus* (2n=58), PRO = *P. guyannensis* (2n=46), THR = *T. apereoides* (2n=28), ISO = *I. pagurus* (2n=22), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtlocêntrico, a = acrocêntrico. As setas indicam as regiões onde, provavelmente, ocorreram rearranjos. Barra = 10,0µm. (Apêndice 7) 68

Figura 3. **Cladograma das espécies, obtido após a análise de Máxima Parsimônia.** *D. dactylinus* (2n=94), *M. didelphoides* (2n=72), *M. hispidus* (2n=60), *T. paratus* (2n=58), *P. guyannensis* (2n=46), *T. apereoides* (2n=28), *I. pagurus* (2n=22), usando o método de inferência Min-Min Heuristic gerada, considerando os retroelementos L1 e B1 como caracteres únicos (Apêndice 5) 71

Figura 4. **Fiber-FISH mostrando cluster de LINE-L1 (vermelho) e SINE-B1 (verde) adjacentes e intercalados em espécies de Echimyidae.** DAC = *D. dactylinus* (2n=94), MAK = *M. didelphoides* (2n=72), MES = *M. hispidus* (2n=60), TRI = *T. paratus* (2n=58), PRO = *P. guyannensis* (2n=46), THR = *T. apereoides* (2n=28), ISO = *I. pagurus* (2n=22)). (A) SINE-B1, (B) SINE-B1+DAPI, (C) LINE-L1, (D) LINE-L1 + DAPI, (E) SINE-B1+LINE-L1+DAPI. Barra = 10,0µm. 72

Figura 5. **Hibridização correspondente entre LINE-1, SINE-B1, DNAr 18S e Heterocromatina constitutiva (CH) em cromossomos das sete espécies de Echimyidae.** DAC = *D. dactylinus* (2n=94), MAK = *M. didelphoides* (2n=72), MES = *M. hispidus* (2n=60), TRI = *T. paratus* (2n=58), PRO = *P. guyannensis* (2n=46), THR = *T. apereoides* (2n=28), ISO = *I. pagurus* (2n=22)). (A) LINE-1 à esquerda, SINE-B1 no meio e CH à direita. (B) LINE-1 à esquerda, SINE-B1 no meio, e DNAr\_18S à direita. m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtlocêntrico, a = acrocêntrico. Barra = 10,0µm. 73

## Capítulo 3 81

Figura 1. Distribuição dos retroelementos SINEs em *Proechimys* spp. Hibridização do retroelemento B4 em (A) PS1 = *P. guyannensis* (2n=46); (B) PG = *P. gardneri* (2n=40); (C) PS2 = *P. guyannensis* (2n=38); (D) PE = *P. echinothrix* (2n=32); (E) PL = *P. longicaudatus* (2n=28); (F) PC = *P. cuvieri* (2n=28). Hibridização do retroelemento B1 em: (G) PS1; (H) PG; (I) PS2; (J) PE; (K) PL; (L) PC. Barra=10,0 µm. 87

Figura 2. Distribuição dos retroelementos SINEs em *Proechimys* spp. Hibridização do retroelemento MAR em: (A) PS1 = *P. guyannensis* (2n=46); (B) PG = *P. gardneri* (2n=40); (C) PS2 = *P. guyannensis* (2n=38); (D) PE = *P. echinothrix* (2n=32); (E) PL = *P. longicaudatus* (2n=28); (F) PC = *P. cuvieri* (2n=28). Hibridização do retroelemento THER em: (G) PS1; (H) PG; (I) PS2; (J) PE; (K) PL; (L) PC. Barra=10,0 µm. 88

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

<b>Lista de Abreviaes e Siglas</b>	
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>Ng</b>	Nanograma
<b>M</b>	Molar
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>ml</b>	Mililitro
<b>H</b>	Hora
<b>Min</b>	Minuto
<b>Seg</b>	Segundo
<b>Rpm</b>	Rotaes por minuto
<b>Rcf</b>	Força centrífuga relativa
<b>G</b>	Gravitacional ou rcf
<b>2n</b>	Número diploide
<b>pb</b>	Pares de bases
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>g/L</b>	Grama por litro
<b>Mm</b>	Milimitro
<b>Primers</b>	Oligos iniciadores
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina trifosfatada
<b>dCTP</b>	Desoxicitosina trifosfatada
<b>dTTP</b>	Desoxitimosina trifosfatada
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina trifosfatada
<b>dUTP</b>	Desoxiuracila trifosfatada
<b>PCR</b>	Reao em cadeia da polimerase
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>G</b>	Grama
<b>LB</b>	Luria-Bertani

<b>kgf cm<sup>2</sup></b>	quilograma-força por centímetro quadrado
<b>V</b>	Voltagem
<b>SOC</b>	Super Optimal Broth
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnésio
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>X-Gal</b>	5-bromo4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo
<b>IPTG</b>	Isopropil-b-D-galactosídeo
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>SSC</b>	Saline-sodium citrate
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>Ag-RON</b>	Região organizadora de nucléolo
<b>Banda-C</b>	Técnica de detecção da heterocromatina constitutiva
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa
<b>SISBIO</b>	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenilindole
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNAr</b>	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
<b>ETs</b>	Elementos transponíveis
<b>FC</b>	Fórmula Cariotípica
<b>FISH</b>	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
<b>INPA</b>	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<b>NF</b>	Número fundamental
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>CBG</b>	Bandeamento C
<b>HCL</b>	Ácido clorídrico
<b>RON</b>	Região organizadora de nucléolo

# Introdução geral

---

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das técnicas de sequenciamento viabilizou a análise do genoma de diferentes espécies, possibilitando a constatação da presença de elementos transponíveis (TEs) em praticamente todos os organismos. A constatação de que estes elementos podem amplificar-se, gerando variação no número de cópias e na distribuição entre diferentes grupos, bem como a habilidade de introduzir inovações nos aspectos regulatórios e codificantes dos genes, suscitou discussão sobre a importância filogenética deles entre as espécies, estabelecendo o papel desses elementos na estrutura e regulação de genes. No entanto, pouco se sabe sobre a influência dos TEs na variação estrutural do genoma de mamíferos. Como esses elementos se encontram dispersos no genoma de vertebrados é de fundamental importância sua identificação e localização, ao longo dos cromossomos, nas diferentes espécies, de forma a compreender sua evolução (Smith e Riggs 1996).

### 1.1 ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

Elementos Transponíveis (TE) são “sequências lineares de DNA que têm a capacidade de mudar de posição dentro do genoma”, independente de homologia, entre a região genômica, onde se encontram inseridos, e o local ao qual se destinam (Vandewege *et al.* 2016), com tamanho variando de 100 a 10.000 pares de bases, podendo ser muito maiores (Arkhipova e Yushenova 2019).

A classificação é hierárquica e separa os TEs em duas classes principais, com base na presença ou ausência de RNA como intermediário de transposição (Finnegan 1989). Estas classes são subdivididas em subclasses, ordens e superfamílias. As ordens são divididas em superfamílias de acordo com a estratégia de replicação e características, uniformes e generalizadas em grande escala, como a estrutura da proteína ou domínios não codificantes. Além disso, diferem na presença e no tamanho da duplicação do sítio alvo (TSD), uma repetição curta e direta que é gerada em ambos os flancos de um TE após a inserção. As superfamílias se subdividem em famílias, que são definidas pela conservação da sequência de DNA e similaridade ao nível de proteína. Estas se subdividem em subfamílias que são definidas com base em dados filogenéticos e podem, em casos específicos, servir para distinguir populações autônomas e não autônomas internamente homogêneas (Wicker *et al.* 2007).

#### 1.1.1 Elementos de classe I ou Retrotransposons

Os retrotransposons são subdivididos em cinco ordens, estando presentes em todos os reinos - Protista, Plantae, Fungi e Animalia: retrotransposons de repetição terminal longa (LTR), *Penelope* (PLP), *Dictyostelium intermediate repeat sequence* (DIRS), *Long*

*Interspersed Nucleotide Elements* (LINE) e *Short Interspersed Nucleotide Elements* (SINE). (Arkhipova *et al.* 2003; Evgen'ev e Arkhipova 2005; Poulter e Goodwin 2005; Wicker *et al.* 2007).

**a) Retrotransposons de repetição terminal longa (LTR)**

Retrotransposons LTR possuem longas repetições nucleotídicas flanqueadoras nas extremidades 5' e 3' (Capy *et al.* 1998) e sintetizam um intermediário de DNA de cadeia dupla (DNA), utilizando a Transcriptase Reversa (TR) e o próprio RNA como molde. O DNA complementar (DNAc) é então inserido no cromossomo do hospedeiro por recombinação, envolvendo uma integrase associada (ou recombinase) (Kumar e Bennetzen 1999; Beauregard *et al.* 2008). Suas regiões flanqueadoras atuam em uma região central, que contém três módulos abertos de leitura, conhecidos por ORFs (*Open Reading Frames*), do gene *gag*, do gene *pol* e do gene *env* (Capy *et al.* 1998; Morales *et al.* 2007). A estrutura consenso envolve os genes *gag* e *pol*, que se sobrepõem em diferentes quadros de leitura, ou são separados por um ou mais códons de terminação (Eickbush e Jamburuthugoda 2008).

Esta ordem de retroelementos pode ser subdividida em **superfamílias**, com base na similaridade de sequências e características estruturais: Cópia, Gypsy, BEL/Pao, ERVs (Retrovírus endógenos), Halcyon e Echo (Wicher *et al.* 2007), e estão presentes em todos os genomas eucariotos, sendo identificadas em torno de 160 famílias, em aproximadamente 40 espécies (Frame *et al.* 2001; Copeland *et al.* 2005). Este Retrotransposon de repetição terminal longa (LTR) é o componente de DNA mais abundante em plantas, sendo amplamente responsável pela variação do tamanho do genoma, e compõem uma grande fração do genoma de mamíferos, compreendendo, por exemplo, cerca de 8% em humanos e aproximadamente 10% em camundongos (Lander *et al.* 2001; Waterston *et al.* 2002; McCarthy e McDonald 2004; Liu *et al.* 2018). Estima-se que as inserções de ERVs sejam responsáveis por aproximadamente 10% das mutações espontâneas em camundongos (Maksakova *et al.* 2006).

**b) Retrotransposon *Penelope* (PLP)**

Esta ordem de retroelemento é composta pela superfamília *Penelope-like elements* (PLP) (Wicker *et al.* 2007) e contém uma única ORF codificada, que consiste em dois domínios principais: transcriptase reversa (RT) e endonuclease (EN), que é semelhante às endonucleases codificadas por íntron GIY-YIG. Estes elementos são encontrados em diversos eucariotos, incluindo amebas, fungos, cnidários, rotíferos, platelmintos, lombrigas, peixes, anfíbios e répteis (Evgen'ev e Arkhipova 2005). *Penelope* é responsável pela síndrome da disgenesia híbrida em *Drosophila virilis*, caracterizada pela mobilização simultânea de diversas famílias

de TE, não relacionadas à progênie de cruzamentos disgênicos (Evgen'ev *et al.* 1997). A análise filogenética de cópias de *Penelope*, isoladas de várias espécies do grupo *virilis*, revela duas subfamílias deste elemento, uma das quais inclui cópias completas, cujas sequências de nucleotídeos são quase idênticas, enquanto a outra consiste em cópias defeituosas altamente divergentes (Lyozin *et al.* 2001).

#### **c) Retrotransposon *Dictyostelium intermediate repeat sequence* (DIRS)**

Esta ordem de retroelemento é composta pelas superfamílias DIRS, Ngaro e VIPER (Wicker *et al.* 2007). Este grupo é caracterizado pela presença de tirosina recombinases (TR), com função de realizar integração genômica específica do local de retrotransposons (Finnegan 1997; Haren *et al.* 1999). Estes retroelementos formam quatro famílias e todas apresentam composição semelhante, porém com diferentes quadros de leitura aberta (ORFs). Ainda, uma suposta proteína GAG, uma transcriptase reversa (RT) e uma RNase H (RH) (EickbTush e Jamburuthugoda 2008).

#### **d) Elementos intercalados longos autônomos não-LTR ou LINEs**

Esta ordem não possui repetições terminais longas (nao-LTR) e compreendem elementos com tamanhos que variam entre 4 a 6 kb e são delimitados por uma região não traduzida (UTR) em ambas as extremidades. Estes elementos possuem um ou dois quadros de leitura abertos (*open reading frame* - ORF), sendo que o primeiro codifica um RNA de ligação proteica e o segundo codifica enzimas necessárias para a transposição, como a transcriptase reversa, endonuclease de reparo e em alguns casos RNase H, um promotor que se localiza na região interna do terminal 5' (primeiros nucleotídeos), e uma sequência rica em adenina no terminal 3' (Finnegan 1989; Mathias *et al.* 1991; Kolosha e Martin 2003). As proteínas ORF1 e ORF2 juntam-se com o RNA de LINEs em um complexo de ribonucleoproteína (RNP), que é presumivelmente transportado para o núcleo (Martin 2005; Kubo *et al.* 2006).

O mecanismo de retrotransposição e integração de LINEs no genoma é denominado transcrição reversa de alvo inicial (TPRT). De acordo com o modelo TPRT, o complexo intermediário de transposição (RNA modelo), transcriptase reversa e nuclease associam-se ao DNA alvo em uma sequência rica em AT. A nuclease faz uma quebra de uma única cadeia adjacente em uma sequência de timinas, ocorrendo o pareamento da sequência poli (A) na extremidade 3' do RNA com o fragmento de DNA alvo rompido, permitindo que a transcrição reversa seja iniciada a partir do grupo hidroxila 3' livre. O RNA modelo é removido por RNase H e a nuclease faz uma quebra na cadeia oposta do DNA alvo de alguns nucleotídeos do primeiro sítio, ocorrendo a síntese da segunda cadeia de DNA a partir do novo 3'OH e, por fim,

enzimas de reparo do genoma completam a integração (Luan *et al.* 1993; Eickbush e Malik 2002 *apud* Kapitonov *et al.* 2009).

Com base em características estruturais de retrotransposons não-LTR e filogenia de RTs, são considerados sete **superfamílias** para essa ordem a saber **R2**, **RTE** (*retrotransposon-like elemento*), **Jockey**, **L1**, **I**, **Pan**, **Chronos** (Wicker *et al.* 2007). LINE-1 (L1) é o maior representante em mamíferos e estão amplamente associados ao genoma de camundongos (Waterston *et al.* 2002; Eickbush e Malik 2002 *apud* Kapitonov *et al.* 2009).

**Os elementos intercalados longos 1 (LINE-1) autônomos não-LTR** são altamente abundantes e compõem entre 15% e 20% do genoma de mamíferos (Gallus *et al.* 2016), sendo estimado de 100 e 3000 cópias potencialmente ativas no genoma de humanos e camundongos, respectivamente (Sassaman *et al.* 1997; Deberardinis *et al.* 1998). A análise comparativa do genoma de mamíferos tem identificado uma sequência conservada de 612 nucleotídeos na ORF2 de elementos LINE-1 funcional com leitura correta, indicando sua capacidade de retrotransposição ativa (Scott *et al.* 2006; Cantrell *et al.* 2008). Dentre as funções propostas, incluem reparo da fita dupla de DNA e inativação do cromossomo X (Teng *et al.* 1996; Lyon 1998), além de fornecer a maquinaria molecular para o movimento dos elementos SINEs e pseudogenes, mediar recombinação ectópica e afetar a estabilidade genômica (Furano 2000; Gilbert *et al.* 2002). Beraldi *et al.* (2006) sugeriram ainda que os retrotransposons de L1 podem afetar a diversificação somática em camundongos, bem como sua importância para implantação embrionária. Estes elementos compreendem aproximadamente 18% do genoma de camundongos, sendo estratificados, assim como em outros mamíferos, em pelo menos cinco subfamílias: V, F, A, TF e GF (Waterston *et al.* 2002). As subfamílias V e F são consideradas inativas e as A, TF e GF permanecem com a capacidade de retrotransposição (Goodier *et al.* 2001; Sookdeo *et al.* 2013). A transcrição L1 é mais ou menos específica da linhagem germinativa, sendo as cópias acumuladas nas regiões ricas em AT, locais de genes de baixa expressão, do genoma de mamíferos (Cost e Boeke 1998), sendo L1 muito mais abundante em ambos os cromossomos sexuais, possivelmente refletindo uma integração preferencial inerte e com menor disponibilidade de recombinação heterocromática (Smit 1996). Considerando a hipótese de que os LINE-1 desempenham um papel na inativação do cromossomo sexual X, Scott *et al.* (2006) demonstraram que a presença de L1 ativo na espécie de camundongo *Tokudaia osimensis*, com cariótipo XO, contemplou maior densidade ao único cromossomo X, em relação aos autossomos.

Estudos funcionais em células cultivadas revelaram que aproximadamente 3.000 LINEs-1 de camundongos permanecem competentes para retrotransposição, e que a grande maioria dos LINEs-1 no genoma de referência *de Mus musculus* tornaram-se inativos por mutação (Goodier *et al.* 2001; Waterston *et al.* 2002). Eventos de retrotransposição de LINE-1 em genes estão ligados a fenótipos mutagênicos em pelo menos sete linhagens diferentes de camundongos (Kingsmore *et al.* 1994).

#### **e) Elementos intercalados curtos (SINE) não autônomos não-LTR**

Esta ordem não possui repetições terminais longas (nao-LTR), apresenta em torno 300 pb de comprimento e é subdivida em três **superfamílias: 7SL, tRNA e 5S** de acordo com sua estrutura híbrida (Wicker *et al.* 2007). Esta estrutura híbrida é composta por uma sequência de 5', derivada de uma molécula de RNA progenitora (7SL, tRNA, RNA 5S) e uma sequência 3' semelhante ao extremo 3' de um elemento LINE. A primeira região contém sequências box A e box B, características de um promotor de Pol III interno, assegurando que as cópias transpostas sejam transcritas para RNA em ciclos de retrotransposição, enquanto a sequência relacionada à LINE, presumivelmente, permite que o RNA de SINE seja reconhecido por proteínas codificadas pelo LINE correspondente (Chu *et al.* 1995; Weiner 2002; Finnegan 2012). Os SINEs predominantes em seres humanos e outros primatas são conhecidos como Alu porque contêm um local de reconhecimento para a enzima de restrição AluI, adenosinas (Jurka e Smith 1988; Chu *et al.* 1995). Elementos Alu afetam o genoma de várias maneiras, causando mutações de inserção, recombinação entre os elementos, conversão genética e alterações na expressão gênica (Batzer e Deininger 2002).

Todos os SINEs se acumulam, preferencialmente, dentro de sequências de DNA ricas em GC (alta expressão gênica), tendo altos níveis de transcrição em células somáticas, sob estresse (Smith e Riggs 1996). Dentre as classes de SINEs mais conhecidas em camundongos destacam-se B1, B2, ID e B4. As mais abundantes são B1 e B2, com aproximadamente 135 pb e 200 pb, respectivamente, sendo o número de elementos ativos desconhecidos (Krayev *et al.* 1982; Daniels e Deininger 1985; Serdobova *et al.* 1998). Waterston *et al.* (2002) sequenciaram 500.000 cópias de B1 e 300.000 cópias de B2 em camundongos, correspondendo, aproximadamente, a 2,7% e 2,4% do genoma. A retrotransposição do elemento B1 continua a impactar o genoma do camundongo, como por exemplo a inserção de B1 no locus *Atcay* é responsável pela distonia nesta população (Gilbert *et al.* 2004). Eventos de retrotransposição de SINEs mutagênicos são responsáveis por vários fenótipos em raças de cães, tais como narcolepsia, miopatia centronuclear, pigmentação da pelagem, atrofia progressiva e pernas

curtas (Lin *et al.* 1999; Pele *et al.* 2005; Clark *et al.* 2006; Parker *et al.* 2009; Downs *et al.* 2014).

### 1.1.2 Elementos de classe II ou Transposons

Os transposons de DNA são divididos em subclasse 1 e subclasse 2. As ordens: repetições terminais invertidas (TIRs) e Crypton compõem a subclasse 1, com mecanismo molecular de transposição do tipo *cut-and-paste*. A ordem TIR é representada pelas superfamílias Tc1/mariner, PIF/Harbinger, hAT, Mutator, Merlin, Transib, P, piggyBac, PIP – Harbinger e CACTA, e Crypton pela superfamília Crypton. A subclasse 2 é composta pelas ordens Helitron (*rolling-circle replication*), representada pela superfamília Helitron, e Maverick (*self-synthesizing*), representada pela superfamília Maverick (Wicker *et al.* 2007; Muñoz-López e García-Pérez 2010; Levin e Moran 2011; Tellier *et al.* 2015). Esses elementos transponíveis possuem representantes em diversos táxons como ciliados, fungos, plantas, peixes e mamíferos, apesar da grande maioria apresentar mutações múltiplas que os tornam inativos (Plasterk *et al.* 1999).

Estes elementos se movimentam por meio de um intermediário de DNA, sendo que o mecanismo é por meio de uma enzima, que reconhece os TIRs para realizar a excisão no corpo do DNA transposon, que é inserido em um novo local genômico. Após a inserção, o DNA do local alvo é duplicado, resultando em duplicações de sítio-alvo (TSDs), que representam uma marca única para cada transposon de DNA (Garfinkel *et al.* 1985). A enzima responsável em TIR consiste em uma transposase, em Crypton um grupo de tirozina – recombinase, em Helitron e em Maverick uma integrase (Kapitonov e Jurka 2001; Kapitonov e Jurka 2006; Pritham *et al.* 2007).

Entre as novas adições em mamíferos, Smith e Riggs (1996) citam os transposons autônomos da família MER1. Estudos identificaram transposons de DNA potencialmente ativos (elementos hAT e helitron) nos genomas de morcegos, sugerindo que sua transposição pode continuar gerando diversidade genética nesta espécie (Ray *et al.* 2007; Ray *et al.* 2008; Mitra *et al.* 2013). Além destes, outros membros de transposons têm sido estudados em mamíferos, tais como Tc1-família fóssil (Tigger e Mariner) e *piggyBac* de insetos, com 50% de similaridade à transposase, os quais são caracterizados por flanquearem sítios TTAA (Smith e Riggs 1996; Schouten 1998).

### 1.1.3 Elementos Transponíveis e Dinâmica do genoma

Elementos Transponíveis estão presentes em diversos organismos, variando em número de cópias, distribuição e tipos entre as espécies e ainda desempenham um papel fundamental

na estrutura e organização dos cromossomos. A inserção e remoção de TEs podem afetar indiretamente as sequências do genoma, sendo que a frequência alta pode resultar em grandes quantidades de duplicação e rearranjos cromossômicos, incluindo genes e sequências regulatórias. Ainda, atuam na prevenção de perdas teloméricas, de forma a contribuir para a evolução do genoma (Charlesworth *et al.* 1994; Jiang *et al.* 2004; Trono 2016). Segundo Capy (2012) “70-80% das mutações espontâneas são resultado de inserções mediadas por TE, deleções ou rearranjos cromossômicos”, devido sua capacidade de transposição, podendo alterar não apenas a estrutura, mas também a regulação gênica e eventos epigenéticos, de forma a contribuir para o desenvolvimento e evolução das espécies (Charlesworth *et al.* 1994; Kidwell e Holyoake 2001; Senft e Macfarlan 2021). Mesmo após perder a capacidade de mobilização, os elementos transponíveis promovem variação estrutural genômica, pois eventos de recombinação podem ocorrer entre regiões homólogas, dispersas por TEs até em posições genômicas distantes, de forma a originar mutações em grande escala (Deininger *et al.* 2003; Bennetzen e Wang 2014; Carvalho e Lupski 2016).

Um número crescente de evidências tem demonstrado que os TEs desempenham papel expressivo na adaptação e evolução de populações e espécies naturais, visto sua contribuição significativa para o processo de mutação (Makalowski 2000; Nekrutenko e Li 2001; Kazazian 2004), ou mesmo para “transferência vertical – recebimento de material genético de seu antecessor - e/ou transferência horizontal - transferência de material genético para outra célula que não é sua descendente – desses elementos” (Schaack *et al.* 2010). As trajetórias evolutivas de acumulação de TEs em mamíferos foram conservadas entre as espécies, apesar das diferenças específicas no conteúdo de clado, sendo que a transposição realizada por estes elementos pode afetar “a expressão do seu complemento genômico para produzir características próprias (fenótipos), tais como aparência física, comportamento, susceptibilidade a doenças e até mesmo função neuronal” (Biémont e Vieira 2006; Buckley *et al.* 2017).

A atividade de transposição de ERVs foi responsável por 10-15% de fenótipos mutantes herdados em camundongos de laboratório, ou seja, não produzem apenas pequenas alterações silenciosas ao nível da sequência de DNA, podem produzir também efeitos importantes nos traços fenotípicos (Britten 1996; Maksakova *et al.* 2006). Novas inserções de TEs em células germinativas podem causar doenças genéticas, pois mais de 120 inserções destes elementos foram associadas a doenças em humanos, e a transposição desses elementos no cérebro de mamíferos tem sido proposta para diversificar a população de células neurais. A expressão de

TEs foi ainda associada à leucemia mieloide aguda (LMA) em 178 pacientes adultos (Baillie *et al.* 2011; Erwin *et al.* 2014; Sundaram *et al.* 2014; Hancks e Kazazian 2016).

TEs são encontrados, na maioria dos casos, em regiões distintas de heterocromatina, mas podem ocorrer em regiões eucromáticas, constituindo até 85% do genoma em algumas espécies, não se correlacionando com a complexidade do organismo (Eickbush e Furano 2002; Fedoroff 2012; Nystedt *et al.* 2013). Em algumas espécies como *Rana esculenta*, *Zea mays*, *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens*, os TEs representam, respectivamente, 77, 60, 15-22 e 45% do genoma (Biémont e Vieira 2006). Em relação aos vertebrados, pode-se exemplificar a representatividade dos elementos transponíveis em 34% do genoma de cachorro, cerca de 40% em camundongo e cerca de 50% em primatas (Böhne *et al.* 2008).

Ribeiro e Kidwell (1994) avaliaram a capacidade de fixação de um elemento móvel em uma população vetorial diploide finita, envolvendo parâmetros como tamanho, taxa reprodutiva, dependência de densidade e eficiência de transposição, e observaram que o equilíbrio foi alcançado rapidamente (<50 gerações), sugerindo que os transposons podem ser manipulados no sentido de conduzir genes, como por exemplo, aqueles para resistência a parasitas. Os elementos transponíveis são, ainda, considerados como parasitas moleculares devido sua capacidade de invadir novos genomas, aproveitando-se da estrutura proporcionada pela célula (Kidwell e Lisch 2000), bem como a tendência à transferência horizontal (Kidwell 1993; Schaack *et al.* 2010). Por sua natureza parasitária, a transposição de um TE ocorre para sua própria manutenção no genoma do hospedeiro, muitas vezes guiada por forças seletivas opostas, um ato de equilíbrio para facilitar a propagação futura, enquanto atenua os efeitos deletérios na função da célula hospedeira (Rebollo *et al.* 2012; Sultana *et al.* 2017).

A transposição de ambas as classes de TEs é propensa a erros e produz elementos não autônomos, diminuindo a taxa de transposição dos elementos ativos, devido à degradação da capacidade de codificação, no entanto, a transferência horizontal possibilita ativação na linhagem seguinte, de forma a reiniciar o ciclo (Kidwell e Lisch 2000). A mobilidade intrínseca desses elementos e as interações ecológicas entre as espécies hospedeiras, incluindo aquelas com patógenos e parasitas, facilitam sua transmissão entre táxons amplamente divergentes (Gilbert e Feschotte 2018; Ivancevic *et al.* 2018). O comportamento dos TEs no genoma do hospedeiro segue um ciclo de vida de quatro fases, começando com (i) a fase de nascimento ou invasão, quando os TEs são inseridos em um novo locus, seguido por (ii) amplificação, (iii) maturação, quando são cooptados e inseridos no genoma para servir a função celular benéfica ao organismo hospedeiro e, (iv) morte ou degeneração (Hartl *et al.* 1997; Kidwel e Lisch 2001;

Fernández-Medina *et al.* 2012). Durante o desenvolvimento dessas fases ocorre aumento do número de cópias, juntamente com possíveis mutações, resultando em elementos inativados, seguido de balanço entre a amplificação e a perda do número de cópias, até a inexistência de elementos autônomos e não autônomos, sendo que não há mais aumento do número de cópias (Kidwell e Lisch 2000; Cordeiro *et al.* 2008). Por exemplo, o genoma humano (haploide) contém aproximadamente 500.000 cópias do retrotransposon L1, sendo que mais de 99,9% dessas cópias são fixas e não são mais móveis devido a várias formas de mutações e truncamentos (Ostertag e Kazazian 2001; Szak *et al.* 2002).

Os padrões de expressão dos TEs são tão específicos que podem organizar embriões, determinar relações evolutivas, rotular tipos de células cancerígenas, prever o resultado de doenças e caracterizar doenças neurodegenerativas (Senft e Macfarlan 2021). Por exemplo, o perfil *cis*-elementos regulatórios (CREs) hepático de primatas, apesar de permanecer com funções essenciais intactas, contribuem para a adaptação das espécies ao ambiente, e são enriquecidos com elementos transponíveis (TEs) jovens, incluindo Long-Terminal-Repeats (LTRs) e SINE-VNTR-*Alus* (SVAs), que afetam significativamente a expressão gênica (Trizzino *et al.* 2017). Thomas e Schneider (2011) demonstraram coevolução entre retroelementos LTR e fatores de transcrição dedo de zinco (*zinc finger* - ZF) em humanos e camundongos. Segundo Senft e Macfarlan (2021), os TEs contribuem fundamentalmente para o desenvolvimento e evolução dos mamíferos, fornecendo elementos reguladores específicos da espécie e novas proteínas. Estes estudos fornecem evidências do processo de exaptação de retroelementos e sequências regulatórias do genoma, após integração casual em um local apropriado para conferir regulação transcricional (Lowe *et al.* 2007; Conley *et al.* 2008; Cohen *et al.* 2009). Além disso, elementos transponíveis podem ser usados para estimar filogenia de espécies com base na evolução molecular da mesma sequência ancestral, como a análise realizada por Johnson e Coffin (1999), onde árvores filogenéticas foram construídas com as repetições terminais longas (LTRS) não codificantes de vários loci retrovírus ERV, comparando com um padrão filogenético bem estabelecido como o dos primatas. Estes dados sugerem que os TEs têm redes reguladoras de genes, moldadas de forma significativa e contínua durante a evolução dos mamíferos (Colombo *et al.* 2018).

O potencial evolutivo da variação derivada de um TE pode ser fortemente influenciado por fatores ambientais e ecológicos, pois os eventos de especiação muitas vezes se correlacionam com a expansão de novas famílias de TE, sugerindo que podem ser

impulsionadores de adaptação, diversificação e especiação, gerando diversidade genômica estrutural entre populações (Jurka *et al.* 2011; Oliver e Greene 2011, 2012; Rebollo *et al.* 2012).

## 1.2 ORGANISMO MODELO

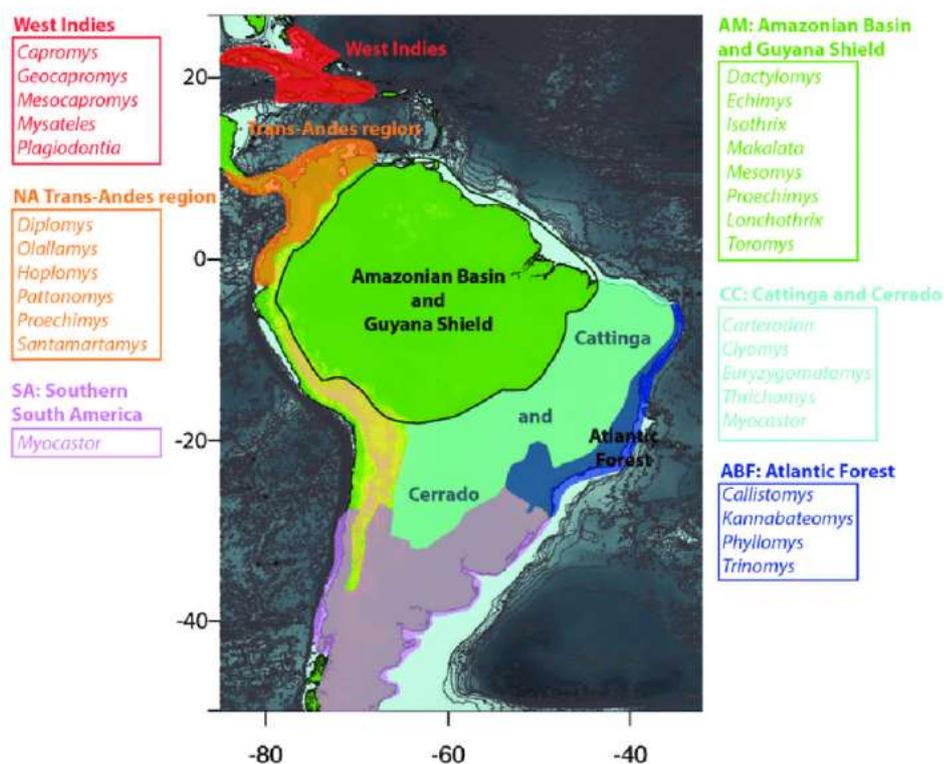
Em camundongos, os elementos móveis são responsáveis por causar aproximadamente 10% de mutações espontâneas que interferem não apenas no genoma, mas também no fenótipo desses indivíduos, sendo relacionados principalmente à família dos retrotransposons não-LTR (Miller *et al.* 2006).

O presente estudo selecionou a família Echimyidae para desenvolvimento de pesquisa inerente ao papel dos retrotransposons não-LTR, devido à alta diversidade de espécies e pouco esclarecimento sobre os processos evolutivos, em particular, as relações intergenéricas mal resolvidas.

Retrotransposons de repetição terminal não longa (não LTR) têm sido associados em esculpir a estrutura e a função dos genomas, como por exemplo a mobilidade dos LINEs-1, Alu e SINE- R /VNTR/Alu-like retrotransposons (elementos SVA), que continuam a gerar variação genética intra e interindividual na população humana (Beck *et al.* 2011).

### 1.2.1 A família Echimyidae

Roedores da família Echimyidae irradiaram-se por múltiplos biomas e abrangem uma vasta gama de formas de vida, histórias e adaptações ecomorfológicas, incluindo estilos de vida semi-fossorial, arbóreo e semiaquático (Emmons *et al.* 2015). É a família mais diversificada de roedores histricognatos da América do Sul (caviomorfos), que se distribuem ao longo de florestas tropicais (Amazônia, Mata Atlântica e porções florestais andinas), ocasionalmente ambientes mais abertos e secos como Cerrado e Caatinga, no nordeste da América do Sul, e ambientes abertos no sul do continente (*Myocastor*) (Figura 1). Esse padrão sugere a influência de processos vicariantes entre a Amazônia e a Mata Atlântica (Galewski *et al.* 2005; Fabre *et al.* 2014). Sua radiação aparentemente começou no Mioceno precoce (23-16 Ma), com divergência daqueles do Leste Brasileiro e dos clados arbóreo e terrestre (Lara *et al.* 1996; Leite e Patton 2002; Galewski *et al.* 2005; Fabre *et al.* 2012).

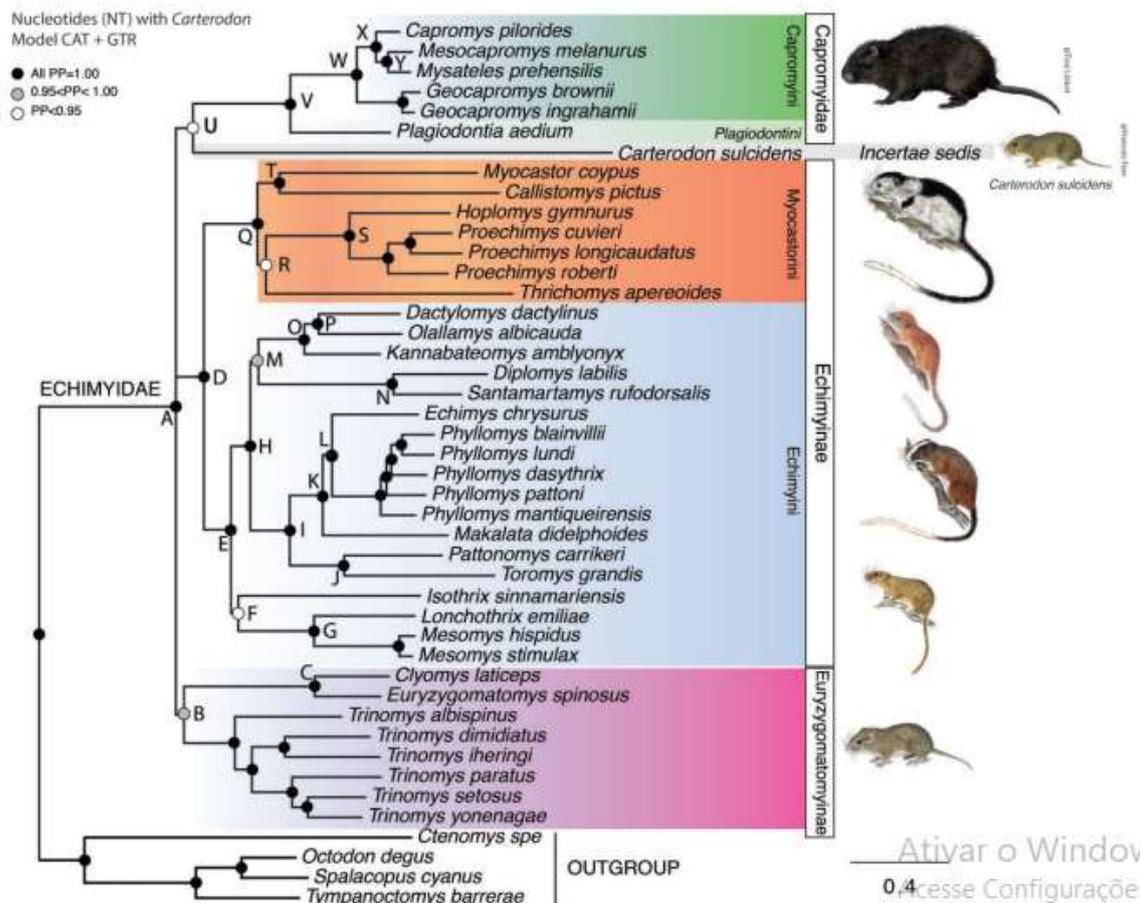


**Figura 1:** Mapa de distribuição para todos os gêneros de Echimyidae e correspondência entre suas distribuições e as províncias biogeográficas dos Neotrópicos (Fabre *et al.* 2017).

Comumente conhecidos como ratos espinhosos e ratos de árvore, os equimídeos são de tamanho pequeno, com exceção para *Myocastor* e *Brachyodont*, com um peso corporal variando de cerca de 200 a 1000 g, compreendendo 91 espécies reconhecidas e agrupadas em 22 gêneros. Todos os membros têm pelos grosseiros e muitos táxons possuem espinhos flexíveis e planos (Emmons e Feer 1990; Upham e Patterson 2012; Fabre *et al.* 2012; Fabre *et al.* 2017). De acordo com o habitat que ocupam, podem ser considerados como táxons semifossoriais (*Clyomys*, *Euryzygomatomys*), terrestres (*Carterodon*, *Hoplomys*, *Proechimys*, *Thrichomys*) e arbóreos (*Dactylomys*, *Diplomys*, *Echimyus*, *Isotrix*, *Kannabateomys*, *Lonchothrix*, *Makalata*, *Mesomys*, *Olallamys*) (Emmons e Feer 1990; Emmons *et al.* 2015). A história taxonômica dos equimídeos tem sido complexa, mesmo em nível de subfamília e gênero, visto que as relações evolutivas ainda não estão bem estabelecidas devido insuficiência de dados relativos à sua ecologia, diversidade e sistemática (Mones 1968; Leite e Patton 2002; Emmons 2005; Iack-Ximenes *et al.* 2005). No entanto, a amostragem de novas moléculas usadas como marcadores promete aumentar a compreensão sobre a sistemática e história biogeográfica de equimídeos (Upham e Patterson 2015).

Fabre *et al.* (2017) analisaram 38 novos exons de mitogenomas de Echimyidae (incluindo membros da família Capromyidae e Myocastorinae) e até cinco éxons nucleares de

evolução mais lenta de táxons chave. Foi usado um método Bayesiano de relógio molecular com taxa de autocorrelação ao longo dos ramos para estimar datas de divergência, ao mesmo tempo em que contabiliza mudanças na taxa evolutiva ao longo do tempo e permite modelos de mistura de evolução da sequência para explicar as heterogeneidades nos padrões de evolução entre partições mitocondriais e nucleares (Figura 2).



**Figura 2:** Topologia bayesiana obtida a partir da concatenação do conjunto de dados de nucleotídeos (NT) da codificação de 13 proteínas e dos 5 genes nucleares para os principais clados de equimídeos (Fabre *et al.* 2017).

O mapeamento realizado por Fabre *et al.* (2017) seguiu o caráter ecomorfológico do modo de vida da locomoção de Echimyidae com base no relato de Patton *et al.* (2015) (Figura 2), confirmando três clados principais Capromyidae intimamente relacionado a Echimyidae, Euryzgomatomyinae (Confirmando *Trinomys*), e os arborícolas Echimyini, exceto *Callistomys* que ramifica-se com a tribo Myocastorini (Lara e Patton 2000; Fabre *et al.* 2014). A tribo Myocastorini inclui *Myocastor* e *Callistomys* (nó T) como grupo irmão de *Thrichomys* e *Hoplomys* + *Proechimys* (nó R) (Woods *et al.* 1992; Galewski *et al.* 2005). A proposta para o clado Echimyini arbóreo (nó E) seguiu os padrões de ramificação em nível de gênero sugeridos como ratos de bambu *Dactylomys*, *Olallamys* e *Kannabateomys* (nó O), (2)

as endêmicas andinas do Norte *Santamartamys* e *Diplomys* (nó N), o clado *cis-andino amazônico* *Toromys* e *Pattonomys* (nó J), os três táxons remanescentes de Echimyinae *Echimys*, *Makalata*, *Phyllomys* (nó K) e o clado *Mesomys/Lonchothrix* (nó G) com uma associação isolada da linhagem *Isothrix* (nó F).

A diversificação rápida dos equimídeos, segundo Galewski *et al.* (2005), particularmente entre espécies arbóreas, pode explicar por que os nós basais na filogenia têm sido difíceis de resolver. Daí a importância de estudos adicionais e integrativos neste grupo de roedores. Nesse sentido, este estudo propôs analisar espécies, representantes das diferentes subfamílias viventes de Echimyidae, do ponto de vista dos elementos transponíveis, visto que sequências repetitivas, conforme Valente *et al.* (2011), influenciam de forma significativa na evolução dos genomas, particularmente por seu envolvimento com rearranjos cromossômicos. Segundo Gray (2000), uma explicação de tal evento é a recombinação homóloga entre cópias múltiplas de um TE, presente no genoma.

Dados cromossômicos para a família Echimyidae ainda não são suficientes para o entendimento dos padrões de evolução cromossômica (Lima *et al.* 1998), e isso se torna mais evidente quando se trata dos táxons amazônicos (Eler ES comunicação pessoal), visto que poucos estudos analisaram a biodiversidade dessas espécies. Estudos citogenéticos mostram grande variabilidade cromossômica em roedores, com número diploide variando de 9 a 118, no entanto, a identificação taxonômica pode ser difícil, já que muitas espécies apresentam apenas pequenas variações morfológicas (Silva e Yonenaga-Yassuda 1998; Dunnum *et al.* 2001, Nagamachi *et al.* 2013). Segundo Yonenaga-Yassuda *et al.* (1985), uma característica cariotípica compartilhada entre todos os equimídeos é a presença de uma constrição secundária em um par cromossômico, coincidente com a região organizadora de nucléolo (RON), indicando homeologia do par nucleolar nesta família, apesar da posição deste par variar entre as espécies.

A caracterização citogenética pode fornecer mais um caráter confiável em critérios taxonômicos, visto que a identificação de rearranjos cromossômicos evidencia diferenças genômicas entre espécies, o que permite delinear possíveis relações entre grupos. Segundo Patton *et al.* (2000), as relações filogenéticas entre os equimídeos ainda não estão bem determinadas, resultando em desordens no diagnóstico dos gêneros e na alocação de espécies. Alguns estudos citogenéticos têm mostrado padrões diferenciados em algumas espécies de Echimyidae, como por exemplo, variação interespecífica na distribuição das sequências teloméricas intersticiais (ITs) em *Thrichomys*. A análise comparativa da banda G e banda C

sugeriu que a variação interespecífica em *Thrichomys* e *Trinomys* pode ser devida a rearranjos como inversões pericêntricas, reposicionamento do centrômero e variação da heterocromatina (Araújo *et al.* 2018; 2019). O padrão da banda C variou entre as espécies e, juntamente com a NOR, permitiu a identificação de duas unidades evolutivas em *P. gr. longicaudatus* na região do médio rio Madeira (citótipos A e B) (Eler *et al.* 2012). Novos registros cariotípicos foram identificados para seis espécies de *Proechimys* da Amazônia brasileira: *P. echinothrix* da região do rio Purus com  $2n = 32$  e FN = 58, *P. cuvieri* da região do rio Japurá com  $2n = 28$  e FN = 46 (Eler *et al.* 2020). Soares *et al.* (2022) demonstraram homeologia de sinal de LINE-L1 e SINE-B1 no cariótipo de cinco espécies de *Proechimys* através de Híbridização *in situ* Fluorescense.

# Objetivos

---

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a dinâmica evolutiva de elementos retrotransponíveis entre espécies representantes das diferentes subfamílias de Echimyidae, a saber: *Dactylomys* sp. (Dactylomyinae); *Isothrix* sp., *Makalata* sp. (Echimyinae); *Proechimys* sp., *Mesomys* sp., *Thrichomys* sp. e *Trynomys* sp. (Eumysopinae).

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar e caracterizar sequências de Elementos retrotransponíveis no genoma de diferentes espécies representantes das diferentes subfamílias de Echimyidae.
- Comparar o mapeamento físico-cromossômico de sequências dos elementos retrotransponíveis entre espécies, representantes das diferentes subfamílias de Echimyidae.
- Identificar possíveis rearranjos cromossômicos associados aos elementos retrotransponíveis, que possam estar envolvidos no processo de evolução cariotípica em Echimyidae.

# Material e Métodos

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

O presente estudo analisou sequências genômicas de representantes das três subfamílias de Echimyidae (Tabela 1), a saber: (*Dactylomys* sp. (Dactylomyinae); *Isothrix* sp., *Makalata* sp. (Echimyinae); *Proechimys* sp., *Mesomys* sp., *Thrichomys* sp. e *Trynomys* sp. (Eumysopinae).

Este trabalho seguiu os Padrões Éticos para Pesquisa Animal de acordo com o parecer 002/2013 da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, de acordo com a Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Os exemplares foram coletados na região Amazônica, biomas da Mata Atlântica (Guarapari, Espírito Santo) e região de transição entre Mata Atlântica e Cerrado (Diamantina, Minas Gerais), Brasil entre 2005 e 2015, com as autorizações: 02005.000642/03-11 (IBAMA/MMA), 02000.002336/2003-93 (IBAMA/MMA), 02005.002672/04 (IBAMA/MMA), 37585-5 (SISBIO/MMA), 37592-4 (SISBIO/MMA), 10985 (SISBIO/MMA).

Os crânios e peles foram depositados, parte na Coleção de Mamíferos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus, Amazonas, Brasil e parte na Universidade Federal do Espírito Santo, em Guarapari, Espírito Santo, Brasil. As análises citogenéticas foram realizadas em preparações cromossômicas obtidas de células da medula óssea, utilizando colchicina na concentração 0,0125%, 1 mL para cada 100 g de massa animal (Ford e Hamerton 1956). E para as análises moleculares foram utilizadas amostras do músculo e fígado. As suspensões celulares e amostras de tecido (músculo e fígado) estão depositadas no Laboratório de Genética Animal do INPA, em tubo tipo eppendorf, em freezer (-10°C), devidamente identificado com o número do espécime (Silva *et al.* 2012; Eler *et al.* 2012; 2017; 2020).

**Tabela 1:** Espécies de Echimyidae analisadas neste estudo e código de identificação dos exemplares. <sup>1</sup>Silva *et al.* 2012, <sup>2</sup>Eler *et al.* 2012; 2017; 2020.

Espécies	Localidade	Coordenadas	2n/FN	Sexo	Voucher
<i>Proechimys guyannensis</i>	Ilha da Serrinha, Usina Hidrelétrica de Balbina, Rio Uatumã, Amazonas	01°52' S, 59°25' W	46/50 <sup>1</sup>	M/F	INPA-CEF14 INPA-CEF12
<i>Proechimys guyannensis</i>	Monte Dourado, Almerim, Pará	00°49' S, 52°39' W	38/52 <sup>2</sup>	M/F	INPA5053 INPA5054
<i>Proechimys gardneri</i>	Margem esquerda do Rio Madeira, Comunidade Bela Vista, Amazonas	05°14' S, 60°42' W	40/54 <sup>2</sup>	M/F	INPA5383 INPA5390
<i>Proechimys echinothrix</i>	Reserva Extrativista Canutama, Rio Purus, Amazonas	06°34' S, 64°33' W	32/58 <sup>2</sup>	M/F	INPA7319 INPA7345
<i>Proechimys longicaudatus</i>	Margem esquerda do rio Aripuanã, Amazonas	06°17' S, 60°23' W	28/46 <sup>2</sup>	M/F	INPA5414 INPA5401
<i>Proechimys cuvieri</i>	Bosques da REMAM (Refinaria Isaac Sabbá), Manaus, Amazonas Bituba, Monte Dourado, Almeirim Pará	00°70' S, 52°67' W 01°11' S, 52°38' W	28/46 <sup>1</sup>	M/F	INPA-EE251 INPA5050
<i>Dactylomys Dactylinus</i>	Flona Saracá-Taquera e Rebio Trombetas, rio Trombetas, Amazonas	14°81' S, 56°45' W	94/134 <sup>2</sup>	M/F	INPA-MAM008869 INPA-MAM008891
<i>Makalata didelphoides</i>	Parque Nacional da Amazônia e Flona do Tapajós, rio Tapajós, Amazonas	45°34' S, 56°60' W	72/132 <sup>2</sup>	M/F	INPA-MAM008898 INPA-MAM008901
<i>Mesomys Hispidus</i>	Região do baixo rio Purus, Amazonas	65°77' S, 64°89' W	60/116 <sup>2</sup>	M/F	INPA-MAM 007317 INPA- MAM 007341
<i>Trinomys paratus</i>	Região do rio da Prata e Buenos Aires, Mata Atlântica, Guarapari, Espírito Santo.	20°53' S, 40°59' W	58/112 <sup>2</sup>	M/F	UFES-MAM 2798 UFES-MAM 2804
<i>Thrichomys apereoides</i>	Parque Nacional Sempre Vivas, Diamantina, Minas Gerais	17°91' S, 43°78' W	28/50 <sup>2</sup>	M/F	MDIA093 MDIA104
<i>Isothrix pagurus</i>	Parque Estadual do rio Negro Setor Sul, rio Cuieiras, Amazonas	27°07' S 60°37' W	22/38 <sup>2</sup>	M/F	INPA-MAM008835 INPA-MAM008843

Fonte: Livros de Registro do LGA-INPA.

### 3.2 MÉTODOS

O DNA total dos exemplares foi extraído a partir de porções de tecido do fígado e/ou músculo fixados em álcool 96%, a partir do protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001), com algumas modificações, utilizando o Kit de extração Wizard® (Promega), segundo as

recomendações do fabricante. A integridade do DNA foi visualizada em gel de agarose 1,0%, quantificado em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare) e diluído em solução de uso, com concentração final de até 250 ng/ $\mu$ L.

### 3.2.1 Extração de DNA total - Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA)

1. Preparar um mix, contendo EDTA + Nuclei Lysis Solution (60  $\mu$ L de EDTA 0,5M + 250  $\mu$ L de Nuclei Lysis Solution) em tubo falcon e deixar no freezer por pelo menos 10 min, até ficar turvo.
2. Dissociar, aproximadamente, 20 mg de tecido muscular e transferir para um tubo tipo eppendorf estéril de volume de 1,5 mL.
3. Em seguida, dissociar e secar o tecido, adicionar 300  $\mu$ L da solução preparada no passo 1 acrescida de 15  $\mu$ L de proteinase K (10 ng/ $\mu$ L), homogeneizar e levar ao termo bloco a 55 °C por cerca de 3 h, sob agitação de 1100 rpm até dissolver todo o tecido.
4. Após o tecido ser dissolvido, adicionar 100  $\mu$ L de Protein Precipitation Solution, homogeneizada em vórtex por 30 seg até ficar espumante e levar ao freezer por 5 min.
5. Passados os 5 min, homogeneizar a solução e centrifugar por 10 min a 13000 rpm a 4 °C.
6. Retirar o sobrenadante (que contém o DNA) com auxílio de uma micropipeta e transferir para novos tubos tipo eppendorf; adicionar 300  $\mu$ L de isopropanol gelado, homogeneizar a solução e centrifugar por 10 min a 13000 rpm a 4 °C.
7. Descartar o sobrenadante, que contém o isopropanol, pois o material de interesse (DNA) está em forma de *pellet*, adicionar 300  $\mu$ L de etanol 70% gelado, homogeneizar e centrifugar por 10 min a 13000 rpm a 4 °C.
8. Descartar o máximo de sobrenadante possível, com cuidado para não descartar o DNA (*pellet*), levar os tubos eppendorf à estufa a 37 °C por aproximadamente 15 min, até todo etanol evaporar.
9. Por fim, adicionar 50  $\mu$ L de água mili-Q, homogeneizar e deixar *overnight* a 4 °C.
10. O DNA extraído foi verificado por comparação com o marcador Low Mass DNA Ladder (Invitrogen) em eletroforese em gel de agarose 1,0%. As visualizações dos géis de agarose foram realizadas no Transiluminador-UV (Loccus biotecnologia).

11. A concentração do DNA total isolado foi obtida através de quantificação no Espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

### 3.2.2. Isolamento dos Retrotransposons pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Para amplificação de elementos transponíveis, já identificados e caracterizados como conservados em mamíferos, foram utilizados os *primers* listados abaixo:

Identificação	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho final das sequências
LINE-L1 <sup>1</sup>	L1F 5' AAGAATTCCGCAGGATACAAGATCAACTCA 3' L1R 5' AAGGATCCCAATTTCGATTCCATTGGT 3'	~612 pb
SINE-B1 <sup>2</sup>	B1F 5' TTGCCGGGCGTGGTGGCG 3' B1R 5' TTGGTTTTTCGAGACAGGGTTTCT 3'	~150 pb
SINE-B4 <sup>3</sup>	B4F 5' -GAGTTCAGATCCCCAGAACC-3' B4R 3' -GGTCTCTCACTGAACCTGGA-5'	~299 pb
SINE-MAR <sup>4</sup>	MarF 5' -CTAGGTGGCGCAGTGGATAG-3' MarR 3' -TGTTTTGCCATTTTCCTTCTC-5'	~259 pb
SINE-THER <sup>5</sup>	TherF 5' -GACCTGGAGTCAGGAAGACC-3' TherR 3' -ATCCTCACACAACCCTGTG-5'	~263 pb

**Fonte:** <sup>1</sup>Gran *et al.* 2005; <sup>2</sup>Rinehart *et al.* 2005; <sup>3</sup>Vassetzky 2013; <sup>4</sup>Kramerov e Vassetzky 2011; <sup>5</sup>Serdobova 1998.

1. A amplificação enzimática destes elementos, a partir dos indivíduos amostrados, foi realizada a partir do DNA celular total previamente isolado, sendo a amplificação realizada pela técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction* – Saiki *et al.* 1988) em 15 tubos eppendorf de 250 µL para L1, e para os SINEs B1, B4, MAR, THER.
2. Os produtos de PCR, fita dupla, foram obtidos em um volume total de 25 µL (~100 ng de DNA genômico; Tampão 1X; 0,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Promega); 0,2 mM de cada dNTP – dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*); 2,0 mM de cloreto de magnésio e água mili-Q para completar o volume).
3. As reações foram processadas no termociclador Veriti Thermal Cycler – Applied Biosystems PCR instruments. Os ciclos de amplificação das sequências dos retrotransposons LINE-L1/SINE-B1/SINE-B4/SINE-MAR/SINE-THER foram: desnaturação de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min 94 °C, 1 min a 40 °C/55 °C/40 °C/40 °C/55 °C, 1 min e 30 seg a 72 °C; com extensão final de 10 min a 72 °C e um período de resfriamento a 4 °C.
4. Depois de amplificados, os produtos de PCR foram verificados e quantificados por comparação com o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) em eletroforese em

gel de agarose 1,5%. As visualizações dos géis de agarose foram realizadas no Transiluminador-UV (Loccus biotecnologia).

5. As concentrações dos produtos de PCR foram obtidas através de quantificação no Espectrofotômetro NanoVue Plus - GE Healthcare.

### **3.2.3 Purificação do produto de PCR em Gel de agarose - Kit GE Healthcare (Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit)**

1. As amostras do produto de PCR, 15 tubos de eppendorf, foram aplicadas em eletroforese em gel de agarose 1,0%, comparando com o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen).
2. O gel de agarose contendo a sequência de interesse foi visualizado no fotodocumentador Eagle Eye (Stragene) (UV), e com o uso de um bisturi foi realizado corte do gel próximo às sequências de DNA.
3. O gel contendo as sequências de DNA foi colocado em tubos eppendorf de 1,5 µL previamente pesados e identificados.
4. Os eppendorfs contendo o gel de agarose foram novamente pesados e o diferencial foi calculado (ou seja, mesma quantidade de mg de agarose foi a mesma do reagente para dissolução).
5. Foi adicionado o buffer tipo 3 (reagente de dissolução) no tubo contendo o gel, realizando mix por inversão, e colocados em banho maria a 60 °C até a completa dissolução (coloração amarela).
6. 600 µL do mix (buffer tipo 3 e gel dissolvido) foi adicionado em um novo tubo eppendorf de 1,5 µL contendo mini coluna com filtro e previamente identificado.
7. Após 60 seg em temperatura ambiente, o tubo contendo a mini coluna foi centrifugado por 30 seg a 16000 g.
8. O líquido abaixo da mini coluna foi descartado e os procedimentos 6 e 7 foram repetidos até o término do mix (buffer tipo 3 e gel dissolvido).
9. 500 µL do buffer tipo 1 (reagente de lavagem – solução à base de álcool) foi adicionado ao eppendorf contendo a mini coluna.
10. Após 60 seg em temperatura ambiente, o tubo contendo mini coluna foi centrifugado por 30 seg a 16000 g. Após o descarte do líquido abaixo da mini coluna repetir a centrifugação.
11. A mini coluna contendo a sequência de interesse foi transferida para um novo tubo eppendorf de 1,5 µL devidamente identificado.

12. 25  $\mu\text{L}$  do buffer tipo 6 (água miliQ) foi adicionado ao eppendorf, contendo a mini coluna para eluição do DNA.
13. Após 2-3 min em temperatura ambiente, o tubo contendo mini coluna foi centrifugado por 60 seg a 16000 g.
12. A mini coluna foi descartada e o tubo eppendorf contendo o DNA foi homogeneizado e deixado *overnight* a 4 °C.
13. O DNA purificado foi verificado por comparação com o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) em eletroforese em gel de agarose 1,5%. As visualizações dos géis de agarose foram realizadas no Transiluminador-UV (Loccus biotecnologia).
14. A concentração do DNA purificado foi obtida pela quantificação no Espectrofotômetro NanoVue Plus - GE Healthcare.

### **3.2.4 Clonagem das Sequências de Retrotransposons**

#### **3.2.4.1 Ligação das sequências de interesse purificadas ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega)**

O sistema pGEMpT Easy é um kit que contém um plasmídeo linear que possui uma deoxitimidina (T) em cada uma de suas extremidades 3' e que permite a inserção direta de produtos de PCR, pela enzima T4 DNA ligase. A inserção as pontas coesivas T do vetor pGEM T Easy ocorre devido a uma única deoxiadenosina inserida por algumas polimerases termoestáveis às extremidades dos fragmentos amplificados (Neste estudo utilizamos DNA polimerase da Promega). A circularização do DNA pela inserção do produto de PCR nada mais é que a formação do plasmídeo recombinante a ser introduzido posteriormente dentro da bactéria *E. coli* visando a propagação plasmidial (Promega).

1. Para a ligação ao vetor utilizou-se 1  $\mu\text{L}$  para cada 10 ng do produto purificado, 5  $\mu\text{L}$  do vetor pGEM-T Easy (50 ng), 1  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação 2x, 1  $\mu\text{L}$  de T4 ligase, e água milli-Q se necessário, para 10  $\mu\text{L}$  de reação em um tubo eppendorf de 250  $\mu\text{L}$ , estes foram incubados por 16 h a 4 °C.
2. O plasmídeo recombinante foi verificado por comparação com o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) em eletroforese em gel de agarose 1,0%. As visualizações do gel de agarose foi realizada no Transiluminador-UV (Loccus biotecnologia).

#### **3.2.4.2 Preparação dos meios de cultura para plaqueamento e crescimento das bactérias eletrocompetentes TOP10 (Thermo Fisher) transformadas.**

1. Foram preparados meio de culturas – LB (Luria-Bertani) – para plaqueamento e crescimento das bactérias eletrocompetentes transformadas nas seguintes proporções:

Meio de cultura	Triptona (Sigma)	Extrato de Levedura (Sigma)	NaCl – (BIOTEC)	Ágar (KASVI)
LB sólido (1000 mL)	10 g	5 g	10 g	15 g
LB líquido (600 mL)	6 g	3 g	6 g	-

- Os reagentes foram adicionados em balão volumétrico e foram dissolvidos com água destilada. Após a dissolução o conteúdo foi adicionado em frasco (LABORGLAS) de 1000 mL próprio para autoclave (devidamente identificado).
- Os frascos contendo os meios de cultura foram autoclavados em autoclave vertical (Marte) a 1 kgf cm<sup>2</sup> por 15 min. Os meios LB sólido e líquido foram resfriados até 50 °C para o momento de uso.

### 3.2.4.3 Transformação da bactéria *E. coli* - células competentes TOP10 (Thermo Fisher) com os Plasmídeos recombinantes pGEM-T Easy (Promega)

- Cubetas (Electroporation cuvettes - Fisher scientific – com 1mm de abertura) reutilizadas foram testadas com uso de glicerina (Merk) a 10%.
- Foi colocado 200 µL de glicerina a 10% em cada cubeta. Uma por uma das cubetas foram colocadas no eletroporador (equipamento eletromédico utilizado para induzir eletroporação em células e tecidos biológicos), usando uma voltagem de 1800 V (recomendado para cubetas com tamanhos de abertura de 1 mm).
- As cubetas que não tiveram um ruído semelhante a uma explosão estavam adequadas para a transformação bacteriana.
- Após lavagem com álcool (100%), secas e deixadas na UV por 30 min as cubetas estavam prontas para a transformação bacteriana.
- As cubetas (Fisher scientific) novas (com tamanhos de abertura de 1 mm) foram deixadas na UV por 30 min antes de serem utilizadas para transformação bacteriana.
- As bactérias eletrocompetentes TOP10 (Thermo Fisher) foram retiradas do freezer -80 °C, descongeladas em gelo, após uma breve homogeneização.
- Em tubo eppendorf de 1,5 µL devidamente identificado foram adicionados 4 µL do plasmídeo recombinante e 25 µL das bactérias eletrocompetentes (mantidas em gelo).
- Após homogeneizar com cuidado, o conteúdo foi transferido para a cubeta de eletroporação que estava no gelo, devidamente identificada. O mix foi homogeneizado novamente no interior da cubeta, a qual foi mantida no gelo.

9. Após secar as cubetas (externo), estas foram inseridas no eletroporador (Eppendorf - Eporador), com parâmetros ajustados para 1800 V (recomendado para cubetas com tamanhos de abertura de 1 mm), e realizado o pulso elétrico.
10. Após a eletroporação as cubetas foram devolvidas para o gelo, e foi adicionado 800  $\mu\text{L}$  (de 200 em 200 $\mu\text{L}$ ) do meio SOC (Super Optimal Broth) (20 g/L Triptone, 5 g/L Extrato de levedura, 4,8 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 3,603 g/L dextrose, 0,5g/L NaCl e 0,186 g/L KCl) e realizada a sua homogeneização.
11. O conteúdo das cubetas foi transferido suavemente para um tubo cônico tipo falcon de 15 mL devidamente identificado (de 200 em 200  $\mu\text{L}$ ). Os tubos falcon foram incubados em Shaker (Marconi) por 90 min a 200 rpm e 37 °C ou estufa (FANEM) a 37 °C (previamente ligados) para a recuperação das células.

#### **3.2.4.4 Plaqueamento das bactérias eletrocompetentes TOP10 (Thermo Fisher) transformadas – uso de luz Ultravioleta - UV (Fluxo)**

A inserção do DNA necessita de um marcador de seletividade para verificar se de fato a transformação ocorreu. Neste estudo utilizamos o X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo), que é um glicosídeo artificial análogo à lactose e um substrato cromógeno para a enzima  $\beta$ -galactosidase (*E. coli*). O X-Gal é utilizado para triagem azul-branca (blue-White screening). A enzima  $\beta$ -galactosidase hidrolisa o X-gal, formando galactose e 5-bromo-4-cloro-3-indoxil. O 5-bromo-4-cloro-3-indoxil em presença de oxigênio (ar) é oxidado e convertido no corante azul 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo (Thermo Fisher).

Em diversos vetores de clonagem, um "sítio de clonagem múltipla" (*Multiple Cloning Site*) está presente no meio da sequência codificadora do fragmento  $\alpha$  (parte N-terminal) da  $\beta$ -galactosidase. Nesse sítio é possível colocar DNA exógeno de interesse. Com isso, a sequência da  $\beta$ -galactosidase é quebrada somente nas células transformadas com vetor, contendo o inserto (DNA exógeno de interesse), que passam a não expressar mais a enzima. Disso, segue-se que essas células não poderão mais clivar o X-Gal, não produzindo produto azul. Nesse processo de transformação, as colônias sem o fragmento exógeno inserido no vetor aparecerão em azul, enquanto aquelas com o DNA de interesse aparecerão brancas. O X-Gal é usado junto com o IPTG (isopropil-b-D-galactosídeo), que é indutor artificial na expressão da  $\beta$ -galactosidase, para a triagem das colônias azuis. Ainda com o intuito de realizar a seletividade das células recém transformadas, o uso de antibióticos é extremamente recorrente. A ampicilina é o antibiótico mais usado do grupo  $\beta$ -lactâmico por ter alto aspecto de atividade, alta solubilidade,

alta taxa de absorção e satisfatória estabilidade em condições ácidas (Kiernan 2007; Sandhu 2010).

1. Os meios LBs, reagentes e materiais de uso foram submetidos a UV por 15 min.
2. Os seguintes reagentes foram adicionados para cada 300 mL de LB sólido: 480 µL de XGal, 150 µL de IPTG e 300 µL de ampicilina.
3. Foram distribuídos 30 µL de LB contendo os reagentes do item 2 em placas de petri descartáveis, evitando formação de bolhas. As placas foram mantidas semiabertas para resfriamento.
4. Foram distribuídos 100 µL da cultura, contendo as bactérias eletrocompetentes transformadas, em placas previamente identificadas.
5. Foi realizado o plaqueamento, usando alça de Drigalsky previamente esterilizada em chama de bico de Bunsen e resfriada, de forma a distribuir a cultura uniformemente até a completa secagem.
6. As placas foram fechadas, invertidas e incubadas em Shaker (Marconi) a 200 rpm ou estufa (FANEM) a 37 °C (previamente ligados) overnight.

#### **3.2.4.5 Seleção dos clones para extração dos Plasmídeos recombinantes a partir das bactérias eletrocompetentes TOP10 (Thermo Fisher) - uso de luz Ultravioleta - UV (Fluxo)**

Após o período de incubação, algumas colônias resistentes (possíveis recombinantes ou clones positivos) foram selecionadas para realização da extração do seus DNAs plasmidiais. A seleção dos recombinantes foi realizada através da análise de restrição, somente colônias brancas, a fim de verificar a eficiência na transformação, propagação e obter quantidade suficiente de plasmídeos.

1. Foram adicionados 600 µL de ampicilina para 600 mL de meio LB líquido mantido a 50 °C. Após leve resfriamento, o LB foi distribuído em tubos falcon de 10 mL estéreis, devidamente identificados.
2. As colônias selecionadas foram repicadas com uso de uma ponteira (uma para cada colônia), individualmente, e adicionadas nos tubos falcon de 10 mL em triplicata para cada placa.
3. Os tubos foram incubados em Shaker (Marconi) a 200 rpm overnight a 37 °C.

#### **3.2.4.6 Amplificação dos Plasmídeos recombinantes através da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction – Saiki et al. 1988) para verificação de positividade**

1. Foi realizada amplificação dos plasmídeos recombinantes, a partir das colônias incubadas nos tubos falcon de 10 mL, para verificação de positividade e seleção

daquelas com melhores concentrações. Foram utilizados os *primers* universais M13 Forward e Reverse, para amplificação de insertos M13/pUC e derivados com sítios de inserção no gene da galactose. M13 F5'CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG3' e M13 R5'AGCGGATAACAATTTACACAGG3' (Invitrogen).

2. Os produtos de PCR, fita dupla foram obtidos em tubos eppendorf de 250 µL em um volume total de 25 µL (0,5 µL de cada tubo contendo as colônias; Tampão 1X; 0,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Promega); 0,2 mM de cada dNTP – dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*); 2,0 mM de cloreto de magnésio, e água milli-Q para completar o volume).
3. As reações foram processadas no termociclador Veriti Thermal Cycler – Applied Biosystems PCR instruments. O ciclo de amplificação das sequências plasmidial recombinante foi: desnaturação de 3 min a 95 °C, 25 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 50 °C, 30 seg a 72 °C; com extensão final de 5 min a 72 °C e um período de resfriamento a 4 °C.
4. Depois de amplificados, os produtos de PCR foram verificados e quantificados por comparação com o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) em eletroforese em gel de agarose 1,0%. As visualizações dos géis de agarose foram realizadas no Transiluminador-UV (Loccus biotecnologia).
5. As concentrações dos produtos de PCR foram obtidas através de quantificação no Espectrofotômetro NanoVue Plus - GE Healthcare.

#### **3.2.4.7 Extração dos Plasmídeos recombinantes das bactérias eletrocompetentes TOP10 (Thermo Fisher) - uso de luz Ultravioleta - UV (Fluxo) – Miniprep - *kit Wizard Plus***

Foram selecionadas as colônias mais concentradas para extração dos plasmídeos recombinantes. As células tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos através do *kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification Systems*.

1. Os tubos falcon contendo a cultura (15 mL) foram centrifugados por 8 min a 4800 rpm. O sobrenadante foi descartado, permanecendo aproximadamente 1 mL do meio líquido. Preparar um descartex com antecedência.
2. Após homogeneização, usando pipeta pasteur, o 1 mL de meio líquido foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL devidamente identificado.
3. Os tubos falcon foram lavados com aproximadamente 500 µL de água destilada, homogeneizados, e o líquido foi transferido para o tubo eppendorf de 1,5 mL, contendo o meio de cultura.

4. Os tubos eppendorf, contendo o meio de cultura, foram centrifugados por 1 min a 2300 g e o sobrenadante descartado, permanecendo aproximadamente 500  $\mu\text{L}$ .
5. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução de lise buffer tipo 1, invertendo o tubo para homogeneizar. Acrescentar 10  $\mu\text{L}$  de proteinase K, invertendo o tubo para homogeneizar.
6. Os tubos eppendorf foram colocados em banho maria por 15 min a 56 °C e depois no termobloco por 2 min a 70 °C e, em seguida, centrifugados por 10 seg a 2000 g.
7. Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de solução de purificação buffer tipo 4, permanecendo em temperatura ambiente por 10 min, e centrifugado por 10 seg a 11000 g.
8. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf de 1,5  $\mu\text{L}$ , contendo mini coluna com filtro, previamente identificado.
9. Após 60 seg em temperatura ambiente, o tubo contendo mini coluna foi centrifugado por 1min a 11000 g, e o líquido abaixo da mini-coluna foi descartado.
10. Foram adicionados novamente 500  $\mu\text{L}$  da solução de purificação buffer tipo 4 no tubo eppendorf de 1,5  $\mu\text{L}$  (contendo mini coluna com filtro), permanecendo em temperatura ambiente por 10 min, centrifugado por 1 min a 11000 g, e o líquido abaixo da mini-coluna descartado.
11. Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  da solução de lavagem buffer tipo 6 no tubo eppendorf de 1,5  $\mu\text{L}$  (contendo mini coluna com filtro), permanecendo em temperatura ambiente por 2 min, em seguida centrifugado por 3 min a 11000 g. O líquido abaixo da mini-coluna foi descartado e o tubo foi centrifugado novamente.
12. A mini coluna com filtro foi transferida para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL previamente identificado.
13. Foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de água milli-Q no tubo eppendorf de 1,5  $\mu\text{L}$ , contendo mini coluna com filtro, permanecendo em temperatura ambiente por 5 min, e centrifugado por 1 min a 11000 g.
14. A mini coluna foi descartada e o tubo eppendorf, contendo o plasmídeo recombinante, foi homogeneizado e deixado *overnight* a 4 °C.
15. O plasmídeo recombinante purificado foi verificado por comparação com o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) em eletroforese em gel de agarose 1,5%. As visualizações dos géis de agarose foram realizadas no Transiluminador-UV (Loccus biotecnologia).

16. A concentração do plasmídeo recombinante purificado foi obtida através de quantificação no Espectrofotômetro NanoVue Plus - GE Healthcare.
17. Foi realizada amplificação dos plasmídeos recombinantes purificados com o objetivo de aumentar a concentração, usando o *primer* M13, de acordo com item 4.2.4.6.

### **3.2.5 Reação de sequenciamento das Sequências de DNA plasmidial com kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 – Applied Biosystems (Sanger *et al.* 1977).**

Os DNAs plasmidiais extraídos através do “kit Wizard Plus SV *Miniprep DNA Purification Systems*” foram sequenciados usando o kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 – Applied Biosystems.

1. Foi preparado um mix para o número de amostras a serem sequenciadas - Para uma reação de 10 µL: 1,3 µL Tampão Sequenciamento BigDye 5x, 2 µL *primer*\_M13F ou R 10 µM, 0,3 µL BigDye, 1.5-3 µL de PCR purificado (depende da intensidade da sequência e do tamanho do fragmento), completar com água ultrapura para o volume de 10 µL.
2. O mix foi preparado e distribuído na placa devidamente identificada e, logo após, foram adicionados os DNAs plasmidiais.
3. As reações foram processadas no termociclador Veriti Thermal Cycler – Applied Biosystems PCR instruments. Os ciclos de amplificação das sequências dos DNAs plasmidiais foram: 2 min a 96 °C; 35 ciclos de 30 seg a 96 °C, 20 seg a 50 °C, 4 min a 60 °C; com um período de resfriamento a 20 °C.

### **Precipitação**

Após a reação de sequenciamento, realizou-se a precipitação das reações - Foi preparado um mix de Etanol/EDTA de acordo com o número de amostras. Deve-se usar uma placa contendo água com igual número de amostras para balanceamento ao centrifugar.

1. Foram adicionados 2,5 µL de EDTA 125 mM e 30 µL de Etanol 100% (Merck) por amostra.
2. A placa foi homogeneizada rapidamente em velocidade 7 (Vórtex), e incubada por 15 min em temperatura ambiente (coberto com papel alumínio).
3. A placa foi centrifugada a 2000 rcf, 4 °C, por 30 min (com selo), em seguida impulsionada para baixo de forma invertida por 3X para descarte do sobrenadante, e envolvida com papel toalha (mantida invertida).
4. A placa foi centrifugada invertida à 100 rcf, 4 °C, por 1 min (envolvida em papel toalha), e adicionado 30 µL de etanol 70% gelado (manter o selo).

5. A placa foi centrifugada à 1450 rcf, 4 °C, por 15 min (com selo), em seguida impulsionada para baixo de forma invertida por 3X para descarte do sobrenadante, e envolvida com papel toalha (mantida invertida).
6. A placa foi centrifugada novamente invertida 100 rcf, 4 °C, por 1 min (com papel toalha), e incubada no termociclador (aberto) a 37 °C por 45 min (envolvida em papel toalha).
7. Caso não for injetar a placa no mesmo dia, deve-se mantê-la em temperatura ambiente envolvida em papel alumínio.
8. A placa foi ressuspensa em 10 µL de formamida Hi-Di, homogeneizada (Vórtex) por 15 min em velocidade 4, e em seguida foi realizada um spin na centrífuga (ligar no máximo e desligar).
9. A placa foi desnaturada em termociclador a 95 °C por 5 min (usando selo próprio para sequenciamento) (tampa fechada).

### 3.2.6 Confirmação das Sequências – LINE- L1, SINE-B1, SINE-B4, SINE-MAR, SINE-THER – BlastN

1. As sequências provenientes dos DNAs plasmidiais foram submetidas a um “BlastN” para detectar similaridade com sequências de domínio público, contidas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), assim como com o banco de dados do Repbase (Jurka *et al.* 2005) do Instituto de Pesquisa e Informação Genética (Giri) (<http://www.girinst.org/repbase/>) por meio do software CENSOR (Kohany *et al.* 2006)
2. As sequências geradas de LINE-L1 e SINE-B1 foram depositadas no banco de dados do GenBank com os números de acessos disponíveis conforme abaixo.

	LINE-L1	SINE-B1
<i>Dactylomys dactylinus</i>	OR178947	OR500275
<i>Makalata didelphoides</i>	OR194069	OR178954
<i>Mesomys hispidus</i>	OR194070	OR500276
<i>Trinomys paratus</i>	OR178952	OR178956
<i>Proechimys guyannensis</i>	MW027222	MW027223
<i>Thrichomys apereoides</i>	OR194071	OR178957
<i>Isothrix paguros</i>	OR194072	OR500277

### 3.2.7 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) dos Retrotranspos LINE-L1, SINE-B1, SINE-B4, SINE-MAR, SINE-THER (Pinkel *et al.* 1986)

Foi realizada a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) descrita por Pinkel *et al.* (1986) com algumas modificações, para os DNAs plasmidiais de **LINE-L1, SINE-B1, SINE-B4, SINE-MAR, SINE-THER**. A finalidade foi mapear as sequências de TEs no genoma das espécies de Echimyidae.

#### Marcação da Sonda

1. A marcação da Sonda deve ser realizada com pouca luz – Os DNAs plasmidiais foram marcados seguindo o método “Atto nick translation Kit” (Jena Bioscience), otimizados para incorporação em DNA, por tradução de nick, usando DNA Polimerase I, seguindo as instruções do fabricante (5-Propargilamino-dUTP-ATTO-550 – fluoróforo vermelho e 5-Propargilamino-dUTP-ATTO-488 – fluoróforo verde) conforme abaixo:

---

Mix de enzimas 2 unidades/ $\mu$ L de polimerase I, 0,02 unidades/ $\mu$ L de Dnase I em tampão de armazenamento

NT labeling buffer 10x concentração

Atto488/Atto550 NT labeling mix 0,5 mM dATP, 0,5 mM dCTP, 0,5 mM dGTP, 0,25 mM dTTP, 0,25 mM Atto488/Atto550-XX-dUTP, pH 7,5

---

O volume do conteúdo do “Atto nick translation Kit” e da água a ser usado na marcação da sonda, em função da concentração do DNA obtido na PCR, está listado abaixo (para 8 lâminas), utilizando tubos de eppendorf de 250  $\mu$ L (volumes em  $\mu$ L):

	300 ng	400 ng	500/600 ng	700 ng	1000 ng
DNA	5 $\mu$ L	4 $\mu$ L	3 $\mu$ L	2 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Buffer labeling	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
Atto mix	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
Enzima	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
Água milli-Q	9 $\mu$ L	10 $\mu$ L	11 $\mu$ L	12 $\mu$ L	13 $\mu$ L

---

2. O tubo contendo mix do “Atto nick translation Kit” foi homogeneizado delicadamente e incubado por 3 h, a 15 °C no termociclador (Método Atto nick translation Kit modificado para DNA plasmidial).

#### **Preparação cromossômica (FISH simples ou double FISH)**

3. As lâminas contendo as metáfases permaneceram em estufa a 60 °C *overnight* para fixação dos cromossomos.
4. As lâminas foram imersas em um mix contendo 500 µL de pepsina 10 ng e 50 mL de HCL 0,01N (100ng/mL), a 37 °C por 10 min.
5. Foram realizadas três lavagens em água destilada por 3 min em temperatura ambiente. [descartar a cada lavagem]. Deixar secar.
6. As lâminas foram imersas em 2xSSC a 60 °C por 20 min. [descartar].
7. Foram realizadas três lavagens em água destilada por 3 min em temperatura ambiente. [descartar a cada lavagem]. Deixar secar.
8. As lâminas foram desidratadas em série alcoólica (70, 85, 100%) por 5 min cada. [devolver]. Deixar secar.

#### **Pré-hibridização**

9. O DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70% em 2xSSC a 70 °C por 2 min (Só aquecer a formamida na hora do uso). A água do banho maria tem que estar na altura do frasco com a formamida. Após o uso, a formamida retorna ao tubo para ser reutilizada. Solução Formamida 70% (70 mL de formamida, 30 mL de 2xSSC).
10. O DNA cromossômico foi desidratado em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada. Obs. O álcool 70% deverá estar a -20 °C [devolver]. Deixar secar. Obs.: Simultaneamente à desidratação em série alcoólica desnaturar a solução de hibridização.

#### **Solução de hibridização – Etapa em que se altera a extrinsecia**

11. Para a solução de hibridização (mix para oito lâminas) foi pipetado os seguintes componentes em um tubo de 1,5 mL (conforme abaixo). A sonda foi desnaturada a 99 °C (Thermo Shaker) por 10 min, e imediatamente colocada ao gelo.

### Solução de hibridização com duas sondas

Duas sondas marcadas pelo “Atto nick translation Kit” de acordo com o número de lâminas (volumes em  $\mu\text{L}$ ):

Nº de lâminas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Formamida 100%	25	50	75	100	125	150	175	200	225	250
Sulfato de dextrano 50%	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Sonda 1 Atto nick	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	22,5	25
Sonda 2 Atto nick	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	22,5	25
20xSSC	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
H <sub>2</sub> O	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50

### Solução de hibridização com uma sonda

Sonda marcada pelo “Atto nick translation Kit” de acordo com o número de lâminas (volumes em  $\mu\text{L}$ ):

Nº de lâminas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Formamida 100%	25	50	75	100	125	150	175	200	225	250
Sulfato de dextrano 50%	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Sonda Atto nick	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	22,5	25
20xSSC	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
H <sub>2</sub> O	7,5	15	22,5	30	37,5	45	52,5	60	67,5	75

### Hibridização

12. Foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de solução de hibridização sobre cada lamínula, em seguida invertida a lâmina sobre a lamínula. As lâminas com o material foram mantidas invertidas em câmara úmida a 37 °C *overnight*.

### Lavagens – Segundo dia

13. As lâminas foram lavadas em solução 2xSSC a 37 °C por 5 min (Shaker).
14. As lâminas foram lavadas em solução PBS- Tween 37 °C por 5 min (Shaker).  
(Solução de Tween 0,5%: 200 mL de 20xSSC pH 7,0, 500  $\mu\text{L}$  de Tween 100%, completar para 1 litro com H<sub>2</sub>O destilada).
15. As lâminas foram lavadas em solução PBS- Tween por 5 min em temperatura ambiente.
16. As lâminas foram desidratadas em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada.  
Ao final, deixar secar.

### Montagem das Lâminas

17. Foi adicionado, sobre cada lâmina, um mix na proporção de 20 µL de antifading (SlowFade, Invitrogen) com 1µL de solução DAPI (0,8 ng/µL). Em seguida cobriu-se com lamínula, conforme abaixo:

Mix de antifading e solução DAPI (volumes em µL)

Nº de lâminas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Antifade	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
DAPI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Os resultados obtidos por FISH para os retroelementos L1, B1 foram comparados aos padrões de bandeamento CBG, à coloração com prata das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) e a FISH do DNAr 18S descritos por Eler *et al.* (2012; 2020) e Silva *et al.* (2012) pois as amostras foram as mesmas usadas em todos esses estudos.

### 3.2.8 *Fiber-FISH* - protocolo de Barros *et al.* (2011)

Para experimentos de *fiber-FISH* foi utilizado o protocolo de Barros *et al.* (2011), com algumas modificações.

1. O material em suspensão celular foi colocado em lâminas de vidro umedecidas em água a 65 °C, lavadas em solução salina (1× PBS/1 min) por 2 min a temperatura ambiente, seguidas de sucessivos banhos em série alcoólica (70, 85, 100%) por 2 min cada. Secar.
2. Foram adicionados 800 µL de solução de NaOH 0,5 M (diluída em etanol 30%) sobre as lâminas inclinadas. (Lentamente).
3. As fibras cromossômicas foram alongadas usando uma lâmina para o arrasto com força em um único movimento.
4. Foi aplicado imediatamente 500 µL de etanol a 100% sobre a lâmina inclinada até sua evaporação. Em seguida, a FISH foi realizada com sondas LINE-L1 e SINE-B1.

### 3.2.9 Análises cromossômicas

1. Para a determinação do número e morfologia dos cromossomos foi utilizada a coloração convencional por Giemsa, e em seguida analisadas em microscópio óptico. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão, em um aumento de 1000 vezes.
2. As lâminas de FISH e fluorocromos foram analisadas em fotomicroscópio de fluorescência sob filtro apropriado. As melhores metáfases foram capturadas, utilizando sistema de captura de imagens DPController e processadas pelo programa DPManager. Posteriormente, os cariótipos foram montados utilizando o programa Adobe Photoshop CS3.

### 3.2.10 Análise de Bioinformática

1. Rearranjos estruturais nos cromossomos das espécies de *Proechimys* foram detectados a partir da distribuição dos retroelementos L1 e B1, que foram codificados como caracteres binários e utilizados em análise de agrupamento, por meio de cladograma realizado no software PAST 4.3. e estão apresentados no capítulo 1.
2. A comparação de similaridade entre espécies, no capítulo 1, foi realizada utilizando o índice de similaridade de Jaccard (Hammer *et al.* 2001 ). Uma matriz de dados foi estabelecida, com base na presença ou ausência de caracteres de homologia cromossômica, conforme sugerido por Dobigny *et al.* (2004a, 2004b) (Apêndice 1 e 2).
3. O alinhamento das sequências foi realizado, usando a ferramenta Clustal W (Thompson *et al.* 1994), incluída no programa BioEdit 7.0 Sequence Alignment Editor (Hall 1999), e todas as posições, contendo lacunas e dados faltantes, foram eliminadas.
4. O cladograma para os dados do capítulo 2 foi implementado, usando o software Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 11 (MEGA11) e a análise evolutiva foi inferida pelo método de Máxima Parcimônia (MP) (Tamura *et al.* 2021). O índice de consistência foi de 0,786458 (0,683805), o índice de retenção foi de 0,500000 (0,500000) e o índice composto foi de 0,393229 (0,341902) para todos os sítios de parcimônia-informativos. A árvore MP foi obtida usando o algoritmo heurístico Min-mini, com um fator de busca de 1. Esta análise envolveu 7 sequências de nucleotídeos com um total de 758 posições no conjunto de dados final.

# Capítulo 1

---

Soares, S.C.; Eler, E.S.S.; Silva, C.E.F.; da Silva, M.N.F.; Araújo, N.P.; Svartman, M.; Feldberg, E. 2022. Mapeamento e diversificação de LINE-1 and SINE-B1 no genoma de espécies de *Proechimys* (Rodentia: Echimyidae). *Life Science Alliance*, 5(6): 1-11.



# LINE-1 and SINE-B1 mapping and genome diversification in *Proechimys* species (Rodentia: Echimyidae)

Simone Cardoso Soares<sup>1,2,3</sup> , Eduardo Schmidt Eler<sup>1</sup> , Carlos Eduardo Faresin e Silva<sup>1,2</sup> ,  
Maria Nazareth Ferreira da Silva<sup>4</sup>, Naiara Pereira Araújo<sup>5,6</sup>, Marta Svartman<sup>5</sup> , Eliana Feldberg<sup>1,2</sup> 

**This study aimed to understand the impact of LINE-1 and SINE-B1 retroelements on the architecture and karyotypic diversification of five rodent species of the genus *Proechimys* from different regions of the Amazon. Karyotype comparisons were performed using fluorescent interspecific *in situ* hybridization. The L1 and B1 retroelements showed a non-random arrangement and a conserved pattern when the genomes of the five species of *Proechimys* were compared, including the two cytotypes of *Proechimys guyanensis*. The signal homeology among the chromosomes and the degree of similarity among the formed clusters indicate rearrangements such as fusion/fission, and demonstrates that these retroelements can behave as derived characters shared in *Proechimys*. The differentiated distribution and organization of these retroelements in the karyotypes and in the chromosomal fiber, respectively, may represent a strong indication of their role as generating sources of karyotypic diversity in the genus *Proechimys* and provide insights into the evolutionary relationships between taxa.**

DOI 10.26568/lsa.202101104 | Received 22 April 2021 | Revised 25 February 2022 | Accepted 28 February 2022 | Published online 18 March 2022

## Introduction

Transposable elements (TEs) are repetitive nucleotide sequences that are dispersed throughout the genome in euchromatin and heterochromatin regions. This distribution varies according to the taxon and can represent 3–50% of the genome depending on the species (Capy et al, 2000; Levin & Moran, 2011; Vandeweyer et al, 2016).

During transposition, TEs can be inserted into genes or regulatory elements of genes, triggering chromosomal rearrangements, as suggested by Araújo et al (2017) for Akodontini rodents, contributing to genetic diversity and even impairing gene function (Paço et al, 2014). Some studies have shown the influence of TEs in the genome size of species, such as the difference in the number of copies of TEs in the genomes of *Drosophila melanogaster* and

*Aedes aegypti* (Kidwell & Lisch, 2001), and alterations in gene expression and/or accentuated activity in the development of cancer in mice and humans (Faulkner et al, 2009; Tubio et al, 2014). Other evidence suggests that these elements are active in cultured mouse neuronal precursor cells and in the brains of mice (Muotri et al, 2005; Coufal et al, 2009).

The retroelements LINE-1 (L1) and SINE-B1 (B1) are repetitive, interspersed gene sequences that represent a predominant part of the genome of humans and mice (Boyle et al, 1990; Richardson et al, 2015). L1 comprises long and dispersed elements, with sizes varying between 6 and 7 kb, and are considered autonomous because they encode proteins necessary for their own mobilization (Kajikawa & Okada, 2002; Denli et al, 2015). B1 are non-autonomous short dispersed elements, with a length of ~150 bp, that use the LINEs mechanism for their mobilization (Kajikawa & Okada, 2002; Veniaminova et al, 2007).

L1 and B1 comprise about 18% and 2.7% of the mouse genome, respectively. Functional studies in cultured cells of mice revealed 3,000 L1 sequences that are compatible with retrotransposition. However, the number of active B1 sequences remains unknown because of the difficulty in identifying subfamilies given the short length of the sequences (Dewannieux & Heidmann, 2005; Richardson et al, 2015; Yang et al, 2019).

In addition to activity in dynamic, sometimes deleterious processes, such as transcriptional regulation, epigenetic control, cell differentiation, and reprogramming, retrotransposons have also been associated with the structuring and organization of chromosomes (Tökönen et al, 2015; Razali et al, 2019). LINEs, for example, appear to be interconnected with chromatin remodeling, and accumulate in heterochromatin rich regions, such as the centromere and sex chromosomes, contributing to karyotype diversity (Kuznetsova et al, 2006; Meyer et al, 2016; Sotero-Caio et al, 2017). Furthermore, because of their significant contribution to mutations, LINEs play an expressive role in the adaptation and evolution of populations and species (Kazarian, 2004; Jurka et al, 2011).

*Proechimys* is a speciose and chromosomally variable Neotropical rodent. The taxonomic identification of *Proechimys* species

<sup>1</sup>Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Genética Animal (LGA), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil. <sup>3</sup>Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil. <sup>4</sup>Coleção de Mamíferos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil. <sup>5</sup>Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. <sup>6</sup>Instituto

## Resumo

Este estudo teve como objetivo compreender o impacto dos retroelementos LINE-1 e SINE-B1 na arquitetura e diversificação cariotípica de cinco espécies de roedores do gênero *Proechimys*, de diferentes regiões da Amazônia. A comparação dos cariótipos foi realizada utilizando hibridização *in situ* fluorescência. Os retroelementos L1 e B1 apresentaram rearranjos não aleatórios e padrão conservado, quando comparados os genomas das cinco espécies de *Proechimys*, incluindo os dois citótipos de *Proechimys guyannensis*. A homeologia do sinal entre os cromossomos e o grau de similaridade entre os clusters formados indicam rearranjos como fusão/fissão, e demonstram que esses retroelementos podem se comportar como caracteres derivados compartilhados em *Proechimys*. A distribuição e organização diferenciada, desses retroelementos, nos cariótipos e nas fibras cromossômicas, respectivamente, podem representar um forte indício de seu papel como fontes geradoras de diversidade cariotípica no gênero *Proechimys* e fornecer *insights* sobre as relações evolutivas entre os táxons.

**Palavras-chave:** Rato espinhoso, Amazonas, Mapeamento cromossômico, Hibridização *in situ* fluorescência.

## Introdução

Elementos transponíveis (TEs) são sequências de nucleotídeos repetitivas, que estão dispersas por todo o genoma, em regiões de eucromatina e heterocromatina. Essa distribuição varia de acordo com o táxon e pode representar de 3 a 50% do genoma, dependendo da espécie (Capy *et al.* 2000; Levin e Moran 2011; Vandewege *et al.* 2016).

Durante a transposição, os TEs podem ser inseridos em genes ou elementos reguladores de genes, desencadeando rearranjos cromossômicos, como sugerido por Araújo *et al.* (2017) para roedores Akodontini, contribuindo para a diversidade genética e até prejudicando a função gênica (Paço *et al.* 2014). Alguns estudos têm demonstrado a influência dos TEs no tamanho do genoma das espécies, como a diferença no número de cópias de TEs nos genomas de *Drosophila melanogaster* e *Aedes aegypti* (Kidwell e Lisch 2000), e alterações na expressão gênica e/ou atividade acentuada no desenvolvimento de câncer em camundongos e humanos (Faulkner *et al.* 2009; Tubio *et al.* 2014). Outras evidências sugerem que esses elementos são ativos em células precursoras neurais de camundongos cultivadas e nos cérebros de camundongos (Muotri *et al.* 2005; Coufal *et al.* 2009).

Os retroelementos LINE-1 (L1) e SINE-B1 (B1) são sequências genéticas repetitivas e intercaladas, que representam uma parte predominante do genoma de humanos e camundongos (Boyle *et al.* 1990; Richardson *et al.* 2015). L1 compreende elementos longos e dispersos, com

tamanhos variando entre 6 e 7 kb, e são considerados autônomos porque codificam proteínas necessárias para sua própria mobilização (Kajikawa e Okada 2002; Denli *et al.* 2015). B1 são elementos dispersos curtos não autônomos, com comprimento de ~150 pb, que utilizam o mecanismo LINEs para sua mobilização (Kajikawa e Okada 2002; Veniaminova *et al.* 2007).

L1 e B1 compreendem cerca de 18% e 2,7% do genoma do camundongo, respectivamente. Estudos funcionais em células cultivadas de camundongos revelaram 3.000 sequências L1, que são compatíveis com retrotransposição. No entanto, o número de sequências B1 ativas permanece desconhecido devido à dificuldade em identificar subfamílias, dado o curto comprimento das sequências (Dewannieux e Heidmann 2005; Richardson *et al.* 2015; Yang *et al.* 2019).

Além da atividade em processos dinâmicos, às vezes deletérios, como regulação transcricional, controle epigenético, diferenciação celular e reprogramação, os retrotransposons também têm sido associados à estruturação e organização dos cromossomos (Töhönen *et al.* 2015; Razali *et al.* 2019). Os LINEs, por exemplo, parecem estar interligados com a remodelação da cromatina e acumulam-se em regiões ricas em heterocromatina, como o centrômero e os cromossomos sexuais, contribuindo para a diversidade cariotípica (Kuznetsova *et al.* 2006; Meyer *et al.* 2016; Sotero-Caio *et al.* 2017). Além disso, devido à sua contribuição significativa para as mutações, os LINEs desempenham um papel expressivo na adaptação e evolução de populações e espécies (Kazazian 2004; Jurka *et al.* 2011).

*Proechimys* é um roedor Neotropical específico e cromossomicamente variável. A identificação taxonômica de espécies de *Proechimys* é problemática devido, em parte, à sobreposição morfológica inter e intraespecífica, com muitas espécies apresentando variações sutis em seus traços morfológicos característicos (Paton *et al.* 2000; Eler *et al.* 2020). Estudos citogenéticos demonstraram grande variabilidade cromossômica nesse grupo de roedores, com número diploide variando de 14 a 62, e NF (número de braços autossômicos) variando de 18 a 80. Diversidade cariotípica intraespecífica em simpatria também foi relatada, dificultando a compreensão das relações entre as espécies (Weksler *et al.* 2001; Eler *et al.* 2012; Amaral *et al.* 2013). Eler *et al.* (2020) apresentaram novos cariótipos para *Proechimys* e ampliaram a distribuição geográfica de alguns citótipos, atestando a grande diversidade cariológica deste gênero. Diante deste cenário, o presente estudo busca investigar o papel dos TEs na evolução cariotípica de *Proechimys*.

Sequências repetitivas como TEs podem desencadear variações moleculares em populações, causando consequências fenotípicas para os indivíduos, podendo estar envolvidas

no processo de especiação (Razali *et al.* 2019; Schrader e Schmitz 2019 ). Segundo Ricci *et al.* (2018), os TEs influenciam significativamente a evolução dos genomas, principalmente pelo seu envolvimento em rearranjos cromossômicos e pela correlação de sua atividade na especiação de mamíferos.

Neste estudo, mapeamos pela primeira vez os retroelementos transponíveis L1 e B1 nos cromossomos de cinco espécies do rato espinhoso *Proechimys*. Ao comparar resultados de diferentes regiões da Amazônia, avaliamos o impacto desses retroelementos na arquitetura do genoma e na diversificação do cariótipo deste táxon.

## Material e Métodos

As cinco espécies de *Proechimys* analisadas estão listadas na tabela 5. Os indivíduos foram coletados na Amazônia brasileira de 2005 a 2015 com autorização sob licenças 02005.000642/03-11 (IBAMA/MMA), 02000.002336/2003-93 (IBAMA/MMA), 02005.002672/04 (IBAMA/MMA), 37585-5 (SISBIO/MMA), 37592-4 (SISBIO/MMA), 10985 (SISBIO/MMA). As peles e crânios foram depositados na Coleção de Mamíferos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As análises citogenéticas foram realizadas em preparações cromossômicas obtidas de células da medula óssea, utilizando colchicina na concentração de 0,0125%, 1 mL para cada 100 g de massa animal (Ford e Hamerton 1956). As suspensões celulares e amostras de tecidos para estudos citogenéticos moleculares estão depositadas no Laboratório de Genética Animal do INPA (Silva *et al.*, 2012; Eler *et al.* 2012; 2020).

**Tabela 1.** Espécies de *Proechimys* analisadas. 2n=número diploide; NF= número fundamental; INPA=Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Espécies	Local de coleta	Coordenadas	Voucher	2n/NF
<i>P. guyannensis</i> <sup>a</sup>	Ilha Serrinha, UHE Balbina, rio Uatumã, AM	01°52' S, 59°25' W	INPA-CEF12	46/50 <sup>b</sup>
			INPA-CEF14	
<i>P. guyannensis</i> <sup>a</sup>	Monte Dourado, Almeirim, Pará	00°49' S, 52°39' W	INPA5053	38/52 <sup>c</sup>
			INPA5054	
<i>P. gardneri</i>	Margem esquerda do rio Madeira, Comunidade Bela Vista, AM	05°14' S, 60°42' W	INPA5383	40/54 <sup>c</sup>
			INPA5390	
<i>P. echinothrix</i>	Reserva Canutama, rio Purus, AM	06°34' S, 64°33' W	INPA7319	32/58 <sup>c</sup>

			INPA7345	
<i>P. longicaudatus</i>	Margem esquerda do rio Aripuanã, AM	06°17' S, 60°23' W	INPA5414	28/46 <sup>c</sup>
			INPA5401	
<i>P. cuvieri</i>	Madeira da REMAM (Refinaria Isaac Sabbá), Manaus, AM	00°70' S, 52°67' W	INPA-EE251	28/46 <sup>b</sup>
	Bituba, Monte Dourado, Almeirim Pará	01°11' S, 52°38' W	INPA5050	

<sup>a</sup>Diferentes citótipos para *P. guyannensis* 2n = 46<sup>1</sup> e 2n = 38<sup>2</sup>. <sup>b</sup>Silva *et al.* (2012). <sup>c</sup>Eler *et al.* (2012).

Os retroelementos L1 e B1 foram obtidos por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os seguintes conjuntos de primers foram utilizados: L1-F (5'-AAGAATTCCGCAGGATACAAGATCAACTCA-3') e L1-R (5'-AAGGATCCCAATTTCGATTCCATTGGT-3') (Grahn *et al.* 2005), B1-F (5'-GCCGGGCGTGGTGGCG - 3') e B1-R (5'-TTGGTTTTTCGAGACAGGGTTTTCT-3') (Rinehart *et al.* 2005). Os produtos de PCR foram purificados com o kit SV Gel Wizard e sistema de limpeza de PCR (Promega) e clonados no kit pGEM-t Easy Vector (Promega). Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados na plataforma ABI3130 (Myleus Biotechnology), e as sequências foram submetidas ao banco de dados Repbase para consenso (<https://www.girinst.org/censor/>) e estão disponíveis no GenBank com os números <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW027222> e <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW027223>. Os plasmídeos sequenciados foram marcados por tradução de nick com digoxigenina-11-dUTP (DIG-Nick Translation Mix; Roche Applied Science), de acordo com as instruções do fabricante, e utilizados como sondas para FISH. As lâminas contendo os cromossomos alvo foram inicialmente tratadas com pepsina por 10 min a 37 °C e lavadas em água destilada. A desnaturação cromossômica foi realizada em formamida a 70% em 2× SSC a 70 °C por 2 min, seguida de desidratação em etanol. A mistura de hibridização consistiu em 200 ng de sonda marcada com digoxigenina e as hibridizações em tampão de hibridização (formamida 50%/SSC 20x/sulfato de dextrano 50%) foram realizadas a 42 °C *overnight*, com extrinência de 77%. Após lavagens de pós-hibridização em 2×SSC/PBST a 37 °C e imunodeteção com antidigoxigenina conjugada com rodamina, as metáfases foram contrastadas com DAPI (0,8 ng/μL) e reagente antifading (SlowFade; Invitrogen).

Para experimentos de *fiber*-FISH, foi utilizado o protocolo de Barros *et al.* (2011), com algumas modificações. O material em suspensão celular foi colocado em lâminas de vidro com

uma camada de água a 65 °C, lavadas em solução salina (1× PBS/1 min), seguida de sucessivos banhos em série alcoólica. Foram adicionados 800 µL de solução de NaOH 0,5 M (diluída em etanol 30%) e as fibras cromossômicas foram alongadas, seguido da aplicação imediata de 500 µL de etanol 100%. Em seguida, a FISH foi realizada com sondas LINE-L1 e SINE-B1.

Os resultados obtidos por FISH para os retroelementos L1 e B1 foram comparados aos padrões de bandeamento CBG e à coloração com prata das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) descritos em Eler *et al.* (2012; 2020) e Silva *et al.* (2012) pois as mesmas amostras foram usadas em todos esses estudos.

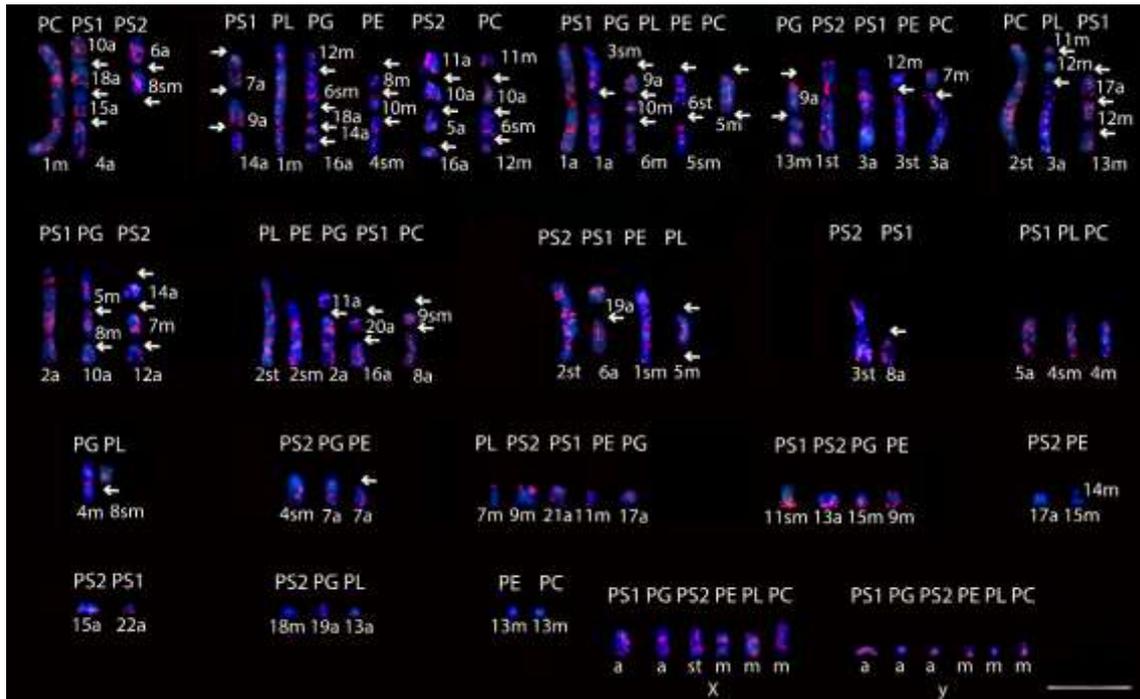
Os prováveis rearranjos estruturais nos cromossomos das espécies de *Proechimys* a partir da distribuição dos retroelementos L1 e B1 foram codificados como caracteres binários e utilizados em análise de agrupamento por meio de cladograma realizado no software PAST 4.3. A comparação de similaridade entre espécies foi realizada, utilizando o índice de similaridade de Jaccard mostrado em Tabela 3 (Hammer *et al.* 2001). Uma matriz de dados foi estabelecida com base na presença ou ausência de caracteres de homologia cromossômica conforme sugerido por Dobigny *et al.* (2004a; 2004b) (Apêndices 1 e 2).

## Resultados

A análise dos cariótipos das cinco espécies de *Proechimys* (*Proechimys guyannensis* [PS1, 2n = 46], *Proechimys guyannensis* [PS2, 2n = 38], *Proechimys gardneri* [PG, 2n = 40], *Proechimys echinothrix* [PE, 2n = 32], *Proechimys longicaudatus* [PL, 2n = 28] e *Proechimys cuvieri* [PC, 2n = 28]) permitiram visualizar a distribuição dos elementos retrotransponíveis LINE-1 e SINE-B1 em cada par cromossômico, e comparar o padrão desses retroelementos entre espécies (Figuras 1 e 2).

O consenso L1 e B1 submetido ao banco de dados Repbase (Bao *et al.* 2015) forneceu uma sequência de retrotransposon não-LTR com 509 pb e 90% de identidade com *Chinchilla lanigera*, coincidente com variantes estruturais L1-3\_Clan (Kojima 2019), e com 149 pb e 84% de identidade com *Cavia porcellus* (Jurka 2010), coincidente com variantes estruturais ID-B1\_Cpo, respectivamente.

Embora disperso em pares cromossômicos, o padrão de L1 permaneceu conservado, quando o genoma das espécies de *Proechimys* foram comparados (Figura 1). Por exemplo, o acúmulo de L1 no par cromossômico 1 de PC é semelhante às regiões correspondentes aos pares 10 + 18 + 15 + 4 do PS1, e aos pares 6 + 8 de PS2, demonstrando possíveis rearranjos nos cromossomos destas espécies (Figura 1 e tabela 2).



**Figura 1:** Distribuição dos retroelementos LINE-1 em *Proechimys* ssp. PS1 = *P. guyannensis* (2n=46), PG = *P. gardneri* (2n=40), PS2 = *P. guyannensis* (2n=38), PE = *P. echinothrix* (2n=32), PL = *P. longicaudatus* (2n=28), PC = *P. cuvieri* (2n=28), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtolocêntrico, a = acrocêntrico. As setas indicam regiões onde os possíveis rearranjos nos cromossomos das diferentes espécies ocorreram. (Apêndice 3). Barra=10,0μm.

O mesmo padrão pode ser observado entre os pares de cromossomos das diferentes espécies. Em pelo menos um grupo de cromossomos foi observada correspondência total entre as espécies: pares 7 + 9 + 14 de PS1, 1 de PL, 12 + 6 + 18 + 14+16 de PG, 8 + 10 + 4 de PE, 11 + 10+5 + 16 de PS2 e 11 + 10+6 + 12 de PC, incluindo os dois citótipos de *P. guyannensis* (Figura 1 e tabela 1). L1 não estava presente nos pares cromossômicos 17 de PS2 e 14 + 15 de PE. A homeologia em cada grupo de espécies de *Proechimys* compreendeu às regiões centroméricas e/ou pericentroméricas de praticamente todos os cromossomos, que foram comparados (Figura 1).

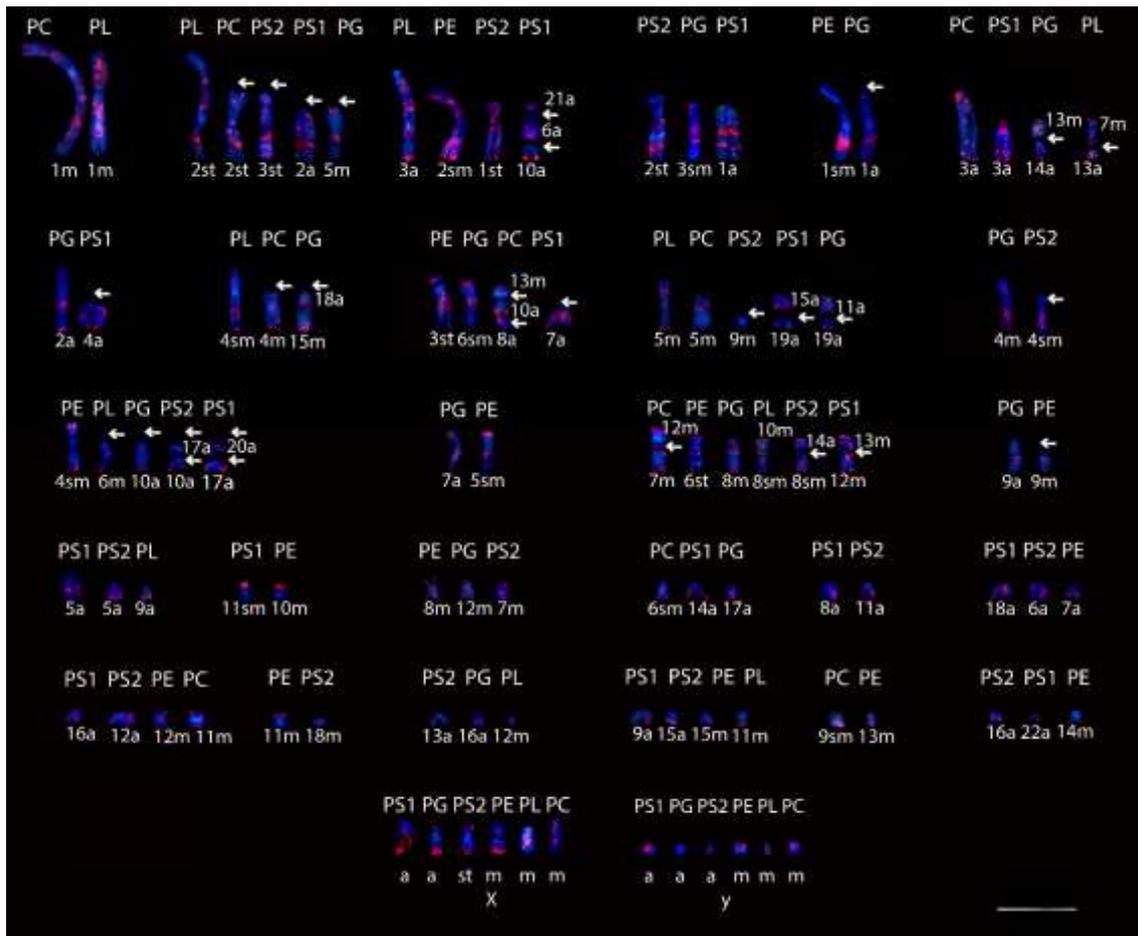
**Tabela 2:** Prováveis rearranjos nos cromossomos de *Proechimys* spp. a partir da distribuição dos retroelementos LINE-1 como mostrado na figura 1.

PS1 (2n=46)	PG (2n=40)	PS2 (2n=38)	PE (2n=32)	PL (2n=28)	PC (2n=28)
1m					10a+18m+15a+4a
7a+9a+14a	12m+6sm+18a+14a+16a	11a+10a+5a+16a	8m+10m+6st	1m	11m+10a+6sm+12m
1m	8m/1a		6st/5sm	9a/10m/6m	
3a		1st	12m/3st		7m/3a
17a/12m/13m				11m/12m/3a	2st
2a	5m+8m+10a	14a+7a+12m			
20a+16a	11a+2a		2sm	2st	
19a+6a		2st	1sm		9sm+8a
8a		3st			
4a				4sm	4m
	4m			8sm	
	7a	4sm	7a		
	1a	9m	11m	7m	
11sm	15m	13a	9m		
		17a	14m+15m		13m+22a
21a		15a			
	19a	18m		13a	
			13m		13m

PS1 = *P. guyannensis* (2n=46), PG = *P. gardneri* (2n=40), PS2 = *P. guyannensis* (2n=38), PE = *P. echinothrix* (2n=32), PL = *P. longicaudatus* (2n=28), PC = *P. cuvieri* (2n=28), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subteloacêntrico, a = acrocêntrico.

L1 estava disperso nos cromossomos X, geralmente marcando as regiões centromérica/pericentromérica e proximal, com exceção de PG. A distribuição de L1 no cromossomo Y foi variável, abrangendo um ou ambos os braços cromossômicos. Estava presente em ambos os braços cromossômicos em PS1, PE e PC, no Yp em PL, no Yq de PG e PS2 e nas regiões pericentroméricas de PS1, PL e PC. Marcação conspícua foi observada na região intersticial e/ou centromérica de PS1, PS2 e PC e região terminal de PE (Figura 1).

O mapeamento físico de B1 no cariótipo das cinco espécies de *Proechimys* analisadas mostrou um padrão com preponderância à compartimentação e, assim como para L1, estabeleceu uma homeologia completa na maioria dos braços cromossômicos (Figura 2).



**Figura 2:** Distribuição dos retroelementos SINE B1 em *Proechimys* spp. PS1 = *P. guyannensis* (2n=46), PG = *P. gardneri* (2n=40), PS2 = *P. guyannensis* (2n=38), PE = *P. echinothrix* (2n=32), PL = *P. longicaudatus* (2n=28), PC = *P. cuivieri* (2n=28), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico. As setas indicam a região dos possíveis rearranjos nos cromossomos das diferentes espécies. (Apêndice 4). Barra=10,0μm.

O padrão de distribuição de B1 nos cromossomos foi conservado entre as espécies, principalmente nas regiões terminais, como nos pares cromossômicos 2 de PL, PC e PS1, 3 de PS2 e 5 de PG, demonstrando possíveis rearranjos nos cromossomos dessas espécies (Figura 2 e tabela 3).

**Tabela 3:** Prováveis rearranjos nos cromossomos de *Proechimys* spp. a partir da distribuição dos retroelementos SINE-B1 como mostrado na figura 2.

PS1 (2n=46)	PG (2n=40)	PS2 (2n=38)	PE (2n=32)	PL (2n=28)	PC (2n=28)
				1m	1m
2a		3st		2st	2st
10a		1st	3st	3a	
1a	3m	2st			
	1a		1sm		
3a	14a			13a	3a
4a	2a				
	6sm		5st		13m+10a+8a
15a+19a	11a+19a	11m+9m		5m	5m
	4sm	12+4sm			
20a+9a	10a	17a+10a	4sm	6m	
	7a		5sm		
13m+12m	8m	14a+8m	6st	10m+8m	11m+7m
	9a		9m		
5a		5a		9a	
11sm			10m		
	12m	7m	8m		
14a	17a				6sm
8a		7m			
18a		6a	7a		
16a		9m			11m
		18m	11m		
	16a	13m		12m	
		15a	15m		
			13m		9sm
17a				13a	
22a		16a			

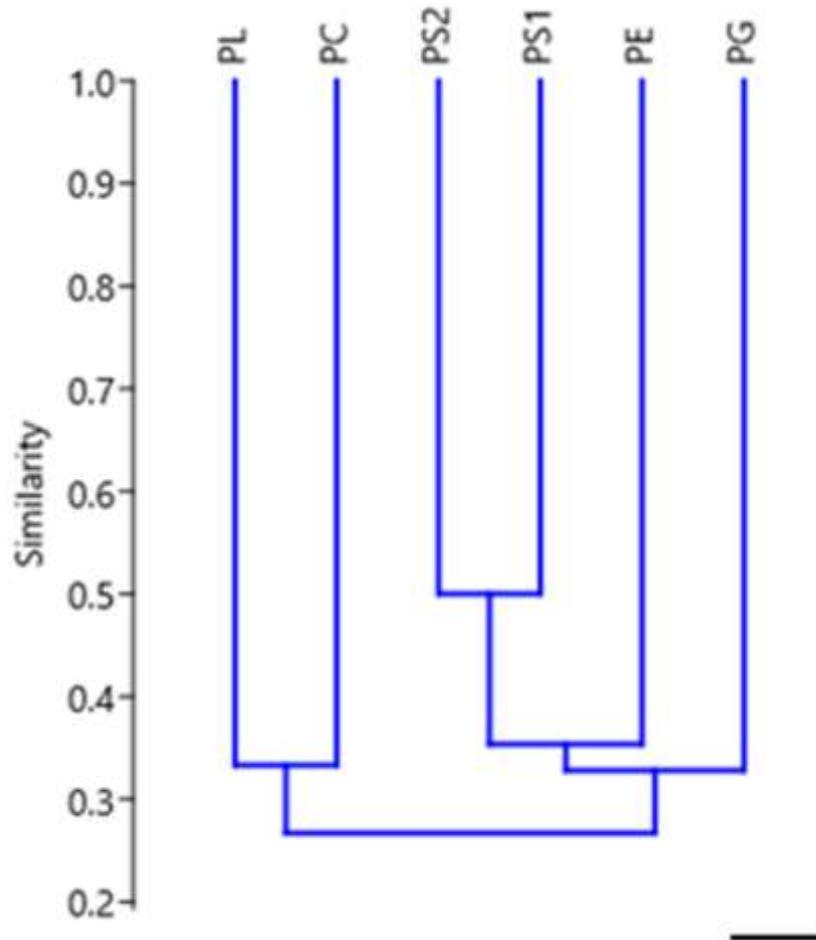
PS1 = *P. guyannensis* (2n=46), PG = *P. gardneri* (2n=40), PS2 = *P. guyannensis* (2n=38), PE = *P. echinothrix* (2n=32), PL = *P. longicaudatus* (2n=28), PC = *P. cuvieri* (2n=28), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelo-cêntrico, a = acrocêntrico.

Como em L1, o sinal de B1 apresentou total equivalência entre espécies em pelo menos um grupo cromossômico, incluindo os dois citótipos de *P. guyannensis*, que compreende os pares cromossômicos 12+7 de PC, 6 de PE, 8 de PG, 10+ 8 de PL, 14+8 de PS2 e 13+12 de PS1 (Figura 2 e tabela 3). O sinal de B1 esteve presente na região centromérica/pericentromérica de todos os cromossomos de cada grupo de espécies de *Proechimys* (Figura 2).

Nos cromossomos X, a distribuição de B1 variou entre as cinco espécies analisadas: foi observada em ambos os braços em PG, PS2, PE, PL e PC, no Xq de PS1. B1 foi mapeado em ambos os braços em PS1, PS2, PE, PL e PC, Yq de PG. Os sinais de B1 nos cromossomos sexuais foram caracterizados pela presença de blocos conspícuos no cromossomo X e envolveram as regiões centroméricas de PG, PE e PL. No cromossomo Y, os sinais ocorreram na região intersticial de PS1, PG e PC, e terminal de PS2, PE e PL, e incluíram as regiões centroméricas de PS1, PS2 e regiões pericentroméricas de PC (Figura 2).

Nossos dados mostram uma predominância de blocos conspícuos de B1 sobre L1, e uma correlação de sinal desses retroelementos nos cromossomos sexuais, em praticamente todas as espécies de *Proechimys* aqui analisadas (Figuras 1 e 2).

Os prováveis rearranjos estruturais, a partir da distribuição dos retroelementos L1 e B1, permitiram o agrupamento das espécies de *Proechimys* examinadas de acordo com os níveis de similaridade (Figura 3 e Tabela 4).



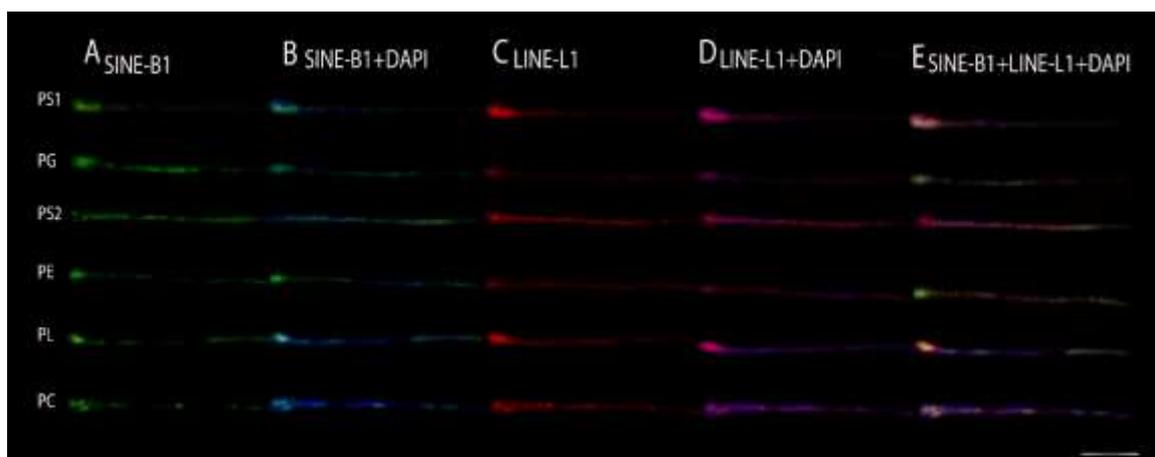
**Figura 3:** Cladograma obtido após a análise em PAST 4.3 das espécies PS1 = *P. guyannensis* (2n=46), PG = *P. gardneri* (2n=40), PS2 = *P. guyannensis* (2n=38), PE = *P. echinothrix* (2n=32), PL = *P. longicaudatus* (2n=28), PC = *P. cuvieri* (2n=28), usando os possíveis rearranjos de cromossomos, gerados pelos retroelementos L1 e B1 como caracteres únicos (Apêndices 1 e 2). Barra=10,0 $\mu$ m.

**Tabela 4.** Similaridade Jaccard obtida na comparação entre espécies.

	PS1	PG	PS2	PE	PL	PC
PS1	1	-	-	-	-	-
PG	0,375	1				
PS2	0,564103	0,35	1			
PE	0,325	0,314286	0,444444	1		
PL	0,472222	0,314286	0,368421	0,257143	1	
PC	0,428571	0,30303	0,225	0,322581	0,464286	1

O cladograma gerado a partir da distribuição dos retroelementos L1 e B1 nos diferentes cariótipos de *Proechimys* revelou dois grandes grupos, compostos por quatro subgrupos, com diferentes graus de similaridade: (1) PL e PC, (2) PS1 e PS2, (3) PE, e (4) PG.

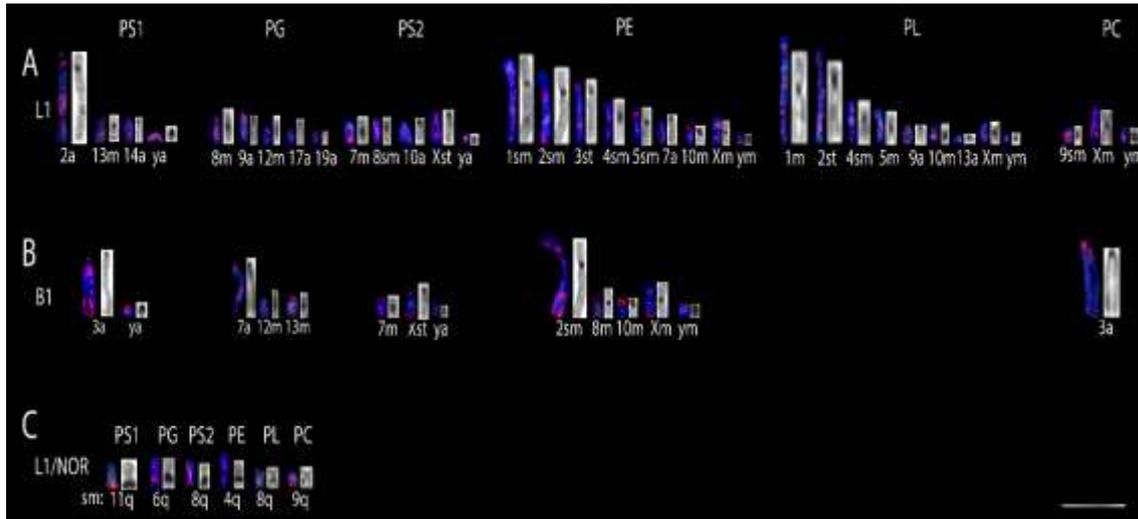
A análise de *fiber*-FISH permitiu a determinação de sinais dos retroelementos L1 e B1 no genoma de *Proechimys* spp. (Figura 4).



**Figura 4.** *Fiber*-FISH mostrando cluster de LINE-L1 (vermelho) e SINE-B1 (verde) adjacente e sobreposto em *Proechimys* spp. PS1 = *P. guyannensis* (2n=46), PG = *P. gardneri* (2n=40), PS2 = *P. guyannensis* (2n=38), PE = *P. echinothrix* (2n=32), PL = *P. longicaudatus* (2n=28), PC = *P. cuvieri* (2n=28). (A) SINE-B1, (B) SINE-B1+DAPI, (C) LINE-L1, (D) LINE -L1 + DAPI, (E) SINE-B1+LINE-L1+ DAPI. Barra=10,0µm.

O padrão de L1 e B1, observado no genoma das espécies de *Proechimys*, pela técnica de *fiber*-FISH, revelou uma distribuição adjacente e sobreposta de forma diferenciada entre as espécies. PS1 e PS2 com sobreposição de L1 ao longo da fibra e formação de blocos B1 preferencialmente na ponta final, PL e PC com sobreposição no início, alternando L1 com blocos B1 ao longo da fibra, PG com blocos B1 no meio e L1 dispersos preferencialmente em ponta final, PE com L1 disperso no meio, com alguma sobreposição e B1 nas regiões terminais (Figura 4).

Comparações dos sítios Ag-RON com retroelementos L1 e B1 demonstraram coincidência com L1, mas não com sinais de B1, no braço longo de um par submetacêntrico das cinco espécies examinadas de *Proechimys*. E ambos retroelementos coincidiram com regiões ricas em heterocromatina constitutiva (CH), de alguns cromossomos (Figura 5 e tabela 5).



**Figura 5. Hibridização correspondente entre LINE-1, SINE-B1, Ag-RONs e heterocromatina constitutiva (CH) em cromossomos de *Proechimys*.** PS1 = *P. guyannensis* (2n=46), PG = *P. gardneri* (2n=40), PS2 = *P. guyannensis* (2n=38), PE = *P. echinothrix* (2n=32), PL = *P. longicaudatus* (2n=28), PC = *P. cuvieri* (2n=28). (A) LINE-1 à esquerda e CH à direita. (B) SINE-B1 à esquerda e CH à direita. (C) LINE-1 à esquerda e Ag-RON à direita. m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subteloentrôico, a = acrocêntrico, q = braço longo. Barra=10,0μm.

Os sítios ricos em CH foram coincidentes com regiões centroméricas e/ou pericentroméricas de alguns cromossomos com sinais L1 e B1 em *Proechimys* spp. (Figura 5A e B e tabela 5).

**Tabela 5.** Hibridização correspondente entre LINE-1, SINE-B1, Ag-RONs e heterocromatina constitutiva (CH) em cromossomos de *Proechimys* como mostrado na figura 5.

<i>Proechimys</i> spp.	PS1 (2n=46)	PG (2n=40)	PS2 (2n=38)	PE (2n=32)	PL (2n=28)	PC (2n=28)
Sinal L1 correspondente a heterocromatina constitutiva	2a/13m/14a/Ya	8m/9a/12m/17a/19a	7m, 8sm, 10a, Xst, Ya	1sm, 2sm, 3st, 4sm, 5sm, 7a, 10m, Xm, Ym	1m, 2st, 4sm, 5m, 9a, 10m, 13a, Xm, Ym	9m, Xm, Ym
Sinal B1 correspondente a heterocromatina constitutiva	3a, Ya	7a, 12m, 13m	7m, Xst, Ya	2sm, 8m, 10m, Xm, Ym	-	3a
Sítios Ag-RONs coincidentes com sinais L1	11sm	6sm	8sm	4sm	8sm	9sm

PS1 = *P. guyannensis* (2n=46), PG = *P. gardneri* (2n=40), PS2 = *P. guyannensis* (2n=38), PE = *P. echinothrix* (2n=32), PL = *P. longicaudatus* (2n=28), PC = *P. cuvieri* (2n=28), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subteloacêntrico, a = acrocêntrico.

Várias características únicas foram observadas em algumas espécies: em *P. guyannensis* (2n=46), o sinal de L1 no cromossomo 2a foi coincidente com HC em região próxima ao centrômero; em *P. echinothrix*, os blocos de L1 e B1 coincidiram com o braço curto totalmente heterocromático do metacêntrico 10; e em *P. longicaudatus* não houve marcação de B1 que coincidissem com a heterocromatina. Os cromossomos Y PS1 e PE totalmente heterocromáticos apresentaram blocos de L1 e B1, e em PS2 e PC também houve forte marcação com L1 (Figura 5A e B).

## Discussão

O mapeamento físico de L1 e B1 nas espécies de *Proechimys* seguiu o padrão proposto por Charlesworth *et al.* (1994), com sinais intercalados na maioria dos cromossomos, como foi descrito em roedores cricetídeos *Microtus agrestis* e *Microtus rossiaemeridionalis* (Neitzel *et al.* 1998; 2002). A disposição desses retroelementos, com padrão conservado em cinco espécies de *Proechimys*, incluindo dois citótipos de *P. guyannensis*, permitiu uma comparação entre cromossomos correspondentes, às vezes envolvendo as regiões centroméricas (Figuras 1 e 2 e Tabelas 1 e 2). As semelhanças observadas entre os cromossomos correspondentes dessas cinco espécies de *Proechimys* sugerem sinais de L1 e B1 nas regiões pericentroméricas, e indicam rearranjos durante a diversificação cariotípica, conforme proposto por Paço *et al.* (2015) e Araújo *et al.* (2017).

A distribuição dos retroelementos L1 e B1 nos diferentes cariótipos apresentados neste estudo revelou homeologias cromossômicas em *Proechimys*, compreendendo quatro grupos: (1) PL e PC, (2) PS1 e PS2, (3) PG e (4) PE. Esses dados refletem algumas das relações taxonômicas propostas por Patton *et al.* (2015) para *Proechimys*: PS1 e PS2, correspondentes aos dois citótipos de *P. guyannensis* (rato espinhoso Guyenne), foram agrupados, assim como PL e PC, correspondentes a *P. longicaudatus* (rato espinhoso de cauda longa) e *P. cuvieri* (rato espinhoso de Cuvier), ambos pertencentes ao grupo *longicaudatus* de acordo com Patton (1987) e Patton *et al.* (2015). Considerando os rearranjos estruturais propostos, é plausível que L1 e B1 estejam envolvidos na reorganização cariotípica destes táxons (Figuras 1 e 2). O grau de similaridade entre os clusters formados mostrou que os retroelementos L1 e B1 podem se comportar como caracteres derivados compartilhados em *Proechimys* (Figura 3). Os padrões de distribuição das sequências TEs demonstram semelhanças entre as espécies, o que infere que esses retroelementos podem estar envolvidos em rearranjos do tipo fusão/fissão nos cromossomos dos grupos propostos (Figuras 1, 2 e 3). Estes dados fornecem informações sobre as relações evolutivas entre táxons, revelando espécies crípticas e contribuindo para o ajuste fino das árvores filogenéticas. Estudos de sequências de TEs em *Proechimys*, envolvendo um maior número de espécies, parecem promissores para esclarecer as relações filogenéticas de gêneros ricos em espécies, como *Proechimys* (Boyle *et al.* 1990; Ricci *et al.* 2018; D'Elía *et al.* 2019).

O padrão de distribuição de L1 e B1 nas fibras cromossômicas das espécies de *Proechimys* demonstra que esses retroelementos foram organizados em diferentes locais do genoma de cada espécie de forma intercalada e/ou colocalizada, compreendendo quatro grupos, conforme mostrado no cladograma, devido à similaridade de sinal entre as fibras (Figuras 3 e 4). O padrão do sinal L1 e B1 na fibra cromossômica de *Proechimys* confirma os dados fornecidos pelos possíveis rearranjos, pois demonstra que esses retroelementos permaneceram no genoma de diferentes espécies, organizados de forma diferente (Figuras 1, 2, 3 e 4). *Fiber-Fish* tem se mostrado uma ferramenta para mapear com precisão sequências repetitivas, possibilitando avaliar se elas estão sobrepostas ou adjacentes no genoma, como neste estudo (Wang *et al.* 2013; Souza-Sousa *et al.* 2021).

Os sinais de hibridização dos retroelementos nos cromossomos sexuais das espécies de *Proechimys* seguiram o mesmo padrão dos autossomos, nos quais L1 é acumulado principalmente nas regiões intersticiais, enquanto B1 é centromérico/pericentromérico (Figuras 1 e 2), conforme relatado por Chen e Manuelidis (1989). A marcação de L1 nesses

cromossomos apresentou padrões intercalados e não aleatórios semelhantes aos obtidos nas espécies de roedores *Mus musculus* e *Peromyscus maniculatus* (Wichman *et al.* 1992; Baker e Kass 1994). No entanto, o padrão de marcação de B1 diferiu daquele relatado para *M. musculus* e três espécies da tribo de roedores Akodontini (Boyle *et al.* 1990; Araújo *et al.* 2017), que não mostraram preferência pelos cromossomos sexuais. Análises de cromossomos sexuais demonstraram um acúmulo significativo de TEs específicos em locais específicos, conforme relatado por Erlandsson *et al.* (2000) e Dong *et al.* (2017).

Em relação ao acúmulo de L1 e B1 no cromossomo Y, conforme observado em PS1/PS2/PC e PS1, respectivamente (Figuras 1 e 2), pode estar relacionado a mecanismos epigenéticos. Estudos em humanos, chimpanzés e camundongos indicam que esse padrão sugere um envolvimento de TEs, L1 e B1, na divergência do cromossomo Y em mamíferos (Erlandsson *et al.* 2000; Simonti *et al.* 2017; Rojas-Ríos e Simonelig 2018; Tang *et al.* 2018).

O elevado acúmulo de L1 em regiões intersticiais dos cromossomos X, das cinco espécies de *Proechimys* examinadas, incluindo os dois citótipos de *P. guyannensis*, apoia a hipótese de Lyon (1998) de que o retroelemento L1 está associado à inativação do cromossomo X. Em estudos com células-tronco embrionárias em camundongos, Chow e Heard (2009) e Chow *et al.* (2010) mostraram que regiões específicas, compostas por aglomerados de LINEs, podem estar envolvidas no recrutamento de RNAs Xist no processo de silenciamento do cromossomo X.

As regiões terminais e pericentroméricas de alguns cromossomos de *Proechimys* aqui examinados foram marcadas com sondas de retroelementos. Algumas regiões centroméricas apresentaram forte marcação, coincidentes com HC: L1 em PS1 (Ya), PG (9a, 12m), PS2 (7m, 8sm e Ya), PE (10m, 4sm), PL (10m) e PC (9sm, Ym) e B1 em PS1 (Ya), PG (13m), PE (10m, Ym) e PC (3a) (Figura 5A e B). Nossos resultados concordam com os apresentados por Schueler *et al.* (2001), nos quais foi demonstrado que sítios pericentroméricos em humanos possuem grandes blocos de LINE e SINE.

Nos cromossomos sexuais de *Proechimys*, os retroelementos L1 e B1 pareciam acumular-se nas regiões centroméricas/pericentroméricas (Figuras 1 e 2), característica também relatada em outros roedores como *M. agrestis* e *M. rossiaemeridionalis* (Neitzel *et al.* 1998; 2002). A alternância de L1 e/ou B1 em sítios centroméricos heterocromáticos nos cromossomos sexuais de várias espécies de *Proechimys* (Figura 5A e B) pode estar associada à competição entre cópias de TEs, presentes no mesmo genoma, conforme sugerido por Hua-Van *et al.* (2011).

A particularidade observada no cromossomo 2a de PS1, que apresentava blocos L1 e HC próximos ao centrômero, e os blocos L1/B1 em PE coincidentes com o braço curto totalmente heterocromático do par metacêntrico 10 (Figura 5A e B), pode estar associada à plasticidade do genoma na remodelação da heterocromatina. Nishibuchi e Déjardin (2017) sugeriram que a desrepressão dos TEs pode resultar na redistribuição e reorganização da heterocromatina, o que normalmente restringe a atividade desses elementos. A presença de TEs em regiões centroméricas, associadas ou não à heterocromatina, tem sido sugerida como parte da dinâmica e arquitetura dos genomas dos mamíferos. Nesse sentido, alguns estudos têm demonstrado que essas sequências estão inseridas nos domínios centroméricos, a fim de serem utilizadas para o recrutamento de histonas e formação de novos centrômeros (Schueler *et al.* 2001; Kuznetsova *et al.* 2006; Meyer *et al.* 2016).

Em *Proechimys* destacam-se características específicas desses retroelementos, como a formação de blocos conspícuos, principalmente nos cromossomos sexuais (Figuras 1 e 2). É possível que esse acúmulo de sequências L1 e/ou B1 em locais específicos do genoma desses roedores tenha ocorrido de forma não aleatória, podendo ser uma estratégia evolutiva para que os TEs reduzam seu impacto deletério no genoma (McGurk *et al.*, 2021). Rebollo *et al.* (2011) e Chuong *et al.* (2017) sugeriram que os agrupamentos de TEs em determinadas regiões poderiam alterar substancialmente a regulação gênica ou mesmo influenciar a expressão simultânea de múltiplos genes em contextos específicos, apesar dos efeitos deletérios e da repressão da atividade genética. As interações entre essas sequências e locais específicos do genoma são uma característica marcante e consideram-se que refletem a funcionalidade dos TEs porque podem desempenhar um papel importante na plasticidade genômica e no comportamento adaptativo (Bourque *et al.* 2018; Razali *et al.* 2019 ; Gonçalves *et al.* 2020).

A localização dos retroelementos L1 e B1 na região terminal dos cromossomos de diversas espécies de *Proechimys*, incluindo os cromossomos sexuais (Figuras 1 e 2), pode estar relacionada à sua associação com a heterocromatina subtelomérica e ao seu papel na regulação do alongamento dos telômeros, como visto em outros mamíferos (Gonzalo *et al.* 2006; Slotkin e Martienssen 2007).

TEs foram encontrados anteriormente perto de RONS, como detectado neste estudo, pois este local coincidiu com o sinal de L1, mas não com B1, em um par de cromossomos submetacêntricos (portador de RON) em todas as espécies (Figura 5C). Um padrão semelhante foi observado com o elemento marinho (MLE), mapeado próximo à heterocromatina associada às RONS no caracol aquático *Theodoxus fluviatilis* e no peixe *Gobius niger* (Mandrioli *et al.*

2001; Mandrioli e Manicardi 2001). A presença de TEs em regiões regulatórias do genoma ocorre para que esses retroelementos contribuam para essas regiões, mecanismo conhecido como exaptação (Chuong 2013; Lynch *et al.* 2015).

Simonti *et al.* (2017) demonstraram em células humanas e de camundongos que elementos antigos têm maior probabilidade de se sobrepor a um intensificador de regulação no genoma. Também é possível que as sequências de L1 e não de B1, inseridas próximas à matriz dos genes de RNAr nos cromossomos das espécies de *Proechimys*, possam ter sido cooptadas para potencializar seu efeito regulatório. Esta hipótese pode ser avaliada levando em consideração os resultados aqui apresentados, pois B1 é mais jovem que L1 e surgiu ca. 65 MYA após divergência de roedores (Kramerov e Vassetzky 2005; Yang *et al.*, 2019).

Os retroelementos L1 e B1 parecem estar relacionados à diversificação cariotípica das espécies de *Proechimys* analisadas neste estudo, de acordo com Dobigny *et al.* (2004a, 2004b), que demonstraram que a amplificação de L1 acompanhou a evolução do cariótipo em espécies de *Taterillus*.

A diversificação cariotípica em *Proechimys* pode ter ocorrido através da fixação de rearranjos cromossômicos e, quando associada a regiões pericentroméricas ou subteloméricas, pode representar um hotspot de quebra cromossômica com recombinação entre cromossomos homólogos e não homólogos. As semelhanças na distribuição de L1 e B1 entre os cromossomos das espécies de *Proechimys* parecem derivar de uma tendência a rearranjos cromossômicos, evidenciada pela diferente organização desses retroelementos na fibra cromossômica, que mantêm um padrão cariotípico diversificado em suas relações evolutivas.

A diversidade cariotípica no gênero *Proechimys* tem sido repetidamente citada na literatura, mas os princípios que regem esta variação permanecem obscuros. O presente estudo amplia nossa compreensão do genoma deste gênero ao mapear dois TEs, permitindo avaliar homologias cromossômicas entre os táxons e deduzir caracteres em investigações filogenéticas. A distribuição de L1 e B1 pode representar uma fonte de diversidade cariotípica, que poderá ser revelada em estudos futuros se for demonstrado que estão relacionadas a pontos de quebra de rearranjos.

### **Disponibilidade de dados**

Todas as sequências analisadas neste estudo foram submetidas ao NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) sob o número de acesso <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW027222> e <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW027223>.

### **Agradecimentos**

Autor Silva, CEF foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 310433/2018-5). Eler, ES também foi bolsista do CNPq (processo 301886/2019-9). O apoio financeiro foi fornecido pelo SISBIOTA BRASIL (Programa 47/2010), pelo Programa Pró-Amazônia (nº 047/2012) e pela CAPES (Recursos Naturais e Produtos) para o projeto, “Estudos citogenéticos e citogenômicos da biodiversidade da Amazônia, com a implementação de avanços técnicos”.

### **Contribuições dos autores**

SC Soares: Conceitualização, investigação, metodologia e escrita – dados originais.

ES Eler: Coleta, escrita – revisão e edição.

CEF Silva: Coleta, metodologia, escrita - revisão e edição.

MNF Silva: Escrita - revisão e edição.

NP Araújo: Metodologia, escrita - revisão e edição.

M Svartman: Escrita - revisão e edição.

E Feldberg: Conceitualização, supervisão, aquisição de financiamento, gerenciamento de projetos e redação – dados originais, revisão e edição.

### **Conflito de interesse**

Declaramos que não há conflitos de interesse.

# Capítulo 2

---

Soares, S.C.; Eler, E.S.S.; Silva, C.E.F.;  
Souza, F.B; da Silva, M.N.F.; Araújo, N.P.;  
Svartman, M.; Feldberg, E. 2023.  
Mapeamento de LINE-1 e SINE-B1 e  
diversificação genômica em espécies de  
Echimyidae (Mammalia: Rodentia).

## Resumo

Este estudo propôs analisar a distribuição de sequências de retrotransposons nos cromossomos de sete espécies de Echimyidae, de forma a relacioná-los à evolução cariotípica desta família. Foram utilizadas técnicas citogenéticas moleculares para caracterizar as sequências de LINE-L1 e SINE-B, que foram usadas como sondas para hibridização nos cromossomos metafásicos. O mapeamento de LINE-L1 e SINE-B1 demonstrou homeologia de sinal destas sequências nos cariótipos das espécies de Echimyidae. A comparação deste mapeamento com sítios de heterocromatina constitutiva e DNAr 18S evidenciou coincidência das marcações de L1 e/ou B1 com HC e DNAr 18S. O cladograma gerado, a partir das sequências destes retroelementos, revelou dois grandes grupos, compostos por cinco subgrupos, com diferentes graus de similaridade, corroborado pela técnica *fiber*-FISH. A variabilidade cariotípica ( $2n$  e NF) em Echimyidae pode ter ocorrido devido à disposição não aleatória dos retroelementos L1 e B1, por facilitar a ocorrência de rearranjos cromossômicos, confirmados pelos clusters, correlacionados com padrões de diferenciação dessa família. Nossos dados demonstram que TEs podem estar relacionados com a evolução cariotípica de Echimyidae, fornecendo informações sobre as relações evolutivas desta família, especialmente por serem encontrados em blocos, nas regiões centroméricas e/ou pericentroméricas, podendo estar associados à plasticidade e remodelamento da cromatina.

**Palavras-chave:** Rearranjos cromossômicos, Evolução cariotípica, Sequenciamento, Elementos Transponíveis.

## Introdução

A família Echimyidae Gray, 1825 tem distribuição neotropical e é considerada uma das mais diversificadas dentre os roedores Caviomorpha (Leite e Patton 2002; Emmons 2005). De acordo com os diferentes modos de vida e adaptações, está dividida em táxons semifossoriais (por exemplo *Clyomys*, *Euryzygomatomys*), terrestres (por exemplo *Trinomys*, *Proechimys*, *Thrichomys*), arbóreos (por exemplo *Dactylomys*, *Isothrix*, *Lonchothrix*, *Makalata*, *Mesomys*) e semiaquáticos (*Myocastor*) (Woods 1993; McKenna e Bell 1997; Woods e Kilpatrick 2005). As relações filogenéticas dessa família não estão bem determinadas, devido os laços evolutivos serem poucos conclusivos, uma vez que filogenias moleculares não corroboram a classificação morfológica proposta (Leite e Patton 2002; Emmons 2005; Fabre *et al.* 2012; Fabre *et al.* 2017).

Dados moleculares, combinados com sequências publicamente disponíveis, têm sido descritos no sentido de inferir sobre a filogenia da família Echimyidae e estimar o período de sua diferenciação (Fabre *et al.* 2017; Courcelle *et al.* 2019). Fabre *et al.* (2017) sequenciaram 38 novos mitogenomas completos e inferiram uma estrutura filogenética robusta, estabelecendo um ritmo na diversificação dos roedores. Courcelle *et al.* (2019) isolaram 500 éxons de DNA nuclear para 35 espécies, pertencentes a todos os principais clados de Echimyidae e Capromyidae, tentando resolver relações evolutivas ambíguas.

Sequências genômicas de evolução mais lenta podem não acumular substituições suficientes para serem filogeneticamente informativas e mutações em genes conservados também podem estar sob restrições seletivas. Desse modo, estudos recentes tendem a combinar sequências de evolução mais rápida com aquelas de evolução mais lenta e/ou elementos conservados, afim de elucidar as relações evolutivas em diferentes níveis hierárquicos (Källersjö *et al.* 1999; de Knijff 2000; Townsend *et al.* 2012; Branstetter *et al.* 2017; Delsuc *et al.* 2018).

Elementos transponíveis (TE) têm sido considerados como sequências candidatas na evolução do genoma de mamíferos, devido sua trajetória evolutiva de acumulação conservada e, ao mesmo tempo, com diferenças de conteúdo específicas dos clados (Buckley *et al.* 2017), como sugerido por Soares *et al.* (2022) ao analisarem a disposição de TEs no cariótipo de diferentes espécies de *Proechimys*. Ricci *et al.* (2018) demonstraram que a atividade de um TE pode estar fortemente associada à geração de variabilidade e especiação em mamíferos, por meio da densidade de inserção e taxa relativa de especiação. Jiang *et al.* (2004) evidenciaram que o transposon DNA MULEs foi responsável por rearranjos de aproximadamente 1.000 fragmentos de genes no genoma do arroz. Sharma e Peterson (2023) demonstraram que

elementos transponíveis podem formar rearranjos cromossômicos complexos, por eventos recorrentes de transposição alternativa, e levar à formação de alelos que podem alterar a expressão gênica. Estes estudos indicam que os TEs são importantes condutores da evolução do genoma (Bourque *et al.* 2018). Alguns estudos têm relacionado a atividade de TEs com o surgimento de certas linhagens de vertebrados, de forma a contribuir para origem e radiação de mamíferos como primatas, roedores e micromorcegos (Oliver e Greene 2009; 2011; Okada *et al.* 2010; Britten 2010).

Elementos retrotransponíveis do tipo LINE (~ 6 kb - elementos de nucleotídeos intercalados longos autônomos) e SINE (~ 300 pb - elementos de nucleotídeos intercalados curtos) se reproduzem por meio de um intermediário de RNA, compreendem 30-50% do genoma de mamíferos, com distribuição taxonômica específica, como por exemplo, os elementos SINES Alu e B1 encontrados em primatas e roedores, respectivamente (Boyle *et al.* 1990; Kajikawa e Okada 2002; Böhne *et al.* 2008). LINE-L1 e SINE-B1 têm sido correlacionados à duplicação gênica, inversões, regulação da expressão gênica e evolução em longo prazo, em mamíferos (Jurka *et al.* 2011; Elbarbary *et al.* 2016; Janoušek *et al.* 2016; Ricci *et al.* 2018; Ricci *et al.* 2023).

Do ponto de vista cariotípico, a família Echimyidae apresenta enorme diversidade, com número diploide variando de  $2n=14/16/17/18$  em *Proechimys gr. goeldii* até  $2n=118$  em *Dactylomys boliviensis* e número de braços cromossômicos variando de  $NF=38$  a 134 (Barros 1978; Patton e Emmons 1985; Aniskin 1993; Patton *et al.* 2000; Dunnun *et al.* 2001; Bonvicino *et al.* 2002; Silva *et al.* 2012; Eler *et al.* 2012; 2017; Oliveira da Silva *et al.* 2019). As relações filogenéticas mal resolvidas na família, associada à ocorrência de diferentes fórmulas cariotípicas tornam este grupo um bom modelo para estudos evolutivos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a associação de elementos retrotransponíveis LINE-L1 e SINE-B1 na evolução cariotípica da família Echimyidae, visto que sequências repetitivas, segundo Valente *et al.* (2011), influenciam de forma significativa na evolução dos genomas.

## **Material e Métodos**

Foram estudados 14 indivíduos pertencentes a sete espécies, representantes das três subfamílias viventes de Echimyidae (Tabela 1). Os exemplares foram coletados na região Amazônica, na Mata Atlântica (Guarapari, Espírito Santo) e região de transição entre Mata Atlântica e Cerrado (Diamantina, Minas Gerais), no Brasil, entre 2005 e 2015. As coletas foram autorizadas pelos processos 02005.000642/03-11 (IBAMA/MMA), 02000.002336/2003-93 (IBAMA/MMA), 02005.002672/04 (IBAMA/MMA), 37585-5 (SISBIO/MMA), 37592-4

(SISBIO/MMA), 10985 (SISBIO/MMA) e pelo parecer 002/2013 da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/INPA. As análises citogenéticas foram realizadas em preparações cromossômicas obtidas de células da medula óssea, usando o método “*air-drying*” de Ford e Harmerton (1956), utilizando colchicina na concentração 0,0125%, 1mL para cada 100g de peso animal. As suspensões celulares e amostras de tecido para estudos citogenéticos moleculares estão depositadas no Laboratório de Genética Animal do INPA. Os crânios e peles estão depositados na Coleção de Mamíferos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, na Coleção de Mamíferos da Universidade Federal do Espírito Santo e na Coleção de Mamíferos da Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies da família Echimyidae analisadas. 2n = número diploide, NF = número fundamental.

Espécies	Localização amostral	Coordenadas	Voucher	2n/NF
<i>Dactylomys dactylinus</i>	Flona Saracá-Taquera e Rebio Trombetas, rio Trombetas, AM	14°81' S, 56°45' W	INPA-MAM008869 INPA-MAM008891	94/134 <sup>2</sup>
<i>Makalata didelphoides</i>	Parque Nacional da Amazônia e Flona do Tapajós, rio Tapajós, PA	45°34' S, 56°60' W	INPA-MAM008898 INPA-MAM008901	72/132 <sup>2</sup>
<i>Mesomys hispidus</i>	Região do baixo rio Purus, AM	65°77' S, 64°89' W	INPA-MAM 007317 INPA- MAM 007341	60/116 <sup>2</sup>
<i>Trinomys paratus</i>	Região do rio da Prata e Buenos Aires, Mata Atlântica, Guarapari, Espírito Santo	20°53' S, 40°59' W	UFES-MAM 2798 UFES-MAM 2804	58/112 <sup>2</sup>
<i>Proechimys guyannensis</i>	Ilha da Serrinha, UHE de Balbina, rio Uatumã, AM	01°52' S, 59°25' W	INPA-CEF12 INPA-CEF14	46/50 <sup>1</sup>
<i>Thrichomys apereoides</i>	Parque Nacional Sempre Vivas, Diamantina, MG	17°91' S, 43°78' W	MDIA093 MDIA104	28/50 <sup>2</sup>
<i>Isothrix paguros</i>	Parque Estadual do rio Negro Setor Sul, rio Cuieiras, AM	27°07' S 60°37' W	INPA-MAM008835 INPA-MAM008843	22/38 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Silva *et al.* 2012, <sup>2</sup>Eler *et al.* 2017; 2020.

Os retroelementos LINE-L1 e SINE-B1 foram isolados por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os seguintes primers: L1F(5'AAGAATTCGCGCAGGATACAAGATCAACTCA3') e L1R(5'AAGGATCCCAATTCGATTCCATTGGT3') (Gran *et al.* 2005); B1F(5'TTGCCGGGCGTGGTGGCG3') e 1R(5'TTGGTTTTTCGAGACAGGGTTTCT3') (Rinehart *et al.* 2005). As reações seguiram um volume total de 25 µL (~100 ng de DNA genômico; Tampão 1X; 0,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Promega); 0,2 mM de cada dNTP – dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*); 2,0 mM de cloreto de magnésio e água mili-Q para completar o volume), utilizando o ciclo de desnaturação de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min 94 °C, 1 min a 40 °C/55 °C, 1 min e 30 seg a 72 °C; com extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados com o kit Wizard SV Gel e sistema de limpeza PCR (Promega), ligados ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega) e clonados em células competentes de *E. coli* XL1 Blue\_Top10 (Invitrogen). Os plasmídeos recombinantes foram amplificados, utilizando os primers M13 forward 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' e M13 reverse 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (Invitrogen) e sequenciados na Plataforma ABI3130 (Myleus Biotechnology). As sequências foram submetidas ao banco de dados Repbase para consenso (<https://www.girinst.org/censor/>) e disponibilizadas no GenBank com os números OR178947, OR194069, OR194070, OR178952, OR194071, OR194072 para LINE-L1 e OR500275, OR178954, OR500276, OR178956, OR178957, OR500277 para SINE-B1. Estas sequências foram comparadas com as de *Proechimys guyannensis* disponibilizadas no Genbank sob os números MW027222 e

MW027223 (Soares *et al.* 2022). Os DNAs plasmidiais sequenciados foram marcados por nick-translation, LINE-L1 com dUTP-ATTO-550 (Jena Bioscience) e SINE-B1 com dUTP-ATTO-488 (Jena Bioscience), seguindo as instruções do fabricante, e usados como sondas para hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (Pinkel *et al.* 1986). As lâminas, contendo os cromossomos, foram inicialmente tratadas com pepsina. A desnaturação cromossômica foi realizada com formamida a 70%. A hibridização foi realizada a 42 °C *overnight*, com 77% de estringência. As metáfases foram contracoradas com DAPI (0,8 ng/μL) em reagente antifading (SlowFade, Invitrogen).

Para experimentos com *fiber*-FISH foi utilizado o protocolo de Barros *et al.* (2011), com algumas modificações. O material em suspensão celular foi tratado com solução salina, seguido de sucessivos banhos em série alcoólica. As fibras cromossômicas foram alongadas e, em seguida, aplicou-se o protocolo para FISH.

Os resultados obtidos para os retroelementos LINE-L1 e SINE-B1 foram comparados com os padrões de banda CBG e FISH do gene ribossomal 18S, descritos por Eler (2017) e Eler *et al.* (2020), uma vez que os mesmos espécimes foram usados nestes estudos.

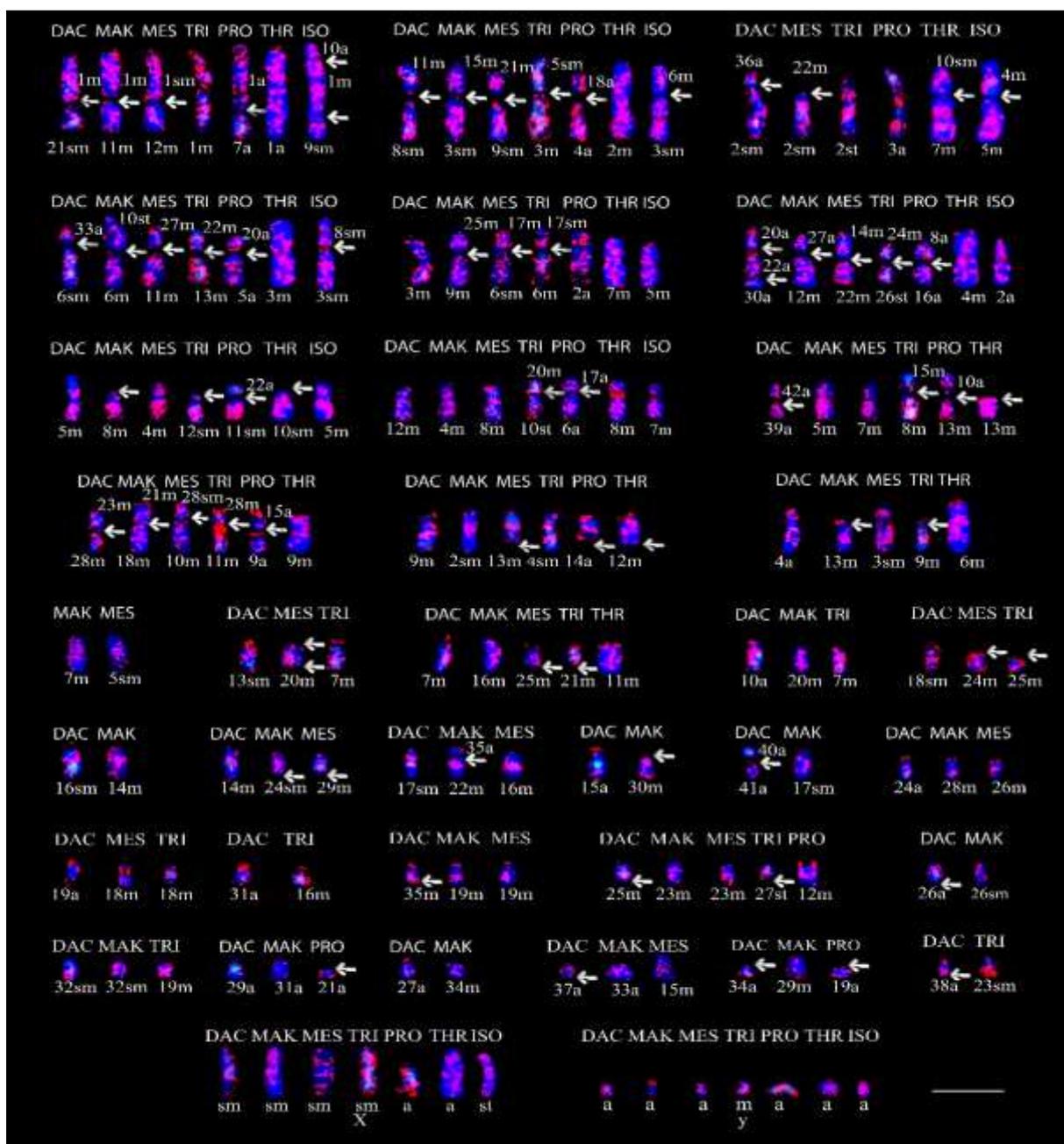
As sequências de LINE-L1 e SINE-B1 validadas no banco de dados Repbase foram alinhadas, utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999). O cladograma foi implementado usando o software Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 11 (MEGA11) e a análise evolutiva foi inferida pelo método de Máxima Parcimônia (MP) (Tamura *et al.* 2021). O índice de consistência foi de 0,786458 (0,683805) para todos os sítios de parcimônia informativos. A árvore MP foi obtida usando o algoritmo heurístico Min-mini, com um fator de busca de 1. Esta análise envolveu 7 sequências de nucleotídeos com um total de 758 posições no conjunto de dados final (Apêndice 5).

## Resultados

Sete espécies representantes de três subfamílias de Echimyidae tiveram o seu padrão de distribuição de retroelementos LINE-L1 e SINE-B1 determinados e comparados (Figuras 1 e 2): *Dactylomys dactylinus* (subfamília Dactylomyinae); *Makalata didelphoides*, *Isothrix pagurus* (subfamília Echimyinae); *Mesomys hispidus*, *Trinomys paratus*, *Proechimys guyannensis* e *Thrichomys apereoides* (subfamília Eumysopinae).

O padrão de distribuição de LINE-L1 nos cromossomos dos espécimes da família Echimyidae mostrou-se disperso (Figura 1). No entanto, ao compararmos o genoma entre as espécies, observou-se que este retroelemento manteve-se nos cariótipos em cromossomos não

homeólogos. Por exemplo, o padrão de L1 nos pares cromossômicos 1m+21sm de *D. dactylinus* é semelhante às regiões cromossômicas de 1m+11m de *M. didelphoides*, 1sm+12m de *M. hispidus*, 1m de *T. paratus*, 1a+7a de *P. guyannensis*, 1a de *T. apereoides* e 10a+1m+9sm de *I. pagurus* (Figura 1 e tabela 2).



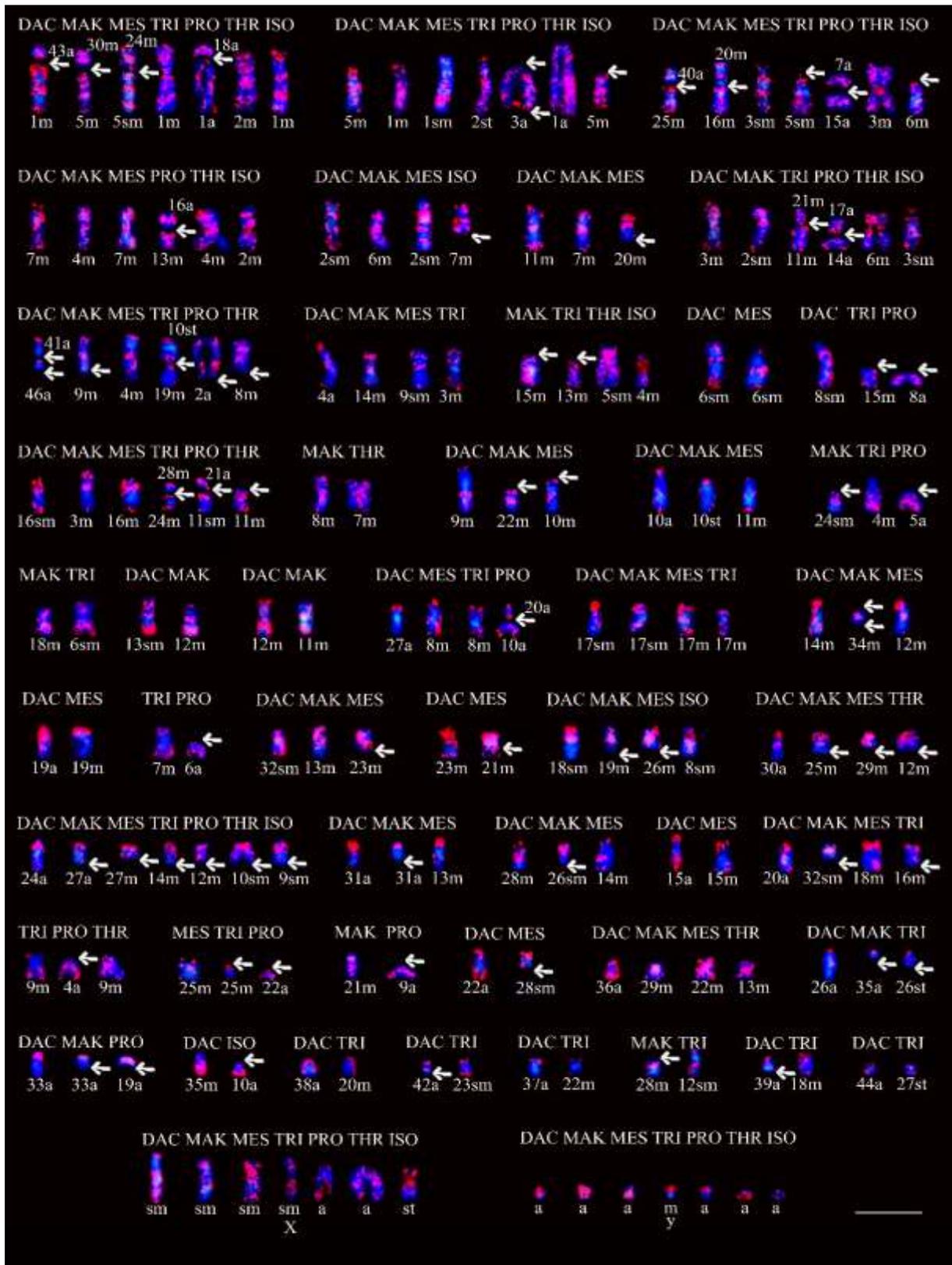
**Figura 1. Distribuição do retroelemento LINE-1 em espécies da família Echimyidae.** DAC = *D. dactylinus* (2n=94), MAK = *M. didelphoides* (2n=72), MES = *M. hispidus* (2n=60), TRI = *T. paratus* (2n=58), PRO = *P. guyannensis* (2n=46), THR = *T. apereoides* (2n=28), ISO = *I. pagurus* (2n=22), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subteloentrico, a = acrocêntrico. As setas indicam as regiões onde, provavelmente, ocorreram rearranjos. Barra = 10,0µm. (Apêndice 6).

Entretanto, foi possível observar homeologia de sinal das sequências de LINE-L1 entre os grupos cromossômicos, envolvendo as sete espécies analisadas. O padrão de LINE-L1 compreendeu regiões centroméricas e/ou pericentroméricas e intersticiais de quase todos os cromossomos. Houve marcação de LINE-L1 nas regiões pericentromérica e/ou centromérica do par sexual de todas as espécies, exceto o cromossomo X de *T. apereoides*. Blocos intersticiais foram visualizados no braço longo do cromossomo X de *D. dactylinus*, no braço curto e longo do cromossomo X de *M. didelphoides*, *T. paratus*, *P. guyannensis* e *T. apereoides*, e apenas no braço curto do cromossomo X de *I. pagurus*. Ainda, marcação conspícua foi visualizada no Y de *D. dactylinus*, *M. didelphoides*, *T. paratus*, *P. guyannensis* e *I. pagurus* (Figura 1).

**Tabela 2.** Prováveis rearranjos cromossômicos em Echimyidae a partir da distribuição dos retroelementos LINE-1 (Figura 1). DAC = *D. dactylinus* (2n=94), MAK = *M. didelphoides* (2n=72), MES = *M. hispidus* (2n=60), TRI = *T. paratus* (2n=58), PRO = *P. guyannensis* (2n=46), THR = *T. apereoides* (2n=28), ISO = *I. pagurus* (2n=22), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico.

DAC (2n=94)	MAK (2n=72)	MES (2n=60)	TRI (2n=58)	PRO (2n=46)	THR (2n=28)	ISO (2n=22)
1m+21sm	1m+11m	1sm+12m	1m	1a+7a	1a	10a+1m+9sm
11m+8sm	15m+3sm	21m+9sm	5sm+3m	18a+4a	2m	6m+3sm
36a+2sm		22m+2sm	2st	3a	10sm+7m	4m+5m
33a+6sm	10st+6m	27m+11m	22m+13m	20a+5a	3m	8sm+3sm
3m	25m+9m	17m+6sm	17sm+6m	2a	7m	5m
20a+22a+3a	27a+12m	14m+22m	24m+26st	8a+16a	4m	2a
5m	8m	4m	12sm	22a+11sm	10sm	5m
12m	4m	8m	20m+10st	17a+6a	8m	7m
42a+39a	5m	7m	15m+8m	10a+13m	13m	
23m+28m	21m+18m	28sm+10m	28m+11m	15a+9a	9m	
9m	2sm	13m	4sm	14a	12m	
4a	13m	3sm	9m		6m	
	7m	5sm				
13sm		20m	7m			
7m	16m	25m	21m		11m	
10a	20m		7m			
18sm		24m	25m			
16sm	14m					
14m	24sm	29m				
17sm	35a+22m	16m				
15a	30m					
40a	17sm					
24a	28m	26m				
19a		18m	18m			
32sm			16m			
35m	19m	19m				
25m	23m	23m	27st	12m		
26a	26sm					
31a	32sm		19m			
29a	31a			21a		
27a	34m					
37a	33a	15m				
34a	29m			19a		
38a			23sm			

O padrão de SINE-B1 no cariótipo dos espécimes da família Echimyidae mostrou preponderância de compartimentalização, presença de blocos conspícuos (Figura 2) e, assim como em LINE-L1, manteve-se nos cariótipos em cromossomos não homeólogos (Figura 2). Por exemplo, o padrão de SINE-B1 nos pares cromossômicos 43a+1m de *D. dactylinus* é semelhante às regiões cromossômicas de 30m+5m de *M. didelphoides*, 24m+5sm de *M. hispidus*, 1m de *T. paratus*, 18a+1a de *P. guyannensis*, 2m de *T. apereoides* e 1m de *I. pagurus* (Figura 2 e tabela 3).



**Figura 2.** Distribuição do retroelemento SINE-B1 em espécies da família Echimyidae. DAC = *D. dactylinus* (2n=94), MAK = *M. didelphoides* (2n=72), MES = *M. hispidus* (2n=60), TRI = *T. paratus* (2n=58), PRO = *P. guyannensis* (2n=46), THR = *T. apereoides* (2n=28), ISO = *I. pagurus* (2n=22), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtlocêntrico, a = acrocêntrico. As setas indicam as regiões onde, provavelmente, ocorreram rearranjos. Barra = 10,0μm. (Apêndice 7).

**Tabela 3:** Prováveis rearranjos cromossômicos em Echimyidae a partir da distribuição dos retroelementos SINE-B1 (Figura 2). DAC = *D. dactylinus* (2n=94), MAK = *M. didelphoides* (2n=72), MES = *M. hispidus* (2n=60), TRI = *T. paratus* (2n=58), PRO = *P. guyannensis* (2n=46), THR = *T. apereoides* (2n=28), ISO = *I. pagurus* (2n=22), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico.

DAC (2n=94)	MAK (2n=72)	MES (2n=60)	TRI (2n=58)	PRO (2n=46)	THR (2n=28)	ISO (2n=22)
43a+1m	30m+5m	24m+5sm	1m	18a+1a	2m	1m
5sm	1m	1sm	2st	3a	1a	5m
40a+25sm	20m+16m	3sm	5sm	7a+15a	3m	6m
7m	4m	7m		16a+13m	4m	2m
2sm	6m	2sm				7m
11m	7m	20m				
3m	2sm		21m+11m	17a+14a	6m	3sm
41m+46a	9m	4m	10st+19m	2a	8m	
4a	14m	9sm	3m			
	15m		13m		5sm	4m
6sm		6sm				
8sm			15m	8a		
16sm	3m	16m	28m+24sm	21a+11sm	11m	
	8m				7m	
9m	22m	10m				
10a	10st	11m				
	24sm		4m	5a		
	18m		6sm			
13sm	12m					
12m	11m					
27a		8m	8m	20a+10a		
17sm	17sm	17m	17m			
14m	34m	12m				
19a		19m				
			7m	6a		
31a	13m	23m				
23m		21m				
18sm	19m	26m				8sm
30a	25m	29m			12m	
24a	27a	27m	14m	12m	10sm	9sm
32sm	31a	13m				
28m	26sm	14m				
20a	32sm	18m	16m			
			9m	4a	9m	
		25m	25m	22a		
	21m			9a		
22a		28sm				
36a	29m	22m		13m		
26a	35a		26st			
33a	33a			19a		
35m						10a
38a			20m			
42a			23sm			
45a			22m			
	28m		12sm			
39a			18m			
44a			27st			

Para SINE-B1 também foi possível observar homeologia de sinal entre os grupos cromossômicos, envolvendo as espécies representantes das três subfamílias analisadas. A

marcação deste retroelemento compreendeu regiões centroméricas e/ou pericentroméricas de quase todos os cromossomos. Blocos conspícuos foram visualizados nos braços longos de *D. dactylinus*, *T. paratus* e *P. guyannensis* e nos braços curto e longo de *M. didelphoides*, *M. hispidus* e *I. pagurus*. Nos cromossomos sexuais de todas as espécies, o sinal de SINE-B1 esteve presente em blocos conspícuos nas regiões centroméricas e/ou pericentroméricas, e região intersticial e/ou terminal, exceto no cromossomo X de *T. apereoides* e do cromossomo Y de *I. pagurus*, nos quais o sinal foi mais fraco (Figura 2).

A comparação das sequências de LINE-L1 e SINE-B1 com as demais do banco de dados Repbase (Bao *et al.* 2015) nos forneceu consenso com variantes estruturais de retrotransposons não LTRs (Tabelas 4 e 5).

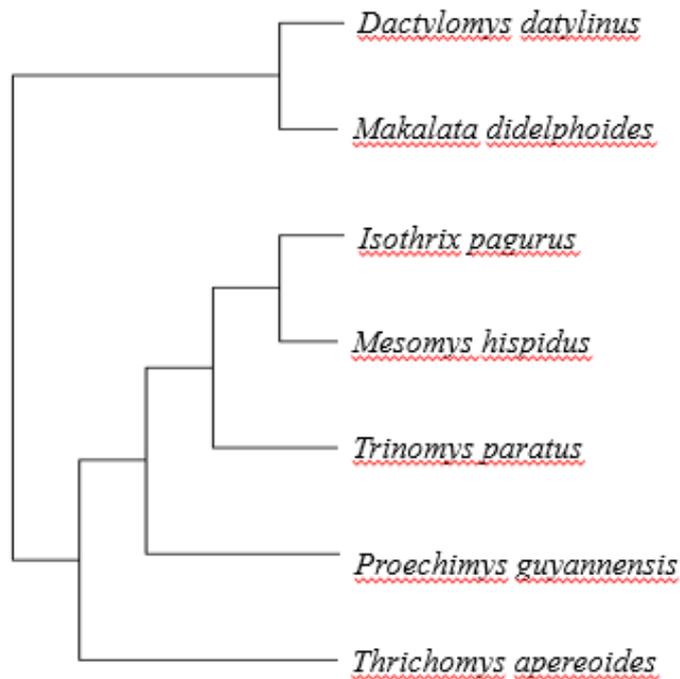
**Tabela 4.** Consenso de LINE-L1 das espécies da família Echimyidae com variantes estruturais de retrotransposons não LTRs. <sup>1,3,7</sup> Wichman *et al.* 2005; <sup>2</sup> Bao e Jurka 2009; <sup>4,6</sup> Kojima 2019; <sup>5</sup> Soares *et al.* 2022.

Espécie	Retrotransposon Variante estrutural	pb	Identidade %
<i>D. dactylinus</i>	Cpor3b LINE-1 <sup>1</sup>	402	78,86% <i>Cavia porcellus</i>
<i>M. didelphoides</i>	L1-4Cpo <sup>2</sup>	518	88% <i>Cavia porcellus</i>
<i>M. hispidus</i>	Cpor3b LINE-1 <sup>3</sup>	400	76% <i>Cavia porcellus</i>
<i>T. paratus</i>	L1-3 Clan <sup>4</sup>	523	94% <i>Chinchilla lanígera</i>
<i>P. guyannensis</i>	LINE-L1 <sup>5</sup>	528	96,40% <i>Proechimys guyannensis</i>
<i>T. apereoides</i>	L1-3 Clan <sup>6</sup>	518	94% <i>Chinchilla lanígera</i>
<i>I. paguros</i>	Cpor3b LINE-1 <sup>7</sup>	521	76,69% <i>Cavia porcellus</i>

**Tabela 5.** Consenso de SINE-B1 das espécies da família Echimyidae com variantes estruturais de retrotransposons não LTRs. <sup>1,2,7</sup> Veniaminova *et al.* 2007; <sup>6</sup> Jurka 2010; <sup>3,4,5</sup> Soares *et al.* 2022.

Espécie	Retrotransposon Variante estrutural	pb	Identidade %
<i>D. dactylinus</i>	Mco20-B1 <sup>1</sup>	150	90,37% <i>Myocastor coypus</i>
<i>M. didelphoides</i>	Mco12 ID-B1 <sup>2</sup>	149	90,91% <i>Myocastor coypus</i>
<i>M. hispidus</i>	SINE-B1 <sup>3</sup>	150	90,48% <i>Proechimys guyannensis</i>
<i>T. paratus</i>	SINE-B1 <sup>4</sup>	148	94,56% <i>Proechimys guyannensis</i>
<i>P. guyannensis</i>	SINE-B1 <sup>5</sup>	148	96,40% <i>Proechimys guyannensis</i>
<i>T. apereoides</i>	ID-B1-3_Cpo <sup>6</sup>	149	84% <i>Cavia porcellus</i>
<i>I. pagurus</i>	Mco12ID-B1 <sup>7</sup>	150	92,31% <i>Myocastor coypus</i>

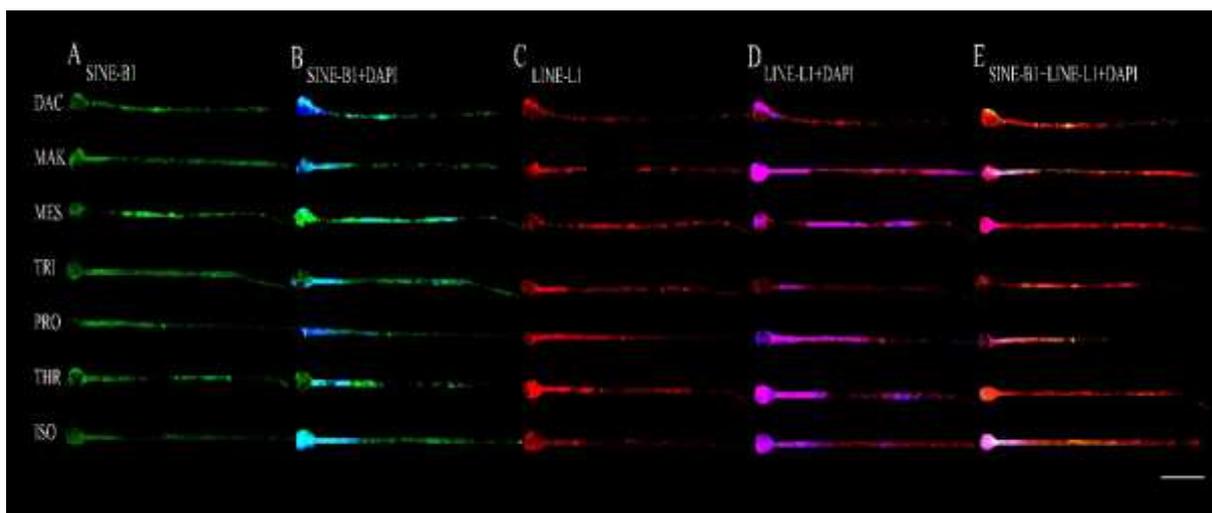
A topologia obtida pelo algoritmo heurístico Min-mini (Máxima Parcimônia) para as sequências de LINE-L1 e SINE-B1 foi congruente com algumas associações propostas pela literatura, e originou o agrupamento das espécies de Echimyidae de acordo com os níveis de similaridade (Figura 3).



**Figura 3. Cladograma das espécies, obtido após a análise de Máxima Parcimônia.** *D. dactylinus* (2n=94), *M. didelphoides* (2n=72), *M. hispidus* (2n=60), *T. paratus* (2n=58), *P. guyannensis* (2n=46), *T. apereoides* (2n=28), *I. pagurus* (2n=22), usando o método de inferência Min-Min Heuristic gerada, considerando os retroelementos L1 e B1 como caracteres únicos (Apêndice 5).

O cladograma gerado a partir das sequências dos retroelementos LINE-L1 e SINE-B1 das espécies de Echimyidae revelou dois grandes grupos compostos por cinco subgrupos com diferentes graus de similaridade: (1) *D. dactylinus* e *M. didelphoides*, (2) *M. hispidus* e *I. pagurus*, (3) *T. paratus*, (4) *P. guyannensis*, (5) *T. apereoides*.

A figura 4 demonstra a distribuição do sinal dos retroelementos LINE-L1 and SINE-B1 por *fiber-FISH* nas sete espécies de Echimyidae.

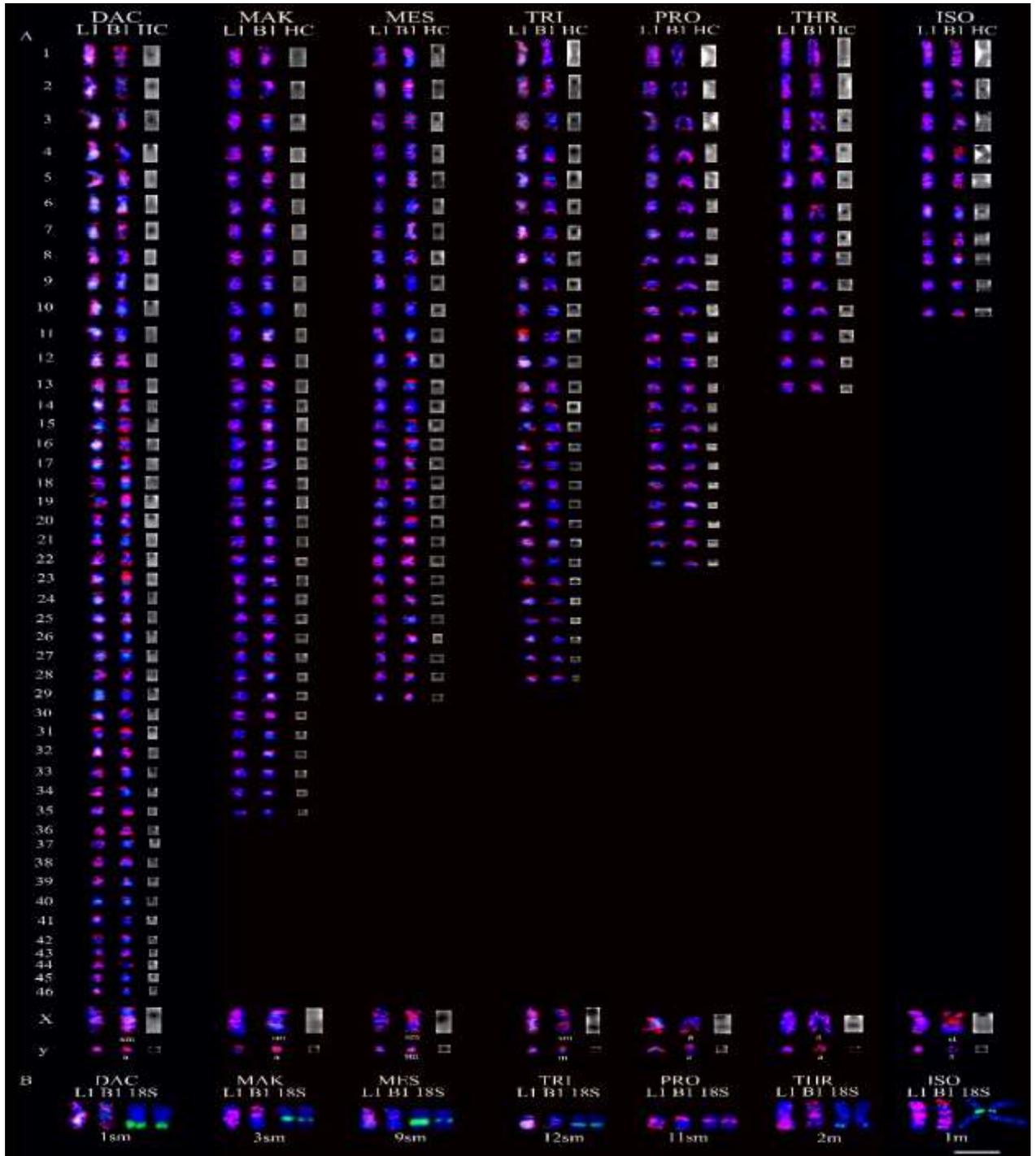


**Figure 4.** *Fiber-FISH* mostrando cluster de LINE-L1 (vermelho) e SINE-B1 (verde) adjacentes e intercalados em espécies de Echimyidae. DAC = *D. dactylinus* (2n=94), MAK = *M. didelphoides* (2n=72), MES = *M. hispidus* (2n=60), TRI = *T. paratus* (2n=58), PRO = *P. guyannensis* (2n=46), THR = *T. apereoides* (2n=28), ISO = *I. pagurus* (2n=22). (A) SINE-B1, (B) SINE-B1+DAPI, (C) LINE-L1, (D) LINE-L1 + DAPI, (E) SINE-B1+LINE-L1+ DAPI. Barra = 10  $\mu$ m.

A *fiber-FISH* revelou uma distribuição de LINE-L1 e SINE-B1 diferenciada no genoma das espécies de Echimyidae. Em *D. dactylinus* o padrão destes retroelementos ocorreu de forma equilibrada, sobrepostos em algumas regiões do início e meio, sendo L1 mais evidente no meio e blocos de B1 principalmente na ponta final da fibra. L1 destacou-se ao longo de toda fibra, com blocos no início e ponta final em *M. didelphoides*, sendo ambos retroelementos intercalados no meio da fibra. Na fibra de *M. hispidus* L1 e B1 distribuíram-se de forma adjacente, com evidência para L1 no início da fibra. O padrão de L1 e B1 em *T. paratus* ocorreu de forma adjacente, com destaque para L1 no meio e B1 nas pontas inicial e final da fibra. Em *P. guyannensis* houve destaque de L1 no início, seguindo um padrão adjacente ao longo da fibra, e blocos de B1 preferencialmente no meio e ponta final. A fibra de *T. apereoides* revelou uma distribuição adjacente para L1 e B1, com blocos de L1 na ponta inicial. Em *I. pagurus* o padrão destes retroelementos foi intercalado ao longo da fibra, sobrepostos em algumas regiões no meio, com evidência para L1 no início e ponta final (Figura 4).

O sinal dos retroelementos LINE-L1 e SINE-B1 foram coincidentes com o DNAr 18S em todos os espécimes analisados. Ambos os retroelementos no par cromossômico 1sm em *D. dactylinus*, no 3sm de *M. didelphoides*, no 9sm de *M. hispidus*, no 12sm de *T. paratus*, no 2m de *T. apereoides*, no 1m de *I. pagurus*, e apenas L1 em *P. guyannensis*. Uma particularidade observada em *M. didelphoides*, *M. hispidus* e *I. pagurus* foi a presença de marcação simples do DNAr 18S, coincidente com sinal de B1 em par cromossômico, e marcação duplicada deste gene em seu homólogo, coincidente com bloco conspícuo de L1 (Figura 5B e tabela 6).

A comparação com sítios de heterocromatina constitutiva (HC) evidenciou coincidência com as marcações dos retroelementos LINE-L1 e/ou SINE-B1 (Figura 5A e tabela 6).



**Figure 5. Hibridização correspondente entre LINE-1, SINE-B1, DNAr 18S e Heterocromatina constitutiva (CH) em cromossomos das sete espécies de Echimyidae.** DAC = *D. dactylinus* ( $2n=94$ ), MAK = *M. didelphoides* ( $2n=72$ ), MES = *M. hispidus* ( $2n=60$ ), TRI = *T. paratus* ( $2n=58$ ), PRO = *P. guyannensis* ( $2n=46$ ), THR = *T. apereoides* ( $2n=28$ ), ISO = *I. pagurus* ( $2n=22$ ). **(A)** LINE-1 à esquerda, SINE-B1 no meio e CH à direita. **(B)** LINE-1 à esquerda, SINE-B1 no meio, e DNAr\_18S à direita. m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, a = acrocêntrico. Barra = 10,0µm.

A distribuição dos retroelementos L1 e/ou B1 foi coincidente com a distribuição da heterocromatina constitutiva (HC) na região pericentromérica e/ou centromérica de todos os pares cromossômicos das espécies analisadas, com exceção de *P. guyannensis* e *I. pagurus*. *M. hispidus* apresentou marcações mais fortes nos blocos de B1 em todos os cromossomos. Em *M. didelphoides* houve consciência da distribuição da heterocromatina constitutiva com os retroelementos L1 e B1 nos pares 2sm, 3sm, 9m, 11m, 14m, 16m, 17sm, 18m, 20m, 22m, 24sm, 25m, 26sm, 27a, 28m, 29m, 30m, 31a, 32sm, 33a, 35a, com presença de mais blocos de B1 que de L1. Em *T. paratus* houve coincidência da distribuição da HC com ambos retroelementos nos pares 2st, 4sm, 6m, 10st, 12sm, 13m, 14m, 15m, 16m, 17sm, 18m, 20m, 21m, 26st e 27st, e apenas com L1 nos pares 3m, 5sm, 7m, 8m, 9m, 11m, 19m, 22m, 23sm, 24m, 25m e 28m, com padrão mais forte de L1. Em *T. apereoides* houve coincidência com ambos retroelementos nos pares 3m, 4m, 5sm, 6m, 7m, 9m, 11m e 12m, com marcação mais forte de B1 (Figura 5 e tabela 6).

A colocação da HC e dos retroelementos L1 e B1 foi diferente em *P. guyannensis* e *I. pagurus*. Em *P. guyannensis* HC está presente com ambos retroelementos na região pericentromérica e/ou centromérica nos pares, 3a, 4a, 6a, 13m, e 20a, e somente com B1 nos cromossomos 15a, 21a e 22a. Nos cromossomos 2a, 5a e 18a desta espécie a HC está presente na região distal do braço curto, sendo coincidente com L1 e/ou B1, e presente em todo braço curto do 11sm, correspondente a blocos de L1 e B1. Em *I. pagurus* a distribuição da HC foi coincidente com L1 e/ou B1 no sítio centromérico nos pares 2m, terminal em 3m e 4m, biterminal e centromérica em 6m, biterminal em 7m e 9sm, terminal com blocos no braço longo de 8sm e 10a (Figura 5 e tabela 6).

L1, B1 e HC foram coincidentes em todos os cromossomos sexuais, com exceção do X de *M. didelphoides*, dos representantes de Echimyidae. Em relação ao cromossomo X ocorreu somente na região pericentromérica e/ou centromérica em *D. dactylinus*, *M. hispidus* e *P. guyannensis*, envolvendo blocos de L1 e B1 no sítio centromérico, braços curto e longo em *T. paratus*, com ambos retroelementos no sítio centromérico e braço longo em *T. apereoides*, e em *I. pagurus* neste sítio e em todo braço curto. Blocos de L1 e/ou B1 foram coincidentes com marcação conspícua de HC na região centromérica do Y de *M. hispidus*, e com HC total no Y de todos outros espécimes analisados. Sendo um padrão similar de ambos retroelementos em *T. paratus* e *T. apereoides*, a presença de L1 mais forte em *D. dactylinus*, *P. guyannensis* e *I. pagurus*, e a presença de B1 mais forte em *M. didelphoides* e *M. hispidus* (Figura 5 e tabela 6).

**Tabela 6.** Hibridização correspondente entre LINE-1, SINE-B1, DNAr 18S e Heterocromatina constitutiva (HC) em cromossomos de Echimyidae. DAC = *D. dactylinus* (2n=94), MAK = *M. didelphoides* (2n=72), MES = *M. hispidus* (2n=60), TRI = *T. paratus* (2n=58), PRO = *P. guyannensis* (2n=46), THR = *T. apereoides* (2n=28), ISO = *I. pagurus* (2n=22) como mostrado na fig 4. m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subteloicêntrico, a = acrocêntrico.

Espécie	Sinal de L1 correspondente com heterocromatina constitutiva	Sinal de B1 correspondente com heterocromatina constitutiva	DNAr 18S coincidente com sinal de L1 e/ou B1
DAC (2n=94)	1m/2sm/3m/4a/5m/6sm/7m/8sm/9m/10a/11m/12m/13sm/14m/15a/16sm/17sm/18sm/19a/20a/21sm/22a/23m/24a/25m/26a/27a/28m/29a/30a/31a/32sm/33a/34a/35m/36a/37a/38a/39a/40a/Xsm/Ya	1m/2sm/3m/4a/5m/6sm/7m/8sm/9m/10a/11m/12m/13sm/14m/15a/16sm/17sm/18sm/19a/20a/21sm/22a/23m/24a/25m/26a/27a/28m/29a/30a/31a/32sm/33a/34a/35m/36a/37a/38a/39a/40a/Xsm/Ya	1sm
MAK (2n=72)	2sm/3sm/9m/11m/14m/16/17sm/18m/20m/22m/24sm/25m/26sm/27a/28m/29m/30m/31a/32sm/33a/35a/Ya	2sm/3sm/9m/11m/14m/16/17sm/18m/20m/22m/24sm/25m/26sm/27a/28m/29m/30m/31a/32sm/33a/35a/Ya	3sm
MES (2n=60)	1sm/2sm/3sm/4m/5sm/6sm/7m/8m/9sm/10m/11m/12m/13m/14m/15m/16m/17m/18m/19m/20m/21m/22m/23m/24m/25m/26m/27m/28sm/29m/Xsm/Ysm	1sm/2sm/3sm/4m/5sm/6sm/7m/8m/9sm/10m/11m/12m/13m/14m/15m/16m/17m/18m/19m/20m/21m/22m/23m/24m/25m/26m/27m/28sm/29m/Ysm	9sm
TRI (2n=58)	2st/3m/4sm/5sm/6m/7m/8m/9m/10st/11m/12sm/13m/14m/15m/16m/17sm/18m/19m/20m/21m/22m/23sm/24m/25m/26st/27st/28m/Xsm/Ym	2st/4sm/6m/10st/12sm/13m/14m/15m/16m/17sm/18m/20m/21m/26st/27st/28m/Xsm/Ym	12sm
PRO (2n=46)	2a/3a/4a/5a/6a/11sm/13m/16a/20a/Xa/Ya	2a/3a/4a/5a/6a/11sm/13m/15a/16a/18a/20a/21a/22a/Xa/Ya	11sm
THR (2n=28)	3m/4m/5sm/6m/7m/9m/11m/12m/Xa/Ya	3m/4m/5sm/6m/7m/9m/11m/12m/Xa/Ya	2m
ISO (2n=22)	2m/3sm/4m/6m/7m/8sm/9sm/10a/Xst/Ya	2m/3sm/4m/6m/7m/8sm/9sm/10a/Xst/Ya	1m

## Discussão

O mapeamento de LINE-L1 e SINE-B1 no genoma de espécies representantes de sete gêneros da família Echimyidae demonstrou que estes retroelementos mantiveram-se nos cariótipos em cromossomos não homeólogos. Entretanto, houve homeologia de sinal das

sequências de L1 e B1 em regiões cromossômicas distintas entre as espécies, quando se compara representantes das subfamílias Dactylomyinae (*D. dactylinus*), Echimyinae (*M. didelphoides* e *I. pagurus*) e Eumysopinae (*M. hispidus*, *T. paratus*, *P. guyannensis*, *T. apereoides*) (Figuras 1 e 2).

A diversidade cariotípica ( $2n$  e NF) encontrada na família Echimyidae pode ter ocorrido em parte pela disposição não aleatória dos retroelementos L1 e B1, que teriam facilitado a ocorrência de rearranjos cromossômicos durante a evolução cariotípica dessa família (setas nas Figuras 1 e 2). Segundo Dobigny *et al.* (2004) o retrotranspon LINE-L1 foi responsável por alterações cariotípicas no roedor *Taterillus*, estando relacionado à estrutura filogenética deste gênero de forma não aleatória. Usando genômica comparativa, Buckley *et al.* (2017) identificaram um acúmulo de retrotranspos, em posições conservadas no genoma de mamíferos, o que foi demonstrado neste estudo em espécies representantes de Echimyidae.

O cladograma proposto pelas sequências de L1 e B1, composto por cinco subgrupos com diferentes graus de similaridade (Figura 3 e tabela S3), reflete algumas das relações taxonômicas propostas por Fabre *et al.* (2017) para Echimyidae: *D. dactylinus* e *M. didelphoides* (ratos espinhosos arbóreos) foram agrupados, assim como *M. hispidus* e *I. pagurus* (ratos espinhosos arbóreos), *T. paratus*, *T. apereoides* e *P. guyannensis* (ratos espinhosos terrestres). Os clusters formados a partir das sequências de LINE-L1 e SINE-B1 sugere que estes retroelementos podem estar correlacionados com padrões de diferenciação, nessa família. Esses dados demonstram que a atividade dos retrotranspos L1 e B1 não varia aleatoriamente dentro da filogenia de Echimyidae, e que, podem estar relacionados com a sua capacidade de diferenciação e especiação, como sugerido por alguns estudos ao fornecer informações sobre as relações evolutivas entre táxons e TEs (Boyle *et al.* 1990; Ricci *et al.* 2018; D'Elía *et al.* 2019; Soares *et al.* 2022).

As incongruências na composição dos agrupamentos taxonômicos, a partir das análises dos retroelementos L1 e B1, comparadas aos dados de Fabre *et al.* (2017), podem ser devidas à reduzida representação taxonômica do grupo, neste estudo.

Experimentos com *fiber*-FISH, realizados por Kuznetsova *et al.* (2006), evidenciaram sequências intercaladas de TEs em matrizes centroméricas de camundongos. Em Echimyidae, a análise das fibras cromossômicas revelou que os retroelementos LINE-L1 e SINE-B1 estão organizados de forma diferente no genoma de cada espécie, sugerindo grupos distintos de acordo com a semelhança de sinal entre as fibras, sendo intercalados e/ou sobrepostos para *D.*

*dactylinus*, *M. didelphoides* e *I. pagurus*, e adjacente para *M. hispidus*, *T. paratus*, *P. guyannensis* e *T. apereoides*. A presença de blocos de L1 ao longo da fibra separa as espécies em três subgrupos distintos: com disposição no meio para *D. dactylinus* e *T. paratus*, no início para *M. hispidus*, *P. guyannensis* e *T. apereoides*, no início e extremidade final para *M. didelphoides* e *I. pagurus*. Já, a disposição de blocos de B1 ao longo da fibra revelou três subgrupos com algumas diferenças daqueles propostos para L1, com disposição na extremidade final para *D. dactylinus*, *T. paratus*, *P. guyannensis*, no meio para *M. didelphoides* e colocalizados para *M. hispidus*, *T. apereoides* e *I. pagurus*. Esses dados confirmam que os retroelementos L1 e B1 permanecem no genoma de Echimyidae em cromossomos não homeólogos e corroboram com o mapeamento de TEs em fibras cromossômicas de vertebrados (Wang *et al.* 2013; Souza-Sousa *et al.* 2017; 2021; Soares *et al.* 2022).

A presença de blocos de LINE-L1 e SINE-B1 nas regiões centroméricas e/ou pericentroméricas de quase todos os cromossomos foi coincidente com heterocromatina constitutiva (HC) nos espécimes analisados, com exceção do X de *M. didelphoides* (Figura 5 e tabela 6). A colocalização de L1 e/ou B1 com HC nas regiões centroméricas e/ou pericentroméricas evidencia a relação destes retroelementos com a organização e estrutura cromossômica deste grupo, de forma a influenciar significativamente na evolução do genoma dos equimídeos, especialmente pelo envolvimento destes retroelementos com rearranjos cromossômicos. Segundo Wong e Choo (2004), elementos transponíveis contribuem para a evolução da arquitetura e função do centrômero em vários organismos, sendo encontrados em quantidades desproporcionais neste sítio, em uma variedade de espécies. Estudos têm demonstrado que a inserção de TEs em centrômeros de humanos facilita a recombinação nesta região e está associada à evolução de humanos modernos (Contreras-Galindo *et al.* 2013; Zahn *et al.* 2015). Neste sentido, Soares *et al.* (2022) relataram que a localização de LINE-L1 em sítios específicos no genoma de *P. guyannensis* e *P. echinothrix* pode estar associada à plasticidade e remodelamento da cromatina neste grupo de roedores, podendo esse etendimento ser extrapolado para toda a família.

A presença de blocos e/ou sinais de L1 e B1, coincidente com marcação conspícua de HC, em praticamente todos os cromossomos das espécies analisadas, e no braço curto e/ou longo de alguns cromossomos de *P. guyannensis* e *I. pagurus*, sugere a relação destes retroelementos com a expansão da heterocromatina (Figura 5A). Segundo Caizzi *et al.* (2016) o acúmulo de sequências de elementos transponíveis em regiões específicas da cromatina pode induzir a formação de blocos de heterocromatina em espécies relacionadas. A presença de L1

e/ou B1 nestes sítios cromossômicos ocorre como se o sinal de um retroelemento complementasse o sinal do outro, de forma preferencial. Esta preferência, segundo Kazazian (2000), pode ser refletida de acordo com o nível taxonômico de um TE, resultando no enriquecimento de uma família de elemento transponível específica na heterocromatina. O impacto de um TE se estende além de mutações e inclui a evolução dos mecanismos de defesa do genoma, como por exemplo modificações epigenéticas, para combater a sua replicação e mobilidade e, portanto, regular sua atividade transcricional (Slotkin e Martienssen 2007; Klein e O'Neill 2018).

Em relação aos cromossomos sexuais, as marcações conspícuas de L1 e/ou B1 esteve presente de forma intercalada e não aleatória (Figuras 1 e 2). Segundo Dechaud *et al.* (2019) blocos de L1 e/ou B1 aumentam a probabilidade destes retroelementos se localizarem nas proximidades de genes de desenvolvimento sexual e interagirem com eles.

A presença de blocos conspícuos de L1 e B1 nos cromossomos sexuais, coincidente com blocos de HC, sugere uma heterocromatinização espécie-específica destes cromossomos e pode estar relacionado à sua inativação, como visto nos braços longo e/ou curto do cromossomo X de *T. paratus*, *T. apereoides* e *I. pagurus* (Figura 5A). Alguns estudos têm demonstrado que LINEs estão relacionados ao silenciamento do cromossomo X em mamíferos ao recrutar RNAs Xist com consequente heterocromatização, sugerindo uma associação na regulação da expressão de genes deste cromossomo (Bailey *et al.* 2000; Chaumeil *et al.* 2006; Chow e Heard 2009; Chow *et al.* 2010). Tannan *et al.* (2014) demonstraram em primatas que o L1 ocorre em densidades mais altas em torno de genes ligados ao cromossomo X, que estão sujeitos à inativação em comparação com aqueles que escapam da inativação.

Elementos transponíveis apresentam maior densidade no cromossomo Y em comparação aos autossomos, sendo quatro vezes maior para LINE-L1 e SINE-Alu em humanos (Tang *et al.* 2018). No presente estudo foram observados blocos de L1 e B1 coincidentes com HC em todo o cromossomo Y das espécies estudadas, com exceção de *M. hispidus*, que apresentou blocos somente na região centromérica (Figura 5A), sugerindo que o cromossomo Y de equimídeos seja um *hotspot* para heterocromatização, devido a inserção de TEs específicos. Conforme Lemos *et al.* (2010), a presença de TEs e DNA satélite em alta densidade no cromossomo Y auxilia na formação de marcas de heterocromatina.

Elementos transponíveis têm sido associados ao sítio do DNAr 18S, como ocorreu neste estudo com LINE-L1 e SINE-B1 (Figura 5B). A hipótese é que estes retroelementos podem ter sido cooptados como parte da função de regulação do gene DNAr 18S em Echimyidae por

efeito de exaptação. O efeito de exaptação de TEs tem sido discutido como um fator importante na evolução da regulação gênica em camundongos (Bejerano *et al.* 2006; Sasaki *et al.* 2008; Smith *et al.* 2008; Franchini *et al.* 2011; 2012), uma vez que evidências experimentais têm demonstrado que a associação de TEs a fatores de transcrição (TFBSs) servem como promotores e intensificadores na expressão gênica (Souza *et al.* 2013).

A presença de blocos de LINE-L1, mas não de SINE-B1, coincidente com DNAr 18S duplicado em um dos homólogos de *M. didelphoides*, *M. hispidus* e *I. pagurus* (Figura 5B) pode ser explicada pelo fato de TEs antigos tenderem a uma maior fixação no genoma e, neste caso o retroelemento L1 é mais antigo que B1, o qual surgiu há 65 Mya após a divergência de roedores (Kramerov e Vassetzky 2005; Yang *et al.* 2019). Além disso, para evitar inativação mutacional, a replicação de um TE deve exceder a do genoma do hospedeiro (Klein e O'Neill 2018), como parece ter ocorrido em um dos homólogos das espécies acima citadas.

## **Conclusão**

Os dados obtidos neste estudo demonstraram que os retroelementos LINE-L1 e SINE-B1 estão relacionados com a organização e estrutura cromossômica na família Echimyidae, influenciando de forma significativa a evolução cariotípica deste grupo, particularmente por seu envolvimento com rearranjos cromossômicos, influenciando as relações filogenéticas, especialmente por serem encontrados em abundância desproporcional nas regiões centroméricas e/ou pericentroméricas, e serem importantes no início da formação da heterocromatina.

A preferência de LINE-L1 e SINE-B1 por regiões específicas pode ter impacto na estabilização e manutenção da heterocromatina em Echimyidae, destacando o dinamismo do envolvimento destes retroelementos na recombinação entre cromossomos homólogos e não homólogos, e funcionando como *hostpost* para evolução cariotípica, especiação e diversidade deste grupo.

## **Disponibilidade de dados**

Todos os dados de sequenciamento, brutos e processados, demonstrados neste estudo foram submetidos ao NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) sob o número de acesso OR178947, OR194069, OR194070, OR178952, OR194071, OR194072 para LINE-L1 e OR500275, OR178954, OR500276, OR178956, OR178957, OR500277 para SINE-B1.

## **Agradecimentos**

Este trabalho teve o apoio financeiro do projeto SISBIOTA Brasil (Programa 47/2010), pelo Programa Pró-Amazônia (nº 047/2012) e pela CAPES (Recursos Naturais e Produtos) para o projeto, “Estudos citogenéticos e citogenômicos da biodiversidade da Amazônia, com a implementação de avanços técnicos”. Apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM- POSGRAD. Taxa da bolsa de produtividade de Eliana Feldberg (CNPq - Processo Nº 302421/2014-9). Silva, CEF foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 310433/2018-5). Eler, ES também foi bolsista do CNPq (processo 301886/2019-9).

## **Contribuições dos autores**

SC Soares: Conceitualização, investigação, metodologia e escrita – dados originais.

ES Eler: Coleta, escrita – revisão e edição.

CEF Silva: Coleta e metodologia.

FB Souza: Bioinformática.

MNF Silva: Coleta, escrita - revisão e edição.

NP Araújo: Metodologia, escrita - revisão e edição

M Svartman: Escrita - revisão e edição.

E Feldberg: Conceitualização, supervisão, aquisição de financiamento, gerenciamento de projetos e redação – dados originais, revisão e edição.

## **Conflito de interesse**

Declaramos que não há conflitos de interesse.

# Capítulo 3

---

Soares, S.C.; Eler, E.S.S.; Silva, C.E.F.;  
Souza-Sousa, J.F; da Silva, M.N.F.; Araújo,  
N.P.; Svartman, M.; Feldberg, E. 2023.  
Mapeamento de diferentes SINEs no  
genoma de espécies de *Proechimys*  
(Mammalia: Rodentia).

## Resumo

Este estudo teve como objetivo analisar a distribuição cromossômica de elementos intercalados curtos (SINEs) em cinco espécies de *Proechimys*, incluindo dois citótipos variantes. Foram utilizadas técnicas citogenéticas moleculares para caracterizar as sequências de SINEs-B1, B4, MAR e THER, que foram usadas como sondas para hibridização nos cromossomos metafásicos. A ampla distribuição dos SINEs nos cromossomos demonstrou diferenciação destes retroelementos nas espécies de *Proechimys*. O sinal de SINE-B4 foi mais evidente que SINE-B1, principalmente em *P. echinothrix*, *P. longicaudatus* e *P. cuvieri*. Apesar do sinal de SINE-MAR ter sido mais explosivo que o de SINE-THER, nas espécies *P. echinothrix*, *P. guyannensis* ( $2n=46$ ) e *P. longicaudatus*, suas distribuições no cariótipo foram similares. O sinal destes retroelementos ocorreu em sítios específicos de heterocromatina, sendo regiões centroméricas/pericentroméricas e terminais, na maioria dos cromossomos. Esta preferência parece ser um comportamento dos elementos SINEs e indicam que podem estar envolvidos em rearranjos durante a diversificação cariotípica em *Proechimys*. Blocos conspícuos foram observados nos cromossomos sexuais, na maioria das espécies, principalmente dos SINE-B4 e MAR, assim como nos autossomos. A variação dos SINEs no genoma das espécies de *Proechimys* demonstra que estes elementos se distribuem de forma específica neste gênero e a preferência por alguns sítios, considerados *hotspots* para quebra cromossômica, nos permite propor que estes elementos estão relacionados com a evolução cariotípica de *Proechimys*.

**Palavras-chave:** Elementos curtos intercalados, FISH, SINE-B1, SINE-B4, SINE-MAR, SINE-THER.

## Introdução

Elementos curtos intercalados (SINEs) são elementos móveis não autônomos e estão presentes no genoma de muitos eucariotos, com repetições que variam de 80 a 500 pb de comprimento. Estes retrotransposons se propagam no genoma por retrotransposição (transcrição reversa de RNA) e subsequente integração, usando a transcriptase reversa, codificada pelos elementos longos intercalados (LINEs). SINEs são compostos por uma sequência 5' derivada de uma molécula de RNA progenitora (por exemplo, 7SL) que contém a sequência promotora da RNA polimerase III, uma sequência intermediária e uma cauda 3' que é reconhecida pelo elemento autônomo (Okada 1991; Okada e Ohshima 1993; Deininger *et al* 2003; Kramerov e Vassetzky 2005; Weiner 2005). O número de cópias de SINEs representa metade do total de elementos repetitivos em humanos e camundongos, sendo que o genoma de mamíferos contém  $10^4$ – $10^6$  cópias deste retroelemento (Kramerov e Vassetzky 2005). Embora a família Alu em humanos e B1 em camundongos se originem do RNA 7SL, alguns SINEs são originários do RNAr 5S, sendo que a maioria se origina do tRNA. Estes elementos repetitivos podem mediar certos processos celulares e desempenhar um importante papel na evolução dos loci genômicos (Weiner 2002; Gogolevsky *et al.* 2009; Kramerov e Vassetzky 2011; Dunker *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2021).

A família SINE estava ativa em amniotas (mamíferos, aves e répteis) durante o período Carbonífero, pelo menos 310 milhões de anos atrás (Mya), e somente foi identificada devido a múltiplas cópias altamente conservadas. A conservação observada indica que o domínio central destes elementos transponíveis foi exaptado, ou seja, tornou-se um componente funcional do genoma de mamíferos (Nishihara *et al.* 2006). Os SINEs surgiram muitas vezes na evolução, por exemplo, 23 famílias primárias de SINEs apareceram independentemente na evolução dos mamíferos placentários e, mais recentemente, foram descritas 51 famílias de SINEs em mamíferos (Kramerov e Vassetzky 2011). Segundo Yang *et al.* (2019), a explosão da atividade do SINE-B1 pode ter contribuído para a extinção do LINE-L1 em roedores, por competição ou por forte pressão seletiva sobre o genoma das espécies, de forma a controlar a retrotransposição.

Elementos transponíveis, tais como SINEs, podem ser cooptados no genoma para auxiliar em funções, tais como na neuroplasticidade, inativação do cromossomo X, funções regulatórias e reparo de quebra de DNA (Morrish *et al.* 2002; Muotri *et al.* 2005; Sasaki *et al.* 2008; Coufal *et al.* 2009; Chow *et al.* 2010; Kunarso *et al.* 2010). Alguns estudos têm demonstrado a relação dos retroelementos SINEs com o genoma de roedores, por exemplo, B1 em esquilos (Sciuridae), porquinhos-da-índia (Caviidae), hamsters (Cricetidae), camundongos e ratos (Muridae); ID e B1 em outros roedores; MEN em esquilos dos gêneros *Menetes* e *Callosciurus*; B4 composto, contendo B1, em camundongo (Haynes *et al.* 1981; Krayev *et al.* 1982; Dunnen e Schoenmakers 1987; Bains e Temple-Smith 1989; Kim *et al.* 1994; Zietkiewicz e Labuda 1996; Lee *et al.* 1998; Serdobova e Kramerov 1998). Sasaki *et al.* (2008) verificaram que o retroelemento AmnSINE1 é um intensificador da expressão de FGF8 (fator de crescimento de fibroblastos 8) em duas regiões do prosencéfalo de camundongos. Churakov *et al.* (2010) sequenciaram SINE-B1 e forneceram suporte significativo para uma associação inicial dos clados, relacionando camundongos e Ctenohystrica (porquinhos-da-índia). O camundongo (137.584 cópias no total) e o porquinho-da-índia (380.365 cópias no total) compartilham cinco subfamílias de SINE relacionadas ao B1 (pB1D7, pB1D9, B1F, B1F1, B1F2) (Churakov *et al.* 2010).

Desse modo, neste estudo, analisamos a distribuição cromossômica e organização genômica de elementos intercalados curtos (SINEs) em espécies de *Proechimys*.

## Material e Métodos

Neste estudo analisamos o cariótipo de um macho e uma fêmea de cinco espécies e mais um citótipo variante de *Proechimys* (Tabela 1). Os exemplares foram coletados na região

Amazônica, no Brasil, entre 2005 e 2015. As coletas foram autorizadas pelos processos 02005.000642/03-11 (IBAMA/MMA), 02000.002336/2003-93 (IBAMA/MMA), 02005.002672/04 (IBAMA/MMA), 37585-5 (SISBIO/MMA), 37592-4 (SISBIO/MMA), 10985 (SISBIO/MMA) e pelo parecer 002/2013 da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/INPA. As peles e crânios foram depositados na Coleção de Mamíferos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As suspensões celulares e amostras de tecido para estudos citogenéticos moleculares estão depositadas no Laboratório de Genética Animal do INPA. (Tabela 1). As análises citogenéticas foram realizadas em preparações cromossômicas obtidas de células da medula óssea, pelo método “air-drying” de Ford e Harmerton (1956), utilizando colchicina na concentração 0,0125%, 1mL para cada 100g de peso animal.

**Tabela 1.** Espécies de *Proechimys* analisadas. 2n=número diploide; NF= número fundamental; INPA=Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Espécies	Local de coleta	Coordenadas	Voucher	2n/NF
<i>P. guyannensis</i> <sup>1</sup>	Ilha Serrinha, UHE Balbina, rio Uatumã, AM	01°52' S, 59°25' W	INPA-CEF12 INPA-CEF14	46/50 <sup>2</sup>
<i>P. guyannensis</i> <sup>1</sup>	Monte Dourado, Almeirim, Pará	00°49' S, 52°39' W	INPA5053 INPA5054	38/52 <sup>3</sup>
<i>P. gardneri</i>	Margem esquerda do rio Madeira, Comunidade Bela Vista, AM	05°14' S, 60°42' W	INPA5383 INPA5390	40/54 <sup>3</sup>
<i>P. echinothrix</i>	Reserva Canutama, rio Purus, AM	06°34' S, 64°33' W	INPA7319 INPA7345	32/58 <sup>3</sup>
<i>P. longicaudatus</i>	Margem esquerda do rio Aripuanã, AM	06°17' S, 60°23' W	INPA5414 INPA5401	28/46 <sup>3</sup>
<i>P. cuvieri</i>	Madeira da REMAM (Refinaria Isaac Sabbá), Manaus, AM Bituba, Monte Dourado, Almeirim Pará	00°70' S, 52°67' W 01°11' S, 52°38' W	INPA-EE251 INPA5050	28/46 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Diferentes citótipos para *P. guyannensis* 2n = 46 e 2n = 38. <sup>2</sup>Silva *et al.* (2012). <sup>3</sup>Eler *et al.* (2012).

Os retroelementos SINEs-B1, B4, MAR e THER foram obtidos por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os seguintes conjuntos de *primers* foram utilizados (Tabela 2):

**Tabela 02:** *Primers* utilizados na amplificação dos retrotransposons não-LTR-SINEs.

Identificação	Sequência de <i>primers</i>	Tamanho final das sequências
<b>SINE-B1</b> <sup>1</sup>	B1F 5' -GCCGGGCGTGGTGGCG-3'	150 pb
	B1R 5'-TTGGTTTTTCGAGACAGGGTTTCT-3'	
<b>SINE-B4</b> <sup>2</sup>	B4F 5'-GAGTTCAGATCCCCAGAACC-3'	299 pb
	B4R 3'-GGTCTCTCACTGAACCTGGA-5'	
<b>SINE-MAR</b> <sup>3</sup>	MarF 5'-GCCTGAAGAAAGCTCATCA-3'	269 pb
	MarR 3'-CTGCTTAGCACCTCGCTTA-5'	
<b>SINE-THER</b> <sup>4</sup>	Ther 5'-GACCTGGAGTCAGGAAGACC-3'	263 pb
	Ther 3'-ATCCTCACAAACCCTGTG-5'	

**Fonte:** <sup>1</sup>Rinehart *et al.* 2005; <sup>2</sup>Vassetzky 2013; <sup>3</sup>Kramerov e Vassetzky 2011; <sup>4</sup>Serdobova 1998.

As reações seguiram um volume total de 25 µL (~100 ng de DNA genômico; Tampão 1X; 0,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Promega); 0,2 mM de cada dNTP – dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*); 2,0 mM de cloreto de magnésio e água mili-Q para completar o volume), utilizando o ciclo de desnaturação de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min 94 °C, 1 min a 55 °C/40 °C/40 °C /55 °C, 1 min e 30 seg a 72 °C; com extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados com o kit Wizard SV Gel e sistema de limpeza PCR (Promega), ligados ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega) e clonadas em células competentes de *E. coli* XL1 Blue\_Top10 (Invitrogen). Os plasmídeos recombinantes foram amplificados, utilizando os *primers* M13 forward 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' e M13 reverse 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (Invitrogen) e sequenciados na Plataforma ABI3130 (Myleus Biotechnology). As sequências foram submetidas ao banco de dados Replibase para consenso (<https://www.girinst.org/censor/>). Os DNAs plasmidiais sequenciados foram marcados por nick-translation, dUTP-ATTO-550 (Jena Bioscience), seguindo as instruções do fabricante, e usados como sondas para hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (Pinkel *et al.* 1986). As lâminas, contendo os cromossomos, foram inicialmente tratadas com pepsina. A desnaturação cromossômica foi realizada com formamida a 70%. A hibridização foi realizada a 42 °C *overnight*, com 77% de estringência. As metáfases foram contracoradas com DAPI (0,8 ng/µL) em reagente antifading (SlowFade, Invitrogen).

## Resultados

O mapeamento dos SINEs- B1, B4, MAR e THER demonstrou diferenciação entre os cariótipos das cinco espécies de *Proechimys* (*P. guyannensis* [2n = 46], *P. guyannensis* [2n = 38], *P. gardneri* [2n = 40], *P. echinothrix* [2n = 32], *P. longicaudatus* [2n = 28] e *P. cuvieri* [2n = 28]) (Figuras 1 e 2).

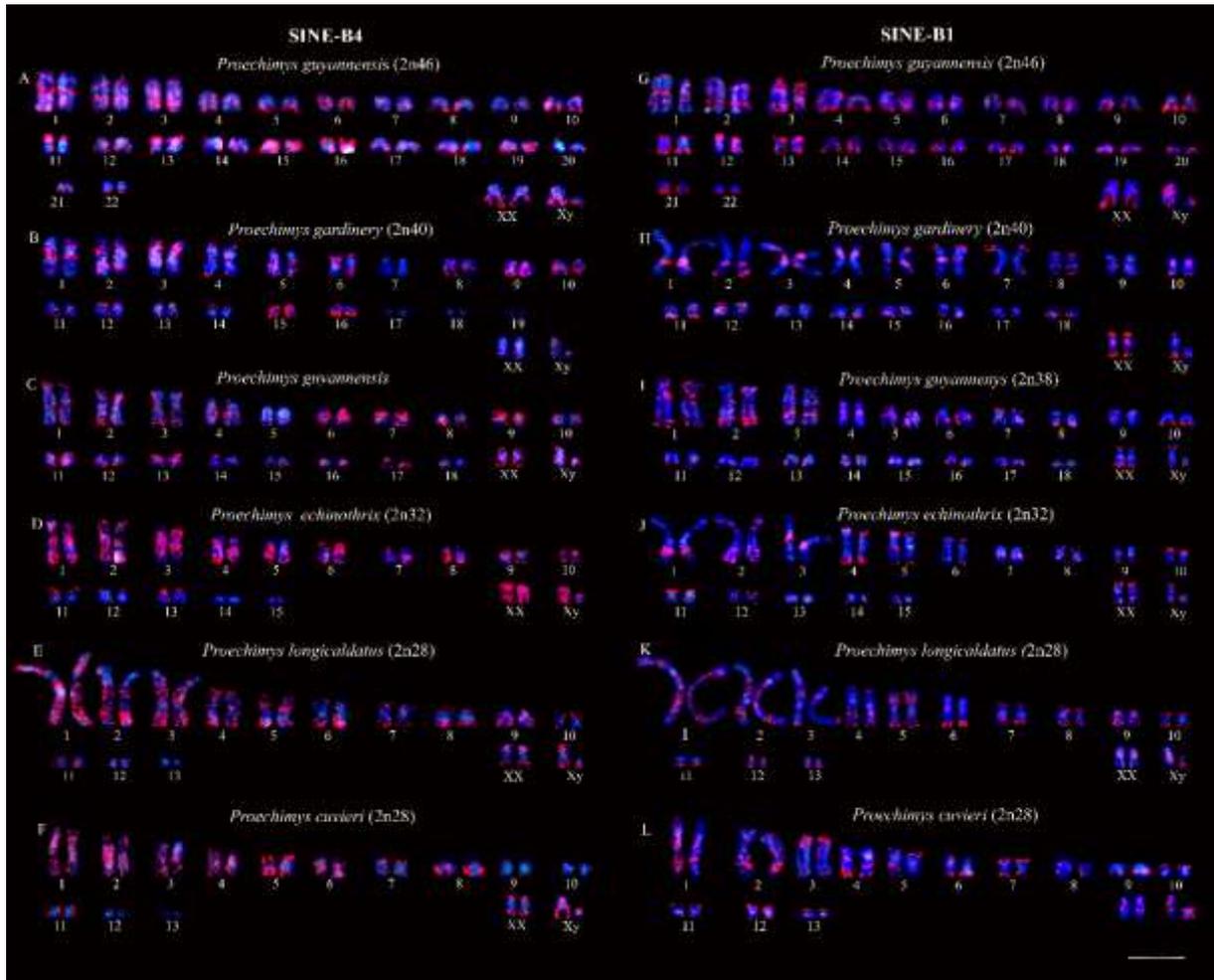
O consenso B1 (149pb), B4 (148pb), MAR (269pb) e THER (263pb) submetido ao banco de dados Repbase (Bao *et al.* 2015) forneceu sequências de retrotransposons não-LTRs, coincidentes com as variantes estruturais ID-B1\_Cpo (*Cavia porcellus* (Jurka 2010)), B4A\_ROD (*Mus musculus* (Finn *et al.* 2015)), B1\_Did (*Dryomys nitedula* (Kramerov *et al.* 1999)) e B1\_Did (*Dryomys nitedula* (Kramerov *et al.* 1999)), respectivamente.

O sinal de SINE-B4 teve uma distribuição mais ampla nos cariótipos de todas as espécies, quando comparado com SINE-B1, sendo mais forte em *P. echinothrix*, *P. longicaudatus* e *P. cuvieri*. O retroelemento B1 ocorreu de forma mais compartimentalizada. Foram observados blocos conspícuos de B4 bem mais evidentes que B1, em quase todos os pares cromossômicos das espécies, incluindo os sexuais (Figura 1).

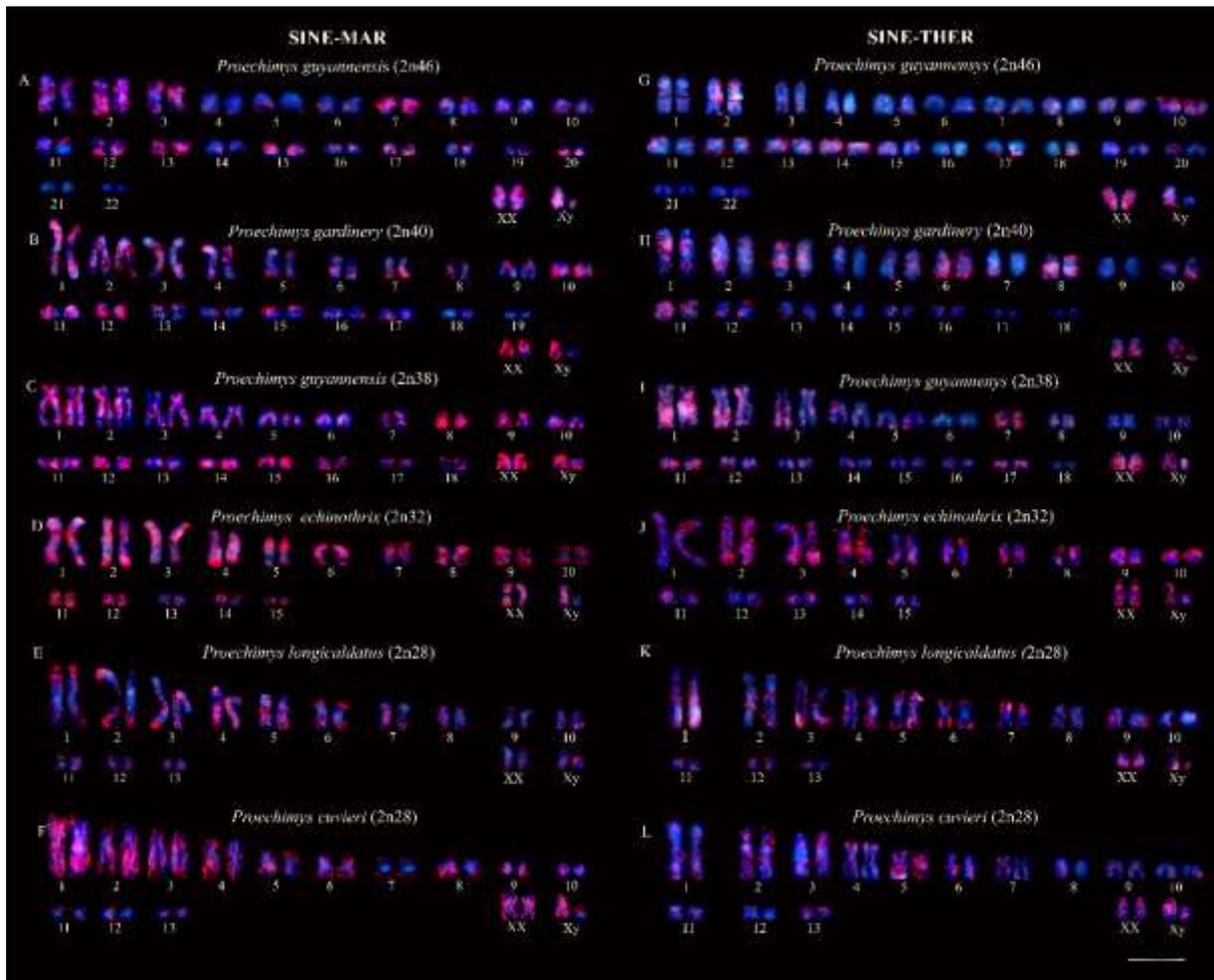
O sinal de SINE-MAR foi mais evidente, com ampla distribuição nos cariótipos de *P. guyannensis* (2n=38), *P. echinothrix* e *P. cuvieri*, menos evidente em *P. guyannensis* (2n=46), bem mais compartimentalizado em *P. longicaudatus*. Em relação aos cromossomos sexuais das espécies de *Proechimys* foram observados blocos conspícuos deste elemento transponível no X, com exceção de *P. longicaudatus*, e no Y, com exceção de *P. gardneri* e *P. echinothrix* (Figura 2).

SINE-THER foi mais evidente em *P. echinothrix*, com menor distribuição em *P. guyannensis* (2n=46), mais compartimentalizado em *P. longicaudatus* e mais disperso em *P. cuvieri*. Blocos conspícuos de SINE-THER foram observados nos cromossomos X de todas as espécies e apenas no cromossomo Y de *P. guyannensis* (2n=38) (Figura 2).

Apesar de dispersos em alguns pares cromossômicos das espécies de *Proechimys*, os SINES B4, MAR e THER tiveram preferências por regiões terminais, assim como B1, marcando em regiões centroméricas e/ou pericentroméricas na maioria dos pares cromossômicos (Figuras 1 e 2).



**Figura 1:** Distribuição dos retroelementos SINEs em *Proechimys* spp. Hibridização do retroelemento B4 em (A) PS1 = *P. guyannensis* (2n=46); (B) PG = *P. gardneri* (2n=40); (C) PS2 = *P. guyannensis* (2n=38); (D) PE = *P. echinothrix* (2n=32); (E) PL = *P. longicaudatus* (2n=28); (F) PC = *P. cuvieri* (2n=28). Hibridização do retroelemento B1 em: (G) PS1; (H) PG; (I) PS2; (J) PE; (K) PL; (L) PC. Barra=10,0  $\mu$ m.



**Figura 2:** Distribuição dos retroelementos SINEs em *Proechimys* spp. Hibridização do retroelemento MAR em: (A) PS1 = *P. guyannensis* (2n=46); (B) PG = *P. gardneri* (2n=40); (C) PS2 = *P. guyannensis* (2n=38); (D) PE = *P. echinothrix* (2n=32); (E) PL = *P. longicaudatus* (2n=28); (F) PC = *P. cuvieri* (2n=28). Hibridização do retroelemento THER em: (G) PS1; (H) PG; (I) PS2; (J) PE; (K) PL; (L) PC. Barra=10,0  $\mu$ m.

## Discussão

O mapeamento físico dos elementos intercalados curtos (SINEs) B1, B4, MAR e THER demonstrou um padrão de distribuição variado e abundante no genoma das espécies de *Proechimys*, corroborando alguns estudos que demonstraram uma ampla amplificação do SINE-ID no genoma de camundongos (Deininger 1989; Kim *et al.* 1994; Kass *et al.* 1996; Ono *et al.* 2001). Veniaminova *et al.* (2007) demonstraram que diferentes subfamílias de B1 predominam em diferentes famílias de roedores, como verificado neste estudo. Longo *et al.* (2015) demonstraram que o retroelemento SINE28 ocorre em abundância no genoma de mamíferos, sugerindo que o alto nível de conservação destas sequências esteja relacionado a uma função de exaptação dentro do genoma.

Ao compararmos SINEs-B4 e B1 verificamos uma presença mais explosiva de B4, principalmente em *P. echinothrix*, *P. longicaudatus* e *P. cuvieri*, em regiões centroméricas e/ou pericentroméricas e terminais, na maioria dos cromossomos (Figura 1). Nesse sentido, Soares *et al.* (2022) demonstraram que o sinal de SINE-B1 esteve presente nas regiões centroméricas/pericentroméricas e terminais, particularmente associado à heterocromatina, em *Proechimys* spp. Este padrão evidencia que os SINEs são direcionados para sítios ricos em heterocromatina tais como regiões terminais e centroméricas/pericentroméricas.

Ono *et al.* (2001) demonstraram que a distribuição dos elementos SINE-ID diferiu no genoma de três espécies de roedores. Neste estudo apesar do sinal de SINE-MAR ter sido mais explosivo que SINE-THER, suas distribuições nas espécies *P. echinothrix*, *P. guyannensis* (2n=46) e *P. longicaudatus* foram equivalentes, sugerindo que durante a explosão destes retroelementos, estes foram fixados nestas espécies na mesma região cariotípica no mesmo estágio de evolução. Neste sentido, Okada (1991) relata que SINEs são considerados marcos temporais da evolução por estarem relacionados com a organização genômica e fixados na população, em determinados estágios da evolução.

A concentração de MAR e THER em regiões terminais foi mais evidente, assim como B1 e B4. Esta preferência parece ser um comportamento dos elementos SINEs, além de envolver regiões centroméricas e/ou pericentroméricas na maioria dos pares cromossômicos, sítios ricos em heterocromatina (Figuras 1 e 2). Este comportamento dos SINEs nestes sítios indicam que estes retroelementos podem estar envolvidos em rearranjos durante a diversificação cariotípica em *Proechimys*, refletindo um papel importante na plasticidade genômica, como proposto por alguns estudos (Paço *et al.* 2015; Araújo *et al.* 2017; Razali *et al.* 2019). Segundo Soares *et al.* (2022) a diversificação cariotípica em *Proechimys* pode ter ocorrido pela fixação de rearranjos cromossômicos e, quando associada a regiões pericentroméricas ou subteloméricas, pode representar um *hotspot* de quebra cromossômica.

Em relação aos cromossomos sexuais, blocos conspícuos foram observados na maioria das espécies, principalmente dos SINEs-B4 e MAR, acompanhando a organização do sinal nos autossomos. Nesse sentido, alguns estudos demonstram, ao analisarem cromossomos sexuais, que TEs específicos tendem a acumular em locais específicos, refletindo a funcionalidade destes elementos na organização genômica das espécies (Erlandsson *et al.* 2000; Dong *et al.* 2017; Gonçalves *et al.* 2020).

A variação dos SINEs no genoma das espécies de *Proechimys* demonstra que estes elementos se distribuem de forma específica nos organismos. Como relatado por Veniaminova

*et al.* (2007), ao demonstrar que variantes de B1 apresentam variação de sequência no genoma de diferentes roedores, sugerindo que a família SINE é específica para organismos de uma ou mais famílias ou ordem. A explosão de SINEs no genoma de *Proechimys* pode ser explicada pelo fato destes elementos surgirem *de novo* muitas vezes na evolução a partir de moléculas disponíveis (por exemplo, tRNA), e as modificações epigenéticas parecem não combater a sua replicação e mobilidade. Conforme Kramerov e Vassetzky (2011) o grande número de cópias genômicas permite variações incomuns ou raras destes retroelementos, como demonstrado neste estudo. A integração de novas cópias do SINE pode desestabilizar a expressão genética, ou servir como fonte de inovações genômicas e fator de plasticidade do genoma (Makalowski 2000).

### **Conclusão**

A explosão de SINEs no genoma de *Proechimys*, envolvendo regiões centroméricas e/ou pericentroméricas e terminais, sugere que estes elementos estão associados à organização e evolução cromossômica nesse gênero.

A distribuição destes SINEs, com predominância em sítios terminais, sugere um comportamento similar destes elementos, nestas regiões, podendo estar relacionados à explosão destes retroelementos em determinados estágios evolutivos.

### **Agradecimentos**

Autor Silva, CEF foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 310433/2018-5). Eler, ES também foi bolsista do CNPq (processo 301886/2019-9). O apoio financeiro foi fornecido pelo SISBIOTA BRASIL (Programa 47/2010), pelo Programa Pró-Amazônia (nº 047/2012) e pela CAPES (Recursos Naturais e Produtos) para o projeto, “Estudos citogenéticos e citogenômicos da biodiversidade da Amazônia, com a implementação de avanços técnicos.” POSGRAD. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) - Programa Institucional de Apoio à Pós-Graduação Stricto Sensu (FAPEAM-POSGRAD).

### **Contribuições dos autores**

SC Soares: Conceitualização, investigação, metodologia e escrita – dados originais.

ES Eler: Coleta, escrita – revisão e edição.

CEF Silva: Coleta e metodologia.

JF Souza-Sousa: Escrita – revisão e edição.

MNF Silva: Coleta, escrita - revisão e edição.

NP Araújo: Metodologia, escrita - revisão e edição

M Svartman: Escrita - revisão e edição.

E Feldberg: Conceitualização, supervisão, aquisição de financiamento, gerenciamento de projetos e redação – dados originais, revisão e edição.

### **Conflito de interesse**

Declaramos que não há conflitos de interesse.

## CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo demonstrou a contribuição dos TEs para diversidade genética em Echimyidae, pois o padrão de L1 e de B1 foram semelhantes em regiões cromossômicas distintas ao comparar o genoma das espécies deste grupo.

A presença de L1 e B1, principalmente em blocos associados à heterocromatina, em regiões subteloméricas, centroméricas e/ou pericentroméricas representam um *hospo*st de quebra cromossômica, originando rearranjos cromossômicos, que induziram a evolução cariotípica em Echimyidae.

O dinamismo destes retroelementos, na recombinação entre cromossomos, influenciou na plasticidade e remodelamento da cromatina, além de potencializar regiões regulatórias como DNAr 18S.

A história evolutiva dos retroelementos L1 e B1 acompanhou a evolução de Echimyidae, pois os clusters formados refletem algumas das relações taxonômicas propostas na literatura, inferindo que TEs participam da evolução cariotípica, especiação e diversidade deste grupo.

A explosão de SINEs de forma variada e específica no genoma de *Proechimys*, envolvendo regiões centroméricas e/ou pericentroméricas e terminais, sugere que estes elementos estão associados à organização e evolução cromossômica nesse gênero.

Assim, consideramos que os elementos transponíveis são de fundamental importância para a divergência específica entre diferentes organismos, incluindo mamíferos, em virtude de seu potencial para gerar variabilidade genética. E que, a caracterização citogenética pode fornecer mais um caráter confiável em critérios taxonômicos, visto que a identificação de rearranjos cromossômicos pode evidenciar diferenças genômicas entre espécies e assim, delinear possíveis relações entre grupos.

## REFERÊNCIAS

- Amaral, P.J.S.; Nagamachi, C.Y.; Noronha, R.C.R.; Costa, M.J.R.; Pereira, A.L.; Rossi, R.V.; *et al.* 2013. *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae): Characterization and taxonomic considerations of a form with a very low diploid number and a multiple sex chromosome system. *BMC Genetics*, 14: 21.
- Aniskin, V.M. 1993. Three new karyotypes of prickly chinchillas of the Family Echimyidae (Rodentia). *Genetika*, 29: 1500-1507.
- Araújo, N.P.; Kuhn, G.C.S.; Vieira, F.N.; Morcatty, T.Q.; Paglia, A.P.; Svartman, M. 2017. Comparative genomic in situ hybridization and the possible role of retroelements in the karyotypic evolution of three Akodontini species. *International Journal of Genomics*, 1-11.
- Araújo, N.P.; Dias, C.A.R.; Stumpp, R.; Svartman, M. 2019. Cytogenetic analyses in *Trinomys* (Echimyidae, Rodentia), with description of new karyotypes. *PeerJ*, 6: 1-16.
- Araújo, N.P.; Bonvicino, C.; Svartman, M. 2019. Comparative cytogenetics of four species of *Thrichomys* (Rodentia: Echimyidae). *Genome*. 62(1): 31-41.
- Arkhipova, I.R.; Pyatkov, K.I.; Meselson, M.; Evgen'ev, M.B. 2003. Retroelements containing introns in diverse invertebrate taxa. *Nature Genetics*, 33(2): 123-124.
- Arkhipova, I.R.; Yushenova, I.A. 2019. Giant Transposons in Eukaryotes: Is Bigger Better? *Genome Biology and Evolution*, 11(3): 906-918.
- Baillie, J.K.; Barnett, M.W.; Upton, K.R.; Gerhardt, D.J.; Richmond, T.A.; De Sapia, F.; *et al.* 2011. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature*, 479(7374): 534-7.
- Bailey, J.Á.; Carrel, L.; Chakravarti, A.; Eichler, E.E. 2000. Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: the Lyon repeat hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 97: 6634–6639.
- Bains, W.; Temple-Smith, K. 1989. Similarity and divergence among rodent repetitive DNA sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 28: 191-199.
- Baker, R.J.; Kass, D.H. 1994. Comparison of chromosomal distribution of a retroposon (LINE) and a retrovirus-like element *mys* in *Peromyscus maniculatus* and *P. leucopus*. *Chromosome Research*, 2: 185–189.
- Bao, W.; Jurka, J. 2009. "L1-type non-LTR retrotransposons from guinea pig."; *Rebase Reports*, 9, 2847-2847. Disponível em: [https://www.girinst.org/2009/vol9/issue11/L1-4\\_Cpo.html](https://www.girinst.org/2009/vol9/issue11/L1-4_Cpo.html). Acesso: 03/04/2023.
- Bao, W.; Kojima, K.K.; Kohany, O. 2015. Rebase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. *Mobile DNA*, 6: 1-6.

- Barros, R.M.S. 1978. *Variabilidade cromossômica em Proechimys e Oryzomys (Rodentia) da Amazônia*. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 184pp.
- Barros, A.; Sczepanski, T.; Cabrero, J.; Camacho, J.; Vicari, M.; Artoni, R. 2011. *Fiber FISH* reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. *Aquaculture*, 322: 47–50.
- Batzler, M.A.; Deininger, P.L. 2002. Alu repeats and human genomic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 3(5): 370-9.
- Bailey, J.M.; Dunne, M.P.; Martin, N.G. 2000. Genetic and environmental influences on sexual orientation and its correlates in an Australian twin sample. *Journal of Personality and Social Psychology*, 78(3):524-36.
- Beauregard, A.; Curcio, M.J.; Belfort, M. 2008. The take and give between retrotransposable elements and their hosts. *The Annual Review of Genetics*, 42: 587-617.
- Beck, C.R.; Garcia-Perez, J.L.; Badge, R.M.; Moran, J.V. 2011. LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annual Review Genomics Human Genetics*, 12(1): 187–215.
- Bejerano, G.; Lowe, C.; Ahituv, N.; King, B.; Siepel, A.; Salama, S.R.; et al. 2006. A distal enhancer and an ultraconserved exon are derived from a novel retroposon. *Nature*, 441: 87–90.
- Bennetzen, J.L.; Wang, H. 2014. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. *Annual Review Plant Biology*, 65: 505-30.
- Beraldi, R.; Pittoggi, C.; Sciamanna, I.; Mattei, E.; Spadafora, C. 2006. Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine pre implantation development. *Molecular Reproduction and Development*, 73: 279–287.
- Biémont, C.; Vieira, C. 2006. Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, 443: 521-24.
- Böhne, A.; Brunet, F.; Galiana-Arnoux, D.; Schultheis, C.; Volff, J.N. 2008. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research*, 16: 203-215.
- Bonvicino, C.R.; Otazú, I.B.; D'Ándrea, P.S. 2002. Karyological evidence for the diversification of the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). *Cytogenetics Cell Genetics*, 97: 200-204.
- Bourque, G.; Burns, K.H.; Gehring, M.; Gorbunova, V.; Seluanov, A.; Hammell, M.; et al. 2018. Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biology*, 19: 1-12.
- Boyle, A.L.; Ballard, S.G.; Ward, D.C. 1990. Differential distribution of long and short interspersed element sequences in the mouse genome: Chromosome karyotyping by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 7757–7761.

- Branstetter, M.G.; Longino, J.T.; Ward, O.S.; Faircloth, B.C. 2017. Enriching the ant tree of life: enhanced UCE bait set for genome-scale phylogenetics of ants and other Hymenoptera. *Methods Ecology Evolution*, 8: 768-778.
- Britten, R.J. 1996. DNA sequence insertion and evolutionary variation in gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18): 9374–9377.
- Britten, R.J. 2010. Transposable element insertions have strongly affected human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences on the United States of America*, 107: 19945–19948.
- Buckley, R.M.; Kortschak, R.D.; Raison, J.M.; Adelson, D.L. 2017. Similar evolutionary trajectories for retrotransposon accumulation in mammals. *Genome Biology Evolution*, 9: 2336–2353.
- Caizzi, R.; Moschetti, R.; Piacentini, L.; Fanti, L.; Marsano, R.M.; Dimitri, P. 2016. Comparative Genomic Analyses Provide New Insights into the Evolutionary Dynamics of Heterochromatin in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 12: 1-26.
- Cantrell, M.A.; Scott, L.; Brown, C.J.; Martinezm, A.R.; Wichman, H.A. 2008. Loss of LINE-1 activity in the mega bats. *Genetics*, 178: 393–404.
- Capy, P.; Bazin, C.; Higuete, D.; Langin, T. 1998. *Dynamics and evolution of transposable elements*. Austin/London: Landes Bioscience/Chapman Hall, 197pp ([https://books.google.com.br/books/about/Dynamics\\_and\\_evolution\\_of\\_transposable\\_e.html?id=aoLwAAAAMAAJ](https://books.google.com.br/books/about/Dynamics_and_evolution_of_transposable_e.html?id=aoLwAAAAMAAJ)). Acesso em: 12/05/2023.
- Capy, P.; Gasperià, G.; Biémont, C.; Bazin, B. 2000. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity*, 85: 101-06.
- Capy, P. 2012. Evolution and Impact of Transposable. *Springer Science & Business Media*: 309pp([https://play.google.com/store/books/details/Pierre\\_Capy\\_Evolution\\_and\\_Impact\\_of\\_Transposable\\_E?id=qEXqCAAQBAJ](https://play.google.com/store/books/details/Pierre_Capy_Evolution_and_Impact_of_Transposable_E?id=qEXqCAAQBAJ)). Acesso em: 06/05/2017.
- Carvalho, C.M.; Lupski, J.R. 2016. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. *Nature Reviews Genetics*, 17(4): 224-38.
- Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220.
- Chaumeil, J.; Le Baccon, P.; Wutz, A.; Heard, E. 2006. A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced. *Genes & Development*, 20: 2223–2237.
- Chen, T.L.; Manuelidis, L. 1989. SINES and LINES cluster in distinct DNA fragments of Giemsa band size. *Chromosoma*, 98: 309–316.
- Chow, J.O.; Heard, E. 2009. X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Current Opinion Cell Biology*, 21: 359–366.

- Chow, J.C.; Ciaudo, C.; Fazzari, M.J.; Mise, N.; Servant, N.; Glass, J.L.; *et al.* 2010. LINE-1 activity in facultative heterochromatin formation during X chromosome inactivation. *Cell*, 141: 956–969.
- Chu, W.M.; Liu, W.M.; Schmid, C.W. 1995. RNA polymerase III promoter and terminator elements affect Alu RNA expression. *Nucleic Acids Research*, 23: 1750–1757.
- Chuong, E.B. 2013. Retroviruses facilitate the rapid evolution of the mammalian placenta. *BioEssays*, 35: 853–861.
- Chuong, E.B.; Elde, N.C.; Feschotte, C. 2017. Regulatory activities of transposable elements: From conflicts to benefits. *Nature Reviews Genetics*, 18: 71–86.
- Churakov, V.; Sadasivuni, M.K.; Rosenbloom, K.; Huchon, D. 2010. Rodent Evolution: Back to the Root. *Molecular Biology and Evolution*, 27(6):1315-26.
- Clark, L.A.; Wahl, J.M.; Rees, C.A.; Murphy, K.E. 2006. Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5): 1376–1381.
- Cohen, C.J.; Lock, W.M.; Mager, D.L. 2009. Endogenous retroviral LTRs as promoters for human genes: a critical assessment. *Gene*, 448(2): 105-14.
- Colombo, A.R.; Triche, T.Jr.; Ramsingh, G. 2018. Transposable Element Expression in Acute Myeloid Leukemia Transcriptome and Prognosis. *Scientific Reports*, 8(1): 1-10.
- Conley, A.B.; Miller, W.J.; Jordan, I.K. 2008. Human cis natural antisense transcripts initiated by transposable elements. *Trends Genetics*, 24(2): 53-56.
- Contreras-Galindo, R.; Kaplan, M.H.; He, S.; Contreras-Galindo, A.C.; Gonzalez-Hernandez, M.J.; Kappes, F.; *et al.* 2013. HIV infection reveals widespread expansion of novel centromeric human endogenous retroviruses. *Genome Research*, 23: 1505–1513.
- Copeland, C.S.; Mann, V.H.; Morales, M.E.; Kalinna, B.H.; Brindley, P.J. 2005. The Sinbad retrotransposon from the genome of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*, and the distribution of related Pao-like elements. *BMC Evolutionary Biology*, 5: 1-18.
- Cordeiro, J.; Robe, L.J.; Loreto, E.L.; Valente, V.L. 2008. The LTR retrotransposon micropia in the cardini group of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): a possible case of horizontal transfer. *Genetica*, 134(3): 335-344.
- Cost, G.J.; Boeke, J.D. 1998. Targeting of human retrotransposons integration is directed by the specificity of the L1 endonuclease for regions of unusual DNA structure. *Biochemistry*, 37: 18081–18093.
- Coufal, N.G.; Garcia-Perez, J.L.; Peng, G.E.; Yeo, G.W.; Um, Y.; Lovci, M.T.; *et al.* 2009. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature*, 460: 1127–1131.
- Courcelle, M.; Tilaka, M.K.; Leite, Y.L.R.; Douzerya, E.J.P.; Fabre, P.H. 2019. Digging for the spiny rat and hutia phylogeny using a gene capture 2 approach, with the description of a new mammal subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, (136): 241-253.

- Daniels, G.R.; Deininger, P.L. 1985. Repeat sequence families derived from mammalian tRNA genes. *Nature*, 317(6040): 819-22.
- Deberardinis, R.J.J.L.; Goodier, E.M.; Ostertag, H.H.; Kazazian, Jr. 1998. Rapid amplification of a retrotransposon subfamily is evolving the mouse genome. *Nature Genetics*, 20: 288–290.
- Dechaud, C.; Volff, J.N.; Schartl, M.; Naville, M. 2019. Sex and the TEs: transposable elements in sexual development and function in animals. *Mobile DNA*, 10: 42.
- Deininger, P. L. 1989. SINEs: Short interspersed repeated DNA elements in higher eukaryotes. In Berg, D. E.; Howe, M.M. (eds) *Mobile DNA* (Am. Soc. Microbiol., Washington DC): pp. 619–636.
- Deininger, P.L.; Moran, J.V., Batzer, M.A.; Kazazian, H.H.Jr. 2003. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Current Opinion in Genetics Development*, 13: 651–658.
- D'Elía, G.; Fabre, P-H.; Lessa, E.P. 2019. Rodent systematics in an age of discovery: Recent advances and prospects. *Journal of Mammalogy*, 100: 852–871.
- Delsuc, F.; Kuch, M.; Gibb, G.C.; Hughes, J.; Szpak, P.; Southon, J.; *et al.* 2018. Resolving the phylogenetic position of Darwin's extinct ground sloth (*Myiodon darwini*) using mitogenomic and nuclear exon data. *Proceedings of the Royal Society*, 285: 1-10.
- Denli, A.M.; Narvaiza, I.; Kerman, B.E.; Pena, M.; Benner, C.; Marchetto, M.C.; *et al.* 2015. Primate-specific ORF0 contributes to retrotransposon-mediated diversity. *Cell*, 163: 583–593.
- Dewannieux, M.; Heidmann, T. 2005. L1-mediated retrotransposition of murine B1 and B2 SINEs recapitulated in cultured cells. *Journal Molecular Biology*, 349: 241–247.
- Dobigny, G.; Ducroz, J.F.; Robinson, T.J.; Volobouev, V. 2004a. Cytogenetics and cladistics. *System Biology*, 53: 470–484.
- Dobigny, G.; Ozouf-Costaz, C.; Waters, P.D.; Bonillo, C.; Coutanceau, J.P.; Volobouev, V. 2004b. LINE-1 amplification accompanies explosive genome repatterning in rodents. *Chromosome Research*, 12: 787–793.
- Dong, Y.; Huang, Z.; Kuang, Q.; Wen, Z.; Liu, Z.; Li, Y.; *et al.* 2017. Expression dynamics and relations with nearby genes of rat transposable elements across 11 organs, 4 developmental stages and both sexes. *BMC Genomics*, 18: 1-11.
- Downs, L.M.; Mellersh, C.S. 2014. An Intronic SINE insertion in FAM161A that causes exon-skipping is associated with progressive retinal atrophy in Tibetan Spaniels and Tibetan Terriers. *PLoS One*, 9(4): 1-12.
- den Dunnen, J.T.; Schoenmakers, J.G. 1987. Consensus sequences of the *Rattus norvegicus* B1- and B2 repeats. *Nucleic Acids Research*, 15(6):2772.
- Dunker, W.; Zhao, Y.; Song, Y.; Karijolich, J. 2017. Recognizing the SINEs of Infection: Regulation of Retrotransposon Expression and Modulation of Host Cell Processes. *Viruses*, 12 (386): 1-9.

- Dunnum, J.L.; Salazar-Bravo, J.; Yates, T.L. 2001. The Bolivian Bamboo Rat, *Dactylomys boliviensis* (Rodentia: Echimyidae), a new record for chromosome number in a mammal. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 66: 121-126.
- Eickbush, TH; Furano, AV. 2002. Fruit flies and humans respond differently to retrotransposons. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(6): 669-74.
- Eickbush, T.H.; Jamburuthugoda, V.K. 2008. The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. *Virus Research*, 134(1-2): 221–234.
- Elbarbary, R.A.; Lucas, B.A.; Maquat, L.E. 2016. Retrotransposons as regulators of gene expression. *Science*, 351: 1-18.
- Eler, E.S.; da Silva, M.N.F.; Silva, C.E.F.; Feldberg, E. 2012. Comparative cytogenetics of spiny rats of the genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae) from the Amazon region. *Genetics Molecular Research*, 11: 830-846.
- Eler, E.S. 2017. *Estudos citogenéticos evolutivos em roedores da família Echimyidae (Mammalia: Rodentia), com ênfase no gênero Proechimys*. Tese de doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus, Amazônia. 87pp.
- Eler, E.S.; Silva, C.E.F.; da Silva, M.N.F.; Feldberg, E. 2020. New karyotype records for the genus *Proechimys* (Rodentia: Echimyidae) from Brazilian Amazonia. *Genetics Molecular Research*, 43(3): 1-11.
- Emmons, L.H.; Feer, F. 1990. *Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide*. University of Chicago Press, Chicago. 279p (<http://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/N/bo3628148.html>). Acesso:15/05/2023.
- Emmons, L.H. 2005. A revision of the genera of arboreal Echimyidae (Rodentia, Echimyidae, Echimyinae), with description of two new genera. *Zoology*, 133: 247-310.
- Emmons, L.H.; Patton, J.L.; Leite, Y.L.R. 2015. Subfamily Dactylomyiinae Tate, 1935. In: Patton, J.L. U. F. J. Pardiñas, U.F.J.; D'Elía, G. (Eds). *Mammals of South America, Rodents*. Vol. 2. University of Chicago Press, Chicago, Illinois. p. 880–888.
- Erlandsson, R.; Wilson, J.F.; Pääbo, S. 2000. Sex chromosomal transposable element accumulation and male-driven substitutional evolution in humans. *Molecular Biology Evolution*, 17: 804–812.
- Erwin, J.A.; Marchetto, M.C.; Gage, F.H. 2014. Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(8): 497-506.
- Evgen'ev, M.B.; Zelentsova, H.; Shostak, N.; Kozitsina, M.; Barskyi, V.; Lankenau, D.H.; *et al.* 1997. Penelope, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 94(1):196-201.
- Evgen'ev, M.B.; Arkhipova, I.R. 2005. Penelope-like elements--a new class of retroelements: distribution, function and possible evolutionary significance. *Cytogenetic and Genome Research*, 110(1-4): 510-521.

- Fabre, P.H.; Galewski, T.; Tilak, M.K.; Douzery, E.J.P. 2012. Diversification of South American spiny rats (Echimyidae): a multigene phylogenetic approach. *Zoologica Scripta*, 42: 117-134.
- Fabre, P.H.; Vilstrup, J.T.; Raghavan, M.; Der Sarkissian, C.; Willerslev, E.; Douzery, E.J.P.; *et al.* 2014. Rodents of the Caribbean: origin and diversification of hutias unraveled by next-generation museomics. *Biology Letters*, 10(7): 1-7.
- Fabre, P.H.; Upham, N.S.; Emmons, L.H.; Justy, F.; Leite Y.L.; Carolina, L.A.; *et al.* 2017. Mitogenomic Phylogeny, Diversification, and Biogeography of South American Spiny Rats. *Molecular Biology Evolution*, 34(3): 613-633.
- Faulkner, G.J.; Kimura, Y.; Daub, C.O.; Wani, S.; Plessy, C.; Irvine, K.M.; *et al.* 2009. The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nature Genetics*, 41: 563–571.
- Fedoroff, N.V. 2012. Presidential address. Transposable elements, epigenetics, and genome evolution. *Science*, 338(6108): 758-767.
- Fernández-Medina, R.D.; Ribeiro, J.M.C.; Carareto, C.M.A; Luciane Velasque, L.; Struchiner, C.J. 2012. Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 13 (272): 1-15.
- Finn, R.D.; Hubley, R.; Jones, T.; Jurka, J.; Smit, A.; Wheeler, T. 2015. Murinae. *Rebase Reports*.
- Finnegan, D.J. 1989. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genetics*, 5: 103–107.
- Finnegan, D.J. 2012. Retrotransposons. *Current Biology*, 22(11): 1-6.
- Ford, C.; Hamerton, J. 1956. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technology*, 31: 247-251.
- Frame, I.G.; Cutfield, J.F.; Poulter, R.T. 2001. New BEL-like LTR-retrotransposons in *Fugu rubripes*, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 263(1-2): 219-30.
- Franchini, L.F.; López-Leal, R.; Nasif, S.; Beati, P.; Gelman, D.M.; Low, M.J.; *et al.* 2011. Convergent evolution of two mammalian neuronal enhancers by sequential exaptation of unrelated retroposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 15270–15275.
- Franchini, L.F; de Souza, F.S; Low, M.J; Rubinstein, M. 2012. Positive selection of co-opted mobile genetic elements in a mammalian gene: if you can't beat them, join them. *Mobile Genetics Elements*, 2: 106–109.
- Furano, A.V. 2000. The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 64: 255–294.

- Galewski, T.; MauVrey, J.F.; Leite, Y.L.R.; Patton, J.L.; Douzery, E.P. 2005. Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 601–615.
- Gallus, S.; Lammers, F.; Nilsson, M.A. 2016. When Genomics Is Not Enough: Experimental Evidence for a Decrease in LINE-1 Activity During the Evolution of Australian Marsupials. *Genome Biology and Evolution*, 8(8): 2406–2412.
- Garfinkel, D.J.; Boeke, J.D.; Fink, G.R. 1985. Ty element transposition: reverse transcriptase and virus-like particles. *Cell*, 42: 507–517.
- Gilbert, N.; Lutz-Prigge, S.; Moran, J.V. 2002. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*, 110: 315–325.
- Gilbert, N.; Bomar, J.M.; Burmeister, M.; Moran, J.V. 2004. Characterization of a mutagenic B1 retrotransposon insertion in the jittery mouse. *Human Mutation*, 24(1):9-13.
- Gilbert, C.; Feschotte, C. 2018. Horizontal acquisition of transposable elements and viral sequences: patterns and consequences. *Current Opinion in Genetics and Development*, 49: 15-24.
- Gogolevsky, K.P.; Vassetzky, N.S.; Kramerov, D.A. 2009. SINEs derivados de 5S rRNA e derivados de tRNA em morcegos frugívoros. *Genômica*, 93 :494–500.
- Gonçalves, O.S.; Campos, K.F.; Assis, J.C.S.; Fernandes, A.S.; Souza, T.S.; Rodrigues, L.G.C.; *et al.* 2020. Transposable elements contribute to the genome plasticity of *Ralstonia solanacearum* species complex. *Microbiology Genomics*, 6: 1–12.
- Gonzalo, S.; Jaco, I.; Fraga, M.F.; Chen, T.; Li, E.; Esteller, M.; Blasco, M.A. 2006. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, 8: 416–424.
- Goodier, J.L.; Ostertag, E.M.; Du, K.; Kazazian, H.H.Jr. 2001. A novel active L1 retrotransposon subfamily in the mouse. *Genome Research*, 11: 1677–1685.
- Grahn, R.A.; Rinehart, T.A.; Cantrell, M.A.; Wichman, H.A. 2005. Extinction of LINE-1 activity coincident with a major mammalian radiation in rodents. *Cytogenetics Genome Research*, 110, 407–415.
- Gray, Y.H.M. 2000. It takes two transposons for a tango – element mediated chromosomal rearrangements. *Trends in Genetics*, 16: 461–468.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/96/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hammer, O.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4: 1–9.
- Hancks, D.C.; Kazazian, H.H.Jr. 2016. Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mobile DNA*, 7: 1-28.

- Haren, L.; Ton-Hoang, B.; Chandler, M. 1999. Integrating DNA: Transposases and retroviral integrases. *Annual Review of Microbiology*, 53: 245-281.
- Hartl, D.L.; Andrew, G.C.; Andrew, G.C. 1997. *Principles of population genetics*. Vol. 116. Sunderland, MA: Sinauer associates.
- Haynes, S.R.; Toomey, T.P.; Leinwand, L.; Jelinek, W.R. 1981. The Chinese hamster Alu-equivalent sequence: a conserved highly repetitious, interspersed deoxyribonucleic acid sequence in mammals has a structure suggestive of a transposable element. *Molecular and Cellular Biology*, 1: 573-583.
- Hua-Van, A.; Le Rouzic, A.; Boutin, T.S., Filee, J.; Capy, P. 2011. The struggle for life of the genome's selfish architects. *Biology Direct*, 6: 1-29.
- Iack-Ximenes, G.E.; Vivo, M.; Percequillo, A.R. 2005. A new genus for *Loncheres grandis* Wagner, 1845, with taxonomic comments on other arboreal echimyids (Rodentia, Echimyidae). *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 63 (1): 89-112.
- Ivancevic, A.M.; Kortschak, R.D.; Bertozzi, T.; Adelson, D.L. 2018. Horizontal transfer of BovB and L1 retrotransposons in eukaryotes. *Genome Biology*, 19(85): 1-13.
- Janoušek, V.; Laukaitis, C.M.; Yanchukov, A.; Karn, R.C. 2016. The role of retrotransposons in gene family expansions in the human and mouse genomes. *Genome Biology Evolution*, 8: 2632-2650.
- Jiang, N.; Bao, Z.; Zhang, X.; Eddy, S.R.; Wessler, S.R. 2004. Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. *Nature*, 431(7008): 569-73.
- Johnson, W.E.; Coffin, J.M. 1999. Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(18): 10254-10260.
- Jurka, J.; Smith, T. 1988. A fundamental division in the Alu family of repeated sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 4775-4778.
- Jurka, J.; Kapitonov, V.V.; Pavlicek, A.; Klonowski, P.; Kohany, O.; Walichiewicz, J. 2005. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetics and Genome Research*, 110: 462-467.
- Jurka, J. 2010. SINE elements from guinea pig. *Repbase Reports*, 10: 777.
- Jurka, J.; Bao, W.; Kojima, K.K. 2011. Families of transposable elements, population structure and the origin of species. *Biology Direct*, 6: 44.
- Kajikawa, M.; Okada, N. 2002. LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 39 sequence. *Cell*, 111: 433-444.
- Källersjö, M.; Albert, V.A.; Farris, J.S. 1999. Homoplasy Increases Phylogenetic Structure. *Cladistics*, 15: 91-93.

- Kapitonov, V.V.; Jurka, J. 2006. Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 03(12): 4540-5.
- Kapitonov, V.V.; Tempel, S.; Jurka, J. 2009. Simple and fast classification of non-LTR retrotransposons based on phylogeny of their RT domain protein sequences. *Gene*, 448: 207–213.
- Kass, D. H.; Kim, J.; Deininger, P. L. 1996. Sporadic amplification of ID elements in rodents. *Journal of Molecular Evolution*, 42: 7–14.
- Kazazian, H.H.Jr. 2000. L1 retrotransposons shape the mammalian genome. *Science*, 289: 1152–1153
- Kazazian, H.H.Jr. 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*, 303(5664): 1626-1632.
- Kidwell, M.G. 1993. Lateral transfer in natural populations of eukaryotes. *The Annual Review of Genetics*, 27: 235-56.
- Kidwell, M.G; Lisch, D.R. 2000. Transposable elements and host genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(3): 95-99.
- Kidwell, M.G.; Lisch, D.R. 2001. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution*, 55(1):1-24.
- Kidwell, M.G.; Holyoake, A. 2001. Transposon-induced hotspots for genomic instability. *Genome Research*, 11: 1321-22.
- Kiernan, J.A. 2007. Indigogenic substrates for detection and localization of enzymes, *Biotechnic & Histochemistry*, 82(2): 73-103.
- Kim, J.; Martignetti, J. A.; Shen, M. R.; Brosius, J.; Deininger, P. L. 1994. Rodent BC1 RNA gene as a master gene for ID element amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 91: 607– 3611.
- Kingsmore, S.F.; Giros, B.; Suh, D.; Bieniarz, M.; Caron, M.G.; Seldin, M.F. 1994. Glycine receptor  $\beta$ -subunit gene mutation in spastic mouse associated with LINE-1 element insertion. *Nature Genetics*, 7: 136–141.
- Klein, S.J.; O'Neill, R.J. 2018. Transposable elements: genome innovation, chromosome diversity, and centromere conflict. *Chromosome Research*, 26: 5-23.
- de Knijff, P. 2000. Messages through bottlenecks: on the combined use of slow and fast evolving polymorphic markers on the human Y chromosome. *American Journal of Human Genetics*, 67: 1055-1061.
- Kohany, O.; Gentles, A.J.; Hankus, L.; Jurka, J. 2006. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: Repbase Submitter and Censor. *BMC Bioinforma*, 7: 474.

- Kojima, K.K. 2019. Non-LTR retrotransposons from the long-tailed chinchilla genome. *Rebase Reports*, 19: 2063.
- Kolosha, V.O.; Martin, S.L. 2003. High-affinity, non-sequence-specific RNA binding by the open reading frame 1 (ORF1) protein from long interspersed nuclear element 1 (LINE-1). *Journal of Biological Chemistry*, 278: 8112–8117.
- Kramerov, D.A. 1999. The evolutionary position of dormice (Gliridae) in *Rodentia* determined by a novel short retroposon. *Molecular Biology Evolution*, 16: 715-717.
- Kramerov, D.A.; Vassetzky, N.S. 2005. Short retroposons in eukaryotic genomes. *International Review Cytology*, 247: 165–221.
- Kramerov, D.; Vassetzky, N. 2011. Origin and evolution of SINEs in eukaryotic genomes. *Heredity*, 107, 487–495.
- Krayev, A.S.; Markusheva, T.V.; Kramerov, D.A.; Ryskov, A.P.; Skryabin, K.G.; Bayev, A.A.; *et al.* 1982. Ubiquitous transposonlike repeats B1 and B2 of the mouse genome: B2 sequencing. *Nucleic Acids Research*, 10: 7461-7475.
- Kubo, S.; Seleme, M.C.; Soifer, H.S.; Perez, J.L.; Moran, J.V.; Kazazian, H.H.Jr.; *et al.* 2006. L1 retrotransposition in nondividing and primary human somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(21): 8036-8041.
- Kumar, A.; Bennetzen, J.L. 1999. Plant Retrotransposons. *The Annual Review of Genetics*, 33: 479–532.
- Kunarso, G.; Chia, N.Y.; Jeyakani, J.; Hwang, C.; Lu, X.; Chan, Y.S. *et al.* 2010. Transposable elements have rewired the core regulatory network of human embryonic stem cells. *Nature Genetic*, 42(7): 631–634.
- Kuznetsova, I.; Podgornaya, O.; Ferguson-Smith, M.A. 2006. High-resolution organization of mouse centromeric and pericentromeric DNA. *Cytogenetics Genome Research*, 112: 248–255.
- Lander, E.S.; Linton, L.M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M.C.; Baldwin, J.; *et al.* 2001. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822): 860-921.
- Lara, M.C.; Patton, J.L.; da Silva, M.N.F. 1996. The simultaneous diversification of South American Echimyidae rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome *b* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 403–413.
- Lara, M.C.; Patton J.L. 2000. Evolutionary diversification of spiny rats (genus *Trinomys*, Rodentia: Echimyidae) in the Atlantic Forest of Brazil. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 130: 661–686.
- Lee, I.Y.; Westaway, D.; Smit, A.F.; Wang, K.; Seto, J.; Chen, L. *et al.* 1998. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Research*, 8: 1022-1037

- Leite, Y.L.R.; Patton, J.L. 2002. Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25: 455–464.
- Lemos, B.; Branco, A.T.; Hartl, D.L. 2010. Epigenetic effects of polymorphic Y chromosomes modulate chromatin components, immune response, and sexual conflict. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 15826–15831.
- Levin, H.L.; Moran, J.V. 2011. Dynamic interaction between transposable elements and their hosts. *Nature Reviews Genetics*, 12(9): 615–17.
- Lima, J.F.S.; Langguth, A.; Sousa, L.C. 1998. The karyotype of *Makalata didelphoides* (Rodentia, Echimyidae). *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 63: 315–318.
- Lin, L.; Faraco, J.; Li, R.; Kadotani, H.; Rogers, W.; Lin, X.; Qiu, X.; et al. 1999. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin orexin receptor 2 gene. *Cell*, 98: 365–376.
- Liu, M.Y.; Lou, H.Q.; Chen, W.W.; Piñeros, M.A.; Xu, J.M.; Fan, W.; et al. 2018. Two citrate transporters coordinately regulate citrate secretion from rice bean root tip under aluminum stress. *Plant, Cell & Environment*, 41: 809–822.
- Longo, M.S.; Brown, J.D.; Zhang, C.; O'Neill, M.J.; O'Neill, R.J. 2015. Identification of a recently active mammalian SINE derived from ribosomal RNA. *Genome Biology Evolution*, 7(3): 775–88.
- Lowe, C.B.; Bejerano, G.; Haussler, D. 2007. Thousands of human mobile element fragments undergo strong purifying selection near developmental genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19): 8005–10.
- Luan, D.D.; Korman, M.H.; Jakubczak, J.L.; Eickbush, T.H. 1993. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell*, 72: 595–605.
- Lynch, V.J.; Nnamani, M.C.; Kapusta, A.; Brayer, K.; Plaza, S.L.; Mazur, E.C.; et al. 2015. Ancient transposable elements transformed the uterine regulatory landscape and transcriptome during the evolution of mammalian pregnancy. *Cell Reports*. 10(4): 551–561.
- Lyon, M.F. 1998. X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 80: 133–137.
- Lyozin, G.T.; Makarova, K.S.; Velikodvorskaja, V.V.; Zelentsova, H.S.; Khechumian, R.R.; Kidwell, M.G.; et al. 2001. The structure and evolution of Penelope in the virilis species group of *Drosophila*: an ancient lineage of retroelements. *Journal of Molecular Evolution*, 52: 445–456.
- Makalowski, W. 2000. Genomic scrap yard: how genomes utilize all that junk. *Gene*, 259: 61–67.

- Maksakova, I.A.; Romanish, M.T.; Gagnier, L.; Dunn, C.A.; van de Lagemaat, L.N.; Mager, D.L. 2006. Retroviral elements and their hosts: insertional mutagenesis in the mouse germ line. *PLoS Genetics*, 2(1): 1-10.
- Mandrioli, M.; Manicardi, G.C. 2001. Cytogenetic and molecular analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Genetica*, 111: 433–438.
- Mandrioli, M.; Manicardi, G.C.; Machella, N.; Caputo, V. 2001. Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). *Genetica*, 110: 73–78.
- Martin, S.L.; Cruceanu, M.; Branciforte, D.; Wai-Lun, Li.P.; Kwok, S.C.; Hodges, R.S.; *et al.* 2005. LINE-1 retrotransposition requires the nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein. *Journal of Molecular Biology*, 348(3): 549-61
- Mathias, S.L.; Scott, A.F.; Kazazian, H.H.Jr.; Boeke, J.D.; Gabriel, A. 1991. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science*, 254(5039): 1808-10.
- McCarthy, E.M.; McDonald, J.F. 2004. Long terminal repeat retrotransposons of *Mus musculus*. *Genome Biology*, 5(3): 1-8.
- McGurk, M.P.; Dion-Côté, A-M.; Barbash, D.A.; 2021. Rapid evolution at the *Drosophila* telomere: Transposable element dynamics at an intrinsically unstable locus. *Genetics*, 217(2): 1-26.
- McKenna, MC.; Bell, S.K. 1997. *Classification of Mammals Above the Species Level*. Columbia University Press, New York. 640p ([https://books.google.com.br/books/about/Classification\\_of\\_Mammals.html?id=zS7FZkzIw-cC&redir\\_esc=y](https://books.google.com.br/books/about/Classification_of_Mammals.html?id=zS7FZkzIw-cC&redir_esc=y)). Acesso: 12/07/2023.
- Meyer, T.J.; Held, U.; Nevenon, K.A.; Klawitter, S.; Pirzer, T.; Carbone, L.; *et al.* 2016. The flow of the gibbon LAVA element is facilitated by the LINE-1 retrotransposition machinery. *Genome Biology Evolution*, 8: 3209–3225.
- Miller, W.J.; Brunmeir, R.; Lagger, S.; Seiser, C. 2006. Epigenetic regulation of mobile genetic elements in the mouse System. In *Genomic Impact of Eukaryotic Transposable Elements*. 1ST INTERNATIONAL CONFERENCE/WORKSHOP. ([http://http://www.girinst.org/conference/Asilomar-2006/Book\\_of\\_abstracts.pdf](http://http://www.girinst.org/conference/Asilomar-2006/Book_of_abstracts.pdf).) Acesso:10/05/2023.
- Mitra, R.; Li, X.; Kapusta, A.; Mayhew, D.; Mitra, R.D.; Feschotte, C.; *et al.* 2013. Functional characterization of piggyBat from the bat *Myotis lucifugus* unveils an active mammalian DNA transposon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 234–239.
- Mones, A. 1968. Proposición de una nueva terminología relacionada con el crecimiento de los molares. *Zoology Platense*, 1: 13-14.
- Morales, M.E; Mann, V.H; Kines, K.J; Gobert, G.N; Fraser, M.J.Jr.; Kalinna, B.H.; *et al.* 2007. PiggyBac transposon mediated transgenesis of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *FASEB Journal*, 21(13): 3479-3489.

- Morrish, T.A.; Gilbert, N.; Myers, J.S.; Vincent, B.J.; Stamato, T.D.; Taccioli, G.E. *et al.* 2002. DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nature Genetic*, 31(2):159–65.
- Muñoz-López, M.; García-Pérez, J.L. 2010. DNA transposons: nature and applications in genomics. *Current Genomics*, 11(2): 115-28.
- Muotri, A.R.; Chu, V.T.; Marchetto, M.C.; Deng, W.; Moran, J.V.; Gage, F.H. 2005. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature*, 435: 903–910.
- Nagamachi, C.Y.; Pieczarka, J.C.; O’Brien, P.C.; Pinto, J.Á.; Malcher, S.M.; Pereira A.L.; *et al.* 2013. FISH with whole chromosome and telomeric probes demonstrates huge karyotypic reorganization with ITS between two species of Oryzomyini (Sigmodontinae, Rodentia): *Hylaeamys megacephalus* probes on *Cerradomys langguth* karyotype. *Chromosome Research*, 21: 107–119.
- Neitzel, H.; Kalscheuer, V.; Henschel, S.; Digweed, M.; Sperling, K. 1998. Beta heterochromatin in mammals: Evidence from studies in *Microtus agrestis* based on the extensive accumulation of L1 and non-L1 retroposons in the heterochromatin. *Cytogenetics Cell Genetics*, 80: 165–172.
- Neitzel, H.; Kalscheuer, V.; Singh, A.P.; Henschel, S.; Sperling, K. 2002. Copy and paste: The impact of a new non-L1 retroposon on the gonosomal heterochromatin of *Microtus agrestis*. *Cytogenetics Genome Research*, 96: 179–185.
- Nekrutenko, A.; Li, W.H. 2001. Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends in Genetics*, 17(11): 619-21.
- Nishibuchi, G.; Déjardin, J. 2017. The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals. *Chromosome Research*, 25: 77–87.
- Nishihara, H.; Smit, A.F.; Okada, N. 2006. Functional noncoding sequences derived from SINEs in the mammalian genome. *Genome Research*, 16(7):864-74.
- Nystedt, B.; Street, N.R.; Wetterbom, A.; Zuccolo, A.; Lin, Y.C.; Scofield, D.G.; *et al.* 2013. The *Norway spruce* genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*, 497(7451): 579-584.
- Okada N. 1991. SINEs: Short interspersed repeated elements of the eukaryotic genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 6(11):358-61.
- Okada, N.; Ohshima, K. 1993. Um modelo para o mecanismo de geração inicial de elementos curtos intercalados (SINEs). *Journal of Molecular Evolution*, 37: 167–170.
- Okada, N.; Sasaki, T.; Shimogori, T.; Nishihara, H. 2010. Emergence of mammals by emergency: exaptation. *Genes Cells*, 15: 801–812.
- Oliver, K.R.; Greene, W.K. 2009. Transposable elements: powerful facilitators of evolution. *Bioessays*, 31: 703–714.

- Oliver, K.R.; Greene, W.K. 2011. Mobile DNA and the TE-Thrust hypothesis: supporting evidence from the primates. *Mobile DNA*, 2: 1-17.
- Ono, T.; Kondoh, Y.; Kagiya N.; Sonta, S.; Yoshida, M.C. 2001. Genomic organization and chromosomal distribution of rat ID elements. *Genes & Genetic Systems*, 76: 213–220.
- Ostertag, E.M.; Kazazian, H.H.Jr. 2001. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annual Review Genetics*, 35: 501-38.
- Paço, A.; Adegá, F.; Chaves, R. 2014. LINE-1 retrotransposons: From ‘parasite’ sequences to functional elements. *Journal of Applied Genetics*, 56: 133–145.
- Paço, A.; Adegá, F.; Meštrović, N.; Plohl, M.; Chaves, R. 2015. The puzzling character of repetitive DNA in *Phodopus* genomes (Cricetidae, Rodentia). *Chromosome Research*, 23: 427–440.
- Parker, H.G.; Von Holdt, B.; Quignon, P.; Margulies, E.; Shao, S.; Mosher, D.; *et al.* 2009. An expressed fgfr retrogene is associated with breed-defining chondrodysplasia in domestic dogs. *Science*, 325(5943): 995–998.
- Patton, J.L.; Emmons, L.H. 1985. A review of genus *Isothrix* (Rodentia, Echimyidae). *American Museum Novitates*, 2817: 1-14.
- Patton, J.L. 1987. Species groups of spiny rats, genus *Proechimys* (Rodentia Echimyidae). *Fieldiana Zoology*, 39: 305–345.
- Patton, J.L.; Silva, M.N.F.; Malcolm, J.R. 2000. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *The Bulletin of the American Museum of Natural History*, 244: 1–306.
- Patton, J.L. 2015. Hystricomorpha. In: Patton JL, Pardiñas UFJ and D’Elía GD (Eds). In: *Mammals of South America, Rodents*. Vol. 2. University of Chicago Press, Chicago, p. 688-690.
- Pele, M.; Tired, L.; Kessler, J.L.; Blot, S.; Panthier, J.J. 2005. SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Human Molecular Genetics*, 14: 1417-1427.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Science*, 83: 2934-2938.
- Plasterk, R.H.; Izsvák, Z.; Ivics, Z.; 1999. Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends in Genetics*, 15(8): 326-332.
- Poulter, R.T.; Goodwin, T.J. 2005. DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons. *Cytogenet Genome Research*, 110(1-4): 575-88.
- Pritham, E.J.; Putliwala, T.; Feschotte, C. 2007. Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene*, 390: 3-17.

- Ray, D.A.; Pagan, H.J.; Thompson, M.L.; Stevens, R.D. 2007. Bats with hATs: evidence for recent DNA transposon activity in genus *Myotis*. *Molecular Biology Evolution*, 24: 632–639.
- Ray, D.A.; Feschotte, C.; Pagan, H.J.; Smith, J.D.; Pritham, E.J.; Arensburger, P.; *et al.* 2008. Multiple waves of recent DNA transposon activity in the bat, *Myotis lucifugus*. *Genome Research*, 18: 717–728.
- Razali, N.M.; Cheah, B.H.; Nadarajah, K. 2019. Transposable elements adaptive role in genome plasticity, pathogenicity and evolution in fungal phytopathogens. *International Journal Molecular Sciences*, 20: 1–14.
- Rebollo, R.; Karimi, M.M.; Bilenky, M.; Gagnier, L.; Miceli-Royer, K.; Zhang, Y.; *et al.* 2011. Retrotransposon-induced heterochromatin spreading in the mouse revealed by insertional polymorphisms. *PLoS Genetics*, 7(9): 1-14.
- Rebollo, R.; Romanish, M.T.; Mager D.L. 2012. Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. *The Annual Review of Genetics*, 46: 21-42.
- Ribeiro, J.M.; Kidwell, M.G. 1994. Transposable elements as population drive mechanisms: specification of critical parameter values. *Journal of Medical Entomology*, 31(1): 10-16.
- Richardson, S.R.; Doucet, A.J.; Kopera, H.C.; Moldovan, J.B.; Garcia-Perez, J.L.; Moran, J.V. 2015. The influence of LINE-1 and SINE retrotransposons on mammalian genomes. *Microbiology Spectrum*, 3(2): 1-63.
- Ricci, M.; Peona, V.; Guichard, E.; Taccioli, C.; Boattini, A. 2018. Transposable elements activity is positively related to rate of speciation in mammals. *Jornal Molecular Evolution*, 86: 303–310.
- Ricci, M.; Peona, V.; Boattini, A.; Taccioli, C. 2023. Comparative analysis of bats and rodents' genomes suggests a relation between non-LTR retrotransposons, cancer incidence, and ageing. *Scientific Reports*, 13: 2-11.
- Richardson SR, Doucet AJ, Kopera HC, Moldovan JB, Garcia-Perez JL, Moran JV. 2015. The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. *Microbiology Spectrum*, 3(2): 1-63.
- Rinehart, T.A.; Grahn, R.A.; Wichman, HA. 2005. SINE extinction preceded LINE extinction in Sigmodontine rodents: implications for retrotranspositional dynamics and mechanisms. *Cytogenetics Genome Research*, 110: 416–425.
- Rojas-Ríos, P.; Simonelig, M. 2018. piRNAs and PIWI proteins: regulators of gene expression in development and stem cells. *Development*, 145: 1–13.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; *et al.* 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.

- Sandhu, S.S. 2010. *Recombinant DNA Technology*. [S.l.]. I K International Publishing House. p. 116.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. I. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor. NY. 2344p (<http://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>). Acesso: 23/05/2023.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. 1977. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Science*, 74: 5463-5467.
- Sasaki, T.; Nishihara, H.; Hirakawa, M.; Fujimura, K.; Tanaka, M.; Kokubo, N.; *et al.* 2008. Possible involvement of SINEs in mammalian-specific brain formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 4220-4225.
- Sassaman, D.M.B.A.; Dombroski, J.V.; Moran, M.L; Kimberland, T.P. Naas, T.P.; DeBerardinis, R.J.; *et al.* 1997. Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nature Genetics*, 16: 37-43.
- Schaack, S.; Gilbert, C.; Feschotte, C. 2010. Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution. *Trends Ecology Evolution*, 25(9): 537-46.
- Schouten, G.J.; Van Luenen, H.G.A.M.; Verra, N.C.V.; Valerio, D.; Plasterk, R.H.A. 1998. Transposon Tc1 of the nematode *Caenorhabditis elegans* jumps in human cells. *Nucleic Acids Research*, 26: 3013-3017.
- Schrader, L.; Schmitz, J. 2019. The impact of transposable elements in adaptive evolution. *Molecular Ecology*, 28: 1537-1549.
- Schueler, M.G.; Higgins, A.W.; Rudd, M.K.; Gustashaw, K.; Willard, H.F. 2001. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science*, 294: 109-115.
- Scott, L.; Kuroiwa, A.; Matsuda, Y.; Wichman, G.A. 2006. X accumulation of LINE-1 Retrotransposons in *Tokudaia Osimensis*, a spiny rat with the Karyotype XO. *Cytogenetic and Genome Research*, 112: 261-269.
- Senft, A.D.; Macfarlan, T.S. 2021. Transposable elements shape the evolution of mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 22: 691-711.
- Serdobova, I.M.; Kramerov, D.A. 1998. Short retroposons of the B2 superfamily: evolution and application for the study of rodent phylogeny. *Journal of Molecular Evolution*, 46(2): 202-214.
- Sharma, S.P.; Peterson, T. 2023. Complex chromosomal rearrangements induced by transposons in maize. *Genetics*, 223: 1-11.
- Silva, M.J.J.; Yonenaga-Yassuda, Y. 1998. Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences by fluorescence in situ hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). *Chromosome Research*, 6: 455-462.

- Silva, C.E.F.; Eler, E.S.; da Silva, M.N.F.; Feldberg, E. 2012. Karyological analysis of *Proechimys cuvieri* and *Proechimys guyannensis* (Rodentia, Echimyidae) from central Amazon. *Genetics Molecular Biology*, 35, 88-94.
- Simonti, C.N.; Pavlicev, M.; Capra, J.A. 2017. Transposable element exaptation into regulatory regions is rare, influenced by evolutionary age, and subject to pleiotropic constraints. *Molecular Biology Evolution*, 34: 2856–2869.
- Slotkin, R.K.; Martienssen, R. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Review Genetics*, 8: 272–285.
- Smith, A.F.A.; Riggs, A.D. 1996. Tiggers and other DNA transposon fossils in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 1443-1448.
- Smith, A.M.; Sanchez, M.J.; Follows, G.A.; Kinston, S.; Donaldson, I.J.; Green, A.R; *et al.* 2008. A novel mode of enhancer evolution: the Tal1 stem cell enhancer recruited a MIR element to specifically boost its activity. *Genome Research*, 18: 1422–1432.
- Soares, S.C.; Eler, E.E.; Silva, C.E.F.; Silva, M.N.F.; Araujo, N.P.; Svartman, M.; Feldberg, E. 2022. LINE-1 and SINE-B1 mapping and genome diversification in *Proechimys* species (Rodentia: Echimyidae). *Life Science Alliance*, 5: 1-11.
- Sookdeo, A.; Hepp, C.M.; McClure, M.A.; Boissinot, S. 2013. Revisiting the evolution of mouse LINE-1 in the genomic era. *Mobile DNA*, 4(1): 3.
- Sotero-Caio, C.G.; Cabral-de-Mello, D.C.; Calixto, M.D.S.; Valente, G.T.; Martins, C.; Loreto, V.; de Souza, M.J.; *et al.* 2017. Centromeric enrichment of LINE-1 retrotransposons and its significance for the chromosome Evolution of Phyllostomid bats. *Chromosome Research*, 25: 313–325.
- Souza, F.S.; Franchini, L.F.; Rubinstein, M. 2013. Exaptation of transposable elements into novel cis-regulatory elements: is the evidence always strong?. *Molecular Biology Evolution*, 30: 1239-12351.
- Souza-Sousa, J.F.; Viana, P.F.; Bertollo, L.A.C.; Cioffi, M.B.; Feldberg, E. 2017. Evolutionary Relationships among *Boulengerella* Species (Ctenoluciidae, Characiformes): Genomic Organization of Repetitive DNAs and Highly Conserved Karyotypes. *Cytogenetics Genome Research*, 152: 194-203.
- Souza-Sousa, J.F.; Guimarães, E.M.C.; Pinheiro-Figliuolo, V.S.; Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Feldberg, E. 2021. Chromosomal analysis of *Ctenolucius hujeta Valenciennes*, 1850 (Characiformes): A new piece in the chromosomal evolution of the Ctenoluciidae. *Cytogenetics Genome Research*, 161: 195–202.
- Sultana, T.; Zamborlini, A.; Cristofari, G.; Lesage, P. 2017. Integration site selection by retroviruses and transposable elements in eukaryotes. *Nature Reviews Genetics*, 18(5): 292-308.
- Sundaram, V.; Cheng, Y.; Ma, Z.; Li, D.; Xing, X.; Edge, P.; *et al.* 2014. Widespread contribution of transposable elements to the innovation of gene regulatory networks. *Genome Research*, 24(12): 1963-1976.

- Szak, S.T.; Pickeral, O.K.; Makalowski, W.; Boguski, M.S.; D.; Boeke, J.D. 2002. Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome Biology*, 3(10): 1-18.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology Evolution*, 38(7): 3022-3027.
- Tang, W.; Mun, S.; Joshi, A.; Han, K.; Liang, P. 2018. Mobile elements contribute to the uniqueness of human genome with 15,000 human-specific insertions and 14 Mbp sequence increase. *DNA Research*, 25: 521–533.
- Tannan, N.B.; Brahmachary, M.; Garg, P.; Borel, C.; Alnefaie, R.; Watson, C.T.; *et al.* 2014. DNA methylation profiling in X; autosome translocations supports a role for L1 repeats in the spread of X chromosome inactivation. *Human Molecular Genetics*, 23: 1224-1236.
- Tellier, M.; Bouuaert, C.C.; Chalmers, R. 2015. Mariner and the ITm Superfamily of Transposons. *Microbiology Spectrum*, 3(2): 3-33.
- Teng, S.C.; Kim, B.; Gabriel, A. 1996. Retrotransposon reverse transcriptase-mediated repair of chromosomal breaks. *Nature*, 383: 641–644.
- Thomas, J.H.; Schneider, S. 2011. Coevolution of retroelements and tandem zinc finger genes. *Genome Research*, 21(11): 1800-1812.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Töhönen, V.; Katayama, S.; Vesterlund, L.; Jouhilahti, E.M.; Sheikhi, M.; Madisson, E.; *et al.* 2015. Novel PRD-like homeodomain transcription factors and retrotransposon elements in early human development. *Nature Commun*, 6: 8207.
- Townsend, J.P.; Su, Z.; Tekle, Y.L. 2012. Phylogenetic Signal and Noise: Predicting the Power of a Data Set to Resolve Phylogeny. *System. Biology*, 61, 835-849.
- Trizzino, M.; Park, Y.; Holsbach-Beltrame, M.; Aracena, K.; Mika, K.; Caliskan, M. *et al.* 2017. Transposable elements are the primary source of novelty in primate gene regulation. *Genome Research*, 27(10): 1623-1633.
- Trono, D. 2016. Transposable elements, polydactyl proteins and the genesis of human-specific transcription networks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 80: 281–88.
- Tubio, J.M.C.; Li, Y.; Ju, Y.S.; Martincorena, I.; Cooke, S.L.; Tojo, M.; *et al.* 2014. Mobile DNA in cancer. Extensive transduction of nonrepetitive DNA mediated by L1 retrotransposition in cancer genomes. *Science*, 345(6196): 1-21.
- Upham, N.S.; Patterson, B.D. 2012. Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidae (Rodentia: Hystricognathi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63: 417–429.

- Upham, N.S.; Patterson, B.D. 2015. Phylogeny and evolution of caviomorph rodents: a complete time tree for living genera. In: Vassallo, A.I.; Antenucci, D. (Eds). *Biology of caviomorph rodents: diversity and evolution*. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM). Argentina: Buenos Aires. p.63-120.
- Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; Ferreira, I.A.; Poletto, A.B.; Fantinatti, B.E.A.; Martins, C. 2011. Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among cichlid fish: New insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetic and Genome Research*, 133: 34-42.
- Vandewege, M.W.; Platt, R.N.; Ray, D.A.; Hoffmann, F.G. 2016. Transposable Element Targeting by piRNAs in Laurasiatherians with Distinct Transposable Element Histories. *Genome Biology and Evolution*, 8(5): 1327–37.
- Vassetzky, N.S.; Kramerov, D.A. 2013. SINEBase: a database and tool for SINE analysis. *Nucleic Acids Research*, 41: 83-89.
- Veniaminova, N.A.; Vassetzky, N.S.; Kramerov, D.A. 2007. B1 SINEs in diferente rodent families. *Genomics*, 89: 678–686.
- Wang, K.; Zhang, W.; Jiang, Y.; Zhang, T. 2013. Systematic application of DNA *fiber*-FISH technique in cotton. *PLoS One* 8: 1-7.
- Waterston, R.H.; Lindblad-Toh, K.; Birney, E.; Rogers, J.; April, J.F.; Agarwal, P.; *et al.* 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420: 520–562.
- Weiner, A.M. 2002. SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feeds you. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(3):343-50.
- Weiner, A. 2005. SINEs e LINEs: SINEs and LINEs: Troublemakers, Saboteurs, Benefactors, Ancestors. 46: 507-555. In: Gesteland R, Cech T, Atkins J, editores. *The word of RNA*. Cold Spring Harbor, NY: imprensa CSHL.
- Weksler, M.; Bonvicino, C.R.; Otazu, I.B.; Silva, J.S. 2001. Status of *Proechimys roberti* and *P. oris* (Rodentia: Echimyidae) from Eastern Amazonia and central Brazil. *Jornal Mammalogy*, 82: 109–122.
- Wichman, H.A.; Van Den Bussche, R.A.; Hamilton, M.J.; Baker, R.J. 1992. Transposable elements and the evolution of genome organization in mammals. *Genetica*, 86: 287–293.
- Wichman, H.A.; Scott, L.A.; Erickson, I.K.; Bush, K.A.; Martinez, A.R.; Cantrell, M.A. 2005. LINE dancing across 200 million years of mammalian evolution. *Biology Science*, University of Idaho, Moscow, ID 83844-3051, USA. Disponível em: [http://mampol.uab.es/cgi-bin/MamPol\\_search4.pl?MamPolref=MAMref008659&disp=20&page=1&tool=Sequences](http://mampol.uab.es/cgi-bin/MamPol_search4.pl?MamPolref=MAMref008659&disp=20&page=1&tool=Sequences). Acesso: 03/04/2023.
- Wicker, T.; Sabot, F.; Hua-Van, A.; Bennetzen J.L.; Capy. P.; Chalhoub, B.; *et al.* 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, 8: 973–982.

- Wong, H.L.; Choo, K.H.A. 2004. Evolutionary dynamics of transposable elements at the centromere. *Trends Genetics*, 20, 611-616.
- Woods, C.A.; Contreras, L.; Willner-Chapman, G.; Whidden, H.P. 1992. *Myocastor coypus*. *Mammalian Species*, 398: 1-8
- Woods, C.A. 1993. Suborder Hystricomorpha. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammals Species of the World, A Taxonomic and Geographic Reference*. Smithsonian Institution Press, Washington, 771–806p ([https://books.google.com.br/books/about/Mammal\\_Species\\_of\\_the\\_World.html?id=JgAMbNSt8ikC&redir\\_esc=y](https://books.google.com.br/books/about/Mammal_Species_of_the_World.html?id=JgAMbNSt8ikC&redir_esc=y)). Acesso: 22/05/2023.
- Woods, C.A.; Kilpatrick, C.W. 2005. Infraorde Hystricognathi. In: Wilson, DE; Reeder, DM. (Eds.) *Mammals Species of the World, A Taxonomic and Geographic Reference*. 3ª Edição. John Hopkins University Press, Baltimore MD, 1538-1600p ([https://books.google.com.br/books/about/Mammal\\_Species\\_of\\_the\\_World.html?id=JgAMbNSt8ikC&redir\\_esc=y](https://books.google.com.br/books/about/Mammal_Species_of_the_World.html?id=JgAMbNSt8ikC&redir_esc=y)). Acesso: 22/05/2023.
- Yang, L.; Scott, L.; Wichman, H.A. 2019. Tracing the history of LINE and SINE extinction in Sigmodontine rodents. *Mobile DNA*, 10: 1-11.
- Yonenaga-Yassuda, Y.; Souza, M.J.; Kasahara, S.; L'Abbate, M.; Chu, H.T. 1985. Supernumerary system in *Proechimys iheringi iheringi* (Rodentia, Echimyidae), from the state of São Paulo, Brazil. *Caryologia*, 38: 179–194.
- Zahn, J.; Kaplan, M.H.; Fischer, S.; Dai, M.; Meng, F.; Saha, A.K.; *et al.* 2015. Expansion of a novel endogenous retrovirus throughout the pericentromeres of modern humans. *Genome Biology*, 16: 1-24.
- Zhang, X.O.; Pratt, H.; Weng, Z. 2021. Investigating the Potential Roles of SINEs in the Human Genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 22:199-218.
- Zietkiewicz, E.; Labuda, D. 1996. Mosaic evolution of rodent B1 elements. *Journal of Molecular Evolution*, 42: 66-72.

## APÊNDICES

### CAPÍTULO 1

#### Apêndice 1: Matriz de dados para LINE-L1. Número de caracteres: 19; Número de caracteres informativos: 19.

PS1 = *P. guyannensis* (2n=46), PG = *P. gardneri* (2n=40), PS2 = *P. guyannensis* (2n=38), PE = *P. echinothrix*

	Caracteres	PS1	PG	PS2	PE	PL	PC
1	Assoc. 1m/10a+18m+15a+4a	1	0	1	0	0	1
2	Assoc. 7a+9a+14a/12m+6sm+18a+14a+16a /11a+10a+5a+16a /8m+10m+4sm /1m/ 11m+10a+6sm+12m	1	1	1	1	1	1
3	Assoc. 1m/3m / 6st+5sm/9a+10m+6m/5m	1	0	1	1	1	1
4	Assoc. 3a/12m+3st/1st/7m+3a	1	1	1	1	0	1
5	Assoc. 17a+12m+13m/11m+ 12m+3a/2st	1	0	0	0	1	1
6	Assoc. 2a/5m+8m+10a /14a+7a+12m	1	1	1	0	0	0
7	Assoc. 20a+16a/11a+2a/2sm/2st/9sm+8a	1	1	0	1	1	1
8	Assoc. 19a+6a/2st /1sm/5m	1	0	1	1	1	1
9	Assoc. 8a/3st	1	0	1	0	0	0
10	Assoc. 5a/4sm/4m	1	0	0	0	1	1
11	Assoc. 4m/8sm	0	1	0	0	1	0
12	Assoc. 7a/4sm/7a	0	1	1	1	0	0
13	Assoc. 21a/9m/11m/7m/17a	1	0	1	1	1	1
14	Assoc. 11sm/15m/13a/9m	1	1	1	1	0	0
15	Assoc. 17a/14m+15m	0	0	1	1	0	0
16	Assoc. 22a/13m	1	1	0	0	0	0
17	Assoc. 21a/15a	1	0	1	0	0	0
18	Assoc. 19a/18m/13a	0	1	1	0	1	0
19	Assoc. 13m/13m	0	0	0	1	0	1

(2n=32), PL = *P. longicaudatus* (2n=28), PC = *P. cuvieri* (2n=28), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st= subtelocêntrico, a = acrocêntrico.

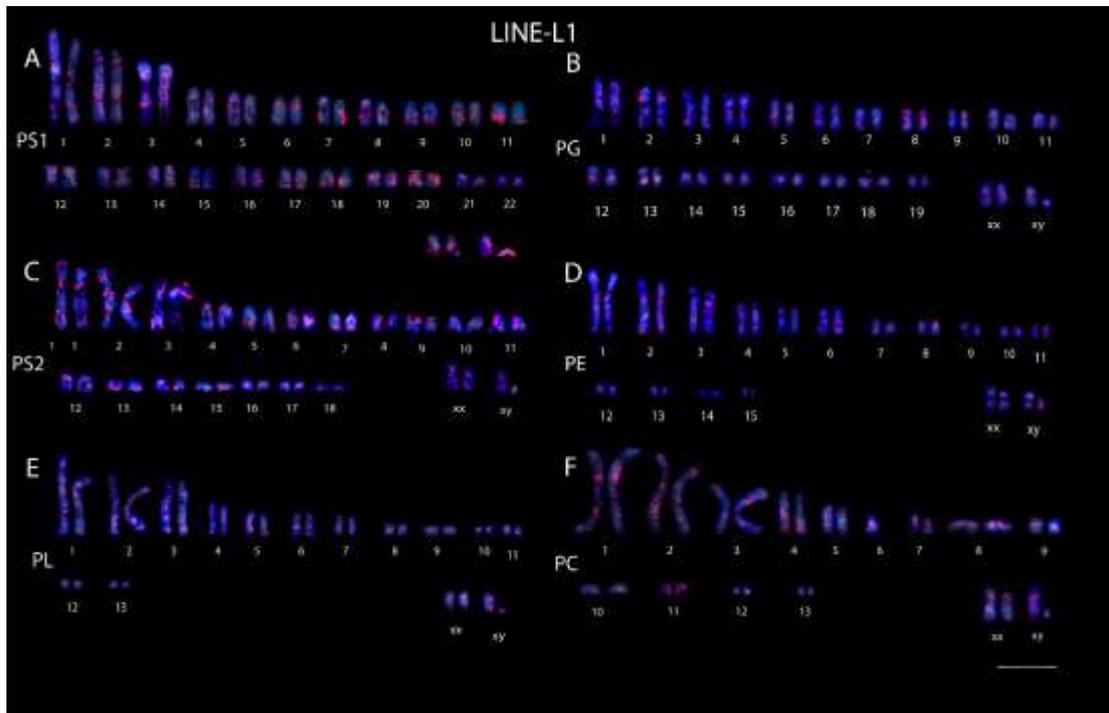
## Apêndice 2:

### Matriz de dados para SINE-B1. Número de caracteres: 27; Número de caracteres informativos: 27.

PS1 = *P. guyannensis* (2n=46), PG = *P. gardneri* (2n=40), PS2 = *P. guyannensis* (2n=38), PE = *P. echinothrix* (2n=32), PL = *P. longicaudatus* (2n=28), PC = *P. cuvieri* (2n=28), m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st= subtelocêntrico, a = acrocêntrico.

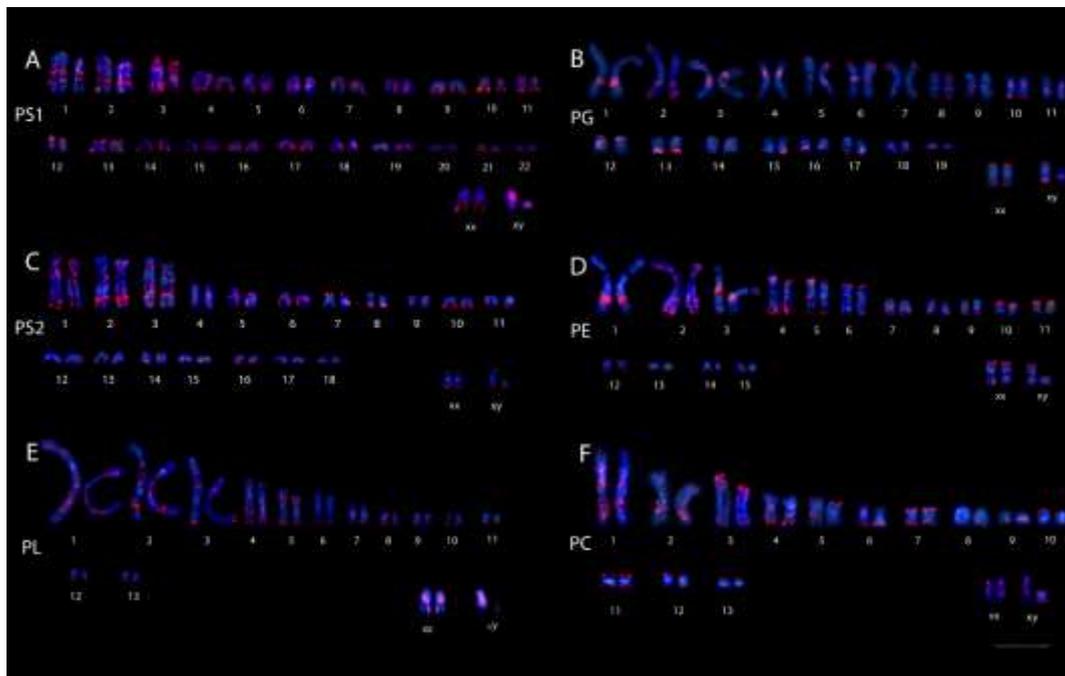
	Caracteres	PS1	PG	PS2	PE	PL	PC
1	Assoc. 1m/1m	0	0	0	0	1	1
2	Assoc. 2a/5m/3st/2st/2st	1	1	1	0	1	1
3	Assoc. 21a+6a+10a/1st/32m/3a	1	0	1	1	1	0
4	Assoc. 1a/3m/2st	1	1	1	0	0	0
5	Assoc. 1a/1sm	0	0	1	1	0	0
6	Assoc. 3a/13a+14a/7m+13a/3 <sup>a</sup>	1	1	0	0	1	1
7	Assoc. 4a/2 <sup>a</sup>	1	1	0	0	0	0
8	Assoc. 18a+15m/4sm/4m	0	1	0	0	1	1
9	Assoc. 7a/6sm/3st/13m+10a+8a	1	1	0	1	0	1
10	Assoc. 15a+19a/ 11a+19a/11m+9m/5m/5m	1	1	1	0	1	1
11	Assoc. 4sm/12a+4sm	0	1	1	0	0	0
12	Assoc. 20a+17a/10a/17a+10a/ 4sm/6m	1	1	1	1	1	0
13	Assoc. 7a/5sm	0	1	0	1	0	0
14	Assoc. 13m+12m/8m/14a+8m/6st/10m+8m/12m+7 m	1	1	1	1	1	1
15	Assoc. 9a+9m	0	1	0	1	0	0
16	Assoc. 15a/5a/9 <sup>a</sup>	1	0	1	0	1	0
17	Assoc. 11sm/10m	1	0	0	0	1	0
18	Assoc. 12m/7m/8m	0	1	1	1	0	0
19	Assoc. 14a/17a/6sm	1	1	0	0	0	1
20	Assoc. 8a/11 <sup>a</sup>	1	0	1	0	0	0
21	Assoc. 18a/6a/7 <sup>a</sup>	1	0	1	1	0	0
22	Assoc. 16a/12a/12m/11m	1	0	1	0	0	0
23	Assoc. 18m/11m	0	0	1	1	0	0
24	Assoc. 16a/13m/12m	0	1	1	0	1	0
25	Assoc. 9a/15a/15m/11m	1	0	1	1	1	0
26	Assoc. 13m/9sm	0	0	0	1	0	1
27	Assoc. 22a/16a/14m	1	0	1	0	1	0

Apêndice 3: Cariótipo das cinco espécies de *Proechimys*, macho e fêmea, incluindo dois citótipos de *P. guyannensis*. Hibridização *in situ* fluorescente do retroelemento LINE-L1.



Hibridização do retroelemento L1 em (A) PS1, *P. guyannensis* ( $2n = 46$ ); (B) PG, *P. gardneri* ( $2n = 40$ ); (C) PS2, *P. guyannensis* ( $2n = 38$ ); (D) PE, *P. echinothrix* ( $2n = 32$ ); (E) PL, *P. longicaudatus* ( $2n = 28$ ); (F) PC, *P. cuvieri* ( $2n = 28$ ). Barra=10.0  $\mu\text{m}$ .

**Apêndice 4: Cariótipo das cinco espécies de *Proechimys*, macho e fêmea, incluindo dois citótipos de *P. guyannensis*. Hibridização *in situ* fluorescente do retroelemento SINE-B1.**



Hibridização do retroelemento SINE-B1 em: (A) PS1, *P. guyannensis* ( $2n = 46$ ); (B) PG, *P. gardneri* ( $2n = 40$ ); (C) PS2, *P. guyannensis* ( $2n = 38$ ); (D) PE, *P. echinothrix* ( $2n = 32$ ); (E) PL, *P. longicaudatus* ( $2n = 28$ ); (F) PC, *P. cuvieri* ( $2n = 28$ ). Barra=10.0  $\mu\text{m}$ .

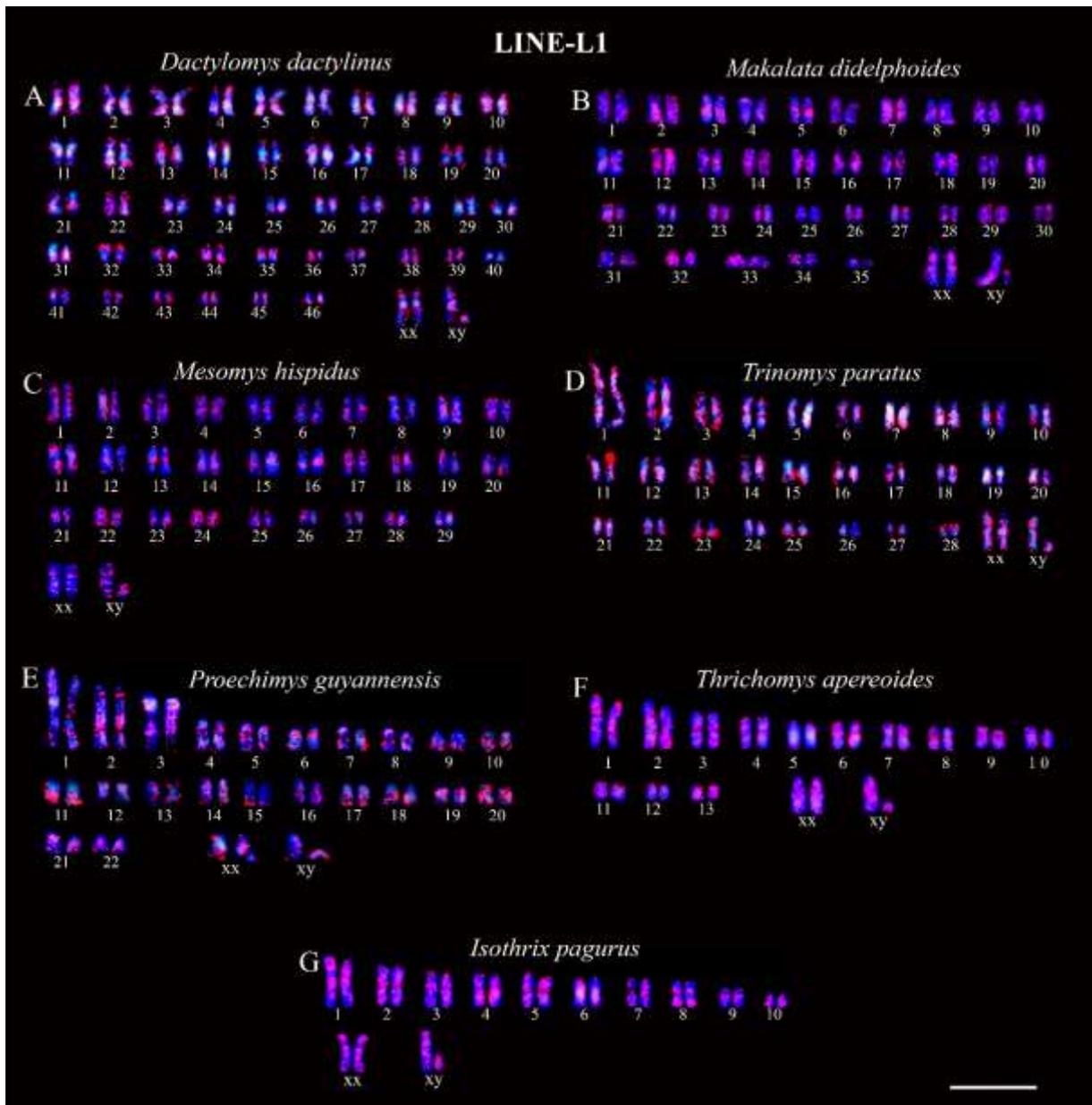
## CAPÍTULO 2

### Apêndice 5: Índice de similaridade Tamura-Kumar nas comparações entre espécies.

	<i>D. dactylinus</i>	<i>I. pagurus</i>	<i>M. didelphoides</i>	<i>M. hispidus</i>	<i>P. guyannensys</i>	<i>T. apereoides</i>	<i>T. paratus</i>
<i>D. dactylinus</i>	1						
<i>I. pagurus</i>	1,585	1					
<i>M. didelphoides</i>	0,476	1,346	1				
<i>M. hispidus</i>	0,968	0,708	0,498	1			
<i>P. guyannensys</i>	0,684	1,249	0,361	0,589	1		
<i>T. apereoides</i>	0,815	1,062	0,192	0,711	0,384	1	
<i>T. paratus</i>	0,735	1,179	0,382	0,426	0,320	0,569	1

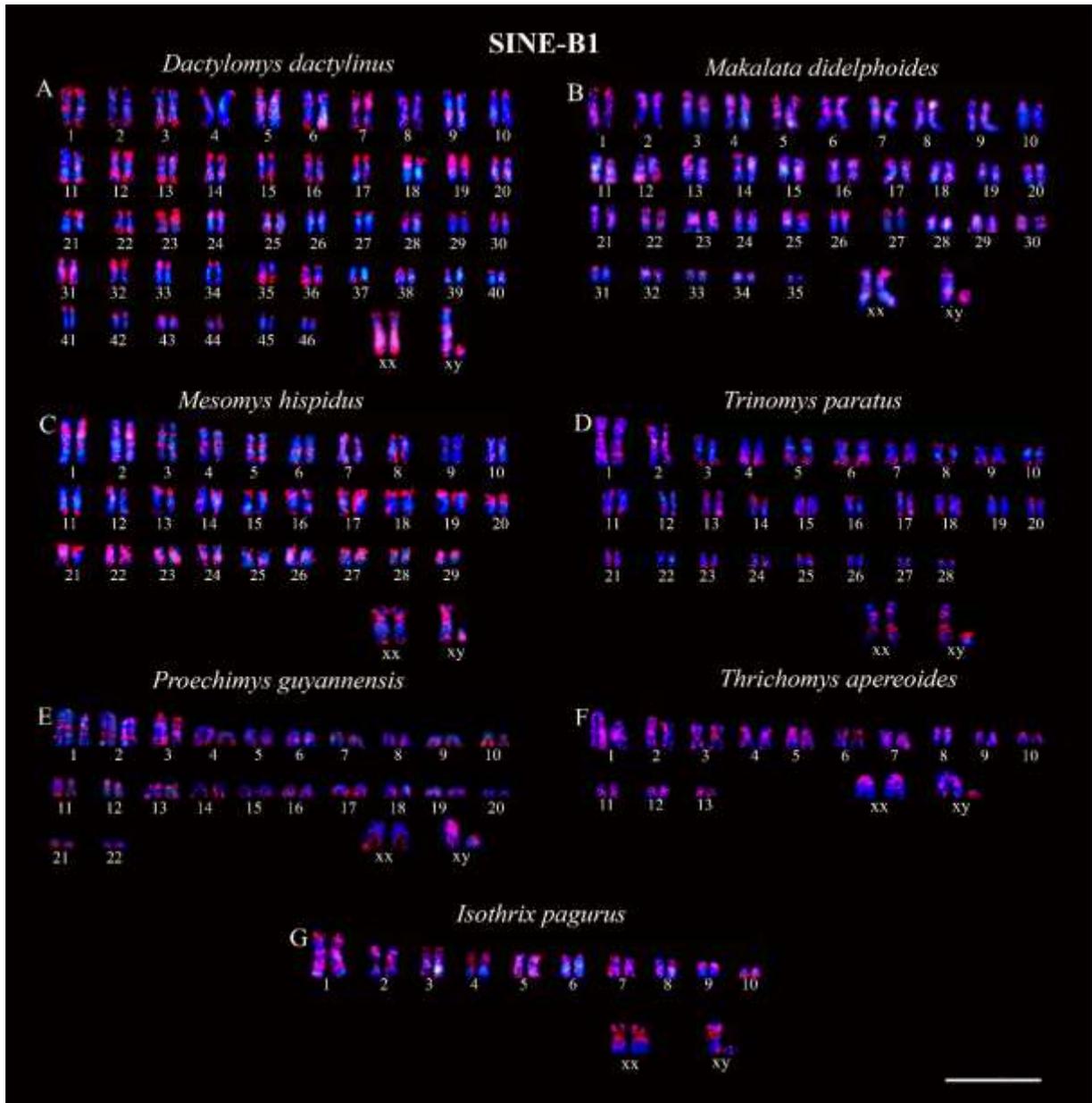
*D. dactylinus* (2n=94), *M. didelphoides* (2n=72), *M. hispidus* (2n=60), *T. paratus* (2n=58), *P. guyannensis* (2n=46), *T. apereoides* (2n=28), *I. pagurus* (2n=22).

Apêndice 6: Cariótipo das espécies da família Echimyidae. Hibridização *in situ* fluorescente do retroelemento LINE-L1



Hibridização do retroelemento L1 em: (A) *D. dactylinus* ( $2n=94$ ), (B) *M. didelphoides* ( $2n=72$ ), (C) *M. hispidus* ( $2n=60$ ), (D) *T. paratus* ( $2n=58$ ), (E) *P. guyannensis* ( $2n=46$ ), (F) *T. apereoides* ( $2n=28$ ), (G) *I. pagurus* ( $2n=22$ ). Barra=10.0  $\mu\text{m}$ .

**Apêndice 7: Cariótipo das espécies da família Echimyidae. Hibridização *in situ* fluorescente do retroelemento SINE-B1.**



Hibridização do retroelemento B1 em: (A) *D. dactylinus* (2n=94); (B) *M. didelphoides* (2n=72); (C) *M. hispidus* (2n=60); (D) *T. paratus* (2n=58); (E) *P. guyannensis* (2n=46); (F) *T. apereoides* (2n=28); (G) *I. pagurus* (2n=22). Barra=10.0  $\mu$ m.