

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Merilane da Silva Calixto

**Mapeamento cromossômico de DNA repetitivos em
espécies de morcegos da família Phyllostomidae.**

Recife

2013

Merilane da Silva Calixto

**Mapeamento cromossômico de DNA repetitivos
em espécies de morcegos da família
Phyllostomidae.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Dra. Maria José de Souza Lopes

Coorientadora: Dra. Neide Santos

Recife

2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Calixto, Merilane da Silva

Mapeamento cromossômico de DNA repetitivos em espécies de morcegos da família Phyllostomidae / Merilane da Silva Calixto. – Recife: O Autor, 2013.

138 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria José de Souza Lopes

Coorientadora: Neide Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Genética, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

1. Genética 2. DNA 3. Mapeamento cromossômico 4. Morcego I. Lopes, Maria José de Souza (orient.) II. Santos, Neide (coorient.) III. Título.

572.86

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-035

Merilane da Silva Calixto

**Mapeamento cromossômico de DNA repetitivos em espécies de
morcegos da família Phyllostomidae**

Aprovado em 16/08/2013

Banca Examinadora:

Dra. Maria José de Souza Lopes
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Martin Alejandro Montes
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Rita de Cássia de Moura
Universidade de Pernambuco

Dra. Tania Tassinari Rieger
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2013

Aos meus pais, às minhas irmãs e
ao meu esposo Wellington, com
amor dedico.

Agradecimentos

Esta Tese representa a etapa mais importante da minha vida profissional e pessoal, até hoje. Foi um período de grandes desafios e descobertas, em que empenhei grandes esforços e descobri o quão forte sou. Mas nada disso seria possível sozinha, sem a ajuda e estímulo preciosos e por isso devo merecidamente expressar os meus mais sinceros agradecimentos:

Em primeiro lugar a Deus que esteve comigo em todos os momentos, me dando força principalmente nos momentos mais difíceis onde o desânimo era notório, e por ter proporcionado mais esse momento de progresso na minha vida profissional e pessoal.

Ao meu pai Everaldo, às minhas irmãs Meriene e Merilene, e ao meu cunhado Ricardo que sempre me apoiaram, com carinho, paciência, incentivo e estímulo constantes, e por sempre acreditarem nos meus sonhos, em especial à minha mãe Marinalva que é meu porto seguro que sempre me ajudou a levantar nos momentos de fraqueza e sempre acreditou que eu conseguiria.

Ao meus lindos e amados sobrinhos Rafael, Daniel e Ítalo que sem saber me ajudaram muito nos períodos de estresse e desestímulo, renovando minhas forças com um simples sorriso ou apenas com a sua presença perto de mim.

À minha orientadora Profa. Maria José pela oportunidade em realizar esse trabalho, pela confiança depositada em mim, pela sua orientação, dedicação, disponibilidade e estímulo que foram fundamentais para a concretização desse trabalho. Saiba que tenho um profundo respeito pela pesquisadora que é.

À minha coorientadora Profa. Neide Santos que além de contribuir cientificamente para este trabalho, sempre acreditou em mim me apoiando constantemente. Agradeço pelo seu entusiasmo e motivação contagiantes que

foram fundamentais para a realização desse trabalho. Muito obrigada pelas oportunidades de crescimento profissional oferecidas a mim. Sou muito grata por tudo!

À Profa. Vilma Loreto por ter sido uma ótima colaboradora, sempre disposta a ajudar e a solucionar problemas surgidos no meio do caminho. Obrigada pelo conhecimento fornecido, pela disponibilidade, incentivo e pela amizade demonstrada.

Ao Prof. Diogo C. Cabral-de-Mello por ter sido um grande colaborador desse trabalho, pela sua enorme capacidade de transmissão de conhecimentos, estimulando o sentido crítico, o rigor e qualidade científicos.

Ao Prof. César Martins pela oportunidade de estágio no Laboratório Genômica Integrativa e pela sua colaboração que foram fundamentais para a concretização desse trabalho.

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo auxílio financeiro.

A técnica Cirlene Silva pela ajuda, amizade, conselhos e incentivo constantes durante esses quatro anos e principalmente pela maravilhosa companhia nas saídas de campo. Ao Sr. Mário pela ajuda com as coletas e por ter proporcionado tantos momentos de descontração em campo.

A minha prima e amiga Vanessa Calixto que, apesar da nossa distância física, sempre me incentivou nas minhas escolhas e me deu força de forma significativa para que eu continuasse a acreditar nos meus sonhos. Muito obrigada!

Ao meu grande amigo Izaquiel Andrade, por toda ajuda fornecida, não apenas no árduo trabalho em laboratório como em campo, mas também, e principalmente, nos momentos mais difíceis que passei durante esse trabalho,

onde o desânimo estava presente. Esteve sempre disposto a ajudar, sempre me estimulando e me fazendo acreditar que tudo daria certo e que Deus estava sempre comigo.

Aos meus grandes amigos Apolônio Florêncio, Jefferson Geovane, Marcela Pinto e Paulo Alcântara, que mesmo ausentes fisicamente no meu dia-a-dia sempre acreditaram em mim e me apoiaram nas minhas escolhas, me dando força e me estimulando a seguir em frente mesmo quando o desânimo estava presente nos momentos difíceis. Muito obrigada pelas longas conversas pelo MSN, celular, enfim por sempre terem dado um jeitinho de estar perto pra ajudar. Vocês são pessoas muito especiais!

A todos do Laboratório de Genética e Citogenética Animal: Adriana, Allison, Andrezza, Ayda, Camila, Carol, Helen, Izabela, Juliana Maria, Juliana Vieira, Kalyne, Kleison, Luana, Lucas, Luiz, Marcos, Rafael, Rafaella, Ronaldo, Suellen, Priscilla, Walter e aos colegas agregados: Santelmo e Tyago, pela boa relação pessoal que criamos, pela amizade, pelos diversos momentos de descontração e pela união que sempre fez inveja a muita gente. Muitos não permaneceram lá até o final deste trabalho, mas fizeram parte em algum momento contribuindo da mesma forma. Sempre lembrarei com muito carinho de vocês!

As minhas amigas, Jéssica Miranda, Carol Machado, Danielle Brandão pela amizade, incentivo, força, carinho, paciência e pelos momentos de descontração e humor que me proporcionaram sempre que estávamos juntas. Apesar da distância e das visitas menos frequentes, nossa amizade continua intacta por ser verdadeira.

Aos colegas do Laboratório Genômica Integrativa da UNESP: Bruno, Danilo, Érika, Guilherme, Juliana, Marcos, Pedro, Rafael e em especial a Sárah,

pela minha permanência em sua casa durante o período que permaneci em Botucatu. Pessoas muito legais que me proporcionaram bons momentos.

Ao meus amigos dos “Sindicato dos casais”: Luciana, Helena, Leka, Jean, Anderson e Ricardo, pela amizade, admiração demonstrada e força dada a mim nestes quatro anos. Por sempre acreditarem e torcerem em mim e pelos inúmeros momentos de lazer e descontração que forma fundamentais para eu renovar minhas forças

Por fim, agradeço a pessoa mais importante pra mim: meu esposo Wellington Serra que apesar de ser leigo na minha área sempre me incentivou, me motivando e apoiando nessa minha caminhada. Agradeço pelo amor incondicional e pela compreensão nos diversos momentos de ausência, seja por estar em coletas, congressos ou no período que estive por um “longo” tempo em São Paulo. Sem o seu apoio eu não teria conseguido finalizar esse trabalho e por isso sou muito grata e tenho uma admiração enorme pela pessoa maravilhosa que você é, e por você me fazer tão feliz e por eu me sentir tão amada. Muito obrigada meu amor. Eu te amo muito! E não posso deixar de agradecer ao meu cãozinho Marley que esteve ao meu lado durante toda a escrita desta Tese e leitura de artigos, principalmente por me proporcionar muito carinho e alegrias nos momentos de desânimo e dificuldades.

A ciência humana de maneira alguma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável". (Galileu Galilei).

Resumo

Para compreender a organização cromossômica de elementos repetitivos na família Phyllostomidae o mapeamento físico de genes ribossomais/sequências teloméricas e do retrotransposon MAZE/L1-like foi realizado em 12 e 13 espécies, respectivamente. O número de clusters para o gene 45S variou de um a três, com exclusiva localização autossômica exceto em *Carollia perspicillata* (cromossomo X). Para o gene 5S um único par de sítios autossômicos foi observado em todas as espécies. A FISH com sequência telomérica hibridizou os telômeros de todas as espécies, exceto em *C. perspicillata* e foram observados sítios teloméricos intersticiais (ITS) na região pericentromérica da maioria das espécies. Adicionalmente, o elemento MAZE/L1-like mostrou-se presente na região centromérica (regiões heterocromáticas) dos cromossomos de todas as espécies, exceto em *Chrotopterus auritus*, e algumas espécies apresentaram o enriquecimento desse elemento no braço longo do cromossomo X e outras apresentaram sinais de hibridização na região proximal dos braços cromossômicos do X. Esses resultados indicam que distintas forças evolutivas atuam no genoma de Phyllostomidae, bem como podemos especular que a presença do elemento MAZE/L1-like em regiões heterocromáticas centroméricas seja pela baixa pressão seletiva que atua nestas regiões genômicas e pelo seu envolvimento com funções centroméricas. Além disso, a localização de elementos repetitivos em regiões centroméricas fornece um bom marcador molecular com aplicações em estudos de evolução e rearranjos cromossômicos.

Palavras-chave: DNA repetitivo; heterocromatina; retrotransposons; DNA ribossomal; sequências teloméricas; Phyllostomidae.

Abstract

To understand the chromosomal organization of repetitive elements in the Phyllostomidae family the physical mapping of ribosomal genes/telomeric sequences and MAZE/L1-like retrotransposon was performed in 12 and 13 species, respectively. The number of clusters for the 45S gene ranged from one to three, with location autosomal exclusive except in *C. perspicillata* (X chromosome). To 5S gene 5S a single site was observed in all species with location autosomal exclusive. The FISH with telomeric sequence hybridized telomeres of all species, except in *C. perspicillata* and were observed interstitial telomeric sites (ITS) in the pericentromeric region of most species. Additionally, the element MAZE/L1-like was present on centromeric regions (heterochromatic regions) of the chromosomes of all species, except in *Chrotopterus auritus*, and some species showed enrichment of this element on the long arm of X chromosome and showed other signs hybridization in the proximal region of the X chromosome arms. These results indicate that different evolutionary forces act on the genome of Phyllostomidae and we can speculate that the presence of element MAZE/L1-like in centromeric heterochromatic regions is due low selective pressure acting on these genomic regions and their involvement with centromeric functions. Furthermore, the location of repetitive elements in the centromeric region provides a good marker for applications in molecular evolution studies and chromosomal rearrangements.

Key words: repetitive DNA; heterochromatin; retrotransposable; ribosomal DNA; telomeric sequences; Phyllostomidae.

Lista de Ilustrações

Revisão da Literatura

- Figura 1** Esquema da organização dos DNAs repetitivos nos Eucariotos 29
(Adaptado de Martins et al., 2011).
- Figura 2** Organização dos genes que codificam o RNAr 45S (DNAr) em 30
Eucariota. Os genes estão organizados em unidades repetidas *in tandem* como esquematizado na parte superior. Uma unidade típica ampliada é mostrada em detalhe. As posições dos três genes de RNAr (18S, 5.8S, 28S) estão em azul e as regiões processadas estão em branco (ETS = Espaçadores Transcritos Externos; ITS = Espaçadores Transcritos Internos). Entre as unidades de transcrição estão os Espaçadores Intergênicos = IGS (Martins et al., 2011).
- Figura 3** Organização dos genes de RNAr 5S no genoma de Eucariota. 31
Os genes estão organizados em unidades repetidas *in tandem* como esquematizado na parte superior. Uma unidade típica ampliada é mostrada em detalhe. NTS = Espaçador Não Transcrito (Martins et al., 2011).
- Figura 4** Estrutura geral dos principais elementos transponíveis 38
(Adaptado de Martins et al., 2011).

Capítulo I

- Figura 1** Fluorescence in situ hybridization with 45S rDNA probe in 50
mitotic metaphases. a *Artibeus cinereus*, b *A. lituratus*, c *A.*
planirostris, d *Platyhrrinus lineatus*, e *Sturnira lillium*, f *Carollia*
perspicillata, g *Glossophaga soricina*, h *Phyllostomus discolor*,
i *P. elongatus* and j *Trachops cirrhosus*. The arrowheads
indicate the chromosomes carrying the 45S rDNA sites. Bar 5
lm. In g the 45S sites is shown in green, whereas pink sites
correspond to detected 5S rDNA sites.
- Figura 2** Fluorescence in situ hybridization with 5S rDNA probe on 51
mitotic metaphases. a *Artibeus cinereus*, b *A. lituratus*, c *A.*
obscurus, d *A. planirostris*, e *Platyhrrinus lineatus*, f *Sturnira*
lillium, g *Carollia perspicillata*, h *Glossophaga soricina*, i
Lonchorhina aurita, j *Phyllostomus discolor*, k *P. elongatus*
and l *Trachops cirrhosus*. The arrow indicate the chromosome
carrying the 5S rDNA sites. Bar 5 lm
- Figura 3** Fluorescence in situ hybridization with telomeric sequence 52
probe (TTAGGG)_n in mitotic metaphases. a *Artibeus cinereus*,
b *A. lituratus*, c *A. obscurus*, d *A. planirostris*, e *Platyhrrinus*
lineatus, f *Sturnira lillium*, g *Carollia perspicillata*, h
Glossophaga soricina, i *Lonchorhina aurita*, j *Phyllostomus*
discolor, k *P. elongatus* and l *Trachops cirrhosus*. Bar 5 lm

Capítulo 2

Figura 1 Idiogram with C-banding pattern. (a) *Artibeus lituratus*, (b) *A. planirostris*, (c) *A. obscurus*, (d) *A. cinereus*, (e) *Sturnira lilium*. 76
Note the differential staining of the long arm of the X chromosome.

Figura 2 Idiogram with C-banding pattern. (a) *Phyllostomus elongatus*, (b) *Platyrrhinus lineatus*, (c) *Lonchorhina aurita*, (d) *Carollia perspicillata*, (e) *Glossophaga soricina*, (f) *Chrotopterus auritus*, (g) *Diaemus yongii*, (h) *Diphylla ecaudata*. 77

Figura 3 Element repetitive centromeric MAZE/L1-like in Phyllostomidae bats. (a) *Artibeus lituratus*, (b) *A. cinereus*, (c) *Sturnira lilium*, (d) *A. obscurus*, (e) *Platyrrhinus lineatus*, (f) *Carollia perspicillata*, (g) *A. planirostris*, (h) *Glossophaga soricina*, (i) *Phyllostomus elongatus*, (j) *Diphylla ecaudata*, (k) *Lonchorhina aurita*, (l) *Diaemus yongii*, (m) *Chrotopterus auritus*. Arrowheads indicate the chromosome X. Bar = 5µm. 78

Lista de Tabelas

Revisão da Literatura

Tabela 1	Número de gêneros e espécies por famílias da subordem Yangochiroptera dentro da ordem Chiroptera descritas no Brasil.	23
-----------------	---	----

Capítulo I

Tabela 1	Chromosomal features and location of repetitive DNAs mapped for studied species	47
Tabela 2	C-banding data from the analyzed Phyllostomidae species.	49

Capítulo II

Tabela 1	Chromosomal features of the studied species.	75
-----------------	--	----

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

2n - Número diploide

AgNO₃ - Nitrato de prata)

CMA₃ - Cromomicina A₃

Constitutive Heterochromatin - CH

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

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNAr - DNA ribossomal

DNA satélite – DNAsat

ET - Elemento Transponível

ETs - Elementos Transponíveis

ETS - External Transcribed Spacer

FISH - Hibridização *in situ* Fluorescente (Fluorescence *in situ* Hybridization)

HC - Heterocromatina Constitutiva

IGS - Espaçadores Intergênicos

ITS - Espaçadores Internos Transcritos (Internal transcribed spacer

ITS - Sítios Teloméricos Intersticiais

Junk DNA - DNA lixo

LINEs - Long Interspersed Nuclear Elements

LTR - Long Terminal Repeat

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NF - número fundamental

non-LTR - non-Long Terminal Repeat

NTS - *Non Transcribed Spacer*

ORF - Open Reading frame

PCR - Polymerase Chain Reaction

Rb - Fusão Robertsoniana

rDNA - ribosomal DNA

RNA - Ácido ribonucleico

RNAr - RNA ribossomal

rRNA - ribosomal RNA

RON - Região Organizadora de Nucléolo

RONs - Regiões Organizadoras de Nucléolos

TEs - Transposable Elements

(TTAGGG)_n - Sequência telomérica

VNTR - Variable Numbers of Tandem Repeats

Sumário

Resumo	x
Abstract	xi
Lista de ilustrações	xii
Lista de Tabelas	xv
Lista de abreviaturas, Siglas e Símbolos	xvi
1. Introdução	19
2. Revisão da Literatura	21
2.1 Considerações gerais sobre morcegos	21
2.2 Família Phyllostomidae	23
2.2.1 Aspectos Gerais	23
2.2.2 Aspectos citogenéticos e evolutivos	24
2.2.3 Heterocromatina em morcegos: ênfase para a família Phyllostomidae	25
2.3 DNAs repetitivos	27
2.3.1 Características gerais dos DNAs repetitivos e organização dos genomas	27
2.3.2 Elementos transponíveis e seu papel na evolução do Genoma	37
2.3.3 Retrotransposons	40
2.3.4 Transposons	41
3. Objetivos	45
3.1 Objetivo Geral	45
3.2 Objetivos Específicos	45
4. Capítulo I	46
Patterns of rDNA and telomeric sequences diversification: contribution to repetitive DNA organization in Phyllostomidae bats.	47
5. Capítulo II	56
A centromeric repetitive L1-like DNA is conserved among Phyllostomidae bats species (Chiroptera).	57
6. Discussão geral	79
7. Conclusões gerais	90
8. Referências Bibliográficas	91
9. Anexos	102
9.1 Protocolos	102
9.2 Instruções para autores	112
10. Curriculum Vitae (Lattes)	123

1. Introdução

Os morcegos compreendem um dos mais antigos grupos de mamíferos e apresentam características morfofisiológicas peculiares que possibilitam o voo verdadeiro. Na maioria das espécies, a ecolocalização permite explorar uma variedade de nichos ecológicos permitindo aos morcegos ocupar abrigos menos expostos à predação e à competição, e aproveitar de forma mais eficiente os recursos naturais oferecidos pelo meio ambiente. Consequentemente, esses organismos apresentam uma ampla distribuição geográfica fazendo deles um grupo bem sucedido que está representado nas regiões temperadas e tropicais de todos os continentes e em muitas áreas, com uma grande diversidade de espécies e ampla variedade de hábitos alimentares.

Do ponto de vista biológico e citogenético os representantes da família Phyllostomidae são os mais estudados dentro da ordem Chiroptera. Representam uma família extremamente diversificada em termos de morfologia e estratégia alimentar, o que determina considerável controvérsia aos estudos sistemáticos e filogenéticos de alguns gêneros e espécies.

Nos últimos anos o estudo citogenético molecular vem sendo realizado em diferentes organismos, com a utilização de sondas específicas para localização de sequências cromossômicas, através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Esta técnica tem fornecido novos elementos para os estudos de evolução cariotípica e genômica de diferentes espécies pelas suas inúmeras aplicações como: construção de mapas físicos de cromossomos, análise de estruturas e rearranjos cromossômicos e estudo de estrutura, função e evolução de cromossomos e genomas.

Em morcegos a técnica de FISH tem sido utilizada principalmente para a localização de diferentes tipos de sequências de DNA repetitivo, incluindo DNA ribossomal (45S e 5S) e DNA satélite. Tais marcadores cromossômicos aliados aos estudos taxonômicos têm contribuído para uma melhor compreensão dos mecanismos de evolução envolvidos durante a diversificação e história evolutiva das espécies. Análises moleculares realizadas tanto em nível de família como em níveis taxonômicos inferiores têm permitido a obtenção de informações importantes que na maioria das vezes não são identificadas ou reconhecidas pelos estudos morfológicos nos quais se baseavam a maior parte da classificação das espécies.

Para melhor entender a organização cromossômica estrutural e os mecanismos evolutivos ocorridos ao longo da evolução de morcegos da família Phyllostomidae, a caracterização da organização cromossômica de sequências de DNAs repetitivos foi realizada através do mapeamento físico dessas sequências em representantes das espécies *Artibeus cinereus*, *A. lituratus*, *A. obscurus*, *A. planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Chrotopterus auritus*, *Diaemus youngii*, *Diphylla ecaudata*, *Glossophaga soricina*, *Lonchorhina aurita*, *Phyllostomus discolor*, *P. elongatus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira lillium* e *Trachops cirrhosus*.

2. Revisão da Literatura

2.1 Considerações gerais sobre morcegos

A ordem Chiroptera é composta dos únicos mamíferos capazes de executar um voo verdadeiro, graças a determinadas estruturas especializadas. O nome Chiroptera provém do grego “*Cheir*” (mão) e “*ptero*” (asa), indicando que a asa de um morcego é uma mão altamente modificada com membros anteriores alongados, que possuem uma membrana elástica (patágio) sustentada pelos dedos e ossos ligando-se aos membros posteriores e aos lados do corpo (Peracchi *et al.*, 2011).

A habilidade de voar, juntamente com a ecolocalização e hábitos noturnos possibilitam esses animais a explorarem uma grande variedade de nichos ecológicos, levando ao desenvolvimento de muitas especializações morfológicas e hábitos alimentares como resposta às adaptações a estes nichos. A ocupação em diferentes nichos tornam esses animais fundamentais para a manutenção das relações tróficas nos ecossistemas (Simmons, 2005).

Os hábitos alimentares dos morcegos são bastante variados e sua diversidade de dietas não encontra semelhança em nenhum outro grupo de mamíferos, utilizando como alimento: insetos e pequenos artrópodes, frutos, sementes, folhas, flores, pólen, néctar, pequenos vertebrados e sangue, predominando o hábito insetívoro nos Yangochiroptera. As espécies frugívoras, nectarívoras, carnívoras e hematófagas são localizadas nas regiões tropicais e subtropicais, enquanto as insetívoras são encontradas em quase todas as regiões do globo, normalmente se refugiando em cavernas, minas, fendas de rochas e casca de árvores, cavidades no tronco e nos galhos das árvores, bem como em

folhagens e construções humanas. Podem se reunir em grandes ou pequenos grupos e coabitar com outras espécies formando colônias (Perachi *et al.*, 2011).

De acordo com a classificação atual a ordem Chiroptera está dividida em duas subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera. A subordem Yinpterochiroptera está representada por seis famílias: Rhinolophidae, Hipposideridae, Hipposideridae, Hipposideridae, Craseonycteridae, Megadermatidae e Pteropodidae, enquanto a Yangochiroptera compreende 14 famílias das quais nove destas têm ocorrência nas Américas estando todas representadas no Brasil (Tabela 1) (Perachi *et al.*, 2011; Paglia *et al.*, 2012).

Os morcegos são considerados o segundo maior grupo de mamíferos em abundância representando aproximadamente 21% de todas as espécies com ampla distribuição mundial (IUCN, 2013) e compreende cerca de 1150 espécies agrupadas em 202 gêneros e 20 famílias (Gardner, 2008).

No Brasil foi descrita cerca de 170 espécies pertencentes a nove famílias de Yangochiroptera (Tabela 1), que habitam todo o território nacional, ocorrendo na Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Nordeste, Pampas gaúchos e em áreas urbanas (Paglia *et al.*, 2012). Com base nesses números, o Brasil tem aproximadamente 15% das espécies de morcegos do mundo sendo assim o segundo maior em diversidade de espécies (Alberico *et al.*, 2000).

As características biológicas especiais desses animais, bem como sua alta diversidade, juntamente com seu papel na economia, ecologia e saúde pública tornam esse grupo um importante objeto de estudos. Diversos trabalhos com diferentes enfoques, tais como biologia, fisiologia, citogenética, morfometria, sistemática e taxonomia vêm sendo realizados há décadas com o intuito de contribuir para o melhor conhecimento desses mamíferos (Souza e Araújo, 1990;

Passos *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2009; Jarrín *et al.*, 2010; Sotero-Caio *et al.*, 2011; Lemos-Pinto *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Czenze *et al.*, 2013; Jones, 2013; Sun *et al.*, 2013).

Tabela 1: Número de gêneros e espécies por famílias da subordem

Yangochiroptera dentro da ordem Chiroptera descritas no Brasil

Famílias	Nº de gêneros	Nº de espécies
Emballonuridae	7	15
Furipteridae	1	1
Molossidae	7	26
Mormoopidae	1	4
Natalidae	1	1
Noctilionidae	1	2
Phyllostomidae	40	90
Thyropteridae	1	4
Vespertilionidae	5	24
Total	64	167

Fonte: Paglia *et al.* (2012).

2. 2 Família Phyllostomidae

2.2.1 Aspectos gerais

Os morcegos da família Phyllostomidae são conhecidos como “leaf-nosed bats” por terem um apêndice nasal (folha nasal) em forma de ponta de lança (exceto os representantes da subfamília Desmodontinae que tem a folha nasal em forma de ferradura) (Baker *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2007). Phyllostomidae representa uma das famílias mais diversificadas possuindo o maior número de gêneros (57) e espécies (160) entre os Chiroptera Neotropicais, agrupados em 11 subfamílias: Carollinae, Desmodontinae, Glossophaginae, Glyphonycterinae, Lonchophyllinae, Lonchorhininae, Macrotinae, Micronycterinae,

Phyllostominae, Rhinophyllinae e Stenodermatinae (Baker *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2011; Paglia *et al.*, 2012).

A família Phyllostomidae é endêmica do continente americano e caracteriza-se como um grupo de hábito alimentar bem variado entre os Chiroptera, podendo explorar frutos, néctar, pólen, folhas, insetos, pequenos vertebrados e sangue. Esta variedade de hábitos alimentares tem sido importante para que a família possa habitar vários nichos ecológicos, mas ao mesmo tempo dificulta a reconstrução da história filogenética do grupo há mais de um século sem um consenso definitivo (Simmons, 2000; Wetterer *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003). Esses morcegos habitam todo o território nacional, ocorrendo na Amazônia, Cerrado, Caatinga, Floresta Atlântica, Pantanal e em áreas urbanas (Paglia *et al.*, 2012).

2.2.2 Aspectos citogenéticos e evolutivos

A evolução cromossômica da família Phyllostomidae sempre foi um assunto bastante discutido uma vez que vários estudos citogenéticos realizados em seus representantes têm revelado uma variabilidade no número diploide ($2n$) e número fundamental (NF = número de braços autossômicos). Essa variabilidade vai de $2n=14$ em *Vampyressa melissa* (Stenodermatinae) até $2n=46$ em *Macrotus waterhousii* (Macrotinae) e $NF=20$ em *Tonatia bidens* até $NF=68$ em *Micronycteris megalotis*, sendo os números mais frequentes $2n=30/32$ e $NF=56/60$ (Baker, 1970), representando mais de 50% dos cariótipos encontrados nos representantes da família Phyllostomidae.

Embora ocorra uma alta frequência de cariótipos com $2n=32$ e $NF=60$ entre as diferentes espécies de Phyllostomidae, Baker (2006) propõe que o

cariótipo ancestral para a família corresponde a $2n=46$ e $NF=60$, similar ao observado em *Mracotus waterhousii*, indicando que a evolução cariotípica entre os filostomídeos pode ter levado a uma redução dos números diploides através de eventos de fusão cêntrica.

Análises citogenéticas realizadas por Baker e Bickham (1980) em várias espécies de morcegos indicam que a evolução cariotípica de algumas famílias da ordem Chiroptera (Phyllostomidae, Mormoopidae, Mystacinidae e Vespertilionidae) não ocorreram de maneira uniforme, com algumas apresentando mudanças rápidas, enquanto outras, uma lenta taxa de evolução cromossômica. De acordo com Varella-Garcia *et al.* (1989) esta não uniformidade na evolução cromossômica é uma característica de toda a ordem Chiroptera.

2.2.3. Heterocromatina em morcegos: ênfase para a família Phyllostomidae

A análise dos DNAs repetitivos em morcegos vem sendo realizada através de diferentes técnicas citogenéticas, principalmente relacionadas à distribuição e qualificação da heterocromatina constitutiva. Dentre estas técnicas as mais aplicadas em estudos em representantes da ordem Chiroptera são o bandeamento C e em menor frequência o uso de fluorocromos base-específicos (CMA₃ e DAPI). Em geral a heterocromatina em morcegos encontra-se preferencialmente localizada nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, podendo em algumas espécies serem observados blocos adicionais em regiões intersticiais e/ou terminais de alguns cromossomos (Varella-Garcia *et al.*, 1989; Varella-Garcia e Taddei, 1989; Souza e Araújo, 1990).

Na família Phyllostomidae o padrão mais comum é a presença de HC na região pericentromérica de todos os cromossomos, contudo tem sido observado um padrão de distribuição de HC nas regiões distais e/ou intersticiais de algumas espécies como: *Carollia perspicillata*, *Choeroniscus minor*, *Glossophaga soricina*, *Artibeus lituratus*, *A. planirostris*, *A. jamaicensis*, *A. obscurus*, *A. cinereus*, *Diaemus youngi*, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata*, *Anoura caudifer*, *Uroderma magnirostrum*, *U. bilobatum*, *Sturnira lillium* e *Platyrrhinus lineatus* (Varella-Garcia *et al.*, 1989; Souza e Araújo, 1990; Baker *et al.*, 1992; Santos e Souza, 1998a,b; Volleth *et al.*, 1999; Neves *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005).

Nos cromossomos sexuais geralmente esta fração genômica encontra-se restrita à região pericentromérica. Contudo, em alguns representantes da ordem Chiroptera com sistema sexual simples, em geral, o cromossomo Y apresenta-se quase totalmente heterocromático. Do mesmo modo, aqueles que têm sistema sexual múltiplo XY_1Y_2 exibem o Y_1 (Y original) heterocromático, diferindo apenas pela presença de blocos característicos do Y_2 (homólogo livre do autossomo translocado ao Xp). Por outro lado, as espécies que apresentam sistema sexual do tipo neo-XY, destacam-se pela presença simultânea de dois padrões distintos de HC nos braços curto e longo do Y. Na subfamília Stenodermatinae, várias espécies apresentam blocos pericentroméricos de HC no cromossomo X, adicionalmente o braço longo deste cromossomo mostra um padrão diferencial de sua cromatina (Souza e Araújo, 1990; Morielle-Versute *et al.*, 1992; Santos e Souza, 1998 a,b; Rodrigues *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001).

2.3 DNAs repetitivos

2.3.1 Características gerais dos DNAs repetitivos e organização dos genomas

Diversos estudos relacionados ao tamanho de genomas em eucariotas têm revelado grande variação de quantidade de DNA entre as diferentes espécies dos mais diversos grupos. Esta variação ocorre independentemente da complexidade do organismo e não apresenta relação com a quantidade de genes apresentados pelos organismos nem com o nível de ploidia (Gregory, 2005).

A ampla variação de quantidade de DNA nos genomas animais tem sido atribuída a diferentes quantidades de DNAs repetitivos nos diversos genomas, sendo a presença destes elementos uma característica ubíqua em eucariotas. As sequências repetitivas de DNA compreendem uma grande porção do genoma da maioria dos organismos e são caracterizadas por ampla variabilidade, constituindo distintas famílias, podendo representar grande parte da quantidade de DNA das células, em alguns casos excedendo mais de 80% da quantidade de DNA da espécie. Os estudos genéticos e citogenéticos-moleculares têm demonstrado que as sequências de DNAs repetitivos podem ser muito úteis como ferramentas para definir a estrutura e revelar a organização e evolução do genoma das espécies, uma vez que tais sequências podem ser facilmente isoladas e encontram-se distribuídas em diversas regiões do genoma, gerando sinais de fácil visualização após hibridização de sondas específicas nos cromossomos (Martins *et al.*, 2011).

Embora por muito tempo os DNAs repetitivos tenham sido classicamente considerados como “*junk DNAs*” (DNA lixo) pela ausência de funções biológicas bem definidas relacionadas à sua atividade e expressão (Doolittle e Sapienza,

1980; Orgel e Crick, 1980), vários estudos sugerem o envolvimento dessas sequências na organização estrutural e funcional do genoma, como por exemplo, no processo de replicação do DNA (Li *et al.* 2002), na expressão gênica (Liu *et al.*, 2001) e na recombinação (Biet *et al.*, 1999). Tais sequências repetitivas parecem também estar envolvidas em rearranjos cromossômicos como inversões, duplicações, deleções e translocações recíprocas, sendo significativamente responsáveis pelas variações cariotípicas observadas em muitos grupos (Kidwell, 2002).

Além disso, alguns estudos têm demonstrado expressão e envolvimento dos elementos repetitivos na formação da heterocromatina e em processos de regulação gênica. Possivelmente o papel mais significativo das sequências repetitivas esteja relacionado aos segmentos presentes nas regiões centroméricas, teloméricas e intersticiais dos braços cromossômicos, desempenhando funções cruciais na manutenção e propagação do material genético nuclear, uma vez que são regiões onde frequentemente a heterocromatina é encontrada (Shapiro e Sternberg, 2005; Biémont e Vieira, 2006; Feschotte e Pritham, 2007).

De acordo com as suas características principais, os DNAs repetitivos são classificados em sequências codificantes e não-codificantes. As sequências codificantes compreendem as famílias multigênicas compostas por DNAs codificadores como os genes de RNAs ribossomais e genes de proteínas histônicas. Por sua vez, as sequências não-codificantes compreendem dois tipos: a) Sequências repetidas in tandem (lado a lado), classificadas em três subgrupos de acordo com o tamanho do seu fragmento: (1) DNA satélite, (2) minissatélites e

(3) microssatélites; b) Sequências dispersas no genoma que compreendem os elementos transponíveis (Figura 1) (Martins et al., 2011).

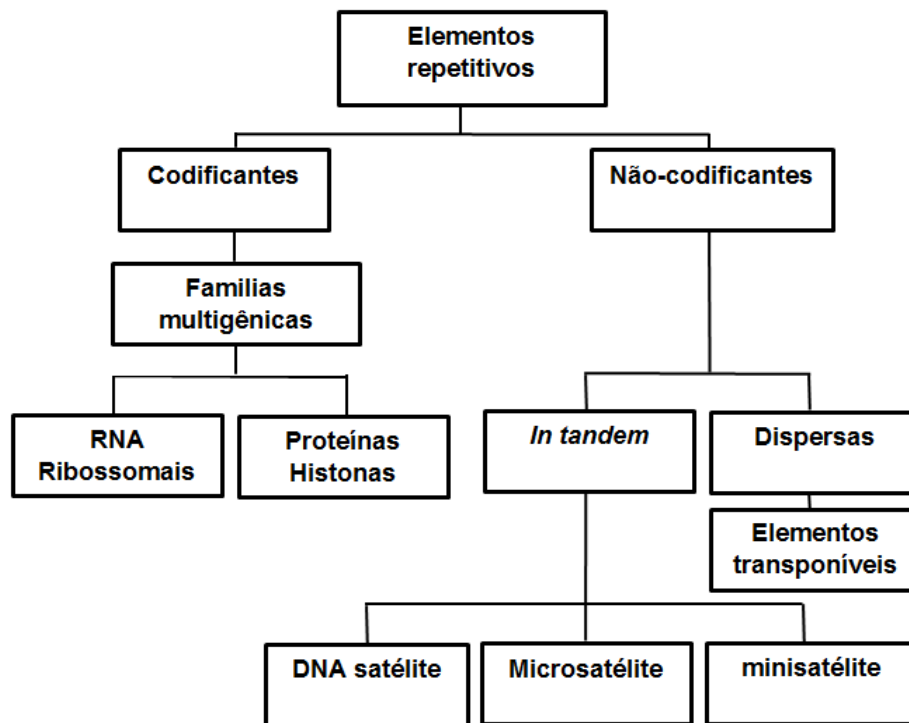


Figura 1. Esquema da organização dos DNAs repetitivos nos Eucariotos (Adaptado de Martins et al., 2011).

As famílias multigênicas são um grupo de sequências de DNA (genes) com similaridade estrutural e funcional, descendentes de um gene ancestral comum. Dentre estas sequências são exemplos conhecidos os genes de RNAs ribossomais (RNAr) e genes codificadores de proteínas histônicas (Nei e Rooney, 2005).

As sequências de DNA ribossomal (DNAr) são constituídas de sequências de nucleotídeos muito conservadas evolutivamente e podem ser encontradas em todos os eucariotas organizadas em dois distintos grupos arranjados *in tandem*. O

arranjo maior (DNAr 45S) é formado pelos genes que transcrevem os RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S, sendo estas sequências separadas por espaçadores intergênicos transcritos internos (ITS-Internal Transcribed Spacer) e cada cluster de DNAr 45S separado por espaçadores transcritos externos (ETS-External Transcribed Spacer) e por espaçadores intergênicos (IGS) (Figura 2), encontrando-se em áreas cromossômicas específicas correspondentes às regiões organizadoras de nucléolos (RONs) (Eickbush e Eickbush, 2007).

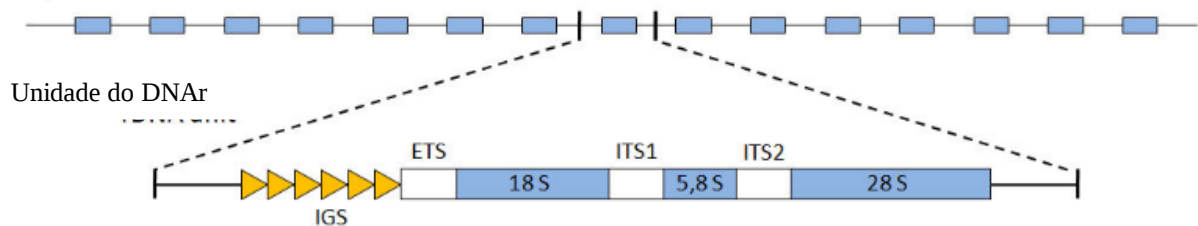


Figura 2. Organização dos genes que codificam o RNAr 45S (DNAr) em Eucariota. Os genes estão organizados em unidades repetidas *in tandem* como esquematizado na parte superior. Uma unidade típica ampliada é mostrada em detalhe. As posições dos três genes de RNAr (18S, 5.8S, 28S) estão em azul e as regiões processadas estão em branco (ETS = Espaçadores Transcritos Externo; ITS = Espaçadores Transcritos Internos). Entre as unidades de transcrição estão os Espaçadores Intergênicos = IGS (Martins *et al.*, 2011).

O outro arranjo é formado pelas sequências dos genes que transcrevem o RNAr 5S e não está envolvido na formação das RONs. Estes genes são bastante conservados e espaçados por sequências não transcritas (NTS-*Non Transcribed Spacer*) que são extremamente variáveis em tamanho e composição nucleotídica (Figura 3) (Eickbush e Eickbush, 2007; Martins *et al.*, 2011). Ambas as classes de DNAr estão presentes em cópias múltiplas organizadas *in tandem* (Levsky e Singer, 2003; Raska *et al.*, 2004).

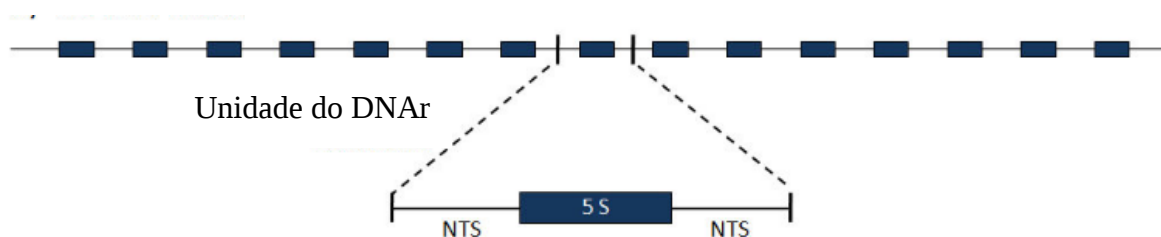


Figura 3. Organização dos genes de rRNA 5S no genoma de Eucariota. Os genes estão organizados em unidades repetidas *in tandem* como esquematizado na parte superior. Uma unidade típica ampliada é mostrada em detalhe. NTS = Espaçador Não Transcrito (Martins *et al.*, 2011).

Em eucariotas inferiores o gene 5S pode ser agrupado em simples ou múltiplos sítios dentro do genoma e pode ser encontrado interespaçado com outros genes multicópias, incluindo o DNAr 45S. Os genes de DNAr 45S em mamíferos são geralmente encontrados em mais de um par cromossômico, diferentemente do que ocorre com os genes de DNAr 5S que, em geral, são observados em apenas um par cromossômico (Raska *et al.*, 2004; Weider *et al.*, 2005; Mcstay e Grummt, 2008).

Em morcegos alguns estudos são concentrados na descrição do número e localização dos sítios de DNA ribossomal (DNAr), principalmente DNAr 45S, através do mapeamento desses genes por meio da técnica de FISH em algumas espécies (Baker *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 2001, 2002; Leite-Silva *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2010), que tem permitido confirmar a localização de sítios de genes de RNAr 45S independentemente de sua atividade (Santos *et al.*, 2002).

Baker *et al.* (1992) analisaram comparativamente o número de sítios de DNAr 45S em 50 espécies de morcegos (compreendendo sete famílias e 38 gêneros). E observaram que o número de sítios de DNAr por complemento cromossômico variou de um a quatro pares. Além da pequena quantidade de

sítios ribossomais observados em morcegos, também se verificou pouca variação entre as espécies analisadas.

O mapeamento físico do DNAr 45S através da FISH tem sido uma forma complementar e/ou alternativa da impregnação com AgNO₃, uma vez que esta técnica evidencia os sítios gênicos independentes da sua ativação. Santos *et al.* (2002) ao analisarem 13 espécies de filostomídeos pertencentes aos gêneros *Artibeus*, *Glossophaga*, *Phyllostomus*, *Phyllosderma*, *Platyrrhinus*, *Tonatia* e *Trachops*, utilizando a impregnação com AgNO₃ para detectar os sítios que se encontravam ativos e a FISH com sonda de DNAr 18S para confirmar a localização desses sítios. Esses autores descreveram que nove das espécies apresentaram apenas um par cromossômico com RON ativa, enquanto as espécies do gênero *Artibeus* apresentaram múltiplas RONS ativas, variando de dois a três pares, confirmando o número e a posição das RONS em todas as espécies. Por outro lado, *A. cinereus* apresentou sinais de hibridização em um par cromossômico adicional, indicando a ocorrência de RON silenciosa nessa espécie.

Em representantes da família Molossidae, Leite-Silva *et al.* (2003) identificaram os genes ribossomais no par 5 de *Molossus ater*, *M. molossus* e nos pares 5, 9 e 10 de *Molossops planirostris* e ao compararem com os resultados obtidos com a impregnação com AgNO₃, confirmaram que todas as RONS dessas espécies são transcricionalmente ativas.

No trabalho de Gomes *et al.* (2010), uma população de *Rhinophylla fischeriae* da Amazônia foi analisada pela citogenética clássica e molecular através de FISH com sonda telomérica e de genes ribossomais 28S e 18S, comparando com dados previamente descritos na literatura. Os genes

ribossomais estavam presentes na região proximal dos braços longos dos cromossomos 16 e 18 confirmando os dados da impregnação com AgNO₃.

Por outro lado, o mapeamento cromossômico de genes 5S em morcegos ainda é bastante escasso, com um único registro na literatura correspondente à espécie *Rhinolophus hipposideros* (Rhinolophidae). Para essa espécie foi descrita a presença de nove pares de cromossomos acrocêntricos portadores de sítios de DNAr 5S, incluindo o par 14 portador da constrição secundária (Puerma *et al.*, 2008).

Dentre os DNAs não codificadores presentes no genoma dos eucariotas, destacam-se pela sua abundância os DNAs satélite (DNAsat), minisatélites, microsatélites e elementos transponíveis. As sequências de DNA satélite se apresentam altamente repetidas com ampla variabilidade organizadas *in tandem* com diferentes números de cópias nos genomas das distintas espécies, podendo variar entre 1.000 e mais de 100.000 cópias. Estas sequências encontram-se localizadas principalmente nas regiões centroméricas e terminais dos cromossomos e constituem o principal componente da heterocromatina (Martins *et al.*, 2011).

O número de cópias de DNAs satélites e sua proporção em relação ao DNA genômico total de uma espécie são bastante variáveis. Em mamíferos essa proporção pode variar entre cinco e 30% do genoma total (Walsh, 2001). Em geral estes elementos são bastante diversificados entre diferentes espécies, incluindo espécies relacionadas, resultante dos mecanismos de mutação e evolução em concerto (Charlesworth *et al.*, 1994; Martins *et al.*, 2011).

O DNAsat encontrado nas regiões terminais é bastante simples, formado por pequenos monômeros repetidos *in tandem* sendo muito conservado, até

mesmo entre diferentes organismos, com o comprimento das repetições de suas sequências sendo variável entre cromossomos e entre espécies. A sequência telomérica (TTAGGG/CCCTAA)_n é compartilhada por todos os vertebrados (Sumner, 2003; Aubert e Lansdorp, 2008).

As sequências teloméricas (TTAGGG)_n têm sido mapeadas em alguns representantes da ordem Chiroptera. Ono e Yoshida (1997) analisaram diferenças na distribuição cromossômica dessas sequências em *Eptesicus parvus nilssonii* e *Vespertilio superans* representantes da família Vespertilionidae e evidenciaram as marcações nas extremidades dos cromossomos em ambas as espécies e sítios teloméricos intersticiais em regiões centroméricas em todos os sete cromossomos acrocêntricos de *V. superans*. Por outro lado, *E. parvus nilssonii* não apresentou nenhum sinal intersticial.

A técnica de FISH com sonda (TTAGGG)_n tem permitido detectar dois padrões desta sequência: 1) Padrão unicamente terminal como observado nas espécies *Macrotus waterhousii*, *M. californicus*, *Monophyllus redmani*, *Molossus molossus* e *Pteronotus macleayii*; 2) Padrão em sítios não terminais (ITS) em regiões centroméricas de *Artibeus jamaicensis*, *Carollia perspicillata*, *Eumops glaucinus*, *E. perotis* e em algumas espécies do gênero *Chiroderma* (Meyne et al., 1990; Finato et al., 2000).

As espécies *Eumops glaucinus*, *Carollia prespicillata* e *Platyrrhinus lineatus* tiveram seus cariótipos analisados para verificar a habilidade da enzima *Alu I* em decompor e/ou remover as sequências de DNA satélite das regiões de heterocromatina, e também identificar a ocorrência de modificações no padrão da FISH utilizando sonda telomérica (TTAGGG)_n após a digestão enzimática. As sequências teloméricas foram visualizadas na extremidade dos cromossomos das

três espécies, entretanto *C. perspicillata* apresentou sinais fracos ou ausentes na maioria dos cromossomos, este fato pode ser devido a um número reduzido de cópias teloméricas (Faria e Morielle-Versute, 2002).

Além disso, *Carollia perspicillata* e *E. glaucinus* exibiram sinais pericentroméricos em dois braços cromossômicos, enquanto sinais intersticiais e terminais quando associados a regiões de heterocromatina e RONS foram observados também em *E. glaucinus* e *P. lineatus*. Os cromossomos das três espécies quando tratados com *Alu I* e depois hibridizados com sonda (TTAGGG)_n revelaram uma significativa diminuição do sinal, indicando que esta enzima foi capaz de clivar ou/e remover parte do DNA satélite. Os resultados sugerem que a sequência telomérica se apresentou como um componente da heterocromatina e que as regiões de banda C positivas (intersticial, terminal e centromérica) apresentaram uma diferente composição, reforçando a heterogeneidade do DNA satélite (Faria e Morielle-Versute, 2002).

Faria *et al.* (2009), através da FISH com sondas teloméricas (TTAGGG)_n de humanos, estabeleceram a localização dessas sequências em cromossomos de algumas espécies de morcegos da família Molossidae (*Cynomops abrasus*, *Eumops auripendulus*, *Molossus rufus*, *Molossops temminckii* e *Nyctinomops*) e da família Phyllostomidae (*Phyllostomus discolor*). Marcações foram observadas na extremidade de quase todos os cromossomos das espécies de *C. abrasus*, *M. rufus*, *M. temminckii*, *N. laticaudatus* e *P. discolor*. Em *E. auripendulus*, a maioria dos telômeros não mostrou qualquer sinal de hibridização. Nas espécies *C. abrasus*, *M. temminckii*, *N. laticaudatus* e *P. discolor* foi detectada relação entre as sequências teloméricas e RONS, e entre as sequências teloméricas e a heterocromatina constitutiva. Este trabalho reforça a heterogeneidade do DNA

satélite e indica que, em algumas espécies de morcegos, as sequências teloméricas são um componente da heterocromatina e do DNA ribossomal.

Algumas espécies de vertebrados apresentam as sequências teloméricas em regiões não terminais, conhecidas como sítios teloméricos intersticiais (ITS). Na maioria dos casos, os ITS coincidem com regiões de heterocromatina constitutiva (HC) (Meyne *et al.*, 1990; Mceachern *et al.*, 2000; Pagnozzi *et al.*, 2000; Ruiz-Herrera *et al.*, 2008). Em morcegos a presença de ITS tem sido descrita em algumas espécies como em *Artibeus jamaicensis*, *Eumops glaucinus*, *E. perotis*, *Platyrrhinus lineatus*, *Carollia perspicillata* e em algumas espécies do gênero *Chiroderma* (Meyne *et al.* 1990; Faria e Morielle-Versute, 2002; Faria *et al.*, 2009). Isso pode ser explicado pelo fato dessas sequências serem um componente do DNAsat de algumas espécies de mamíferos, e em outros casos são fortes evidências da ocorrência de rearranjos cromossômicos.

Os minisatélites ou sequências com número variável de unidades de repetições (*repeats*) conhecidos como VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) apresentam variação de tamanho de 10-100 pares de base. Estas sequências encontram-se dispersas por todo o genoma e agrupadas nos telômeros. São encontrados nos mais distintos grupos de eucariotas, desde leveduras, plantas e animais, sendo uma classe de DNA repetitivo comum nos genomas eucariotas (Martins *et al.*, 2011). Tais marcadores são empregados em estudos de mapeamento genômico e de genética de populações e evolução (Harris e Wright, 1995).

Por outro lado, os microssatélites são conhecidos como as menores sequências repetidas *in tandem* nos eucariotas as quais apresentam de 1-6 nucleotídeos por unidade de repetição. São sequências altamente polimórficas

devido à alta taxa de mutação nessas regiões e por apresentarem variações no número de repetições, sendo encontrados em muitos genomas, particularmente em eucariotas (Ellegren, 2000). Essas sequências podem ocorrer em regiões codificantes (regiões eucromáticas) do genoma, (Schlötterer, 2000), mas localizam-se em uma maior proporção nas regiões não-codificantes, em geral associadas às regiões de HC (Toth *et al.*, 2000).

2.3.2 Elementos transponíveis e seu papel na evolução do genoma

Dentre os DNAs não codificadores presentes no genoma dos eucariotas, os elementos transponíveis (ETs) são diferenciados das outras sequências repetitivas pela sua capacidade de transposição/movimentação para distintas regiões do genoma. Com o avanço dos projetos de sequenciamento foi confirmado que grande parte dos diversos elementos repetitivos é originada dos elementos transponíveis (Böhne *et al.*, 2008).

Os ETs são divididos em dois grupos básicos, os transposons e retrotransposons de acordo com o seu mecanismo de transposição por meio da enzima transposase (Figura 4). Os transposons se movimentam nos genomas a partir de moléculas de DNA, enquanto os retrotransposons se transpõem utilizando RNAs via transcrição reversa (Charlesworth *et al.*, 1994). Os mecanismos para a sua inserção estão relacionados com os meios usados por eles para se inserirem em um novo local dentro do genoma. O meio de inserção pode ser do tipo conservador ou replicativo. No primeiro caso o ET é removido de um local para outro e inserido, enquanto que no segundo o ET é repetido antes de ser transportado para um local novo, aumentando o número de inserções no genoma (Martins *et al.*, 2011).

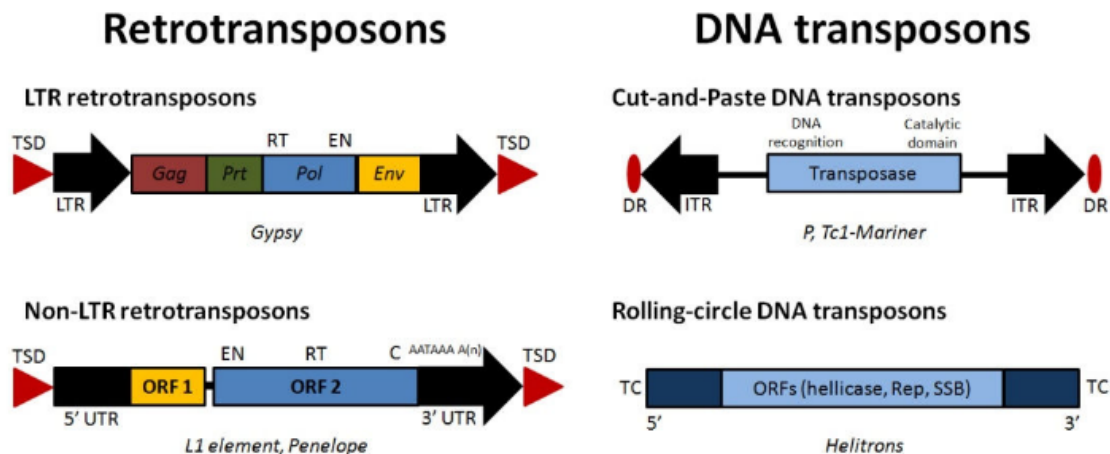


Figura 4. Estrutura geral dos principais elementos transponíveis (Adaptado de Martins *et al.*, 2011).

Diversas famílias destes elementos foram identificadas nos genomas, podendo ocorrer em espécies não relacionadas ou presentes apenas em grupos específicos (Biémont e Vieira, 2006; Feschotte e Pritham, 2007; Wicker *et al.*, 2007). O movimento de excisão e inserção desses elementos e a adição de cópias em outro local do genoma podem causar mutações resultando ou não em mudanças fenotípicas, que quando favoráveis contribuem para o aumento da diversidade das espécies (Charlesworth, 2001).

A identificação e caracterização dos elementos transponíveis têm sido muito importantes para o estudo genômico, uma vez que esses desempenham um papel estrutural e organizacional nos cromossomos, podendo induzir a formação de rearranjos cromossômicos ou atuando na prevenção de perdas teloméricas (Charlesworth, 2001), e possivelmente representam o componente predominante do genoma dos eucariotas (Feschotte, 2004). Cerca de 40% do genoma humano, 50% do genoma dos primatas, 40% do genoma de rato e

camundongo e 34% do genoma de cachorro são constituídos por esses elementos (Böhne *et al.*, 2008).

Embora ambas as classes de elementos transponíveis estejam presentes em grande parte do genoma de bactérias, plantas e invertebrados, há muito tempo se acreditava que esses elementos fossem inativos nos genomas de mamíferos (Lander *et al.*, 2001; Waterston *et al.*, 2002). Contudo, existem relatos confirmando a presença destes elementos no genoma de alguns mamíferos como humano (Lander *et al.*, 2001) e morcegos (Pritham e Feschotte, 2007; Ray *et al.*, 2007, 2008; Thomas *et al.*, 2011). Além disso, também tem sido descrita sua presença em outros vertebrados, particularmente em peixes (Martins *et al.*, 2004; Mazzuchelli e Martins, 2009).

No genoma de espécies de morcegos existem poucos relatos da presença desses elementos (Pritham e Feschotte, 2007; Ray *et al.*, 2007, 2008; Thomas *et al.*, 2011). Alguns trabalhos demonstraram a presença de sequências Helitrons que são distintas de outras classes de ETs pela sua estrutura e atividade enzimática (Kapitonov e Jurka 2001). Embora Helitrons tenham sido identificados no genoma de plantas, fungos, invertebrados e peixes (Kapitonov e Jurka 2001, 2003; Lal *et al.*, 2003; Poulter *et al.*, 2003), estes elementos ainda não tinham sido descritos em mamíferos. Contudo, a primeira ocorrência de tais elementos no genoma de mamíferos foi no morcego *Myotis lucifugus* onde essa sequência foi identificada e caracterizada (Pritham e Feschotte, 2007; Ray *et al.*, 2007, 2008). Recentemente, Thomas *et al.* (2010) analisaram 83 espécies de morcegos de diferentes famílias e identificaram a presença de Helitrons apenas nos 35 vespertilionídeos analisados, demonstrando que tais elementos parecem estar restritos ao genoma de morcegos da subfamília Vespertilionidae.

2.3.3 Retrotransposons

Os retrotransposons são considerados os principais responsáveis pelo aumento ou diminuição do tamanho dos genomas dos organismos (Feshotte e Prithman, 2007), podendo ser divididos em duas categorias dependendo da sua estrutura nucleotídica (Figura 5):

- **Retrotransposons non-LTR (Non long terminal repeat):**

Chamados de Retrotransposons ou retroposons, esta subclasse não possui repetições terminais longas (non-LTR) e é dividida em duas superfamílias (Figura 5). A primeira, inclui os elementos que não codificam as proteínas necessárias para a transcrição reversa e tem como principal componente os elementos dispersos curtos chamados SINEs (Short Interspersed Nucleotide Elements). Na segunda classe estão os LINEs (Long Interspersed Nucleotide Elements), elementos que codificam as proteínas necessárias para a transcrição reversa (Feshotte e Prithman, 2007).

Os SINEs formam uma classe de DNAs repetitivos diferenciados de outros com base em sua estrutura e modo de dispersão no genoma. Como esses elementos não apresentam os genes para a produção dos elementos necessários para a sua própria retrotransposição foi proposto que estes elementos utilizam a maquinaria de transposição de elementos do tipo LINE (Smit, 1996). São encontrados nos genomas de eucariotos tão distintos como plantas e mamíferos (Ohshima et al., 1993). O mais abundante SINE em humanos é chamado de *Alu*, assim porque contém um sítio alvo para a enzima de restrição *Alu*. Tem sido estimado que haja em torno de 1.000.000 cópias da família *Alu* no genoma

humano, também sendo descrito no genoma de outros mamíferos em grande quantidade (Biémont e Vieira, 2006).

Os elementos LINEs da mesma maneira também são encontrados em uma variedade de organismos incluindo protistas, plantas, insetos, moluscos e vertebrados. No genoma humano essas sequências correspondem a cerca de 21% do genoma. O elemento L1 é um dos LINEs mais conhecidos do genoma humano, que por sua vez, está presente em aproximadamente cerca de 850.000 cópias que equivale a cerca de 15% do genoma (Lander *et al.*, 2001).

- **Retrotransposons LTR (Long terminal repeats):**

São elementos estruturalmente similares aos retrovirus. Possuem longas repetições nucleotídicas nas extremidades 5' e 3'. De uma maneira geral, estas repetições terminais flanqueiam uma região central conhecida por ORFs (Open Reading Frame). A ORF denominada gag, produz uma poliproteína integrante do capsídeo dos retrovírus. A outra ORF constitui-se do gene pol que codifica as enzimas necessárias à transposição do elemento: protease, transcriptase reversa, RNaseH e integrase. A última ORF está presente em algumas famílias desta classe, podendo ou não produzir uma proteína funcional, ela corresponde ao gene env, que codifica a proteína do envelope viral nos retrovirus. As LTRs são necessárias para a transcrição e incorporação do elemento no outro local (Böhne *et al.*, 2008).

2.3.4 Transposons

Conhecidos como a segunda classe dos elementos repetidos dispersos de DNA, são divididos em subclasses ou famílias de acordo com a similaridade entre

as suas sequências, encontrando-se dispersos pelo genoma de procariotos e eucariotos (Feshotte e Prithman, 2007). Dentro do genoma há uma variação no número de cópias de 10 a milhares dependendo da família do elemento transponível e da espécie em que ele se encontra (Tafalla *et al.*, 2006). Em diferentes eucariotos vários elementos da mesma família são encontrados, sugerindo que estes divergiram cedo durante a evolução do genoma, antes mesmo da divergência ocorrida entre a linhagem eucarionte (Feschotte, 2004).

O mecanismo de transposição pode variar de um elemento para o outro, mas o mecanismo mais frequente é o “copy and paste” onde há duplicação do elemento obtendo cópia/cópias que se inserem em locais novos. A sequência inicial se mantém no local original, e, portanto a transposição é acompanhada por um aumento no número de cópias do transposon. Outra maneira é a transposição não-replicativa onde não ocorre duplicação do transposon. Neste caso, o elemento transponível se desloca diretamente de um local para outro mantendo suas características, mas, este tipo de movimento não favorece um aumento no número de cópias do transposon já que ele é perdido do local original (Martins *et al.*, 2011).

Alguns transposons utilizam apenas um tipo de transposição enquanto outros utilizam várias formas distintas. Os elementos IS1 e IS903, por exemplo, usam tanto a forma replicativa como a não-replicativa. O local de inserção do transposon é determinada pela transposase, podendo este local ser designado ao acaso ou levar em consideração algumas características como, por exemplo, uma sequência complementar (Lewin, 2004).

Os transposons são classificados em três subclasses: I. Os que se movimentam pelo mecanismo de “copy and paste”, que são os transposons

propriamente dito, onde são reconhecidas dez famílias para tais elementos: Tc1/mariner, haT, elemento P, MuDR/Fokdback, Cacta, PiggyBac, Pif/Harbinger, Merlin, Transib e Banshee. II. Os que se movimentam pelo movimento de círculo rolante, os quais são chamados de Helitrons (Figura 4). Estes elementos não possuem repetições terminais invertidas, todavia, são constituídos por curtos motifs terminais conservados e cópias autônomas as quais codificam uma proteína chamada de helicase. III. Os Mavericks, também conhecidos como Polintrons cujo mecanismo de transposição é pouco conhecido. Em sua estrutura estão presentes longas repetições terminais (Feshotte e Prithman, 2007).

Todas essas subclasses e famílias são encontradas nos eucariotos e procariotos, indicando que os transposons de DNA divergiram muito cedo na evolução dos organismos (Feshotte e Prithman, 2007). Durante o seu movimento de transposição esses elementos podem causar mutações afetando a expressão ou alterando a estrutura de genes, e portanto pode levar a uma perda da função deste no organismo (Kapitonov e Jurka, 2007). Embora as maiorias dessas mutações sejam prejudiciais, algumas vezes os transposons podem contribuir para originar diversidade alélica para a criação de novos genes (Feshotte e Prithman, 2007), sendo a principal função dos elementos móveis de DNA o papel estrutural e funcional desempenhado por estes na evolução genômica dos organismos (Böhne et al., 2008).

Sequências repetitivas de DNA têm se mostrado marcadores cromossômicos informativos em estudos citogenéticos comparativos, análises de estrutura e evolução de genomas e na identificação de rearranjos cromossômicos. Estas sequências são bastante úteis em mapeamentos citogenéticos devido a sua organização *in tandem* ou enriquecimento das mesmas em algumas regiões cromossômicas, permitindo a visualização de blocos ao longo dos cromossomos (Martins *et al.*, 2011).

Em Phyllostomidae o mapeamento de sequências repetitivas de DNA apresenta-se como uma ferramenta útil no entendimento da diversidade cariotípica observada no grupo, podendo ser esclarecedora dos processos que tem conduzido a evolução de seus cariótipos e genomas como um todo. Dessa forma, o uso de elementos repetitivos de DNA tem se mostrado esclarecedor para o entendimento da estrutura de diferentes regiões cromossômicas, tais como centrômeros e telômeros. Além disso, o mapeamento físico cromossômico do genoma tem contribuído no entendimento da estrutura e evolução dos genomas eucariotos, principalmente em relação aos DNAs repetitivos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a organização cromossômica de sequências de DNAs repetitivos em espécies pertencentes a quatro subfamílias da família Phyllostomidae através do mapeamento físico cromossômico.

3.2 Objetivos específicos

1. Isolar e mapear as sequências nucleotídicas das famílias multigênicas de RNAs ribossomais (RNAr 18S e 5S) nos cromossomos de 12 espécies de Phyllostomidae analisando a inter-relação das mesmas;
2. Realizar o mapeamento físico da sequência telomérica (TTAGGG)_n nos cromossomos de 12 representantes de Phyllostomidae;
3. Mapear a sequência MAZE/L1-like nos cromossomos de 13 espécies de Phyllostomidae;
4. Relacionar os dados do mapeamento cromossômico das sequências repetitivas (18S, 5S e telomérica) com dados de bandejamento C previamente descritos para as espécies analisadas.

4. Capítulo I

Patterns of rDNA and telomeric sequences diversification: contribution to repetitive DNA organization in Phyllostomidae bats.

Merilane da Silva Calixto^{1*}, Izaquiel Santos de Andrade¹, Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello², Neide Santos¹, Cesar Martins³, Vilma Loreto¹, Maria José de Souza¹.

¹UFPE - Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Laboratório de Genética e Citogenética Animal, Recife-PE, Brazil.

²UNESP - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Grupo de Estudos em Citogenômica e Evolução Animal – Rio Claro-SP, Brazil.

³UNESP- Universidade Estadual Paulista, Departamento de Morfologia, Laboratório Genômica Integrativa - Botucatu-SP, Brazil.

Manuscrito publicado na Revista Genetica
An International Journal of Genetics and Evolution
ISSN: 1573-6857 (electronic version)

Patterns of rDNA and telomeric sequences diversification: contribution to repetitive DNA organization in Phyllostomidae bats

Merilane da Silva Calixto · Izaquiel Santos de Andrade ·
Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello · Neide Santos ·
Cesar Martins · Vilma Loreto · Maria José de Souza

Received: 1 July 2013 / Accepted: 17 December 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Chromosomal organization and the evolution of genome architecture can be investigated by physical mapping of the genes for 45S and 5S ribosomal DNAs (rDNAs) and by the analysis of telomeric sequences. We studied 12 species of bats belonging to four subfamilies of the family Phyllostomidae in order to correlate patterns of distribution of heterochromatin and the multigene families for rDNA. The number of clusters for 45S gene ranged from one to three pairs, with exclusively location in autosomes, except for *Carollia perspicillata* that had in X chromosome. The 5S gene all the species studied had only one site located on an autosomal pair. In no species the 45S and 5S genes collocated. The fluorescence in situ hybridization (FISH) probe for telomeric sequences revealed fluorescence on all telomeres in all species, except in *Carollia perspicillata*. Non-telomeric sites in the pericentromeric region of the chromosomes were observed in most species, ranged from one to 12 pairs. Most interstitial telomeric sequences were coincident with heterochromatic regions. The results obtained in the present work indicate

that different evolutionary mechanisms are acting in Phyllostomidae genome architecture, as well as the occurrence of Robertsonian fusion during the chromosomal evolution of bats without a loss of telomeric sequences. These data contribute to understanding the organization of multigene families and telomeric sequences on bat genome as well as the chromosomal evolutionary history of Phyllostomidae bats.

Keywords Chromosomal evolution · Fluorescence in situ hybridization · Multigene family · 5S · Phyllostomidae · Telomeric sequences

Background

Repetitive DNA elements constitute a large portion of the eukaryote genomes, comprising multigene families, transposable elements and satellite, minisatellite and microsatellite (Charlesworth et al. 1994). Due to their easy detection, the clustered organization of the rRNA genes and telomeric sequences has been extensively used in many groups of species to understand karyotype evolution, genome organization and other evolutionary relationships. In higher eukaryotes ribosomal DNA (rDNA) is usually arrayed in clusters located on one or several chromosomes. The major ribosomal cluster (45S rDNA) transcribes 28S, 5.8S and 18S rDNAs being separated by variable intergenic spacers and an external transcribed spacer (ETS), whereas the 5S rDNA cluster consists of highly conserved transcribed sequences of 120 bp separated by a variable non-transcribed spacer (Eickbush and Eickbush 2007).

The telomeric tandemly repeated TTAGGG sequence is widely conserved among vertebrates and commonly found at telomeres (Meyne et al. 1990; Gomes et al. 2010). This

M. S. Calixto (&) · I. S. de Andrade · N. Santos · V. Loreto ·
M. J. de Souza
Laboratório de Genética e Citogenética Animal, Departamento
de Genética, UFPE - Universidade Federal de Pernambuco, Av.
Prof. Moraes Rego, SN. Cidade Universitária, Recife,
PE CEP 50732-970, Brazil
e-mail: merilane@gmail.com

D. C. Cabral-de-Mello
Grupo de Estudos em Citogenômica e Evolução Animal,
Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP -
Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brazil

C. Martins
Laboratório Genômica Integrativa, Departamento de Morfologia,
UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil

repeated sequence has been detected not only in telomeres, but also in interstitial and centromeric chromosomal regions, named interstitial telomeric sequences (ITS) in almost all vertebrate species, being the ITS detected by in situ hybridizations coincident with positive C-banding (Meyne et al. 1990; Metcalfe et al. 2004, 2007; Faria et al. 2009).

Phyllostomidae represents a diverse taxonomic family, being the third largest family among Chiroptera with 57 genera and 160 species (Simmons 2005). The group is endemic in the Americas and is characterized by variety of feeding habits (Reis et al. 2011), which enable the individual species to inhabit a wide diversity ecological niches, but at the same time complicates the reconstruction of their phylogenetic history (Wetters et al. 2000). The evolutionary relationships among members of this family inferred from morphological, cytogenetics and molecular data have been in conflict, being subject of several studies for more than a decade (Wetters et al. 2000; Jones 2002; Baker et al. 2003; D'avalos et al. 2012).

Aiming to contribute to a better understanding about chromosomal evolution in Phyllostomidae bats, we studied the heterochromatin distribution and mapped through fluorescence in situ hybridization (FISH) the multigene families for rDNA and telomeric motif in 12 species belonging to four Phyllostomidae subfamilies. Comparative data are discussed in the light of the patterns of rDNA diversification and occurrence of ITS in the chromosomes of phyllostomid bats. The data contribute to the understanding of repetitive DNA

organization and chromosomal diversification in bats, being the first time the 5S rDNA has been mapped in representatives of Phyllostomidae.

Materials and methods

Cytogenetic analysis were carried out in 12 bat species (Table 1) collected at different sites across the Pernambuco State, Brazil: Camaragibe (07856°03'00"S; 35801°45'00"W), Caruaru (08816°53'00"S; 35858°25'00"W), Recife (08803°14'00"S; 34852°51'00"W), Rio Formoso (08839°50'00"S; 35809°32'00"W), Saloá (08857°05'00"S; 36843°22'00"W), Toritama (07859°56'00"S; 36803°08'00"W) and São Lourenço da Mata (08800°13'00"S; 35801°17'00"W). Voucher specimens were deposited at the mammal collection at the Department of Zoology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Mitotic chromosomes were obtained from bone marrow cells according to conventional procedures. Constitutive heterochromatin (CH) was identified by C-banding (Sumner, 1972) and information related to heterochromatin distribution of additional species was retrieved from previously published data (Santos and Souza 1998; Barros et al. 2009; Lemos-Pinto et al. 2012) for purposes of comparative analyses. The FISH procedures using a probe containing the 45S rDNA sequence of *Xenopus laevis* was carried out according to Santos et al. (2002) with variation on denaturation times for different species (5–6 min).

Table 1 Chromosomal features and location of repetitive DNAs mapped for studied species

Subfamily species	Specimens		2n	FN	Sex system	rDNA location		Telomeric motif	
	M	F				45S	5S	Terminals	ITS (number of pairs)
Carolinae									
<i>Carollia perspicillata</i>	2	2	20/21	36	XY ₁ Y ₂	X	3	Absent	8
Glossophaginae									
<i>Glossophaga soricina</i>	1	2	32	60	XY	15	15	All	Absent
Phyllostominae									
<i>Lonchorhina aurita</i>	1	1	32	60	XY	ND	14	All	Absent
<i>Phyllostomus discolor</i>	1	1	32	58	XY	15	13	All	Absent
<i>P. elongatus</i>	1	2	32	58	XY	15	9	All	1
<i>Trachops cirrhosus</i>	1	0	30	56	XY	11	13	All	12
Stenodermatinae									
<i>Artibeus cinereus</i>	1	2	30	56	Neo-XY	9, 10, 13	St	All	4
<i>A. lituratus</i>	2	1	30/31	56	XY ₁ Y ₂	5, 6, 7	St	All	5
<i>A. obscurus</i>	2	1	30/31	56	XY ₁ Y ₂	ND	St	All	5
<i>A. planirostris</i>	3	2	30/31	56	XY ₁ Y ₂	5, 6, 7	St	All	5
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	2	3	30	60	Neo-XY	7	St	All	10
<i>Sturnira lilium</i>	2	3	30	56	Neo-XY	7	St	All	7

M = male; F = female; 2n = diploid number; FN = fundamental number; St = Subtelocentric; ND = no data

Genomic DNA from individuals of *Artibeus planirostris* was extracted according to Sambrook and Russel (2001) from liver stored in 100 % ethanol, and used to the amplification of the probe for the 5S rDNA through polymerase chain reaction (PCR). The primers Sca5SF (5⁰AAC GAC CAT ACC ACG CTG AA), and Sca5SR (5⁰AAG CGG TCC CCC ATC TAA GT) designated for 5S rDNA (Cabral-de-Mello et al. 2011) were used. Telomeric DNA probe was obtained by PCR using hexamers of TTAGGG and its complementary sequence CCCTAA as primers, in the absence of a template according Ijdo et al. (1991), with randomly incorporated digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany).

The probe for 45S rDNA was labeled by nick translation using biotin-14-dATP (Invitrogen, San Diego, CA, USA) and the 5S rDNA was labeled with digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany). Probes labeled with biotin-14-dATP were detected by avidin-FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugate (Sigma, St Louis, MO, USA) and probes labeled with digoxigenin-11-dUTP were detected by anti-digoxigenin-rhodamine (Roche, Mannheim, Germany). Chromosomes were counterstained with DAPI (4⁰,6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma, St Louis, MO, USA) and mounted with Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA) or Vectashield Mounting Medium with propidium Iodide (Vector, Burlingame, CA, USA). The images were captured using an Olympus BX61 microscope equipped with adequate filters and linked to an Olympus DP71 digital camera. The brightness and contrast of the images were optimized using Adobe Photoshop CS2.

Results

The diploid and fundamental number and sex mechanism system of all species were reanalyzed and showed the same chromosomal organization as previously reported (Table 1). The heterochromatin distribution patterns were classified in two distinct groups, (1) species presenting heterochromatin restrict to the pericentromeric regions (non spread pattern) and (2) species with terminal and/or interstitial additional heterochromatic blocks and entire heterochromatic arms (high and moderate spread pattern) (Table 2).

The most common pattern for 45S rDNA clusters was the presence of two sites (one chromosome pair) per diploid genome observed in 58.33 % of the species (seven species), although the number of clusters for this repeated gene ranged from two (one pair) to six (three pairs) (Fig. 1; Table 1). These clusters were preferentially located in autosomes, except for the species *Carollia perspicillata* that presented in the X chromosome (Fig. 1; Table 1). All species presented a single chromosome pair bearing the 5S rDNA site. These sequences were located in one autosomal

pair, on the same chromosome as the 45S rDNA site, in *Artibeus cinereus*, *A. lituratus*, *A. planirostris*, *Glossophaga soricina*, *Platyrrhinus lineatus* and *Sturnira lillium* (Fig. 1a–e), in the remaining species the sites of 45S and 5S rDNA were not coincident (Figs. 1f–j, 2h–l). In no species the 45S and 5S genes collocated.

FISH for telomeric sequence (TTAGGG) revealed a hybridization pattern in terminal regions of all chromosomes in all species (Fig. 3a–e, f, h–l), except in *C. perspicillata* which showed absence of fluorescent signals at the chromosome termini (Fig. 3g). In addition the occurrence of ITS with variable fluorescence intensity was observed at the pericentromeric region of the chromosomes in most species, ranging from one to 12 chromosomal pairs (Fig. 3a–g, k, l). However, the species *Glossophaga soricina* (Fig. 3h), *Lonchorhina aurita* (Fig. 3i) and *Phyllostomus discolor* did not presented ITS (Fig. 3j). Some of these ITS were coincident with C-positive regions. The chromosomal features of studied species and the specific location of repetitive sequences mapped are summarized in the Table 1 and the C-positive blocks are summarized in the Table 2.

Discussion

Ribosomal DNA and heterochromatin organization

Regarding the 45S rDNA, two main patterns of distribution were observed in the species here analyzed: (1) a single chromosome pair harboring these genes, as observed in *C. perspicillata*, *G. soricina*, *L. aurita*, *P. lineatus*, *P. discolor*, *P. elongatus*, *S. lilium* and *T. cirrhosus*; (2) three sites such as observed in three *Artibeus* species. In the later, the increased number of rDNA sites might be a result of the movement of the copies followed by amplification (increase) in the number of sites. This propagation can be associated with the presence, for example, of transposable elements that have an appropriate mechanism for moving the rDNA (Zhang et al. 2008). Although the presence of multiple sites observed in *Artibeus* species have been also reported in other Phyllostomidae species, particularly in the genera *Chiroderma* and *Uroderma* (Morielle and Varela-Garcia 1988; Baker et al. 1992; Neves et al. 2001; Santos et al. 2002; Ribeiro et al. 2003; Silva et al. 2005), in the species *Lonchophylla thomasi* (Ribeiro et al. 2003), in the genus *Choeroniscus* (Neves et al. 2001), as well as in *Macrotus waterhousii* which has the proposed primitive karyotype for the family (Patton and Baker 1978; Baker et al. 1992), the multiple rDNA sites have been considered as rare condition, when compared with the most frequent number (modal condition) that is two, representing the occurrence of one cluster located in a single pair of autosomes.

Table 2 C-banding data from the analyzed Phyllostomidae species

Subfamily/ species	Pericentromeric	Terminal	Interstitial	Y	X	References
Carollinae						
<i>Carollia perspicillata</i>	?	2p, 3p, 5p, Xp	1	Y ₁ almost totally heterochromatic, Y ₂ pericentromeric	Pericentromeric and Xp	(Santos and Souza 1998)
Glossophaginae						
<i>Glossophaga soricina</i>	?	Xq	–	Yq	Pericentromeric and Xq	This paper
Phyllostominae						
<i>Lonchorhina aurita</i>	?	–	–	Almost totally heterochromatic	Pericentromeric	Barros et al. (2009)
<i>Phyllostomus discolor</i>	?	–	–	Almost totally heterochromatic	Pericentromeric	Santos and Souza (1998)
<i>P. elongatus</i>	?	–	–	–	Pericentromeric	this paper
<i>Trachops cirrhosus</i>	?	–	–	Almost totally heterochromatic	Pericentromeric	Barros et al. (2009)
Stenodermatinae						
<i>Artibeus cinereus</i>	?	–	9q, 10q, 13q	Almost totally heterochromatic	Pericentromeric	This paper
<i>A. lituratus</i>	?	5p, 6p, 7p	6q	Almost totally heterochromatic	Pericentromeric and Xq	Lemos-Pinto et al. (2012)
<i>A. obscurus</i>	?	5p, 6p, 7p, 9p	1*, 2q, 5q, 6q	Almost totally heterochromatic	Pericentromeric and Xq	Lemos-Pinto et al. (2012)
<i>A. planirostris</i>	?	5p, 6p, 7p, 9p	1q, 2q, 5q, 6q	Pericentromeric and distal	Pericentromeric and Xq	Lemos-Pinto et al. (2012)
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	?	5p, 6p, 7p, 9p, Xp, Yq	1*, 2q, 3q, 5q, 6q, 7q, 8q	Yq	Pericentromeric and Xp	This paper
<i>Sturnira lilium</i>	?	5p, 6p, 7p, 9p, Xq	–	Almost totally heterochromatic	Pericentromeric and Xq	This paper

? = all autosomes; – = absence of HC; * = in both arms; p = short arm; q = long arm

Besides the common pattern of only one chromosomal pair harboring major rDNA clusters, an unusual location pattern of the major rDNA was observed in *C. perspicillata* and *C. castanea*, from the subfamily Carollinae. In these species, the rDNA sites are located on the X chromosome, which has been formed from a sex-autosome translocation (Tucker 1986; Pieczarka et al. 2005; Noronha et al. 2009). Interestingly, the rDNA cluster seems to be separating the X portion from the autosomal component on this chromosome (Fig. 1f), which can lead to a hypothesis regarding the role of these sequences in the process of X-inactivation in females, and consequently as facilitators of the X-autosome translocation itself.

A comparative analysis of C-banding (Table 2) and 45S rDNA data indicates that there is no correlation between number of heterochromatic blocks and number/location of rDNA sites. There might, however exist a phylogenetic component to the number and location of these chromosome markers across the phyllostomid phylogenetic tree. For instance, within the subfamily Stenodermatinae, there

is some conservation of constitutive heterochromatin sites with additional variation between species. A large number of individuals of each species should be examined to rule out intraspecific variation in number and location of sites.

Contrary to the variability for major rDNA, conservation was observed for the 5S rRNA, concerning the number of clusters in all analyzed species. The presence of 5S rDNA in a single chromosome pair, observed in 13 bats from different phylogenetic positions in the phyllostomid tree, is the most commonly observed condition in mammals (Matsuda et al. 1994; Lomholt et al. 2002; Matsubara et al. 2004; Gornung et al. 2008). In the order Chiroptera, however, knowledge about the chromosomal distribution of 5S rDNA is scarce, being restricted to *Rhinolophus hipposideros* species, belonging to the family Rhinolophidae (Puerma et al. 2008). In this species, the number of 5S rDNA site is significantly larger, being located in nine pairs of acrocentric autosomes.

In four species of Phyllostomidae bats here analyzed, *C. perspicillata*, *P. discolor*, *P. elongatus* and *T. cirrhosus*, we

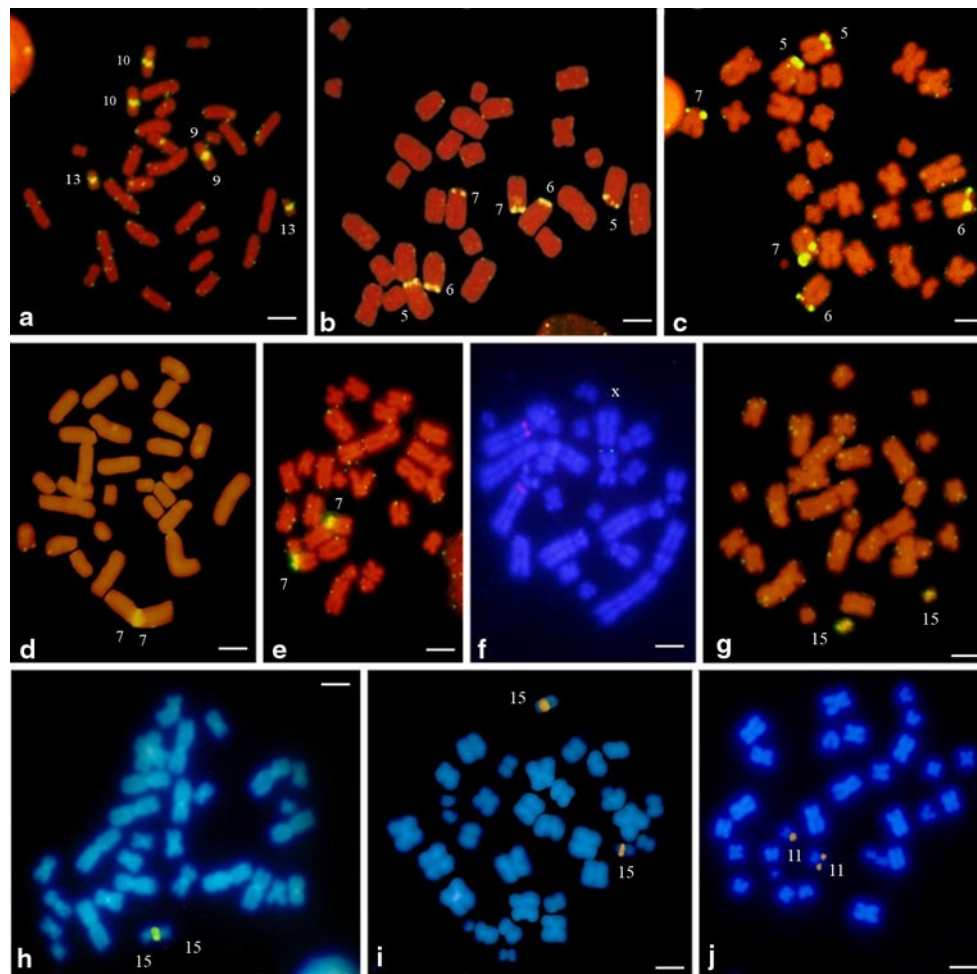


Fig. 1 Fluorescence in situ hybridization with 45S rDNA probe in mitotic metaphases. a *Artibeus cinereus*, b *A. lituratus*, c *A. planirostris*, d *Platyrrhinus lineatus*, e *Sturnira lillium*, f *Carollia perspicillata*, g *Glossophaga soricina*, h *Phyllostomus discolor*, i *P.*

elongatus and j *Trachops cirrhosus*. The arrowheads indicate the chromosomes carrying the 45S rDNA sites. Bar 5 μ m. In g the 45S sites is shown in green, whereas pink sites correspond to detected 5S rDNA sites. (Color figure online)

did not observe an association between the two markers 5S and 45S rDNA, which were located in different chromosome pairs. This condition has also been observed in other species of mammals and vertebrates (Matsubara et al. 2004; Schneider et al. 2012) and is predominant in higher Eukaryotes where the 5S and 45S genes have often been shown to be in separate areas of the genome (Drouin and Moniz de Sá 1995). The differential location of these two classes of rDNA would be important to avoid undesirable translocations of 5S rDNA into the arrangement of 45S rDNA, and vice versa. Therefore, this condition allows an even greater conservatism of these regions, which is important for maintaining the cell.

In contrast, the three species of the genus *Artibeus*, *G. soricina*, *S. lillium* and *P. lineatus*, might bear the 5S rDNA and 45S rDNA sites on the same autosome pair, however with no colocalization of these sites. This condition has not been observed in mammals, however there are reports on

fish in that the sites 5S and 45S rDNA are located on the same chromosome (Pendás et al. 1994; Mórán et al. 1996). The significance of this is not known, but shows that such sites can assume a syntenic organization on the same chromosome. At this point, it is still premature to propose how the ribosomal DNA sequences have contributed to the evolution of genome architecture in bats or if phyllostomids have different patterns of repetitive sequence distribution when compared to other bat families. Further mapping of the different classes of rDNA in bats will prove valuable to the understanding of the distribution and functional pattern of these sequences on bat genomes.

The telomeric sequences

The non-telomeric sequences observed in pericentromeric and centromeric regions in most of the species here analyzed have also been described in several vertebrates (Meyne et al. 1990;

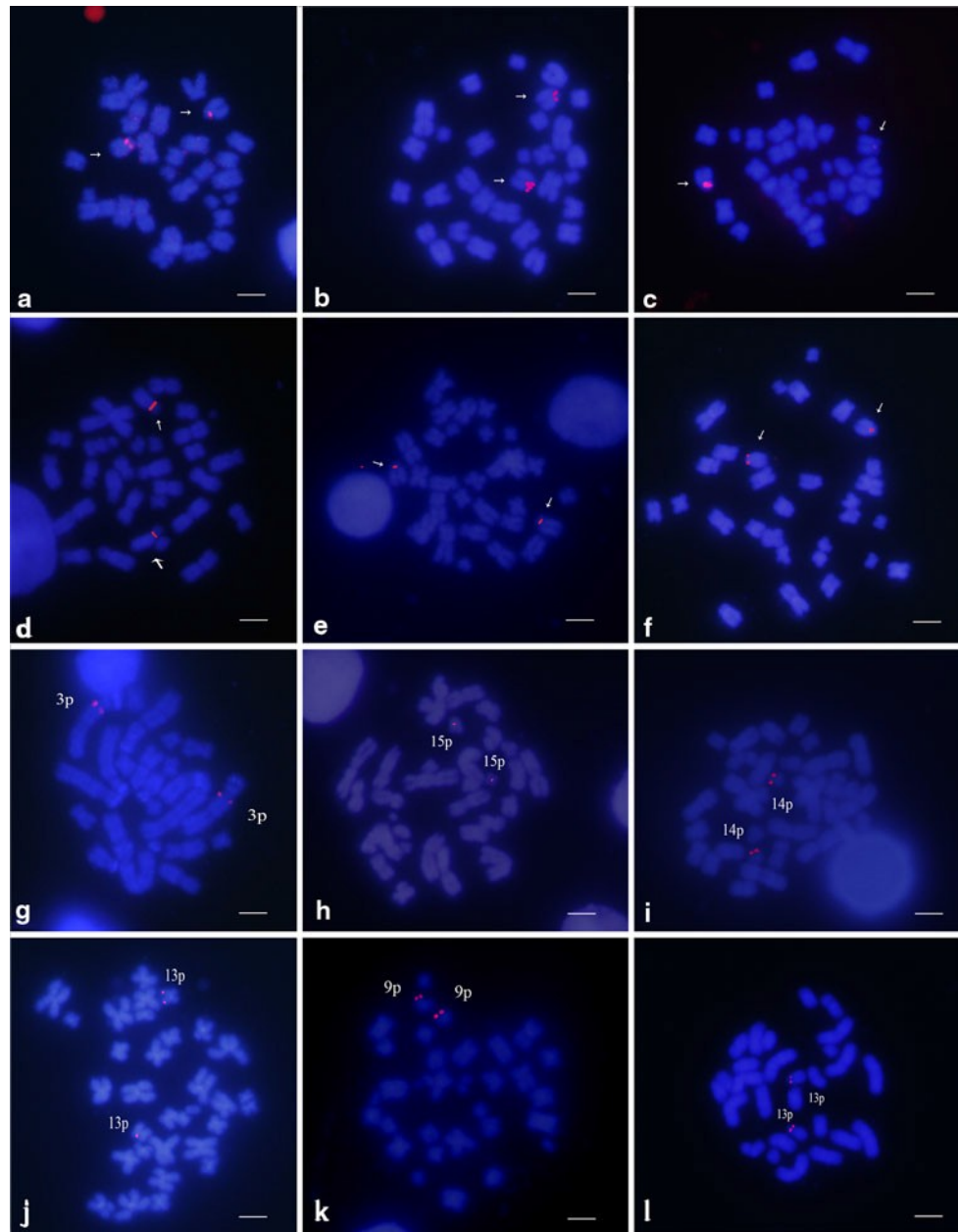


Fig. 2 Fluorescence in situ hybridization with 5S rDNA probe on mitotic metaphases. a *Artibeus cinereus*, b *A. lituratus*, c *A. obscurus*, d *A. planirostris*, e *Platyrrhinus lineatus*, f *Sturnira lillium*, g *Carollia*

perspicillata, h *Glossophaga soricina*, i *Lonchorhina aurita*, j *Phyllostomus discolor*, k *P. elongatus* and l *Trachops cirrhosus*. The arrow indicate the chromosome carrying the 5S rDNA sites. Bar 5 μm

Metcalfe et al. 2004, 2007; Sánchez et al. 2009; Schneider et al. 2012). According to Meyne et al. (1990), which describes ITS in 100 vertebrate species, the presence ITS (TTAGGG) n might be related to the evolutionary status of a given taxa. Moreover, ITS might be relics of chromosomal rearrangements, such as fusions or inversions occurring in the course of genome evolution (Nanda and Schmid 1994). Thus, species with plesiomorphic chromosomal characters (for example, ancestral karyotype for a given taxon, or groups presenting chromosome conservatism) usually display telomere-only patterns, whereas

species with derived karyotypes may have telomeric plus non-telomeric sites. We asked if this trend might correspond to the patterns observed for phyllostomid bats as well as if there is any correlation between the time of divergence of a specific group and the number of ITS.

The results of our analysis seem to partially agree with the statement that most basal karyotypes have mainly telomere located telomeric repeats. They also partially agree with the hypothesis that groups with chromosome stasis seem to have less ITS. For example, both species

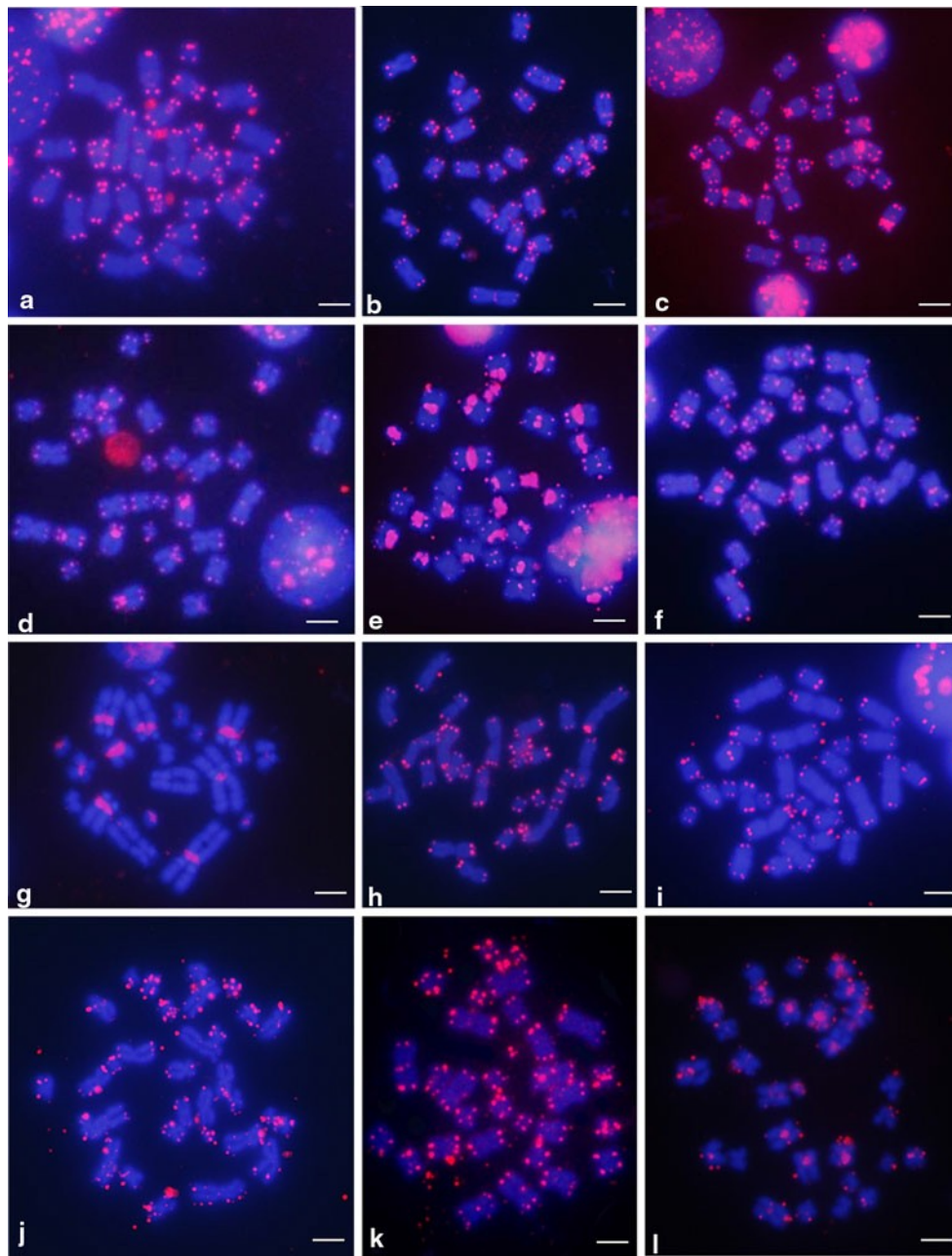


Fig. 3 Fluorescence in situ hybridization with telomeric sequence probe (TTAGGG) $_n$ in mitotic metaphases. a *Artibeus cinereus*, b *A. lituratus*, c *A. obscurus*, d *A. planirostris*, e *Platyrrhinus lineatus*,

f *Sturnira lillium*, g *Carollia perspicillata*, h *Glossophaga soricina*, i *Lonchorhina aurita*, j *Phyllostomus discolor*, k *P. elongatus* and l *Trachops cirrhosus*. Bar 5 μ m

considered to have basal karyotypes (two species of the genus *Macrotus*) for the family lack ITS on their chromosomes (Baker and Bickham 1980; Meyne et al. 1990). The same is true for *G. soricina*, which is proposed to have the ancestral karyotype for the subfamily Glossophaginae and is part of a clade characterized by no intergeneric chromosome rearrangements for the last 16 million years (Baker and Bass 1979; Haiduk and Baker 1982; Baker et al. 2012). Additionally, the genus *Carollia*, has many rearrangements, as compared to the phyllostomid ancestral

karyotype, and the largest number of ITS described for the family. Conversely, groups such as the Stenodermatinae, characterized by extreme chromosome conservatism have karyotypes with considerable ITS numbers (4–10 chromosome pairs). Similarly, we cannot explain the significantly high number of ITS on *Trachops* karyotype. Recent radiation would be the only explanation for the high number of ITS detected in Stenodermatinae, but this parameter would not be sufficient to explain the variation on the family as a whole.

Since there is information on the correspondence of *Carollia* chromosomes with those of other Phyllostomidae bats (Pieczarka et al. 2005, 2013), we have chosen the karyotype of this species to be analyzed in detail, regarding potential correspondence between rearrangements and ITS presence. Firstly, as a matter of clarification, the absence of hybridization signals at ends of the chromosomes of *C. perspicillata* can be interpreted as being due to a reduced number of copies of the telomeric repeat, or to technical feature of the capture system. Second, the intense ITS fluorescent signals in this species are coincident with CH and also with fusion rearrangements that were observed after chromosome painting from *Phyllostomus hastatus* in *C. brevicauda*. The hybridization evidenced that only the chromosome paint 11, 13 and 14 of *Phyllostomus* correspond to a single chromosome of *Carollia* 7, 8 and 9, respectively, with other chromosomes in *Carollia* consisting of more than one chromosomes of *Phyllostomus*.

Our data show that the regions with intense centromeric and pericentromeric fluorescent signals correspond to C-heterochromatin bands (Fig. 3; Table 2), which agrees with data from literature showing that in most cases, these ITS are at the margins or within regions of CH (Meyne et al. 1990; Ono and Yoshida 1997; Finato et al. 2000; Pagnozzi et al. 2000, 2002; Multani et al. 2001; Faria et al. 2002; Santani et al. 2002; Sánchez et al. 2009), although there is no consistent correlation between the amount and chromosomal localization of CH and the presence of non-telomeric sites of (TTAGGG)_n sequences.

Since ITS sequences have been identified as a component of satellite DNA, co-localization of these sequences and C-bands most likely reflects the presence of both as a component of satellite DNA. The sequences (TTAGGG)_n have been described as satellite DNA in some species of vertebrates species (Pagnozzi et al. 2000, 2002; Metcalfe et al. 2004). Considering other possibilities to explain the association between CH and telomeric sequences, the results of the present work indicates that, in some species of bats, the telomeric sequence is a component of the heterochromatin. As discussed by Metcalfe et al. (2004), the ITS sequences may only be identifiable as remnant telomeres in those complements where telomeric sequence is not a major component of CH at non-telomeric sites. Finally, the high number species presenting ITS observed in this work, suggests that the telomeric sequences might be usually retained after Robertsonian fusion events in phyllostomid bats.

Conclusion

Our results indicate that different evolutionary mechanisms are acting in Phyllostomidae genome architecture. The

occurrence of Rb fusion seems also to have acted during the chromosomal evolution of bats without loss of telomeric DNA sequences and suggest the different nature and distribution of the ITS in the pericentromeric regions of biarmed autosomes in the species here analyzed. Contrary to the variability for major rDNA a high conservation was observed for the 5S rRNA, concerning the number of clusters in all analyzed species. Our results suggest that this condition can represent the ancient organization for these sequences on the family; however, it is necessary to expand the number of species mapped to this gene in order to propose the correct ancestral condition for Phyllostomidae. These data contribute to understanding the organization of multigene families and telomeric sequences on bat genome as well as the chromosomal evolutionary history of Phyllostomidae bats.

Acknowledgments The authors are grateful to Cibele Gomes Sotero Caio for reading and advising on the manuscript, and also to Cirlene Maria da Silva and Mario Ferreira da Silva for assistance in the field work. The study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Baker RJ, Bass RA (1979) Evolutionary relationship of the Brachyphyllinae to glossophaginae genera *Glossophaga* and *Monophyllus*. J Mammal 60:364–372
- Baker RJ, Bickham JW (1980) Karyotypic evolution in bats: evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related taxa. Syst Zool 29:239–253
- Baker RJ, Maltbie M, Owen JG, Hamilton MJ, Bradley RD (1992) Reduced number of ribosomal sites in bats: evidenced for mechanism to contain genome size. J Mammal 73:847–858
- Baker RJ, Hoofer SR, Porter CA, Van Den Bussche RA (2003) Diversification among New World leaf-nosed bats: an evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. Mus Tex Tech Univ 230:1–32
- Baker RJ, Bininda-Emonds ORP, Mantilla-Meluk H, Porter CA, Van Den Bussche RA (2012) Molecular timescale of diversification of feeding strategy and morphology in new world leaf-nosed bats (Phyllostomidae): a phylogenetic perspective. Time scale of diversification in new world leaf-nosed bats, pp 1–26
- Barros HMDR, Sotero-Caio CG, Santos N, Souza MJ (2009) Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus* (Chiroptera, Phyllostomidae). Genet Mol Biol 32(4):748–752
- Cabral-de-Mello DC, Martins C, Souza MJ, Moura RC (2011) Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. Cytogenet Genome Res 132:89–93
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature 371:215–220
- D^oavalos LM, Cirranello AL, Geisler JH, Simmons NB (2012) Understanding phylogenetic incongruence: lessons from phyllostomid bats. Biol Rev 87(4):991–1024

- Drouin G, Moniz de Sá M (1995) The concerted of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol Biol Evol* 12(3):481–493
- Eickbush TH, Eickbush DG (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175:477–485
- Faria KC, Morielle-Versute E (2002) In situ hybridization of bat chromosomes with human (TTAGGG)_n probe, after previous digestion with Alu I. *Genet Mol Bio* (25):365–371
- Faria KC, Marchesin SRC, Moreira PRL, Beguelini MR, Morielle-Versute E (2009) New insights into telomeric DNA sequence (TTAGGG)_n location in bat chromosomes. *Genet Mol Res* 8(3):1079–1084
- Finato AO, Varella-Garcia M, Tajara EH, Taddei VA, Morielle-Versute E (2000) Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Eumops perotis* (Molossidae, Chiroptera). *Chromosome Res* 8:563–569
- Gomes AJB, Rodrigues LRR, Rissino JD, Nagamachi CY, Pieczarka JC (2010) Biogeographical karyotypic variation of *Rhinophylla fischeriae* (Chiroptera: phyllostomidae) suggests the occurrence of cryptic species. *Comp Cytogenet* 4:79–85
- Gornung E, Volleth M, Capanna E, Castiglia R (2008) Comparative cytogenetics of moles (Eulipotyphla, Talpidae): chromosomal differences in *Talpa ramana* and *T. europaea*. *Cytogenet Gen Res* 121:249–254
- Haiduk MW, Baker RJ (1982) Cladistical analysis of the G-banded chromosomes of nectar-feeding bats (Glossophaginae: phyllostomidae). *Syst Biol* 31:252–265
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 19(17):4780
- Jones KE (2002) Chiroptera. *Encyclopedia of life sciences*. Macmillan, New York, pp 1–5
- Lemos-Pinto MMP, Calixto MS, Souza MJ, Araújo APT, Langguth A, Santos N (2012) Cytotaxonomy of the subgenus *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera) by characterization of species-specific markers. *Comp Cytogenet* 6(1):7–28
- Lomholt B, Christensen K, Frederiksen S (2002) Guinea pig (*Caio cambayo*) 5S rRNA genes map to 7q2, 20q2 and 30q2 shown by an R-banded karyotype with PNA-FISH. *Hereditas* 136:104–107
- Matsubara K, Nishida-Umehara C, Tsuchiya K, Nukaya D, Matsuda Y (2004) Karyotypic evolution of *Apodemus* (Muridae, Rodentia) inferred from comparative FISH analyses. *Chromosome Res* 12:383–395
- Matsuda Y, Moriwaki K, Chapman VM, Hoi-Sen Y, Akbarzadeh J, Suzuki H (1994) Chromosomal mapping of mouse 5S rRNA genes by direct R-banding fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Genome Res* 66:246–249
- Metcalfe CJ, Eldridge MD, Johnston PG (2004) Mapping the distribution of the telomeric sequence (T₂AG₃)_n in the 2n = 14 ancestral marsupial complement and in the macropodines (Marsupialia: macropodidae) by fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 12:405–414
- Metcalfe CJ, Eldridge MD, Johnston PG (2007) Mapping the distribution of the telomeric sequence (T₂AG₃)_n in the Macropodoidea (Marsupialia) by fluorescence in situ hybridization. II. The ancestral 2n = 22 macropodid karyotype. *Cytogenet Gen Res* 116:212–217
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyzis RK (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99:3–10
- Móran P, Martínez JL, García-Vásquez E, Pendás AM (1996) Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet Cell Genet* 75:145–150
- Morielle E, Varella-Garcia M (1988) Variability of nucleolus organizer regions in Phyllostomid bats. *Rev Brazil Genet* 11:853–871
- Multani AS, Ozen M, Furlong CL, Zhao YJ, Hsu TC, Pathak S (2001) Heterochromatin and interstitial telomeric DNA homology. *Chromosoma* 110:214–220
- Nanda I, Schmid M (1994) Localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in chicken (*Gallus domesticus*) chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 65:190–193
- Neves ACB, Pieczarka JC, Barros RMS, Marques-Aguiar S, Rodrigues LRR, Nagamachi CY (2001) Cytogenetic studies on *Choeroniscus minor* (Chiroptera, Phyllostomidae) from the Amazon region. *Cytobios* 105:91–98
- Noronha RCR, Nagamachi CY, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Pieczarka JC, Ono T, Yoshida MC (2009) Neo-XY body: an analysis of XY1Y2 meiotic behavior in *Carollia* (Chiroptera, Phyllostomidae) by chromosome painting. *Cytogenet Genome Res* 124:37–43
- Ono T, Yoshida MC (1997) Differences in the chromosomal distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in two species of the vespertilionid bats. *Chromosome Res* 5:203–205
- Pagnozzi JM, Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y (2000) Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: didelphidae). *Chromosome Res* 8:585–591
- Pagnozzi J, Ditchfield AD, Yonenaga-Yassuda Y (2002) Mapping the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in eight species of Brazilian marsupials (Didelphidae) by FISH and the correlation with constitutive heterochromatin. Do ITS represent evidence for fusion events in American marsupials? *Cytogenet Genome Res* 98(4):278–284
- Patton JC, Baker RJ (1978) Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoid bats. *Syst Zool* 27:449–462
- Pendás AM, Móran P, Freije JP, García-Vásquez E (1994) Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet Cell Genet* 67:31–36
- Pieczarka JC, Nagamachi CY, O'Brien PCM, Yang F, Rens W, Barros RMS, Noronha RCR, Rissino J, Oliveira EHC, Ferguson-Smith MA (2005) Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Chromosome Res* 13:339–347
- Pieczarka JC, Gomes AJB, Nagamachi CY, Rocha DCC, Rissino JD, O'Brien PCM, Yang F, Ferguson-Smith MA (2013) A phylogenetic analysis using multidirectional chromosome painting of three species (*Uroderma magnirostrum*, *U. bilobatum* and *Artibeus obscurus*) of subfamily Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomidae). *Chromosome Res* 21(4):383–392
- Puerma E, Acosta MJ, Barragan MJL, Martínez S, Marchal JA, Bullejos M, Sanchez A (2008) The karyotype and 5S rRNA genes from Spanish individuals of the bat species *Rhinolophus hipposideros* (Rhinophilidae, Chiroptera). *Genetica* 134:287–295
- Reis NR, Perachi AL, Pedro WA, Lima OP (2011) Morcegos do Brasil. Londrina, Universidade Estadual de Londrina, pp 17–253
- Ribeiro NAB, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Rissino JD, Neves ACB, Gonçalves ACO, Marques-Aguiar S, Assis MFL, Barros RMS (2003) Cytogenetic analysis in species of the subfamily Glossophaginae (Phyllostomidae, Chiroptera) supports a polyphyletic origin. *Caryologia* 56(1):85–96
- Sambrook J, Russell I (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainville, NY
- Sánchez J, Bianchi MS, Bolzán AD (2009) Effect of bleomycin on interstitial telomeric sequences of immortalized Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 669:139–146

- Santani A, Raudsepp T, Chowdhary BP (2002) Interstitial telomeric sites and NORs in Hartmann's zebra (*Equus zebra hartmannae*) chromosomes. *Chromosome Res* 10:527–534
- Santos N, Souza MJ (1998) Characterization of the constitutive heterochromatin of *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae, Chiroptera) using the base-specific fluorochromes, CMA3 (GC) and DAPI (AT). *Caryologia* 51:51–60
- Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y, Souza MJ (2002) Localization of rRNA genes in Phyllostomidae bats reveals silent NORs in *Artibeus cinereus*. *Hereditas* 136:137–143
- Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, Artoni RF, Vicari MR, Martins C, Feldberg E (2012) Chromosomal evolution of Neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. *Rev Fish Biol Fish* 23:201–214
- Silva AM, Marques-Aguiar SA, Barros RMS, Nagamachi CY, Pieczarka JC (2005) Comparative cytogenetic analysis in the species *Uroderma magnirostrum* and *U. bilobatum* (cytotype 2n = 42) (Phyllostomidae, Stenodermatinae) in the Brazilian Amazon. *Gen Mol Biol* 28(2):248–253
- Simmons NB (2005) Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference, vol 1, 3^a edn. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 312–529
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304–306
- Tucker PK (1986) Sex chromosome-autosome translocations in the leaf-nosed bats family Phyllostomidae. I. Mitotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae. *Cytogenet Cell Genet* 43:19–27
- Wetters AL, Rockman MV, Simmons NB (2000) Phylogeny of Phyllostomid bats (Mammalia: chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. *Bull Am Mus Nat Hist* 248:1–200
- Zhang X, Eickbush MT, Eickbush TH (2008) Role of recombination in the long-term retention of transposable elements in rRNA gene loci. *Genetics* 180:1617–1626

5. Capítulo II

A centromeric repetitive L1-like DNA is conserved among Phyllostomidae bats species (Chiroptera).

Manuscrito a ser submetido à Revista Chromosome Research
ISSN: 1573-6849 (electronic version)

A centromeric repetitive *L1*-like DNA is conserved among Phyllostomidae bats species (Chiroptera).

Merilane da Silva Calixto^{1*}, Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello², Vilma Loreto¹, Cesar Martins³, Neide Santos¹, Maria José de Souza¹.

¹UFPE - Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Laboratório de Genética e Citogenética Animal, Recife-PE, Brazil.

²UNESP - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Grupo de Estudos em Citogenômica e Evolução Animal – Rio Claro-SP, Brazil.

³UNESP- Universidade Estadual Paulista, Departamento de Morfologia, Laboratório Genômica Integrativa - Botucatu-SP, Brazil.

* Corresponding author: Merilane da Silva Calixto

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

Av. Prof. Moraes Rego, SN. Cidade Universitária, CEP 50732-970, Recife, Pernambuco, Brazil.

Phone: +55 81 21267827

Fax: +55 81 21268522

E-mail: merilane@gmail.com

Abstract

Repeated DNA sequences have been useful in cytogenetic mapping due to its organization in tandem, allowing visualization of blocks along the chromosomes. In this study to contribute to the knowledge of bats genomes we identified and characterized by means of nucleotide sequencing and physical chromosome mapping one class of repetitive DNA in the genome of the 13 Phyllostomidae species corresponds to a retrotransposable element that was named MAZE/L1-like. This repetitive sequence shows a high similarity to the retrotransposable element non-LTR L1 type described in representatives of the family Pteropodidae (Yinpterochiroptera) and in several vertebrates. The repetitive element identified in this study was located preferentially in the centromeric regions of the chromosomes, except in *Chrotopterus auritus* who revealed absent centromeric marks. For the four species from other mammalian orders (marsupial, primate, rodent and sirenian) used for reference, our probe not hybridized in any species indicating a restricted distribution of the MAZE/L1-like element to bats, particularly Phyllostomidae. There was a preferential localization in heterochromatic regions suggesting that heterochromatin can function as refuge to TEs. However, our probe not hybridized in the terminal and interstitial regions corresponding to heterochromatin rich regions in any species. Therefore, we can speculate that our results indicate a differential composition of the heterochromatin associated with MAZE/L1-like element. Our results indicate a strong conservation of repeated elements in the heterochromatic region preferably in the centromeric region, providing a good molecular centromeric marker with application in study of evolution and chromosomal rearrangements.

Key words: genome evolution, heterochromatin, retrotransposable, TE, L1, Chiroptera

Introduction

Repetitive DNAs make up a large portion of eukaryotic genomes being generally classified into two main classes, (i) tandem repeats, such as long tandem arrays termed satellite DNA, and (ii) dispersed elements, such as transposable elements (TEs) (Charlesworth et al. 1994; Jurka et al. 2005; Wicker et al. 2007). Although the repetitive DNAs have been considered without function and called “junk DNA”, it is currently known that these repetitive sequences can be involved with chromosome and genome evolution by causing mutations (inversions, deletions or insertion, breakage and amplifications) within a gene or regulatory sequence (Lim and Simmons, 1994; Kidwell and Lisch, 2001), and these sequences are also closely associated to heterochromatic regions which support the structural role of these repeats in genome evolution (Dimitri and Junakovic, 1999).

The TEs represent a major fraction of eukaryotic genomes (Böhne et al. 2008), and comprises DNA segments capable of integrating into new locations in the genome and also mobilize non-autonomous sequences (Volff et al. 2003; Jurka et al. 2005). These elements are typically categorized, based on their mode of transposition, as class I elements represented by the “copy-and-paste” retrotransposons and class II that include the “cut-and-paste” DNA transposons (Craig, 2002; Feschotte and Pritham 2007; Wicker et al. 2007). TEs and satellite DNAs are some of the most important components of the genome and can be transferred horizontally between species (Daniels et al. 1990; Robertson and Lampe 1995) that contribute to genetic variations within and between species (Biémont, 2008). TEs are particularly common in heterochromatic regions of the genome a location where TEs might do less damage to their host (Dimitri and Junakovic, 1999). Therefore, natural selection has acted against the negative effects of TEs (Bartolomé et al. 2002; Dawe, 2003).

Retrotransposons are the most widespread and enriched class of eukaryotic transposable elements and their mobilization involve reverse transcription of an RNA

intermediate. Retrotransposons can be classified into: long terminal repeat (LTR), long interspersed nuclear elements (LINEs) and short interspersed nuclear elements (SINEs) (Ding et al. 2006; Rangwala and Kazazian, 2010). The LINEs (L1) elements constitute a dominant family of autonomously replicating retrotransposons in mammals (Furano, 2000), and belong to the class of retrotransposons that lack the long terminal repeats characteristic of the retroviral-like retrotransposons (Ding et al. 2006). LINE-1 has been shown to be responsible for many genetic disorders as such nucleotide deletions, gene disruption, duplications and chromosomal instability through heterologous recombination (Kazazian and Goodier, 2002). However, it is also involved in important genomic functions: regulation of gene expression (Yang et al. 1998; Han et al. 2004) and possibly X-inactivation in females (Lyon, 1998; Hansen, 2003).

Because of their abundance, property to move themselves inside the genomes, irreversible and independent nature of their insertions, promoting changes in their insertion sites neighboring regions, the TEs are powerful genetic variability sources and provide very useful markers for phylogeny reconstruction (Shedlock and Okada 2000; Kidwell and Lisch, 2001). The evolutionary history and genomic impact of mammalian retrotransposons have been the subject of intensive investigation (Szak et al. 2002; Xing et al. 2003; Price et al. 2004; Khan et al. 2006).

In contrast, until now few studies focus on the analysis of structure and evolution of these repetitive DNAs type II in bats. This gap can largely be explained by greater frequency in studies of transposons (Ray et al. 2007, 2008; Thomas et al. 2010) compared with studies evolving retrotransposons (Gogolevsky et al. 2009) in Chiroptera, probably due the relatively recent discovery of activity of such elements on genome of bats. Interestingly, the occurrence of DNA-type retrotransposon was observed in megabats (Yinpterochiroptera) but neither in Yangochiroptera (Gogolevsky et al. 2009).

Phyllostomidae represents the third largest family among Neotropical Chiroptera with 57 genera and 160 species, being a diverse taxonomic family (Baker et al. 2003; Simmons, 2005; Peracchi et al. 2006). In Brazil, 120 species belonging to 40 genera are described (Reis et al. 2011). For more than a decade, evolutionary relationships among members of the New World bat family Phyllostomidae inferred from morphological and molecular data have been in conflict, being subject of several studies (Wetterer et al. 2000; Jones et al. 2002; Baker et al. 2003; Dávalos et al. 2012).

Here, we investigated the presence of retrotransposable element MAZE/L1-Like in 13 bats species belonging to five subfamilies of Phyllostomidae. For reference, it was used four species from other mammalian orders (marsupial, primate, rodent and sirenian) and we report the restricted distribution of this element to Phyllostomidae bats. The repetitive sequence similar to the retrotransposable element non-LTR L1 type was casually obtained in the attempt to isolate 18S rDNA sequences in *Artibeus planirostris* being named MAZE/L1-like.

Material and Methods

Animals, DNA samples and classical cytogenetics

Cytogenetic studies were carried out in 13 bats species (Table 1) captured at different sites across the Pernambuco State, Brazil: Camaragibe (07°56'03"S; 35°01'45"W), Caruaru (08°16'53"S; 35°58'25"W), Recife (08°03'14"S; 34°52'51"W), Rio Formoso (08°39'50"S; 35°09'32"W), Saloá (08°57'05"S; 36°43'22"W), Toritama (07°59'56"S; 36°03'08"W) and São Lourenço da Mata (08°00'13"S; 35°01'17"W). Voucher specimens are deposited in the Mammalian collection at the Department of Zoology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Mitotic chromosomes, from bats species and one species of Marsupial and Rodent, were obtained from bone marrow cells according to conventional procedures. Additionally,

it was used for reference Sirenian and human mitotic chromosomes obtained by cell culture standard procedures from phytohemagglutinin-stimulated peripheral lymphocytes.

The mitotic chromosomes of all species were submitted to Giemsa 5% staining and all the 13 bats species were submitted to C-banding according to Sumner (1972). Genomic DNA was extracted from three individuals of *Artibeus planirostris* according to standard phenol–chloroform procedures (Sambrook and Russel, 2001) from liver stored in ethanol 100%.

Isolation and sequencing of repetitive sequences

Repetitive DNA sequences were occasionally isolated from the genome of *Artibeus planirostris* by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the primers originally designed to amplify the 18S rDNA sequence in fish 18SF (5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT) and 18SR (5'- CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA). PCR products (size ~900bp) were ligated into the plasmid pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA), and the recombinant constructs were used to transform DH5 α Escherichia coli- competent cells. Positive clones were sequenced using an ABI Prism 3100 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with a Dynamic Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), as per the manufacturers' instructions, and revealed a region containing 526 bp with similarity to the retrotransposable element non-LTR L1 type described in representatives of the family Pteropodidae (Yinpterochiroptera). The repetitive DNA isolated was named *MAZE/L1*-like and the sequences were deposited in the NCBI database.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

The FISH was performed using the pool of plasmid containing the retrotransposable element isolated. The sequence was labeled by nick translation with biotin 14-dATP

(BioNick™ Labeling System) (Invitrogen), and FISH procedures followed the protocol proposed by Pinkel et al. (1986), with modifications. Mitotic chromosome were denatured in 70% formamide/0.6X SSC (pH 7.0) for 33–36 seconds at 62 °C, the hybridization mixtures (containing 100 ng of denatured probe, 10% dextran sulfate, 2X SSC and 50% formamide in a final volume of 30 µl) were dropped on the slides and the hybridization was performed overnight (18 hours) at 37 °C in moist chamber. Post-hybridization washes were carried out at 72 °C in 2X SSC for five minutes. Detection of the probe was carried out with avidin-FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugate (Sigma, St Louis, MO, USA). The chromosome preparations were counterstained with Propidium Iodide (0.2%) and mounted with Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA). Images were captured with the Olympus DP71 digital camera coupled to a BX61 Olympus microscope and were optimized for brightness and contrast using Adobe Photoshop CS2.

Results

Classical cytogenetic analysis and mapping of repetitive sequences

All species studied showed the same chromosomal organization as previously reported in some works (Souza and Araujo, 1990; Varella-Garcia et al. 1989; Santos and Souza, 1998a,b; Santos et al. 2001, 2002; Barros et al. 2009; Lemos-Pinto et al. 2012; Calixto et al. 2013) (Table 1). The C-banding revealed heterochromatin mainly in the pericentromeric region, with some additional heterochromatic blocks in the interstitial and/or terminal regions, or almost entire heterochromatic arms (Fig. 1 and 2).

The *in situ* hybridization (Fig. 3) in *A. planirostris* and in other 12 Phyllostomidae bats from five subfamilies revealed the enrichment of MAZE/L1-like in the centromeric region of the autosomes of the all species, except in *Chrotopterus auritus* who revealed absence centromeric marks. Concerning the X chromosome, in *A. planirostris*, *A. lituratus*,

A. obscurus, *A. cinereus*, *Glossophaga soricina*, *Lonchorhina aurita*, *Phyllostomus elongatus*, *Platyrrhinus lineatus* and *Sturnira lillium* this sequence hybridized along the extension of the long arm of X chromosome, and in *Carollia perspicillata* it was restrict to the centromere. For *Diphylla ecaudata*, *Dyaemus youngi* and *Chrotopterus auritus*, hybridization signals were observed in the proximal region (extending to the interstitial region) of two chromosomal arms of the X. Interestingly, in *Chrotopterus auritus* the MAZE/L1-like element was enriched in proximal region of the chromosomes, without centromeric marks. For the four species from other mammalian orders (marsupial, primate, rodent and sirenian) used for reference, our probe not hybridized in any species.

Discussion

In Chiroptera there are now few studies concerning the analysis of structure and evolution of repetitive DNAs type II, the L1 elements, a class of highly repeated sequences scattered throughout mammalian genomes. These elements are the most abundant nonLTR retrotransposons, comprising about 17% and 20% of human and mouse genomes, respectively and constitute the dominant family of autonomously replicating retrotransposons in mammals (Furano, 2000; Han et al. 2004). L1 elements have expanded for occupy an enormous fraction of our genome and may be more than just “junk DNA”, and they have been amplifying and evolving since before the marsupials-eutherian split (Han et al. 2004).

The repetitive element MAZE/L1-like identified in this study was located preferentially in the centromeric regions of the chromosomes (coincident with heterochromatic regions), except in *Chrotopterus auritus* who revelead MAZE/L1-like element in proximal region of the chromosomes without centromeric marks, indicates a possible structural role as component of the centromeric constitutive heterochromatin in

Phyllostomidae bats. This organization pattern is apparently widespread among multicellular eukaryotes and suggests the involvement of repetitive DNAs in centromeric functions (Dawe, 2003). In animals and plants, centromeres are rich regions of highly repetitive satellite DNAs, being vital for the correct sorting of chromosomes during cell division (Henikoff et al. 2001).

The preferential localization of repetitive DNA in heterochromatic regions, such as transposable elements (TEs), mainly in the centromeric region of chromosomes, has often been observed in the genome of many eukaryotic groups, for example in dipterans (Pimpinelli et al. 1995; Pardue et al. 1996), plants (Pearce et al. 1996; Brandes et al. 1997; Dimitri and Junakovic 1999), fishes (Dimitri and Junakovic, 1999; Da Silva et al. 2002; Mazzuchelli and Martins, 2009), reptiles (Yamada et al. 2005) and rodents (Yamada et al. 2006). The TEs can also be found scattered in the chromosomes and sometimes in euchromatic regions (Volff et al. 2003).

This preferential localization suggests that heterochromatin can function as refuge to TEs, since its accumulation in heterochromatic areas has been assumed by involvement of selective pressure against the integration of these elements in euchromatic regions (rich in genes) based on the power that the TEs have to cause mutations (inversions, deletions or insertion through transposition events) within a gene or regulatory sequence. Therefore, natural selection has acted against the negative effects of TEs (Bartolomé et al. 2002; Dawe, 2003).

However, our probe not hybridized in the terminal and interstitial regions, corresponding to heterochromatin rich regions in any species. Therefore, we can speculate that our results indicate a differential composition of the heterochromatin associated with MAZE/L1-like element, since one accumulation in heterochromatin does not seem to be related to intrinsic properties of the element family in question. Thus, the same elements

may be abundant in one species and not in the closely related or sibling species, suggesting that this trait is determined by some sort of interaction between each TE family and the host genome (Dimitri e Junakovic, 1999).

Concerning the X chromosome, in *Artibeus* species, in *Glossophaga soricina*, *Lonchorhina aurita*, *Phyllostomus elongatus*, *Platyrrhinus lineatus* and *Sturnira lillium* the MAZE/L1-like element hybridized along the extension of the long arm of X chromosome. However, in *Artibeus* species and *S. lillium* (Fig. 1), this region corresponding to dispersed euchromatin with different structural properties from telomeric and pericentromeric euchromatin, corroborating other studies that showed that in representatives from Stenodermatinae subfamily, in general, the long arm of X chromosome exhibit a differential pattern of the chromatin revealed by C-banding (Souza and Araújo, 1990; Morielle-Versute et al. 1992; Santos and Souza, 1998 a,b; Rodrigues et al. 2000; Santos et al. 2001; Lemos-Pinto et al. 2012; Calixto et al. 2013).

Interestingly, although some reports show the accumulation of retrotransposons in the Y chromosome of some organisms, as seen in *Drosophila miranda* (Steinemann and Steinemann, 1992, 1998; Bachtrog, 2003), the fish *Xiphophorus maculatus* (Volff et al. 1999) and human (Nanda et al. 2000), in our study we don't find the presence of MAZE/L1-like retrotransposon in greater quantity on the Y chromosome of the species studied.

The hybridization signals observed in the proximal region (extending to the interstitial region) of two arms of X chromosome in *Diphylla ecaudata*, *Dyaemus youngi* and *Chrotopterus auritus*, as well as the differential pattern in *C. auritus* with the MAZE/L1-like element enriched only on proximal region of the chromosomes, without centromeric marks, reinforces the idea that the same elements may be abundant in one species and not in the closely related, in according of the interaction between the TE and the host genome (Dimitri e Junakovic, 1999). Furthermore, for reference, it was used four species from other

mammalian orders (marsupial, primate, rodent and sirenian) and our probe not hybridized in any species, indicate a restricted distribution of the MAZE/L1-like element to bats, particularly Phyllostomidae.

Due their characteristics the TEs provide very useful markers for phylogeny reconstruction (Shedlock and Okada 2000; Kidwell and Lisch, 2001), the evolutionary history and genomic impact of mammalian retrotransposons has been the subject of intensive investigation (Szak et al. 2002; Xing et al. 2003; Price et al. 2004; Khan et al. 2006), with few studies focused in the analysis of structure and evolution of these repetitive DNAs type I in bats. Gogolevsky et al. (2009) described the occurrence of a DNA type retrotransposon in megabats (Yinpterochiroptera) but neither in Yangochiroptera. Interestingly, our study showed the presence of retrotransposon DNA in Yangochiroptera representatives.

In contrast, there is a greater frequency in studies of transposons compared with studies evolving retrotransposons on the Chiroptera order, probably due the relatively recent discovery of activity of such elements on genome of bats (Ray et al. 2007, 2008; Thomas et al. 2010). DNA transposons have been considered transpositionally inactive in mammals genomes, based in human, mouse, rat, opossum and platypus sequencing projects revealed a general loss of Class II DNA transposon activity, suggesting a general mammalian-wide extinction of these elements (Mikkelsen et al. 2007; Warren et al. 2008). Additionally, recent analysis of a vespertilionid bat provided evidence that Class II elements were extremely active in the recent evolutionary past of at least one mammalian lineage (Pritham and Feschotte 2007; Ray et al. 2007, 2008). However, the occurrence of DNA transposon in bats appears to be restricted to the species from Vespertilionidae family (Ray et al. 2007, 2008; Thomas et al. 2010; Pagán et al. 2012).

The presence of the element retrotransposon MAZE/L1-like the species studied in this work can be result of horizontal transfer. TEs identified in the genome of

Vespertilionidae bat have already been shown to have undergone horizontal transmission between distantly related animals including other mammals, reptiles, amphibians, fish, nematodes, insects as well as viruses that infect insects (Thomas et al. 2010; Pace et al. 2008; Novick et al. 2010; Gilbert et al. 2010; Pagán et al., 2010). The horizontal transfer, movement of genetic material between reproductively isolated species, is known to be an important process in genome evolution.

In multicellular eukaryotes, it has occurred frequently in plants (Bergthorsson et al., 2003; Won and Renner, 2003; Roulin et al. 2009) and animals as in amphibian (Pace et al. 2008), bats (Ray et al. 2007; Pace et al. 2008; Thomas et al. 2011), crustacean (Casse et al. 2006), dipteran (Loreto et al. 2008; Bartolomé et al. 2009), fish (Diao et al. 2006; De Boer et al. 2007), opossum (Gilbert et al. 2009), reptiles and rodentia (Pace et al. 2008). Most documented cases of horizontal transfer in animals involve the transfer of TEs, usually between closely related species.

The results of our work, and other work already reported, indicate a strong conservation of repeated elements in the heterochromatic region of chromosomes. This suggests that these components have to play key roles in heterochromatin, such as maintaining the structure centromere. Furthermore, the presence of repeated elements preferably in the centromeric chromosomes regions provides a good centromere molecular marker with application in the study of evolution and chromosomal rearrangements.

Acknowledgements

The authors are grateful to Cirlene Maria da Silva, Izaquiel Santos de Andrade and Mario Ferreira da Silva for assistance in the fieldwork. The study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Bachtrog D (2003) Accumulation of Spock and Worf, Two Novel Non-LTR Retrotransposons, on the Neo-Y Chromosome of *Drosophila Miranda*. *Mol. Biol. Evol.* 20(2):173–181.
- Baker RJ, Hoofer SR, Porter, CA, Van Den Bussche RA (2003) Diversification among New World leaf-nosed bats: An evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. *Occ. Papers* 230:1-32.
- Barros HMDR, Sotero-Caio CG, Santos N, Souza MJ (2009) Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus* (Chiroptera, Phyllostomidae). *Genet. Mol. Biol.* 32(4):748-752.
- Bartolomé C, Maside X, Charlesworth B (2002) On the abundance and distribution of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* 19(6):926-937.
- Bartolomé C, Bello X, Maside X (2009) Widespread evidence for horizontal transfer of transposable elements across *Drosophila* genomes. *Genome Biol.* 10:2.
- Bergthorsson U, Adams KL, Thomason B, Palmer JD (2003) Widespread horizontal transfer of mitochondrial genes in flowering plants. *Nature* 424:197–201.
- Biémont C (2008) Within-species variation in genome size. *Heredity* 101:297-298.
- Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux DG, Schultheis C, Volff JN (2008) Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Res.* 16:203–215.
- Brandes A, Heslop-Harrison JS, Kamm A, Kubis S, Doudrick RL, Schmidt T (1997) Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of Ty1-copia-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. *Plant Mol. Biol.* 33, 11–21.
- Calixto MS, Andrade S, Cabral-de-Mello, DC, Santos N, Martins C, Loreto V, Souza MJ (2013) Patterns of rDNA and telomeric sequences diversification: Contribution to repetitive DNA organization in Phyllostomidae bats. *Genetics* (in press).
- Casse N, Bui QT, Nicolas V, Renault S, Bigot Y, Laulier M (2006) Species sympatry and horizontal transfers of Mariner transposons in marine crustacean genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40:609–619.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.
- Craig NL (2002) Mobile DNA: an introduction. In: Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM (Eds.), *Mobile DNA II*. American Society of Microbiology Press, Washington D.C 3–11.
- Da silva C, Hadji H, Ozouf-Costaz C, Nicaud S, Jaillon O, Weissenbach J, Crollius HR (2002) Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (21):1636-1641.
- Daniels SB, Peterson KL, Strausbaug LD, Kidwell MG, Chovnick A (1990) Evidence for horizontal transmission of the P transposable element between *Drosophila* species. *Genetic* 124 339-355.

- Dávalos LM, Cirranello AL, Geisler JH, Simmons NB (2012) Understanding phylogenetic incongruence: lessons from phyllostomid bats. *Biol. Rev.* 1-34.
- Dawe RK (2003) RNA interference, transposons, and the centromere. *Plant Cell* 15:297–302.
- De Boer JG, Yazawa R, Davidson WS, Koop BF (2007) Bursts and horizontal evolution of DNA transposons in the speciation of pseudotetraploid salmonids. *BMC Genomics*. 8:442.
- Diao X, Freeling M, Lisch D (2006) Horizontal transfer of a plant transposon. *PLoS Biol.* 4:e5.
- Dimitri P, Junakovic N (1999) Revising the selfish DNA hypothesis. New evidence on accumulation of transposable elements in heterocromatin. *Trends in Genetics* 15:123-124.
- Ding w, Lin L, Chen B, Dai J (2006) L1 Elements, Processed Pseudogenes and Retrogenes in Mammalian Genomes. *Life* 58(12):677– 685.
- Feschotte C, Pritham EJ (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Review of Genetics* 41:331-368.
- Furano AV (2000) The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64:255–294.
- Gilbert C, Pace JK, Feschotte C (2009) Horizontal SPINning of transposons. *Communicative & Integrative Biology* 2(2):117-119.
- Gilbert C, Schaack S, Pace JK II, Brindley PJ, Feschotte C (2010) A role for host–parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla. *Nature* 464:1347–1350.
- Gogolevsky KP, Vassetzky NS, Kramerov DA (2009) 5S rDNA-derived and tRNA-derived SINES in fruit bats. *Genomics* 93:494-500.
- Han JS, Szak ST, Boeke JD (2004) Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature* 429:268–274
- Hansen RS (2003) X inactivation-specific methylation of LINE-1 elements by DNMT3B: implications for the Lyon repeat hypothesis. *Hum. Mol. Genet.* 12: 2559–2567.
- Henikoff S, Ahmad K, Malik HS (2001) The Centromere Paradox: Stable Inheritance with Rapidly Evolving DNA. *Science* 293 (5532):1098-1102.
- Jones KE, Purvis A, MacLarnon A, Bininda-Emonds ORP, Simmons NB (2002) A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). *Biological Reviews*. 77:223–259.
- Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J (2005) Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetic and Genome Research* 110:462-467.
- Kazazian HH Jr, Goodier JL (2002) "LINE drive. Retrotransposition and genome instability." *Cell* 110 (3): 277-80.
- Khan H, Smit A, Boissinot S (2006) Molecular evolution and tempo of amplification of human LINE-1 retrotransposons since the origin of primates. *Genome Res.* 16: 78–87.
- Kidwell MG, Lisch DLR (2001) Perspective: transposable elements, parasitic DNA and genome evolution. *Evolution* 55(1):1–24.

- Lemos-Pinto MMP, Calixto MS, Souza MJ, Araujo APT, Langguth A, Santos N (2012) Cytotaxonomy of the subgenus *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera) by characterization of species-specific markers. *Comp. Cytogen.* 6(1):17–28.
- Lim JK, Simmons MJ (1994) Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* 16: 269–275.
- Loreto ELS, Carareto CMA, Capy P (2008) Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. *Heredity.* 100:545–554.
- Lyon MF (1998) X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet. Cell. Genet.* 80: 133–137.
- Mazzuchelli J, Martins C (2009) Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica* 136:461–469.
- Mikkelsen TS, Wakefield MJ, Aken B et al. (2007) Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences. *Nature* 447:167–177.
- Morielle-Versute E, Taddei VA, Varella-Garcia M (1992) Chromosome banding studies of *Chiropterus auritus*(Chiroptera: Phyllostomidae). *Rev. Brasil. Genet.* 15(3): 569-573.
- Nanda I, Volff JN, Weis S, Körting C, Froschauer A, Schmid M, Scharl M (2000) Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Chromosoma* 109:173–180.
- Novick P, Smith J, Ray D, Boissinot S (2010) Independent and parallel lateral transfer of DNA transposons in tetrapod genomes. *Gene.* 449:85–94.
- Pace JK, Gilbert C, Clark MS, Feschotte C (2008) Repeated horizontal transfer of a DNA transposon in mammals and other tetrapods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*105:17023–17028.
- Pagán HJT, Smith JD, Hubley RM, Ray DA (2010) PiggyBac-ing on a primate genome: novel elements, recent activity and horizontal transfer. *Genome Biol Evol.* 2(0):293–303.
- Pagán HJT, Macas J, Nova PK, McCulloch ES, Stevens RD, Ray DA (2012) Survey Sequencing Reveals Elevated DNA Transposon Activity, Novel Elements, and Variation in Repetitive Landscapes among Vesper Bat. *Genome Biol. Evol.* 4(4):575–585.
- Pardue ML, Danilevskaya ON, Lowenhaupt K, Slot F, Traverse KL (1996) *Drosophila* telomeres: new views on chromosome evolution. *Trends Genet.*12:48–52.
- Pearce PR, Pich U, Harrison G, Flavell AJ, Heslop-Harrison JS, Schubert I, Kumar A (1996) The Ty-1 copigagroup retrotransposons of *Allium cepa* are distributed throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin. *Chromosome Res.*4, 357–364.
- Peracchi AL, IP Lima, NR, Reis MR, Nogueira, Ortêncio-Filho H (2006) Ordem Chiroptera, 153-230 In NR Reis, AL Peracchi, WA Pedro, IP Lima (ed.). *Mamíferos do Brasil*. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina.
- Pimpinelli S, Berloco M, Fanti L, Dimitri P, Bonaccorsi S, Marchetti E, Caizzi R, Gatti M (1995) Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3804–3808.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:2934-2938.
- Price AL, Eskin E, Pevzner PA (2004) Whole-genome analysis of Alu repeat elements reveals complex evolutionary history. *Genome Res.* 14: 2245–2252.

- Pritham EJ, Feschotte C (2007) Massive amplification of rolling-circle transposons in the lineage of the bat *Myotis lucifugus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 04(6):1895-900. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100:10824–10829.
- Rangwala SH and Kazazian HH (2010) The L1 retrotransposition assay: A retrospective and toolkit. *Methods* 49(3): 219-226.
- Ray DA, Pagan HJT, Thompson ML, Stevens RD (2007) Bats with hATs: evidence for recent DNA transposon activity in genus *Myotis*. *Mol Bio Evol.* 24:632-639.
- Ray DA, Feschotte C, Pagan HJT, Smith JD, Pritham EJ, Arensburger P, Atkinson PW, NL Craig (2008). Multiple waves of recent DNA transposon activity in the bat *Myotis lucifugus*. *Genome Res.* 18:717-728.
- Reis, NR, Perachi, AL, Pedro, WA, Lima, OP (2011) Morcegos do Brasil. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, pp17-253.
- Robertson HM, Lampe DJ (1995) Recent horizontal transfer of a mariner transposable element among and between Diptera and Neuroptera. *Mol. Bio. Evol.* 12(5): 850-862.
- Rodrigues LRR, Barros RMS, Assis MFL, Marques-Aguiar SA, Pieczarka JC, Nagamachi CY (2000) Chromosome comparison between two species of Phyllostomus (Chiroptera – Phyllostomidae) from Eastern Amazonia, with some phylogenetic insights. *Genetics and Molecular Biology* 23(3): 595–599.
- Roulin A, Piegu B, Fortune PM, Sabot F, D'Hont A, Manicacci D, Panaud O (2009) Whole genome surveys of rice, maize and sorghum reveal multiple horizontal transfers of the LTR-retrotransposon Route66 in Poaceae. *BMC Evol. Biol.* 9:58.
- Sambrook J, Russel, DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manua* Cold Spring Harbor, NY; Cold Spring Harbor Laboratory, 3^a edition.
- Santos N, Souza MJ (1998a) Use of fluorochromes chromomycin A₃ and DAPI to study constitutive heterochromatin and NORs in four species of bats (Phyllostomidae). *Caryologia* 51:265-278.
- Santos N, Souza MJ (1998b) Characterization of the constitutive heterochromatin of *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae, Chiroptera) using the base-specific fluorochromes, CMA3 (GC) and DAPI (AT). *Caryologia* 51: 51-60.
- Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y, Souza MJ (2001) Comparative karyology of brazilian vampire bats *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata* (Phyllostomidae, Chiroptera): banding patterns, base-specific fluorochromes and FISH of ribosomal genes. *Hereditas* 134: 189-194.
- Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y, Souza, MJ (2002) Localization of rRNA genes in Phyllostomidae bats reveals silent NORs in *Artibeus cinereus*. *Hereditas*, 136:137-143.
- Shedlock AM, Okada N (2000) SINE insertions: Powerful tools for molecular systematics. *Bioessays* 22:148–160.
- Simmons NB (2005) *Mammal species of the world: A Taxonomic and geographic reference*. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 3^aed, 1:312-529.
- Souza MJ, Araújo MCP (1990) Conservative pattern of the G-bands and diversity of C-banding patterns and NORs in Stenodermatinae (Chiroptera Phyllostomatidae). *Rev. Brasil. Genet.* 13:255-268.

- Steinemann M and Steinemann S (1992) Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a trap for retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7591-7595.
- Steinemann M and Steinemann S (1998) Enigma of Y chromosome degeneration: Neo-Y and X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution. *Genetica*. 102/103:409-420.
- Sumner AT (1972) A sample technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75:304-306.
- Szak ST, Pickeral OK, Makalowski K, Boguski MS, Landsman D, Boeke JD (2002) Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome Biology* 3(10).
- Thomas J, Schaack S, Pritham EJ (2010) Pervasive horizontal transfer of rolling-circle transposons among animals. *Genome Biol. Evol.* 2:656–664.
- Thomas J, Sorourian M, Ray D, Baker RJ, Pritham EJ (2011) The limited distribution of Helitrons to vesper bats supports horizontal transfer. *Gene* 474:52–58.
- Varella-Garcia M, Morielle-Versute, Taddei VA (1989) A survey of cytogenetic data on Brazilian bats. *Rev. Brasil. Genet.* 12:761-793.
- Volff JN, Körting C, Sweeney K, Scharl M: The non LTR retrotransposon Rex3 from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Mol Biol Evol.* 16:1427–1438 (1999).
- Volff JN, Bouneau L, Ozouf-Costaz C, Fischer C (2003) Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends Genet.* 19:674-678.
- Warren WC, Hillier LW, Marshall Graves JA, et al. (2008) Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature* 453:175–183.
- Wetters AL, Rockman MV, Simmons NB (2000) Phylogeny of Phyllostomid Bats (Mammalia: Chiroptera): Data From Diverse Morphological Systems, Sex Chromosomes, and Restriction Sites. *Bulletin Of The American Museum Of Natural History* (248):1- 200.
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P et al. (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat. Rev. Genet.* 8:973-982.
- Won H, Renner, SS (2003) Horizontal gene transfer from flowering plants to Gnetum. *PNA* (19):10824-10829.
- Xing J, Salem AH, Hedges DL et al. (2003) Comprehensive analysis of two Alu Yd subfamilies. *J. Mol. Evol.* 57:S76–S89.
- Yamada K, Nishida-Umehara C, Matsuda Y (2005) Molecular and cytogenetic characterization of site-specific repetitive DNA sequences in the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*, Trionychidae). *Chromosome Res.* 13:33-46.
- Yamada K, Kamimura E, Kondo M, Tsuchiya K, Nishida-Umehara C, Matsuda Y (2006) New families of site-specific repetitive DNA sequences that comprise constitutive heterochromatin of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*, Cricetinae, Rodentia). *Chromosoma* 115:36-49.
- Yang Z, Boffelli D, Boonmark N, Schwartz K, Lawn R (1998) Apolipoprotein(a) gene enhancer resides within a LINE element. *J. Biol. Chem.* 273: 891–897.

Legends

Tabela 1 – Chromosomal features of the studied species.

Figure 1 – Idiogram with C-banding pattern. (a) *Artibeus lituratus*, (b) *A. planirostris*, (c) *A. obscurus*, (d) *A. cinereus*, (e) *Sturnira lilium*. Note the differential staining of the long arm of the X chromosome.

Figure 2 – Idiogram with C-banding pattern. (a) *Phyllostomus elongatus*, (b) *Platyrrhinus lineatus*, (c) *Lonchorhina aurita*, (d) *Carollia perspicillata*, (e) *Glossophaga soricina*, (f) *Chrotopterus auritus*, (g) *Diaemus yongii*, (h) *Diphylla ecaudata*.

Figure 3 – Element repetitive centromeric MAZE/L1-like in Phyllostomidae bats. (a) *Artibeus lituratus*, (b) *A. cinereus*, (c) *Sturnira lilium*, (d) *A. obscurus*, (e) *Platyrrhinus lineatus*, (f) *Carollia perspicillata*, (g) *A. planirostris*, (h) *Glossophaga soricina*, (i) *Phyllostomus elongatus*, (j) *Diphylla ecaudata*, (k) *Lonchorhina aurita*, (l) *Diaemus yongii*, (m) *Chrotopterus auritus*. Arrowheads indicate the chromosome X. Bar = 5µm.

Order Species	Specimens		2n	FN	Sex system
	M	F			
Chiroptera (Subfamily Desmodontinae)					
<i>Diphylla ecaudata</i>	0	1	32	60	XY
<i>Diaemus yongii</i>	0	1	32	60	XY
Chiroptera (Subfamily Glossophaginae)					
<i>Glossophaga soricina</i>	1	2	32	60	XY
Chiroptera (Subfamily Phyllostominae)					
<i>P. elongatus</i>	1	2	32	58	XY
<i>Lonchorhina aurita</i>	1	1	32	60	XY
<i>Chrotopterus auritus</i>	0	1	28	52	XY
Chiroptera (Subfamily Carrollinae)					
<i>Carollia perspicillata</i>	2	2	20/21	36	XY ₁ Y ₂
Chiroptera (Subfamily Stenodermatinae)					
<i>Sturnira lilium</i>	2	3	30	56	Neo-XY
<i>A. lituratus</i>	2	1	30/31	56	XY1Y2
<i>A obscurus</i>	2	1	30/31	56	XY1Y2
<i>A. planirostris</i>	3	2	30/31	56	XY1Y2
<i>Artibeus cinereus</i>	1	2	30	56	Neo-XY
<i>Platyrrihinus lineatus</i>	2	3	30	60	Neo-XY
Marsupial					
<i>Didelphis albiventris</i>	1	0	22	20	XY
Primate					
<i>Homo sapiens</i>	1	1	46		XY
Rodent					
<i>Rattus novergicus</i>	1	1	42	64	XY
Sirenian					
<i>Trichechus manatus</i>	1	0	48	90	XY

M = male; F = female; 2n = diploid number; FN = fundamental number

M = male; F = female; 2n = diploid number; FN = fundamental number

Tabela 1

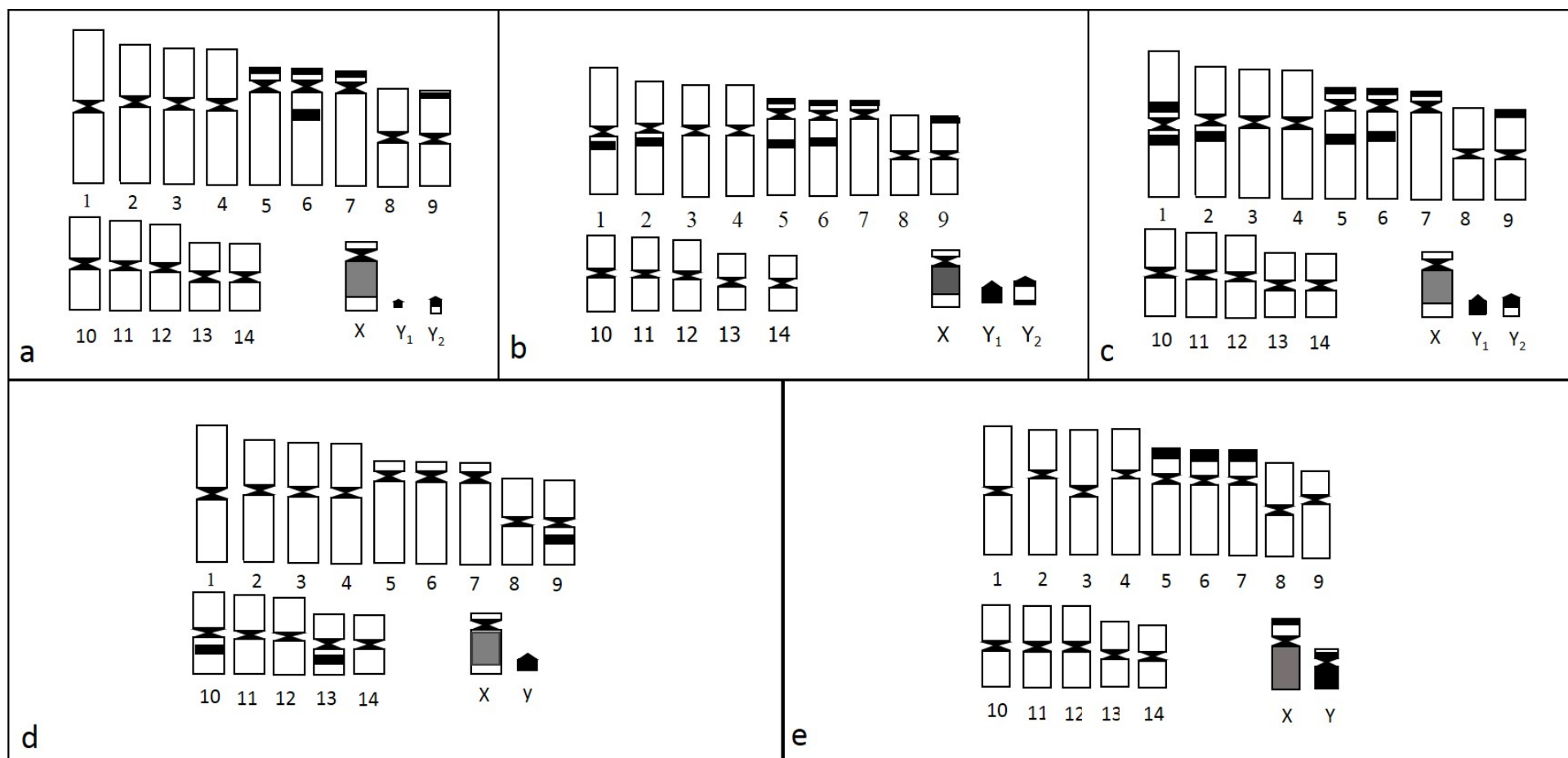


Figure 1

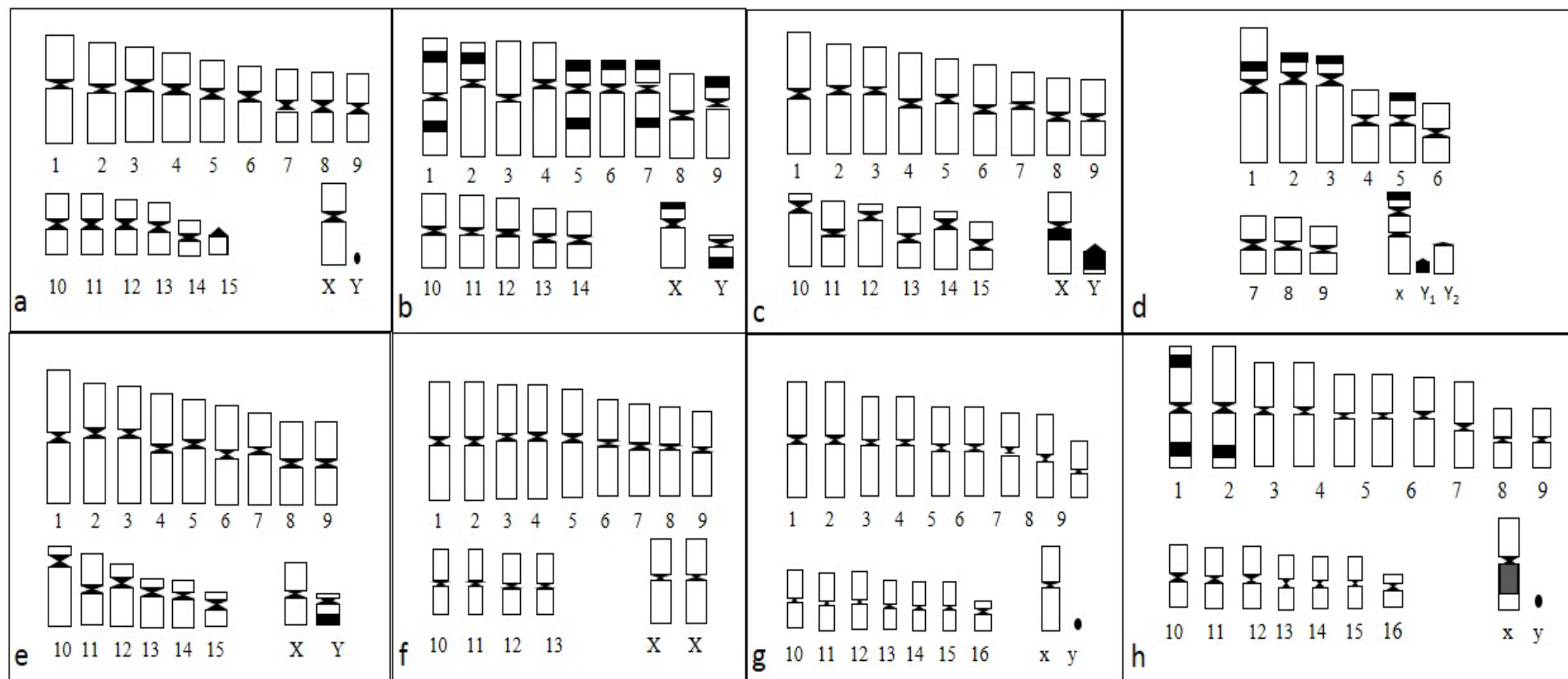


Figure 2

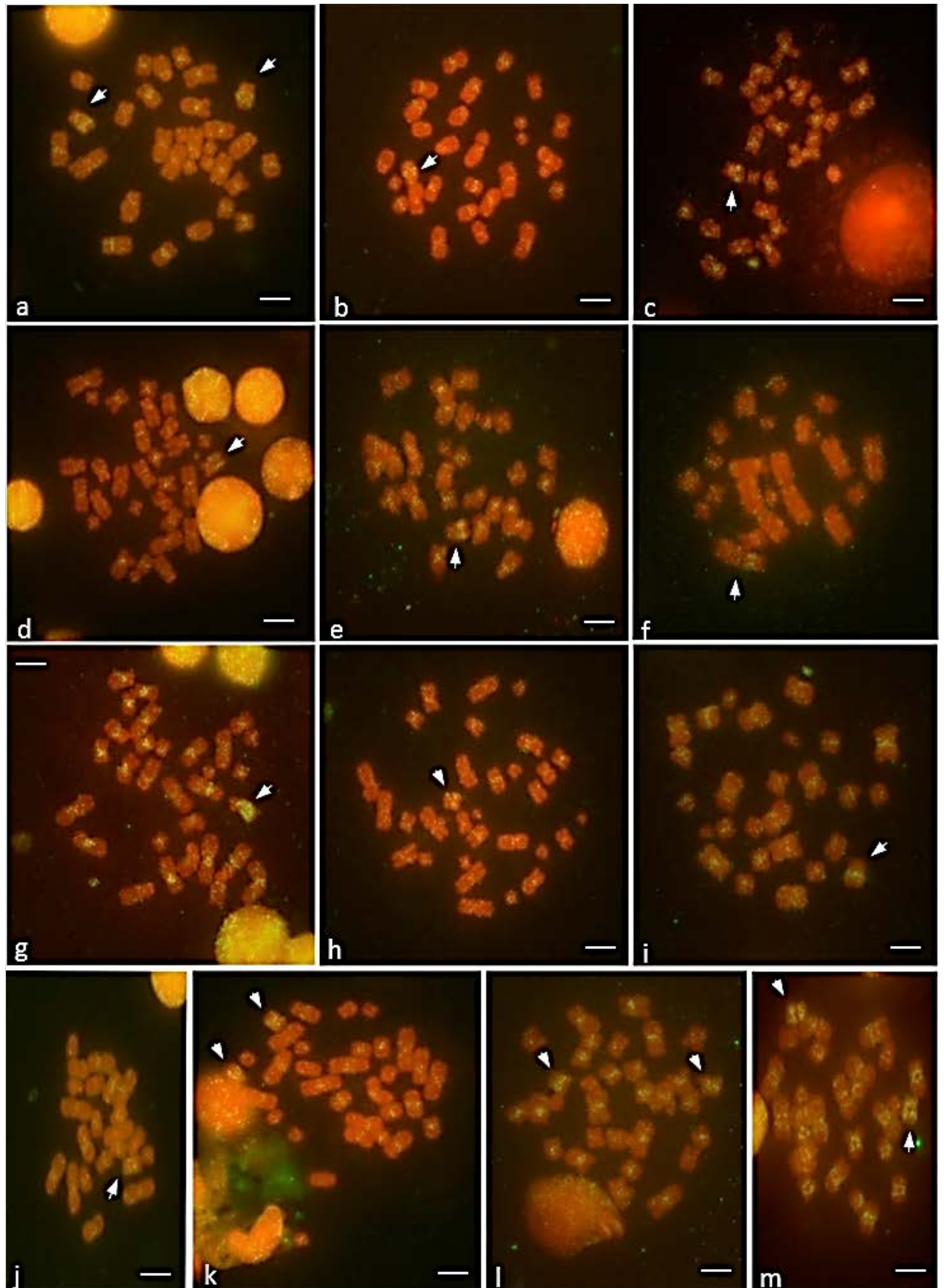


Figure 3

6. Discussão geral

Considerando o DNAr 45S, as espécies analisadas apresentaram dois padrões principais de distribuição (i) 66,67% das espécies com dois sítios e (ii) 33,33% das espécies com seis sítios. A ocorrência do último padrão pode ser devido à amplificação desta sequência, sugerindo que a dispersão dos genes de DNAr 45S pode estar associada à presença de elementos transponíveis que têm mecanismos de transposição adequados para mover o DNAr de um local para outro no genoma (Zhang *et al.*, 2008).

Aparentemente a condição plesiomórfica para este gene na família Phyllostomidae é a ocorrência de dois sítios localizados em um par autossômico, dado corroborado pelo número de espécies com esta característica (condição modal). No entanto, a presença de sítios múltiplos observados em espécies do gênero *Artibeus* também foi descrita em outras espécies da subfamília Stenodermatinae, particularmente nos gêneros *Chiroderma* e *Uroderma* (Baker *et al.*, 1992; Neves *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005), bem como em representantes da subfamília Glossophaginae, como visto em espécies do gênero *Choeroniscus* (Baker *et al.*, 1992; Neves *et al.*, 2001) e em *Lonchophylla thomasi* (Ribeiro *et al.*, 2003), bem como em *Macrotus waterhousii* que é considerado o cariotípo ancestral para Phyllostomidae (Patton e Baker, 1978; Baker *et al.*, 1992).

Além do padrão comum de apenas um par cromossômico portador do sítio DNAr 45S observado em muitas espécies do grupo, também é observado o reposicionamento deste sítio em cromossomos sexuais em espécies de Phyllostomidae: *C. perspicillata* e *C. Castanea*, ambas pertencentes à subfamília Carollinae (Goodpasture e Bloom, 1975; Hsu *et al.*, 1975; Morielle e Varella-

Garcia, 1989; Souza e Araújo, 1990; Santos e Souza, 1998b), aparentemente resultantes de rearranjos cromossômicos, como translocação e fusão (Goodpasture e Bloom, 1975; Tucker, 1986). Embora a ocorrência de tais sítios em cromossomos sexuais seja incomum, estudos mostram esse padrão em outros mamíferos como *Canis familiaris*, *Monodelphis domestica* e *Tragulus Javanicus* (Hsu et al., 1975; Svartman e Vianna-Morgante, 2003; Kim et al., 2004).

A análise comparativa do bandeamento C com dados de DNAr indica que em espécies com alta e moderada dispersão da heterochromatina (blocos pericentroméricos, intersticiais, terminais e braços quase totalmente heterocromáticos) o DNAr sofreu espalhamento como observado em três autossomos em *A. cinereus*, *A. lituratus*, *A. obscurus* e *A. planirostris*, restrito a um autossomo em *G. soricina*, *P. discolor*, *P. elonagatus*, *P. lineatus*, *S. liliun* e *T. cirrhosus*, e ao cromossomo X em *C. perspicillata*.

Observamos uma relação quanto à dispersão da heterochromatina e do DNAr 45S, onde espécies com heterochromatina dispersa em regiões telomérica e/ou intersticial foram caracterizadas pela não conservação do DNAr 45S quanto ao número de sítios, formando dois grupos: (i) três espécies com seis sítios de DNAr 45S e (ii) seis espécies com dois sítios. Além disso, apenas uma espécie apresentou heterochromatina exclusivamente na região pericentromérica, sendo caracterizada pela presença de apenas um dois de DNAr 45S.

Em nossa análise comparativa não observamos uma associação entre as sequências de DNAr 45S e 5S, indicando que possivelmente distintas forças evolutivas estão agindo nesses dois componentes genômicos em Phyllostomidae levando à dispersão do DNAr 45S juntamente com a

heterocromatina. Em contraste uma conservação quanto ao número de clusters de DNAr 5S foi observada em todas as espécies analisadas.

Em vertebrados existem poucos estudos de mapeamento das sequências de 5S, a qual foi mapeada em anfíbios (Rodrigues *et al.*, 2000), répteis (Srikulnath *et al.*, 2011), e principalmente em peixe (Pinhal *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012; Merlo *et al.*, 2012; Nakajima *et al.*, 2012). Em mamíferos estes estudos foram concentrados principalmente em Primata (Lomholt *et al.*, 1995), Rodentia (Matsubara *et al.*, 2004; Matsuda *et al.*, 1994) e Soricomorpha (Gornung *et al.*, 2008). Em Chiroptera, o conhecimento sobre o distribuição cromossômica desse gene é restrita a uma única espécie: *Rhinolophus hipposideros* (família Rhinolophidae) (Puerma *et al.*, 2008), com esses sítios localizados em nove pares autossômicos.

A presença de DNAr 5S em um par cromossômico observada em 12 morcegos Phyllostomidae deste trabalho, é o padrão mais observado em mamíferos (Matsuda *et al.*, 1994; Lomholt *et al.*, 1995; Matsubara *et al.*, 2004; Gornung *et al.*, 2008), embora em alguns casos podem ocorrer em mais de um cromossomo como foi visto em camundongo (Lomholt *et al.*, 2002) e carnívoros (Christensen *et al.*, 1998), e mais de um sítio no mesmo par cromossômico como em *Macaca fascicularis* em que foram descritos três sítios localizados no mesmo par cromossômico (Lomholt *et al.*, 1996). Nossos resultados sugerem que a localização cromossômica do DNAr 5S em apenas um par cromossômico representa a condição ancestral para essas sequências na família Phyllostomidae. No entanto, é necessário aumentar o número de espécies mapeadas para este gene, a fim de propor a condição ancestral correta para a família.

Não foi observada uma associação entre os dois marcadores ribossomais em *C. perspicillata*, *P. discolor*, *P. elongatus* e *T. cirrhosus*, nos quais foram localizados em diferentes pares cromossômicos, sugerindo um caminho evolutivo separado para estas duas famílias multigênicas em Phyllostomidae. Esta condição também foi observada em outras espécies de mamíferos e de vertebrados (Martins e Galletti, 2001; Matsubara *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2012).

Esta característica possivelmente é devido aos diferentes processos de transcrição de ambos os cistrons, uma vez que os genes 45S são transcritos pela RNA polimerase I, enquanto 5S genes são transcritos pela RNA polimerase III (Martins, 2007). Este arranjo é predominante em eucariotos superiores, onde os genes 5S e 45S estão em geral em áreas separadas do genoma (Drouin e Moniz de Sá, 1995). Martins e Galetti-Júnior (1999) descreveram a localização dos sítios de DNAr 45S e 5S em diferentes cromossomos em espécies de peixes, o que parece constituir um bom estado para manter a harmonia desses sítios de múltiplas cópias, que é importante para evitar translocações indesejáveis de DNAr 5S no arranjo de DNAr 45S, ou vice-versa. Portanto, esta condição permite um conservadorismo ainda maior destas regiões, sendo importante para a manutenção da célula. Assim, nestes casos os clusters 45S e 5S estão localizados em diferentes pares cromossômicos, seguindo caminhos evolutivos não relacionados.

Em contraste, nas três espécies do gênero *Artibeus*, e provavelmente em *G. soricina*, *S. lillium* e *P. lineatus*, o sítio de DNAr 5S está localizado no mesmo par autossômico portador do DNAr 45S, no entanto sem co-localização destes

sítios, mostrando que os sítios de DNAr 45S e 5S podem assumir uma organização sintênica no mesmo cromossomo.

Os ITS observados em regiões pericentroméricas e centroméricas na maioria das espécies aqui analisadas são muito frequentes em roedores (*Rattus rattus*), anfíbios (*Hyla versicolor* e *H. chrysoscelis*), répteis (*Sceloporus olivaceus* e *Cophosaurus taxanus*) e aves (*Gallus gallus domesticus* e *Vireo bellii*) (Meyne *et al.*, 1990) e em outros vertebrados (Metcalf *et al.*, 2004, 2007; Sanches *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2012). Segundo Meyne *et al.* (1990), que descreveram ITS em 100 espécies de vertebrados, a presença de sequências (TTAGGG)_n em regiões não terminais pode estar relacionada com o status evolutivo da espécie. Além disso, podem ser indícios de rearranjos cromossômicos como fusão ou inversão ocorridos ao longo da evolução do genoma (Nanda e Schmidt, 1994).

Espécies com características plesiomórficas geralmente têm apenas sequências teloméricas nas regiões terminais dos cromossomos, enquanto espécies com caracteres apomórficas têm sítios teloméricos altamente diferenciados e ITS (sítios teloméricos intersticiais) devido rearranjos cromossômicos ocorridos durante a evolução cariotípica (Meyne *et al.*, 1990).

Os resultados do nosso trabalho apoiam a ideia de que o cariótipo de *C. perspicillata* sofreu muitos rearranjos em comparação com cariótipos considerados mais ancestrais (Meyne *et al.*, 1990), e também indicam que outros mecanismos cromossômicos além de associações teloméricas estão envolvidas, sugerindo que a ausência de sinais de hibridização nas extremidades dos cromossomos pode ser devido a um número reduzido da repetição de cópias da sequência telomérica, resultante da grande associação telomérica sofrida pelos

cromossomos. Estes ITS podem ser remanescentes de eventos de fusão telômero-a-telômeros entre cromossomos acrocêntricos ancestrais.

Além disso, não se sabe se as sequências teloméricas originais são retidas nesses sítios intersticiais. Em alguns vertebrados quando fusões Robertsonianas (Rb) ocorreram, sequências intersticiais (TTAGGG)_n não foram mantidas nos locais de fusão (Garagna *et al.*, 1995; Nanda *et al.*, 1995; Vermeesch *et al.*, 1996). No entanto, vários exemplos de ITS foram identificados em regiões cromossômicas resultantes de Rb bem como fusões *in tandem* e inversões (Lee *et al.*, 1993; Vermeesch *et al.*, 1996; Fagundes *et al.*, 1997).

Os ITS observados em todas as espécies analisadas neste trabalho, exceto em cromossomos de *G. soricina*, *L. aurita* e *P. discolor*, reforçam a ideia de ocorrência de fusão Rb nos cromossomos de morcegos filostomídeos e indicam que as sequências teloméricas foram retidas durante os eventos de fusão. Além disso, os nossos dados mostram que as regiões com intensos sinais fluorescentes centroméricos/pericentroméricos correspondem à HC, corroborando com dados da literatura que mostram que, na maioria dos casos, estes ITS estão nas margens ou nas regiões de HC (Meyne *et al.*, 1990; Ono e Yoshida, 1997; Finato *et al.*, 2000; Pagnozzi *et al.*, 2000, 2002; Multani *et al.*, 2001; Faria *et al.*, 2002; Santani *et al.*, 2002; Sanches *et al.*, 2009), apesar de não ter uma correlação consistente entre a quantidade e localização cromossômica de HC, e a presença de sítios não-teloméricos (TTAGGG)_n.

Uma vez que os ITS foram identificados como sendo um componente do DNAsat, a co-localização destas sequências e da HC reflete a presença de ambos como um componente do DNAsat. As sequências (TTAGGG)_n foram descritas como DNA satélite em algumas espécies de vertebrados, como visto

em espécies de peixes e marsupiais (Pagnozzi *et al.*, 2000, 2002; Metcalfe *et al.*, 2004).

Em relação ao elemento repetitivo MAZE/L1-like identificado neste estudo, sua localização preferencial nas regiões centroméricas dos cromossomos (local coincidentes com as regiões de heterocromatina), exceto em *Chrotopterus auritus* que apresentou ausência de marcação centromérica, indica um possível papel estrutural como componente da heterocromatina constitutiva centromérica em morcegos da família Phyllostomidae. Este padrão de organização é comum entre os eucariontes multicelulares e sugere o envolvimento de DNAs repetitivos em funções centroméricas (Dawe, 2003).

Esta localização preferencial em áreas heterocromáticas sugere que a heterocromatina pode funcionar como refúgio para ETs, uma vez que seu acúmulo em áreas heterocromáticas está relacionado pelo envolvimento de pressão seletiva contra a inserção desses elementos em regiões eucromáticas (rica em genes) com base no poder que os ETs têm de causar mutações (inversões, deleções ou inserções através de eventos de transposição) dentro de um gene ou sequência reguladora. Portanto, a seleção natural age contra os efeitos negativos causados pelos ETs (Bartolomé *et al.*, 2002; Dawe, 2003).

No entanto, nossa sonda não hibridizou nas regiões terminais e intersticiais correspondentes a regiões ricas em heterocromatina em algumas espécies. Portanto, podemos especular que nossos resultados indicam uma composição diferencial da heterocromatina associada ao elemento MAZE/L1-like, uma vez que o acúmulo de heterocromatina não pode ser relacionado com as propriedades intrínsecas das famílias do elemento em questão. Assim, os mesmos elementos podem ser abundantes em uma espécie e não em espécies

estritamente relacionadas ou espécies-irmãs, sugerindo que esta característica é determinada por algum tipo de interação entre cada família de ET e o genoma do hospedeiro (Dimitri e Junakovic, 1999).

Em relação ao cromossomo X, nas espécies do gênero *Artibeus*, em *Glossophaga soricina*, *Lonchorhina aurita*, *Phyllostomus elongatus*, *Platyrrhinus lineatus* e *Sturnira lillium* a sequência do elemento MAZE/L1-like hibridizou na extensão do braço longo do cromossomo X. Nas espécies do gênero *Artibeus* e em *S. lillium* esta região corresponde a uma eucromatina dispersa com diferentes propriedades estruturais da eucromatina telomérica e pericentromérica nestas espécies, corroborando com outros estudos que mostram que em representantes da subfamília Stenodermatinae, em geral, o braço longo do cromossomo X apresenta um padrão diferencial da eucromatina revelado por bandeamento C (Souza e Araújo, 1990; Morielle-Versute *et al.*, 1992; Santos e Souza, 1998 a,b; Rodrigues *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001; Lemos-Pinto *et al.*, 2012).

Curiosamente, embora alguns relatos mostrem o acúmulo de retrotransposons no cromossomo Y de alguns organismos, como visto em *Drosophila miranda* (Steinemann e Steinemann, 1992, 1998; Bachtrog, 2003), no peixe *Xiphophorus maculatus* (Volf *et al.*, 1999) e em humano (Nanda *et al.*, 2000), no nosso trabalho não verificamos a presença do retrotransposon MAZE/L1-like em maior quantidade no cromossomo Y das espécies estudadas.

Além disso, os sinais de hibridização observados na região proximal (que se estende para a região intersticial) dos dois braços cromossômicos do X de *Diphylla ecaudata*, *Dyaemus youngi* e *Chrotopterus auritus*, bem como o padrão diferencial observado em *C. auritus* com o elemento MAZE/L1-like enriquecido

apenas na região proximal dos cromossomos, sem marcação centromérica, reforça a ideia de que os mesmos elementos podem ser abundantes em uma espécie, e não em espécies estreitamente relacionadas, e que depende da interação entre a ET e o genoma do hospedeiro (Dimitri e Junakovic, 1999). Adicionalmente, nas quatro espécies de outras ordens de mamíferos (marsupiais, primata, roedor e sirênio), usadas como referência, a ausência de hibridização nas espécies, indica uma distribuição restrita do elemento MAZE/L1-like em morcegos, particularmente da família Phyllostomidae.

As características dos ETs fazem deles bons marcadores para a reconstrução de filogenias (Shedlock e Okada 2000; Kidwell e Lisch, 2001), assim a história evolutiva e o impacto da presença de retrotransposons no genoma de mamíferos tem sido alvo de intensa investigação (Szak *et al.*, 2002; Xing *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2006), com poucos estudos focados na análise da estrutura e evolução destes DNAs repetitivos tipo I em morcegos. Gogolevsky *et al.* (2009) descreveram a ocorrência de um tipo de DNA de retrotransposons em morcegos Yinpterochiroptera, mas que estava ausente nos representantes de Yangochiroptera. Curiosamente, o nosso estudo mostrou a presença de DNA retrotransposon em representantes de Yangochiroptera.

Contrariamente, existe uma maior frequência em estudos de transposons em comparação com estudos envolvendo retrotransposons na ordem Chiroptera, provavelmente devido à recente descoberta da atividade de tais elementos no genoma de morcegos (Ray *et al.*, 2007, 2008; Thomas *et al.*, 2010). DNA transposons têm sido considerados transcricionalmente inativos em genomas de mamíferos, baseados em projetos de sequenciamento em humano, rato,

marsupial e ornitorrinco que revelaram perda da atividade de DNA transposon (Classe II), sugerindo a extinção desses elementos no genoma de mamíferos (Mikkelsen *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2008).

Além disso, uma análise recente em uma espécie de morcego da família vespertilionidae forneceu evidências de que elementos da classe II foram extremamente ativos num passado evolutivo recente de pelo menos uma linhagem de mamíferos (Pritham e Feschotte 2007; Ray *et al.*, 2007, 2008). No entanto, a ocorrência de DNA transposon em morcegos parece estar restrita às espécies da família Vespertilionidae (Ray *et al.*, 2007, 2008; Thomas *et al.*, 2010; Pagán *et al.*, 2012).

A presença do elemento retrotransposon MAZE/L1-like nas espécies estudadas neste trabalho pode ser resultado de transferência horizontal. De acordo com a literatura, os ETs identificados no genoma de morcegos Vespertilionidae sofreram transferência horizontal entre animais distantemente relacionadas, incluindo outros mamíferos, répteis, anfíbios, peixes, insetos, nematódeos, bem como vírus que infectam insetos (Thomas *et al.*, 2010; Pace *et al.*, 2008; Novick *et al.*, 2010; Gilbert *et al.*, 2010; Pagán *et al.*, 2010). A transferência horizontal, que é o movimento do material genético entre espécies isoladas reprodutivamente, é conhecido por ser um processo importante na evolução do genoma.

A transferência horizontal de ETs tem sido observada em vários eucariontes multicelulares como plantas (Bergthorsson *et al.*, 2003; Won e Renner, 2003; Roulin *et al.*, 2009) e mais recentemente em animais como anfíbios (Pace *et al.*, 2008), morcegos (Ray *et al.*, 2007, Pace *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2011), crustáceos (Casse *et al.*, 2006), dípteros (Loreto *et al.*, 2008; Bartolomé *et al.*,

2009), peixe (Diao *et al.*, 2006; De Boer *et al.*, 2007), timbu (Gilbert *et al.*, 2009), répteis e Rodentia (Pace *et al.*, 2008). A maioria dos relatos de transferência horizontal em animais envolve a transferência de ETs, geralmente entre espécies estreitamente relacionadas.

Os resultados deste trabalho em conjunto com outros trabalhos já descritos, indicam uma forte conservação de elementos repetitivos na região heterocromática dos cromossomos, sugerindo que esses componentes desempenham papéis fundamentais na heterocromatina, como a manutenção da estrutura do centrômero. Além disso, a presença de elementos repetitivos preferencialmente na região centromérica dos cromossomos, fornece um bom marcador molecular centromérico com aplicação no estudo da evolução e rearranjos.

A caracterização da organização cromossômica de sequências de DNA repetitivos é de extrema importância para uma completa compreensão da relação entre sua estrutura e função no cromossomo. Dessa forma, os dados deste trabalho contribuem para a caracterização da organização das famílias multigênicas, sequências teloméricas e elementos transponíveis no genoma de morcegos, bem como na compreensão dos mecanismos evolutivos ocorridos ao longo da evolução cromossômica de morcegos da família Phyllostomidae.

7. Conclusões gerais

1. A não associação entre os dois marcadores ribossomais sugere um caminho evolutivo separado para estas duas famílias multigênicas em Phyllostomidae, indicando que diferentes forças evolutivas estão agindo no genoma dessa família, levando à dispersão dos DNAr 45S, juntamente com a heterocromatina;
2. A presença de apenas um par de sítios de DNAr 5S em todas as espécies analisadas sugere que esta represente a condição plesiomórfica para essas sequências na família Phyllostomidae;
3. Durante a evolução cromossômica de morcegos Phyllostomidae houve a ocorrência de fusões Rb sem perda de sequências de DNA telomérico;
4. O elemento MAZE/L1-like apresenta uma composição diferencial associado a heterochromatina;
5. A ausência de hibridização nos cromossomos de outras espécies de mamíferos sugere uma distribuição do elemento MAZE/L1-like restrita em morcegos, particularmente da família Phyllostomidae;
6. A localização preferencial do retrotransposon MAZE/L1-like em áreas heterocromáticas sugere que também em morcegos a heterocromatina pode funcionar como refúgio para ETs, devido a pressão seletiva contra a inserção desses elementos em regiões eucromáticas (rica em genes).

8. Referências Bibliográficas

- Alberico M, Cadena A, Hernández-Camacho J and Muñoz-Saba Y (2000) Mamíferos (Synapsida: Theria) de Colombia. *Biota Colomb.* (1):43-75.
- Aubert G and Lansdorp, PM (2008) Telomeres and aging. *Physiol Rev*, (88):557-579.
- Bachtrog D (2003) Accumulation of Spock and Worf, Two Novel Non-LTR Retrotransposons, on the Neo-Y Chromosome of *Drosophila miranda*. *Mol. Biol. Evol.* 20(2):173–181.
- Baker RJ (1970) Karyotypic trends in Bats. In: Wimsatt, W.A. (Ed). *Biology of Bats*. Academic Press, NY (1): 65-96., 1970.
- Baker RJ (2006) Order Chiroptera. Pp. 378-380 in the *Atlas of Mammalian Chromosomes* (S. J. O'Brien, J. C. Menninger, and W. G. Nash, eds.). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 760p.
- Baker RJ and Bickham JW (1980) Karyotypic evolution in bats: evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related taxa. *Syst Zool* 29, 239-253.
- Baker RJ, Maltbie M, Owen JG, Hamiltom MJ and Bradley RD (1992) Reduced number of ribosomal sites in bats: evidenced for mechanism to contain genome size. *J Mammal* 73, 847-858.
- Baker RJ, Hofer SR, Porter CA and Van Den Bussche RA (2003) Diversification among New World leaf-nosed bats: An evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. *Occ Papers* 230, 1-32.
- Barros HMDR, Sotero-Caio CG, Santos N and Souza MJ (2009) Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus* (Chiroptera, Phyllostomidae). *Genet. Mol. Biol.* 32(4):748-752.
- Bartolomé C, Maside X and Charlesworth B (2002) On the abundance and distribution of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* 19(6):926-937.
- Bartolomé C, Bello X and Maside X (2009) Widespread evidence for horizontal transfer of transposable elements across *Drosophila* genomes. *Genome Biol.* 10:2.
- Bergthorsson U, Adams KL, Thomason B and Palmer JD (2003) Widespread horizontal transfer of mitochondrial genes in flowering plants. *Nature* 424, 197–201.
- Bernard E, Aguiar LMS and Machado RB (2011) Discovering the Brazilian bat fauna: a task for two centuries? *Mammal Rev* 41(1):23-39.
- Biémont C and Vieira C (2006) Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443: 521-524.
- Biet E, Sun J and Dutreix M (1999) Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research.* (27):596-600.
- Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C and Volff JN (2008) Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research.* (16):203-215.
- Casse N, Bui QT, Nicolas V, Renault S, Bigot Y and Laulier M (2006) Species sympatry and horizontal transfers of Mariner transposons in marine crustacean genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40:609–619.

- Charlesworth B (2001) The effect of life-history and mode of inheritance on neutral genetic variability. *Genet. Res.* (77):153–166.
- Charlesworth B, Sniegowski P and Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*. (371):215-220.
- Christensen K, Lomholt B, Hallenberg C and Nielsen KV (1998) Mink 5S rRNA genes map to 2q in three loci suggesting conservation of synteny with human 1q. *Hereditas* 128:17-20.
- Czenze ZJ, Park AD and Willis CK (2013) Staying cold through dinner: cold-climate bats rewarm with conspecifics but not sunset during hibernation. *J Comp Physiol B*.
- Dawe RK (2003) RNA interference, transposons, and the centromere. *Plant Cell* 15:297–302.
- De Boer JG, Yazawa R, Davidson WS and Koop BF (2007) Bursts and horizontal evolution of DNA transposons in the speciation of pseudotetraploid salmonids. *BMC Genomics*. 8:442.
- Diao X, Freeling M and Lisch D (2006) Horizontal transfer of a plant transposon. *PLoS Biol.* 4:e5.
- Dimitri P and Junakovic N (1999) Revising the selfish DNA hypothesis. New evidence on accumulation of transposable elements in heterocromatin. *Trends in Genetics*. v15, p123-124.
- Doolittle WF and Sapienza C (1980) Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284: 601-603.
- Drouin G and Moniz de Sá M (1995) The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeated units of other multigene families. *Mol Biol Evol* 12:481–493.
- Eickbush TH and Eickbush DG (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175: 477-485.
- Ellegren H (2000) Microsatellites mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*.(16):551-558.
- Fagundes V, Vianna-Morgante AV and Yonenaga-Yassuda Y (1997) Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* (2n 514,15 and 16) *Chromosome Research* 5:228–232.
- Faria KC and Morielle-Versute E (2002) In situ hybridization of bat chromosomes with human (TTAGGG)_n probe, after previous digestion with Alu I. *Gen Mol Biol* 25(4):365–371.
- Faria KC, Marchesin, SR, Moreira, PR, Beguelini MR and Morielle-Versute E. (2009) New insights into telomeric DNA sequence (TTAGGG)_n location in bat chromosomes. *Genetics and Molecular Research*. 8(3):1079-1084.
- Feschotte C (2004) Merlin a New Superfamily of DNA Transposons Identified in Diverse Animal Genomes and Related to Bacterial IS1016 Insertion Sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 21(9):1769-1780.
- Feschotte C and Pritham EJ (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Review of Genetics*. 41:331-368.
- Finato AO, Varella-Garcia M, Tajara EH, Taddei VA and Morielle-Versute E (2000) Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Eumops perotis* (Molossidae, Chiroptera). *Chromosome Research* 8:563–569.
- Garagna S, Broccoli D, Redi CA, Searle JB, Cooke HJ and Capanna E (1995) Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but

- retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. *Chromosoma* 103:685–692.
- Gardner, AL. (2008). *Mammals of South America. Vol. 1. Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats*. Chicago University Press, Chicago.
- Gilbert C, Pace JK and Feschotte C (2009) Horizontal SPINning of transposons. *Communicative & Integrative Biology* 2(2):117-119.
- Gilbert C, Schaack S, Pace JK II, Brindley PJ and Feschotte C (2010) A role for host–parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla. *Nature* 464:1347–1350.
- Gogolevsky KP, Vassetzky NS and Kramerov DA (2009) 5S rDNA-derived and tRNA-derived SINES in fruit bats. *Genomics* 93:494-500.
- Gomes AJB, Rodrigues LRR, Rissino JD, Nagamachi CY and Pieczarka JC (2010) Biogeographical karyotypic variation of *Rhinophylla fischerae* (Chiroptera: Phyllostomidae) suggests the occurrence of cryptic species. *Comparative Cytogenetics*. 4(1):79-85.
- Goopasture C and Bloom SE (1975) Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*. (53):37-50.
- Gornung E, Volleth M, Capanna E and Castiglia R (2008) Comparative cytogenetics of moles (Eulipotyphla, Talpidae): chromosomal differences in *Talpa ramana* and *T. europaea* Cytogen. Gen. Res. 121: 249–254.
- Gregory TR (2005) Genome size evolution in animals. In Gregory TR (Ed.). *The Evolution of the Genome*. Elsevier, San Diego, pp. 3-87.
- Harris AH and Wright JM (1995) Nucleotide sequence and genomic organization of cichlid fish minisatellites. *Genome* (38):177-184.
- He W, Qin Q, Liu S, Li T, Wang J, Xiao J, Xie L, Zhang C and Liu Y (2012) Organization and Variation Analysis of 5S rDNA in Different Ploidy-level Hybrids of Red Crucian Carp Topmouth Culter. *Plos One* 7(6):e38796.
- Hsu T, Spirito SE and Pardue ML (1975) Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* 53:25–36.
- IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acessado em: 31/03/2013.
- Jarrín VP, Flores C and Salcedo J (2010) Morphological variation in the short-tailed fruit bat (*Carollia*) in Ecuador, with comments on the practical and philosophical aspects of boundaries among species. *Integr Zool*. 5(3):226-40.
- Jones G (2013) Sensory biology: listening in the dark for echoes from silent and stationary prey. *Curr Biol*. 18;23(6):R249-51.
- Kapitonov VV and Jurka J (2001) Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 98:8714-8719.
- Kapitonov VV and Jurka J (2007) Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons. *Trends in Genetics*. 23(10):521-529.
- Khan H, Smit A, Boissinot S (2006) Molecular evolution and tempo of amplification of human LINE-1 retrotransposons since the origin of primates. *Genome Res*. 16: 78–87.
- Kim KS, Tanaka K, Ismail DB, Maruyama S, Matsubayashi H, Endo H, Futuka K and Kimura J (2004) Cytogenetic comparison of the lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*) and the greater mouse deer (*T. napu*). *Caryologia*. 57:229–243.
- Kidwell MG and Lisch DLR (2001) Perspective: transposable elements, parasitic DNA and genome evolution. *Evolution* 55(1):1–24.

- Kidwell MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*. (115):49-63.
- Lal SK, Giroux MJ, Brendel V, Vallejos CE and Hannah LC (2003) The maize genome contains a Helitron insertion. *Plant Cell* 15:381-391.
- Lander ES, Linton LM and Birren B (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860-921.
- Lee C, Sasi R and Lin CC (1993) Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs. *Cytogenet Cell Genet* 63:156–159.
- Leite-Silva C, Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y and Souza MJ (2003) Karyotypic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. molossus* and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using FISH and banding techniques. *Hereditas* 138: 94-100.
- Lemos-Pinto MMP, Calixto, MS, Souza MJ, Araújo APT, Langguth A and Santos N (2012) Cytotaxonomy of the subgenus *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera) by characterization of species-specific markers. *Comp. Cytogen* 6(1):7–28.
- Levsky JM and Singer RH (2003) Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Science* 116: 2833-2838.
- Lewin B (2004) Retrovirus and retroposons. In: *Genes VIII*. Carlson G. Ed: Pearson Prentice Hall. NJ. p. 493-509.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A and Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. (11):2453-2465.
- Liu Z, Li P, Kocabas A, Karsi A and Ju Z (2001) Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. (289):317-324.
- Lomholt B, Frederiksen S, Nederby Nielsen J and Hallenberg C, (1995) Additional assignment of the human 5S rRNA genes to chromosome 1q31. *Cytogenet. Cell Genet*. 70: 76-79.
- Lomholt B, Frederiksen S, Jensen LR, Christensen K and Hallenberg C (1996) 5S rRNA genes in *Macaca fascicularis* map to chromosome 1p in three loci. *Mamm Genome* 7:451–53.
- Lomholt B, Christensen K and Frederiksen S (2002) Guinea pig (*Caio cambayo*) 5S rRNA genes map to 7q2, 20q2 and 30q2 shown by an R-banded karyotype with PNA-FISH. *Hereditas* 136:104–107.
- Loreto ELS, Carareto CMA and Capy P (2008) Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. *Heredity*. 100:545–554.
- Martins C, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Mazzuchelli J and Oliveira SG (2011). Cytogenetic mapping and its contribution to the knowledge of animal genomes. *Advances in Genetics Research*. Volume 4, Cap 1: 1-81.
- Martins C, Oliveira C and Wasko AP (2004) Wright J.M. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent *in situ* hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - A review. *Aquaculture*. (231):37-49.
- Martins C (2007) Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: *Fish Cytogenetics*. Eds: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F and Kapoor BG. Science Publisher, Inc., USA.

- Martins C and Galetti PM Jr (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* 7:363–367.
- Martins C and Galetti Jr PM (2001) Two rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica* 111:439–446.
- Matsubara K, Nishida-Umehara C, Tsuchiya K, Nukaya D and Matsuda Y (2004) Karyotypic evolution of Apodemus (Muridae, Rodentia) inferred from comparative FISH analyses. *Chromosome Research*. 12:383–395.
- Matsuda Y, Moriwaki K, Chapman VM, Hoi-Sen Y, Akbarzadeh J and Suzuki H (1994) Chromosomal map-ping of mouse 5S rRNA genes by direct R-banding fluorescence in situ hybridization. *Cyto-genet Genome Research*. 66:246–249.
- Mazzuchelli J and Martins C (2009) Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, 136:461–469.
- Mceachern MJ, Krauskopf A and Blackburn EH (2000) Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.* (334): 331-358.
- Mcstay B and Grummt I (2008) The Epigenetics of rRNA Genes: From Molecular to Chromosome Biology. *Annu.Rev. Cell Dev.Biol.* (24):131-157.
- Merlo MA, Cross I, Palazón JL, Úbeda-Manzanaro M, Sarasquete C and Rebordinos L (2012) Evidence for 5S rDNA Horizontal Transfer in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. *BMC Evolutionary Biology* 12(201): 2-13
- Metcalf CJ, Eldridge MD and Johnston PG (2004) Mapping the distribution of the telomeric sequence (T2AG3)_n in the 2n = 14 ancestral marsupial complement and in the macropodines (Marsupialia: Macropodidae) by fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Research* 12:405-414
- Metcalf CJ, Eldridge MD and Johnston PG (2007) Mapping the distribution of the telomeric sequence (T2AG3)_n in the Macropodoidea (Marsupialia) by fluorescence in situ hybridization. II. The ancestral 2n=22 macropodid karyotype. *Cytogen Gen Res* 116:212–217.
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL and Moyzis RK (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, Berlin (99): 3–10.
- Mikkelsen TS, Wakefield MJ, Aken B et al. (2007) Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences. *Nature* 447:167–177.
- Morielle E and Varella-Garcia M (1989) Variability of nucleolus organizer regions in Phyllostomid bats. *Rev. Brasil. Genet* 11:853–871.
- Morielle-Versute E, Taddei VA and Varella-Garcia M (1992) Chromosome banding studies of *Chrotopterus auritus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Rev. Brasil. Genet.* 15(3): 569-573.
- Multani AS, Ozen M, Furlong CL, Zhao YJ, Hsu TC and Pathak S (2001) Heterochromatin and interstitial telomeric DNA homology. *Chromosoma* 110: 214–220.
- Nakajima RT, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Venere PC and Martins C (2012) Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. *BMC Evolutionary Biology* 12:(198):2–11.

- Nanda I and Schmid M (1994) Localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in chicken (*Gallus domesticus*) chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 65:190–193.
- Nanda I, Schneider, Rasp M, Winking H and Schmid M (1995) Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. *Chromosome Research*. 3:399-409.
- Nanda I, Volff JN, Weis S, Körting C, Froschauer A, Schmid M and Scharf M (2000) Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Chromosoma* 109:173–180.
- Nei M and Rooney AP (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Ann Rev Genetics* 39:121-152.
- Neves ACB, Pieczarka JC, Barros RMS, Marques-Aguiar S, Rodrigues LRR and Nagamachi CY (2001). Cytogenetic studies on *Choeroniscus minor* (Chiroptera, Phyllostomidae) from the Amazon region. *Cytobios* 105:91–98.
- Novick P, Smith J, Ray D and Boissinot S (2010) Independent and parallel lateral transfer of DNA transposons in tetrapod genomes. *Gene*. 449:85–94.
- Ono T and Yoshida MC (1997) Differences in the chromosomal distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in two species of the vespertilionid bats. *Chrom Res* 5:203–205.
- Orgel LE and Crick FH (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284: 604-607.
- Ohshima K, Koishi R, Matsuo M and Okada N (1993) Several short interspersed repetitive elements (SINEs) in distant species may have originated from a common ancestral retrovirus: characterization of a squid SINE and a possible mechanism for generation of tRNA-derived retrotransposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:6260-6264.
- Pace JK, Gilbert C, Clark MS and Feschotte C (2008) Repeated horizontal transfer of a DNA transposon in mammals and other tetrapods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105:17023–17028.
- Pagan HJT, Smith JD, Hubley RM and Ray DA (2010) PiggyBac-ing on a Primate Genome: Novel Elements, Recent Activity and Horizontal Transfer. *Genome Biol. Evol.* 2:293–303.
- Paglia AP, Fonseca Gabda, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar Lms, Chiarello A G, Leite Ylr, Costa Lp, Siciliano S, Kierulff Mm, Mendes SI, Tavares Vdac, Mittermeier RA and Patton JI (2012). *Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals*. 2ª Edição / 2nd Edition. *Occasional Papers in Conservation Biology*, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76p.
- Pagnozzi J, Ditchfield AD and Yonenaga-Yassuda Y (2002) Mapping the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in eight species of Brazilian marsupials (Didelphidae) by FISH and the correlation with constitutive heterochromatin. Do ITS represent evidence for fusion events in American marsupials? *Cytogenet Genome Res* 98(4):278–84.
- Pagnozzi JM, Silva MJJ and Yonenaga-Yassuda Y (2000) Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). *Chromosome Research* (8):585-591.

- Passos FC, Silva WR, Pedro WA and Bonin MR (2003) Frugivoria em morcegos (Mammalia, Chiroptera) no Parque Estadual Intervales, sudeste do Brasil. *Rev. Brasil. Zoo.* 20 (3): 511–517.
- Patton JC, Baker RJ (1978) Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoid bats. *Syst Zool* 27:449-462.
- Pearce PR, Pich U, Harrison G, Flavell AJ, Heslop-Harrison JS, Schubert I, Kumar A (1996) The Ty-1 copia group retrotransposons of *Allium cepa* are distributed throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin. *Chromosome Res.* 4, 357–364.
- Peracchi AL, Lima IP, Reis NR, Nogueira MR and Ortêncio-Filho H (2011) Ordem Chiroptera. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA and Lima IP. *Mamíferos do Brasil*, Londrina, p.162-200.
- Pinhal D, Ypshimura TS, Araki CS and Martins C (2011) The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. *BMC Evol Biol* 11:151.
- Poulter RT, Goodwin TJ and Butler MI (2003) Vertebrate helitrons and other novel Helitrons. *Gene* 313:201–212.
- Price AL, Eskin E and Pevzner PA (2004) Whole-genome analysis of Alu repeat elements reveals complex evolutionary history. *Genome Res.* 14: 2245–2252.
- Pritham EJ and Feschotte C (2007) Massive amplification of rolling-circle transposons in the lineage of the bat *Myotis lucifugus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 04(6):1895-900.
- Puerma E, Acosta MJ, Barragán MJ, Martínez S, Marchal JA, Bullejos M and Sánchez A (2008) The karyotype and 5S rRNA genes from Spanish individuals of the bat species *Rhinolophus hipposideros* (Rhinolophidae, Chiroptera). *Genetica* 134:287-295.
- Raska I, Koberna K, Malínský J, Fidlerová H and Mašata M (2004) The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biology of the Cell* 96:579-594.
- Ray DA, Feschotte C, Pagan HJT, Smith JD, Pritham EJ, Arensburger P, Atkinson PW and Craig NL (2008) Multiple waves of recent DNA transposon activity in the bat, *Myotis lucifugus*. *Genome Res.* (18):717–728.
- Ray DA, HJT, Pagan, Thompson ML and Stevens RD (2007) Bats with hATs: evidence for recent DNA transposon activity in genus *Myotis*. *Mol. Biol. Evol.* (24):632–639.
- Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA and Lima IP (2007) *Morcegos do Brasil*, 1ª edição, 37-127.
- Ribeiro NAB, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Rissino JD, Neves ACB, Gonçalves ACO, Marques-Aguiar S, Assis MFL and Barros RMS (2003) Cytogenetic analysis in species of the subfamilie Glossophaginae (Phyllostomidae, Chiroptera) supports a polyphyletic origin. *Caryologia* 56(1):85–96.
- Rodrigues LRR, Barros RMS, Assis MFL, Marques-Aguiar SA, Pieczarka JC and Nagamachi CY (2000) Chromosome comparison between two species of *Phyllostomus* (Chiroptera - Phyllostomidae) from Eastern Amazonia, with some phylogenetic insights. *Gen. Mol. Biol.* 23(3):595-599.
- Roulin A, Piegou B, Fortune PM, Sabot F, D'Hont A, Manicacci D and Panaud O (2009) Whole genome surveys of rice, maize and sorghum reveal multiple horizontal transfers of the LTR-retrotransposon Route66 in Poaceae. *BMC Evol. Biol.* 9:58.

- Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostino M and Giulotto E (2008) Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenetic and Genome Research*, Oxford, (122): 219–228.
- Sánchez J, Bianchi MS and Bolzán AD (2009) Effect of bleomycin on interstitial telomeric sequences of immortalized Chinese hamster ovary cells *Mutation Research*. 669:139–146.
- Santani A, Raudsepp T and Chowdhary BP (2002) Interstitial telomeric sites and NORs in Hartmann's zebra (*Equus zebra hartmannae*) *Chromosomes. Chromosome Research* 10:527–534.
- Santos N and Souza MJ (1998a) Use of fluorochromes chromomycin A₃ and DAPI to study constitutive heterochromatin and NORs in four species of bats (Phyllostomidae). *Caryologia*, (51):265-278.
- Santos N and Souza MJ (1998b) Characterization of the constitutive heterochromatin of *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae, Chiroptera) using the base-specific fluorochromes, CMA₃ (GC) and DAPI (AT). *Caryologia* 51, 51-60.
- Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y and Souza MJ (2001) Comparative karyology of brazilian vampire bats *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata* (Phyllostomidae, Chiroptera): banding patterns, base-specific fluorochromes and FISH of ribosomal genes. *Hereditas* 134: 189-194.
- Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y and Souza MJ (2002) Localization of rRNA genes in Phyllostomidae bats reveals silent NORs in *Artibeus cinereus*. *Hereditas*, 136: 137-143.
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.
- Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, Artoni RF, Vicari MR, Martins C and Feldberg E (2012) Chromosomal evolution of Neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. *Rev Fish Biol Fisheries* 23:201–214.
- Shapiro JA and Sternberg R (2005) Why repetitive DNA is essential to genome function. *Biol Rev* 80: 1-24.
- Shedlock AM and Okada N (2000) SINE insertions: Powerful tools for molecular systematics. *Bioessays*. 22:148–160.
- Silva AM, Marques-Aguiar SA, Barros RMS, Nagamachi CY and Pieczarka JC (2005) Comparative cytogenetic analysis in the species *Uroderma magnirostrum* and *U. bilobatum* (cytotype 2n=42) (Phyllostomidae, Stenodermatinae) in the Brazilian Amazon. *Gen Mol Biol* 28(2):248–253.
- Simmons NB (2000) Bat phylogeny: an evolutionary context for comparative studies. Pp. 9 -58 in *Ontogeny, functional ecology, and evolution of bats* (R. Adams and S. Pederson, eds.), Cambridge University Press.
- Simmons NB (2005) *Mammal species of the world: A Taxonomic and geographic reference*. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 3rded, v1, 312-529.
- Smit AFA (1996) The origin of interspersed repeats in the human genome. *Current Opinion in Genetics and Development*. 6:743-748.
- Sotero-Caio CG, Pieczarka JC, Nagamachi CY, Gomes AJ, Lira TC, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Souza MJ and Santos N (2011) Chromosomal homologies among vampire bats revealed by chromosome painting (Phyllostomidae, Chiroptera). *Cytogen. Gen. Res.* 132(3):156-64.

- Souza MJ and Araújo, MCP (1990). Conservative pattern of the G-bands and diversity of C-banding patterns and NORs in Stenodermatinae (Chiroptera Phyllostomatidae). *Rev Brasil Genet* 13, 255-268.
- Srikulnath K, Uno Y, Matsubara K, Thongpan A Suputtitada S, Apisitwanich A, Nishida C and Matsuda Y (2011) Chromosomal localization of the 18S-28S and 5S rRNA genes and (TTAGGG)_n sequences of butterfly lizards (*Leiolepis belliana belliana* and *Leiolepis boehmei*, Agamidae, Squamata). *Genetics and Molecular Biology* 34 (4):582–586.
- Steinemann M and Steinemann S (1992) Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a trap for retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7591-7595.
- Steinemann M and Steinemann S (1998) Enigma of Y chromosome degeneratuion: Neo-Y and X chromosomes of *Drosophila Miranda* a model for sex chromosome evolution. *Genetica*. 102/103:409-420.
- Sumner AT (2003) Chromosomes: Organization and Function. Blackwell Science Ltd., UK. 1-287.
- Sun K, Luo L, Zhang Z, Liu S and Feng J (2013) Molecular characteristics and evolution of the mitochondrial control region in three genera (Hipposideridae: *Hipposideros Aselliscus* and *Coelops*) of leaf-nosed bats. *Mitochondrial DNA*.
- Svartman M and Vianna-Morgante AM (2003) Conservation of chromosomal location of nucleolus organizer in American marsupials (Didelphidae). *Genetica* 118:11–16.
- Szak ST, Pickeral OK, Makalowski K, Boguski MS, Landsman D and Boeke JD (2002) Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome Biology* 3(10).
- Tafalla C, Estepa A and Coll JM (2006) Fish transposons and their potential use in aquaculture. *Journal of Biotechnology*. 123(4):397–412.
- Thomas J Sorourian M, Ray D, Baker RJ and Pritham EJ (2011) The limited distribution of Helitrons to vesper bats supports horizontal transfer. *Gene*. 15;474(1-2):52-8.
- Thomas J, Schaack S and Pritham EJ (2010) Pervasive horizontal transfer of rolling-circle transposons among animals. *Genome Biol. Evol.* 2:656–664.
- Toth G, Gaspari Z and Jurka J (2000) Microsatélites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*. (10):967-981.
- Tucker PK (1986) Sex chromosome-autosome translocations in the leaf-nosed bats family Phyllostomidae. I. Mitotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae. *Cytogenet Cell Genet*. 43:19–27.
- Varella-Garcia M and Taddei VA (1989) Citogenetica de chiropteros: Métodos e aplicações. *Rev.bras. Zool.* 6(2):297-323.
- Varella-Garcia M, Morielle-Versute E and Taddei VA (1989) A survey of cytogenetic data on Brazilian bats. *Rev Brasil Genet* (12):761-793.
- Vermeesch JR, De Meurichy W, Van Den Berghe H, Marynen P and Petit P (1996) Differences in the distribution and nature of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in the chromosomes of the Giraficidae, okapi (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob(5;26) fusion site. *Cytogenet Cell Genet* 72:310–315.
- Volff JN, Körting C, Sweeney K and Scharl M (1999) The non LTR retrotransposon Rex 3 from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Mol Biol Evol*. 16:1427–1438.

- Volleth M, Klett C, Kollak A, Dixkens C, Winter Y, Just W, Vogel W and Hameister H (1999) ZOO-FISH analysis in a species of the order Chiroptera: *Glossophaga soricina* (Phyllostomidae). *Chromosome Research* 7: 57-64.
- Walsh JB (2001) Genome Evolution: Overview. *Encyclopedia of life sciences*.
- Warren WC, Hillier LW, Marshall Graves JA, et al. (2008) Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature* 453:175–183.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E et al., (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420:520–562.
- Weider LJ, Elser JJ, Crease TJ, Mateos M, Cotner JB and Markow TA (2005) The Functional Significance of Ribosomal (r) DNA Variation: Impacts on the Evolutionary Ecology of Organisms. *Annu.Rev.Ecol.Syst.* (36):219-242.
- Wetters AL, Rockman MV and Simmons NB (2000) Phylogeny of Phyllostomid Bats (Mammalia: Chiroptera): Data From Diverse Morphological Systems, Sex Chromosomes, and Restriction Sites. *Bulletin Of The American Museum Of Natural History* (248):1- 200.
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P and Schulman A (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Rev Genet* 8: 973-982.
- Won H and Renner, SS (2003) Horizontal gene transfer from flowering plants to Gnetum. *PNA* (19):10824-10829.
- Wu Y, Motokawa M, Harada M, Thong VD, Lin LK and Li YC (2012) Morphometric variation in the pusillus group of the genus *Rhinolophus* (Mammalia: Chiroptera: Rhinolophidae) in East Asia. *Zoolog Sci.* 29 (6):396-402.
- Xing J, Salem AH, Hedges DJ, Kilroy GE, Watkins WS, Schienman JE, Stewart CB, Jurka J, Jorde LB, Batzer MA. (2003) Comprehensive analysis of two Alu Yd subfamilies. *J. Mol. Evol.* 57:S76–S89.
- Zhang X, Eickbush MT and Eickbush TH (2008) Role of recombination in the long-term retention of transposable elements in rRNA gene loci. *Genetics* 180:1617–1626.

9. Anexos

9.1 Protocolos

9.1.2 Cultivo de linfócitos

1. Adicionar 0,5 ml de sangue total do indivíduo em frascos de cultura contendo 4ml do meio RPMI 1690 (GIBCO) suplementado com 1ml de soro bovino fetal (CULTILAB) e 0,2ml de fitohemaglutinina (GIBCO);
2. Incubar em estufa a 37°C, por 72 horas;
3. Após 70 horas adicionar 0,1 ml de colchicina 0,0016% (SIGMA);
4. Após 2 horas (ao completar 72 horas de cultivo), centrifugar o material por 6 minutos a 1800rpm;
5. Desprezar o sobrenadante e adicionar 8 ml de KCl previamente aquecido a 37°C, para a realização de choque hipotônico;
6. Manter os tubos em banho-maria a 37°C por 20 minutos;
7. Centrifugar o material;
8. Fixar o material com metanol/ácido acético, na proporção 3:1.

9.1.2 Preparação direta de medula óssea

1. Aplicar uma injeção subcutânea de fermento glicosado e aguardar um período de 12 horas;
2. Aplicar uma injeção subcutânea de colchicina e aguardar um período de 40 minutos;
3. Sacrificar os animais;
4. Retirar úmeros e fêmures;
5. Lavar em uma solução de Hank's;
6. Centrifugar o material por 6 minutos a 1800rpm;
7. Desprezar o sobrenadante e adicionar 8 ml de KCl previamente aquecido a 37°C, para a realização do choque hipotônico;
8. Manter os tubos em banho-maria a 37°C por 20 minutos;
9. Centrifugar o material;
10. Fixar o material com metanol/ácido acético, na proporção 3:1.

9.1.3 Bandeamento C (Baseado em Sumner, 1980)

1. Mergulhar a lâmina em uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2N por 30 minutos a temperatura ambiente.
2. Lavar com água destilada.
3. Mergulhar a lâmina em solução de hidróxido de bário (BaOH) 5% a 60°C por 30 segundos a 1 minuto.
4. Lavar em banhos rápidos de HCl 0,2N e água destilada.
5. Mergulhar em solução de 2xSSC a 60°C por 45 minutos.
6. Lavar com água destilada.
7. Corar com uma solução de Giemsa a 2% por 10 minutos. Acompanhar ao microscópio. Caso a coloração não fique adequada, submeter a lâmina novamente ao corante, por mais 5 a 10 minutos.
8. Lavar com água destilada, secar, mergulhar no xilol e montar com bálsamo do Canadá.

9.1.4 Extração de DNA genômico de tecidos sólidos (Baseado em Sambrook and Russel 2001)

1. Macerar o tecido (asa, coração ou fígado) obtido dentro de um eppendorff de 1,5mL com auxílio de uma tesoura;
2. Adicional 430 µL de tampão de digestão (ver tabela abaixo)

Reagente	C1	V1	C2	V2
NaCl	5M	10,0 µL	0,1M	500,0 µL
Tris-HCl pH 8	1M	5,0 µL	0,01M	500,0 µL
EDTA pH 8	0,5M	25,0 µL	0,025M	500,0 µL
SDS	10%	25,0 µL	0,5%	500,0 µL
Proteinase K	10mg/mL	5,0 µL	0,1mg/mL	500,0 µL
H ₂ O _d q.s.p.	-	430,0 µL	-	500,0 µL

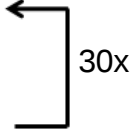
3. Incubar em banho Maria a 50 °C por cerca de 1 hora e 30 min (homogeneizar periodicamente);
4. Adicionar 500,0 µL de Fenol:Clorofórmio (1:1) e agitar com movimentos rotatórios durante 15 min até homogeneizar os componentes;
5. Centrifugar a 15.000 RPM durante 15 min;
6. Transferir a camada superior para outro eppendorf de 1,5 mL;
7. Adicionar 0,2x o volume de NaCl 1M e 2x o volume de Etanol 100% gelado, agitar suavemente para precipitar o DNA;
8. Centrifugar a 15.000 RPM durante 15 min;
9. Descartar o sobrenadante e acrescentar 375,0 µL de Etanol 70% (lavagem), sem agitar;
10. Centrifugar a 15.000 RPM durante 15 min;
11. Descartar o sobrenadante e secar o pellet em estufa 37 °C;
12. Ressuspender com água mili-Q durante algumas horas.

9.1.5 Reações de PCR DNAr 5S

1. Preparo do mix de reação

Reagente	Quantidade
Tampão Taq 10x	2,5 µL
Taq polymerase (5U/µL)*Invitrogen, 11615-010	0,25 µL
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µL
dNTP (8 µM)	0,8 - 1,0 µL
DNA (150,0 – 200,0 mg/µL)	1,0 µL
Pimer F (10,0 µM)	1,0 µL
Primer R (10,0 µM)	1,0 µL
H ₂ O mili-Q (q.s.p. 25,0 µL)	q.s.p. 25,0 µL

2. Ciclos para a PCR

Etapa	Temperatura	Tempo	
1	95 °C	5 min	
2	95 °C	40 seg	
3*	X °C	40 seg	
4	72 °C	1 min	
5	72 °C	5 min	
6	4 °C	For ever	

* Ciclo de anelamento do primer: X = 54 (reação DNAr 5S).

9.1.6 Marcação dos fragmentos de DNA para uso como sonda

Marcação através da reação de *Nick translation*

- Kit BioNick™ Labeling System (Invitrogen, Cat. no. 18247-015), Biotina

Mix para 2-4 lâminas

- 200-250 ng de DNA;
- 1,0 µL de dNTP mix;
- 1,0 µL de mix de enzima;
- H₂O q.s.p. 9,0 µL.

1. Misturar os componentes e incubar a 16 °C durante 30 min;
2. Interromper a reação adicionando 1,0 µL de *stop buffer*;
3. Adicionar 1/10 do volume (1,0 µL) de Acetato de Sódio 3M e dobrar o volume de Etanol (22,0 µL) 100% gelado;
4. Misturar gentilmente invertendo o tubo e incubar em freezer –80 °C durante 30 min;
5. Centrifugar a 15.000 RPM durante 15 min a 4 °C;
6. Descartar o sobrenadante e adicionar Etanol 70% gelado;
7. Centrifugar a 15.000 RPM durante 5 min a 4 °C;
8. Descartar o sobrenadante e secar o pellet em estufa a 37 °C;
9. Resuspender em 6,0 µL de água milli-Q autoclavada.

9.1.7 Marcação através da reação de PCR

Utilizar o plasmídeo com inserto do gene de RNAr 5S para a reação de PCR. A reação é semelhante a uma reação de identificação de inserto.

Mix de reação

Reagente	Quantidade
Tampão Taq 10x	2,5 µL
Taq polymerase (5U/µL)*Invitrogen, 11615-010	0,25 µL
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µL
dNTP (8 mM)*	0,8 - 1,0 µL
DNA (1.000 ng/µL)	0,3 µL
Pimer F (10,0 µM)	1,25 µL
Primer R (10,0 µM)	1,25 µL
H ₂ O mili-Q (q.s.p. 25,0 µL)	q.s.p. 25,0 µL

* Utilizar os dNTPs em separado (2 mM): Adicionar igual volume de dCTP, dGTP, dTTP. Para o dTTP deve ser usado 70% do volume usado para os outros dNTPs e 30% do Digoxigenin-11-dUTP (Roche, cat. no. 11573152910). Checar inicialmente a concentração dos reagentes.

9.1.8 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

1 – Pré-tratamento das lâminas

- o Fixar as Lâminas em Carnoy por 15 minutos;
 - o Desidratar em série alcoólica: 5 min em etanol 70% e 5 min em etanol 100%;
- Incubar as lâminas a 60°C por 30min;
- Deixar esfriar por 5-10min;
- Marcar a lâmina com lápis de diamante;
- RNase:
 - o Incubar as lâminas com 50 µL de solução de RNase por 1h a 37°C em câmara úmida pré-aquecida;
Solução estoque de RNase (4°C): 20 mg/mL de RNase (Invitrogen)
Solução de RNase para uso: 100 µg/mL em 2 x SSC (diluição 1:200)
- Lavar as lâminas 3 x 5 min em 2 x SSC.
- Pepsina:
 - o Incubar as lâminas com 50 µL de solução de pepsina por 20 min a 37°C em câmara úmida pré-aquecida;
Solução estoque de pepsina (20°C): 1 mg/mL em H₂O miliQ
Solução de pepsina para uso: 10 µg/mL em 0,01 N HCl (diluição 1:100)
- Lavar as lâminas 2x 5 min em 2 x SSC;
- Colocar as lâminas no PBD + formaldeído por 10min;
- Lavar as lâminas 2 x 5 min em 2 x SSC;
- Série alcoólica: 5 min em etanol 70% e 5 min em etanol 100%;
- Colocar as lâminas na estufa a 37°C até secar (aprox. 10-15 min);
- Preparar o mix de sonda.

2 – Hibridização

- Preparar a **mistura de hibridização** (76% de estringência):

Quantidade/Reagente	Concentração inicial	Concentração final
6 µL sonda	200-250ng	
15 µL formamida	100%	50%
6 µL sulfato de dextran	50%	10%
3 µL 20XSSC	20XSSC	2XSSC

OBS: A quantidade final do mix poderá variar dependendo da quantidade de sonda utilizada.

- Dar um vortex na mistura de hibridização por no mínimo 10 s;
- Aquecer a mistura de hibridização a 95°C por 10 min e transferir para o gelo por pelo menos 5 min;
- Dar um spin e colocar a **mistura de hibridização** na lâmina, cobrir com lamínula de vidro;
- Desnaturar as lâminas a 75°C por tempo variável (o tempo de desnaturação varia de acordo com a espécie);
 - o Incubar em câmara úmida pré-aquecida a 37°C de 18 a 72 h

3 – Banhos pós-hibridização

- Retirar as lâminas da câmara úmida e retirar cuidadosamente a lamínula;
- Incubar as lâminas em 2 x SSC TA, por 5 min;

Lavagem convencional (72% de Estringência):

- Incubar 2 vezes em 2x SSC, 42 °C, por 5 min;
- Incubar 2 vezes em 0,1x SSC, 42 °C, por 5 min;
- Incubar em 2x SSC, 42 °C, por 5 min;
- Transferir para 2x SSC, TA, por 10 min;
- Transferir para o PBD a 45°C até preparar o anticorpo.

4 – Detecção (para sondas marcadas indiretamente)

Anticorpos primários:

0,5 µL de rodamina ou 0,30 µL de FITC

100µL de PBD

Soma por lâmina: 100 µL

- Aplicar o mix na lâmina e cobrir com lamínula ou parafilme e incubar a 37 °C em câmara úmida por 45min (FITC) e 30min (rodamina);
- Remover o parafilme e lave 3 vezes em PBD por 2 min cada.

* Amplificação do sinal com Anti-avidina

1,0 µL de anti-avidina

30 µL de PBD

Soma por lâmina: 30 µL

- Aplicar na lâmina e cobrir com lamínula ou parafilme e incubar a 37 °C por 10min;
- Remover o parafilme e lave 2 vezes em PBD por 2 min cada;
- Aplicar 20 µL de DAPI e cobrir com parafilme e deixar por 15 min;
- Remover parafilme, aplicar de, cobrir com lamínula e selar com esmalte.
- Quando utilizar Iodeto de propídeo com Vectashield, aplicar 8 a 10 µL, cobrir com lamínula e selar com esmalte.

9.2 Instruções para autores

Periódico: Genetica

**Welcome to the
Online Manuscript Submission,
Review and Tracking System
for the journal
Genetica**

Instructions for Authors

Manuscript submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author
-

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)
-

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style \(zip, 3 kB\)](#)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

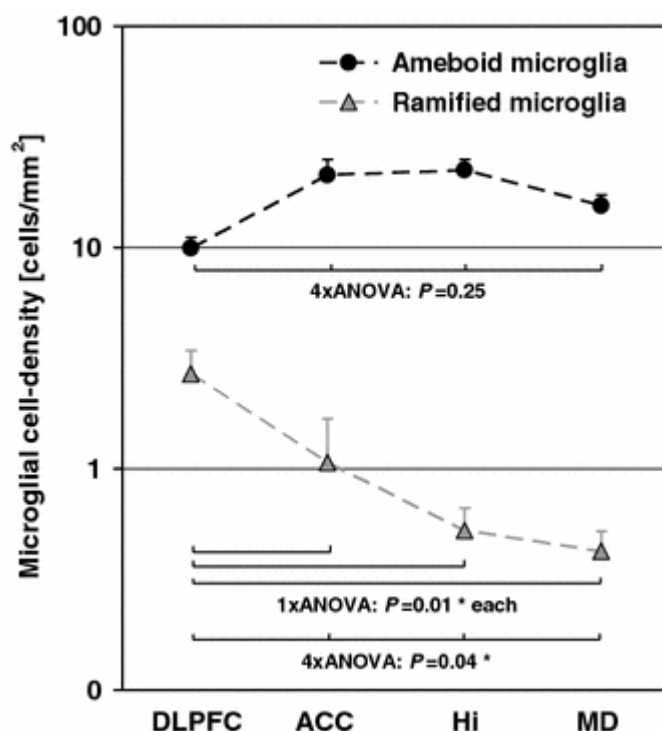
Artwork and Illustrations Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

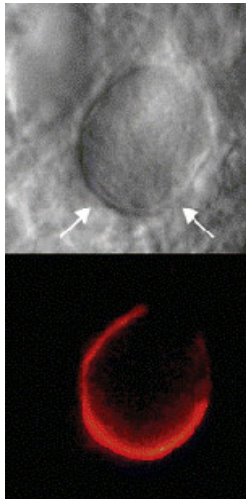
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



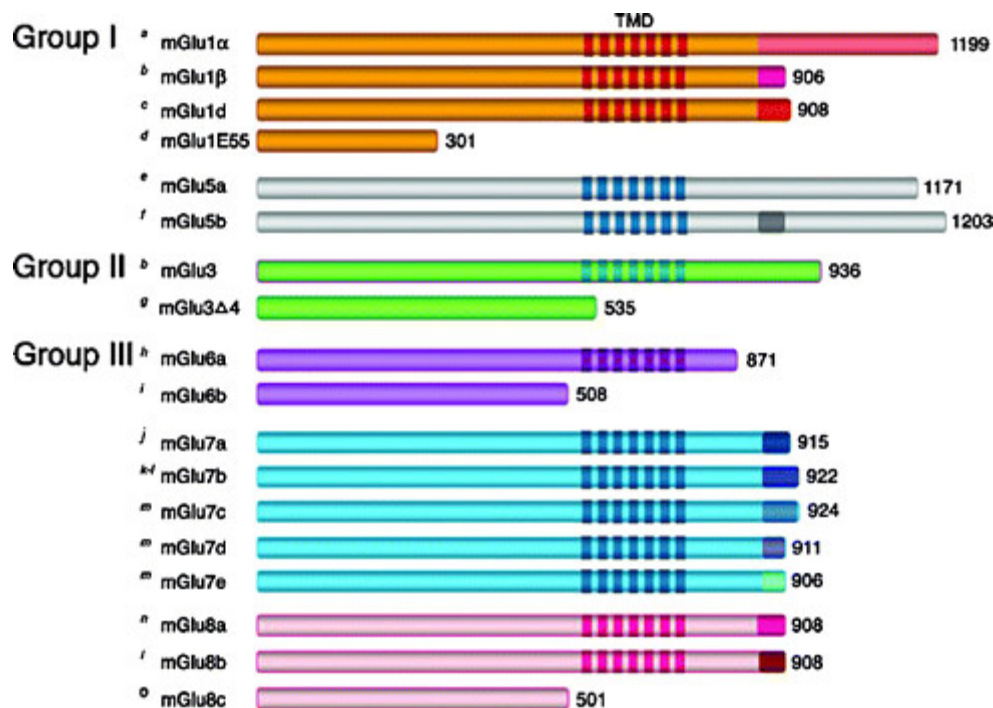
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.

- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.
-

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer ~~推荐~~服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer ~~推荐~~服务公司，协商编辑事宜。

- [理文编辑](#)

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

- [エダンズ グループ ジャパン](#)

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및 신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

- [Edanz Editing Global](#)

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- [Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Chromosome Research

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Manuscript Submission

It is understood that papers submitted for publication have not been published previously and are not simultaneously offered to any other journal. Before submission, the submitting author must ensure that the manuscript has been seen and approved by all other named authors.

There are no page charges or charges for the publication of colour illustrations or administration charges for papers published in Chromosome Research.

How to Submit your Manuscript

Authors should submit their manuscripts online:

<http://www.edmgr.com/chrs/>

Upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen. A decision with regard to acceptance for publication will normally be given within 21 days of receipt of the manuscript.

When submitting your manuscript, please choose one of the Associate Editors as your preferred handling editor. If you do not have a preference, or leave this option open, your submission will be handled by the Editor-in-Chief.

Editor-in-Chief:

Conly L. Rieder, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy NY, USA

Associate Editors:

Wendy Bickmore, MRC Human Genetics Unit, Edinburgh, UK

Matthew Breen, North Carolina State University, Raleigh NC, USA

Job Dekker, University of Massachusetts, Worcester, USA

William C. Earnshaw, University of Edinburgh, UK

Tatsuo Fukagawa, National Institute of Genetics, Mishima, Japan

Dean Jackson, University of Manchester, UK

Jiming Jiang, University of Wisconsin-Madison, USA

Hans de Jong, Wageningen, The Netherlands

Irina Solovei, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany

Beth A. Sullivan, Duke University, Durham, USA

Walther Traut, Universität Lübeck, Germany

Fengtang Yang, The Wellcome Trust Sanger Institute, UK

Style and Presentation

The title page should show the paper title, names and addresses of all authors, a short running title, and fax and telephone numbers and the e-mail address for the corresponding author.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes. Key words should be chosen carefully, they are essential to electronic search tools.

The text of the paper should be arranged in the following sequence:

Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References.

Informative legends should be provided for all illustrations and should be grouped together at the end of the paper, along with all tables. Subheadings may be inserted in the main text, but should not be numbered or lettered. It is the responsibility of the authors to ensure that manuscripts are written in clear, grammatical, idiomatic English. Spelling should conform to Webster's International Dictionary or the Concise Oxford English Dictionary and data should be presented simply and concisely.

Scientific style

Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Gene symbols

Gene symbols, as approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) (<http://www.genenames.org>) must be used.

Abbreviations

All abbreviations not obvious to the general reader should be defined the first time they are used. A complete alphabetically arranged list of all abbreviations used, including the definitions, should be included in the manuscript.

INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Please include this note in a separate section before the reference list.

Conflict of interest

The Conflict of Interest statement should list each author separately by name. Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: This author (name) declares that they have no conflict of interest.

For studies with human subjects include the following:

All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000 (5). Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, the authors must explain the rationale for their approach, and demonstrate that the institutional review body explicitly approved the doubtful aspects of the study. If any identifying information about patients is included in the article, the following sentence should also be included:

Additional informed consent was obtained from all patients for which identifying information is included in this article.

For studies with animals include the following sentence:

All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.

For articles that do not contain studies with human or animal subjects performed by any of the authors:

While it is not absolutely necessary, we recommend to include the following sentence, just to make sure that readers are aware that there are no ethical issues with human or animal subjects:

This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by the any of the authors.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

References should be cited in the text using the Harvard (name–date) system. Where there are three or more authors, only the first author's name should appear, followed by et al. Where several references are cited at the same point in the text, these should be arranged in chronological order. The reference list should be typed with double spacing and arranged in alphabetical order. References should include: names and initials of all authors (unless there are more than six authors, when only the first three authors should be given, followed by et al.); year of publication; full title of the article; source using abbreviations for journals as shown in Index Medicus; volume number; and first and last page numbers. Abstracts should be identified as such. For citations from books, the chapter title should be followed by the names and initials of

all editors, the title of the book, edition, place of publication, publisher and first and last page numbers.

Examples:

Thomas HM, Harper JA, Morgan WG (2001) Gross chromosome rearrangements are occurring in an accession of the grass *Lolium rigidum*. *Chromosome Res* 9: 585–590.

Ohno S (2001) The one-to-four rule and paralogues of sex determining genes. In: Scherer G, Schmid M, eds. *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*. Birkhauser Verlag, pp 1–10.

Engel E, Antonarakis SE (2002) *Genomic Imprinting and Uniparental Disomy in Medicine*. New York: Wiley–Liss.

Only accepted papers should be referenced; all other material should be referred to in the text as 'in preparation', 'personal communication' 'unpublished observations' and should not be included in the reference list.

Citing Internet References

World Wide Web: All references should include the same information that would be provided for a printed source (or as much of that information as possible). The Web information is then placed at the end of the reference. It is important to use "Retrieved from" and the date because documents on the Web may change in content, move, or be removed from a site altogether. To cite a Web site in text (but not a specific document), it is sufficient to give the address (e.g., <http://www.apa.org>) there and no reference entry is needed. However, when citing a particular web page a citation in the text (e.g. Gaten 2000) and an entry in the reference list will be required.

For example:

Gaten E. (2000) Internet references. Retrieved from <http://www.le.ac.uk/biology/teach/mod300/ecitations.html> 19/9/2000

E-mail: E-mail communications from individuals should be cited as personal communications. The format in the text (personal communications are not cited in the reference list) is as follows: (E. Gaten personal communication, March 28, 2001).

It is possible to send an e-mail note disguised as someone else. Authors – not journal editors or copy editors – are responsible for the accuracy of all references, which includes verifying the source of e-mail communications before citing them as personal communications in manuscripts.

One of the most comprehensive guides to citing internet references is provided by the American Psychological Association: <http://www.apastyle.org/elecref.html>

Tables and Illustrations

All tables and illustrations should be referred to in the text, with appropriate locations indicated in the text margin. Tables should present new information and not duplicate data included in the text. Every table should have a descriptive title and, if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Line drawings should be supplied in a form suitable for high-quality reproduction. Axes should be labelled clearly; other lettering should be kept to a minimum. Avoid the use of fine tints, especially as background to text.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel) TIFF.

Photographs and photomicrographs should be cropped as close as possible to the area of interest and should be submitted as high resolution (>300dpi) as electronic files together with the manuscript. All photomicrographs must be accompanied by a scale bar with the equivalent measurement stated in the figure legend.

Colour figures

There are no charges for the publication of colour illustrations, either in the online or in the printed version of *Chromosome Research*.

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- i. Supply all supplementary material in standard file formats.
- ii. Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- iii. To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- i. Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

- ii. If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- i. If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- ii. Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- iii. Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that:

- i. The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- ii. Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Permission and Copyright

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures or tables from unpublished or copyrighted material. Copyright in articles published in this journal is the property of Springer to the extent transferable. Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources. There are no page charges or administration charges for papers published in this journal.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, or offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. Springer Open Choice articles receive all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition are made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. <http://springer.com/openchoice>

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Additional Information

Peter Butler

Chromosome Research

Springer Science & Business Media

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

E-mail: peter.butler@springer.com

<http://www.springer.com/journal/10577>

Chromosome Research

Chromatin, Chromosomes and Genomes

Editor-in-Chief: C.L. Rieder

ISSN: 0967-3849 (print version)

ISSN: 1573-6849 (electronic version)

Journal no. 10577



Merilane da Silva Calixto

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0422895147542128>

Última atualização do currículo em 06/03/2014

Resumo informado pelo autor

Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade de Pernambuco (2004), Mestre em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco (2008) e Doutora em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco (2013). Tem experiência na área de Citogenética Animal, com ênfase em Citogenética de Chiroptera, atuando principalmente no mapeamento de sequências de DNA repetitivo. Tem experiência em Citogenética Humana na área de Dosimetria biológica (Radiação Nêutron-Gamma) e Mutagênese (potencial efeito genotóxico do fármaco formocresol). Atualmente está fazendo Pós-doutorado na área de Citogenética humana e Genética molecular humana pela Universidade de Pernambuco.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Merilane da Silva Calixto

Filiação Everaldo Ramos Calixto e Marinalva da Silva Calixto

Nascimento 04/10/1982 - Recife/PE - Brasil

Carteira de Identidade 5670026 SDS - PE - 21/06/2011

CPF 041.502.764-04

Formação acadêmica/titulação

- 2013** Pós-Doutorado .
Universidade de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2009 - 2013** Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Mapeamento cromossômico de DNA repetitivos em espécies de morcegos da família Phyllostomidae.,
Ano de obtenção: 2013
Orientador: Maria José de Souza Lopes 
Co-orientador: Neide Santoa
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2006 - 2008** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Análise Citogenética Comparativa em Glossophaga soricina, Platyrrhinus lineatus e Sturnira lilium (Phyllostomidae, Chiroptera)., Ano de obtenção: 2008
Orientador: Maria José de Souza Lopes 
Co-orientador: Neide Santos
- 2001 - 2004** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Caracterização Cromossômica em Platyrrhinus lineatus (Phyllostomidae, Chiroptera)
Orientador: Neide Santos

Formação complementar

- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Recursos web aplicados ao estudo de sistemas biol.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Análise filogenética envolvendo milhares de táxons.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
- 2011 - 2011** Estágio com experimentação prática.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Análise filogenética comparativa e modelos de evo.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Evolução cromossômica em animais.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
- 2009 - 2009** Técnicas Moleculares.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2007 - 2007** Citogenética molecular no diagnóstico e pesquisa.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
- 2007 - 2007** Genes, Genomas e tecnologias genômicas.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

- 2007 - 2007** Disciplina Citogenética Molecular Vegetal.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2007 - 2007** Ciclo de palestras em Genética e Biologia molecular.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirão Preto, Brasil
- 2006 - 2006** Genética forense.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirão Preto, Brasil
- 2005 - 2005** Citogenética humana no diagnóstico do câncer.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
- 2005 - 2005** Difusão cultural em câncer de boca.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2005 - 2005** Disciplina de Citogenética.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 2004 - 2004** DNA forense e Diagnóstico molecular.
Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP, Recife, Brasil
- 2004 - 2004** Minicurso de Citogenética animal.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
- 2003 - 2003** DST - Inimigo Íntimo.
Faculdade Fransinetti do Recife, FAFIRE, Brasil
- 2003 - 2003** Minicurso de Bonsai.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
- 2003 - 2003** Marcadores genéticos e epidemiologia molecular.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2003 - 2003** Extensão universitária em Técnicas em Biologia molecular.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
- 2003 - 2003** Emergência e Escape.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
- 2002 - 2002** Discover America (livro 1).
Wizard - Inglês com liderança, WIZARD, Brasil
- 2002 - 2002** Biologia molecular na investigação de paternidade.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

- 2013 - 2013** Vínculo: Aulas ministradas , Enquadramento funcional: Ministrante de aulas , Carga horária: 15, Regime: Parcial
- 2012 - 2012** Vínculo: Aulas ministradas , Enquadramento funcional: Ministrante de aulas , Carga horária: 10, Regime: Parcial
- 2011 - 2011** Vínculo: Aulas ministradas , Enquadramento funcional: Ministrante de aulas , Carga horária: 8, Regime: Parcial

Atividades

- 09/2007 - 10/2007** Graduação, Ciências Biológicas
- Disciplinas ministradas:*
Aulas teóricas e práticas (carga horária: 12hs) , Citogenética Geral
- 03/2003 - 02/2008** Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética
- Linhas de pesquisa:*
Citogenética Animal e Humana
- 03/2003 - 11/2004** Estágio, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética
- Estágio:*
Estágio voluntário em Citogenética de Chiroptera

2. Universidade de Pernambuco - UPE

Vínculo institucional

- 2013 - 2013** Vínculo: Aulas ministradas , Enquadramento funcional: Ministrante de aulas , Carga horária: 3, Regime: Parcial

Atividades

- 02/2002 - 02/2003** Outra atividade técnico-científica, Instituto de Ciências Biológicas UPE
- Especificação:*
Monitoria de Anatomia

3. Faculdade de Odontologia de Pernambuco - FOP

Vínculo institucional

- 2011 - 2013** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Colaborador

4. Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN

Vínculo
institucional**2008 - 2010** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Colaborador , Carga horária: 12, Regime: Parcial

5. Colégio Alpha - COLÉGIO ALPHA

Vínculo
institucional**2007 - 2009** Vínculo: Professora , Enquadramento funcional: Professora de Biologia , Carga horária: 60, Regime: Integral

Linhas de pesquisa

1. Citogenética Animal e Humana

Objetivos: Na Citogenética Animal o objetivo é caracterizar citogeneticamente espécies pertencentes à família Phyllostomidae a partir de técnicas citogenéticas clássicas (coloração convencional, bandeamento C, impregnação com nitrato de prata e fluorocromos base-específicos), além de técnicas de citogenética molecular (FISH) para realizar o mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos (genes ribossomais 18S e 5S, de histonas H3 e H4 e sequência telomérica), fazendo uso destes marcadores cromossômicos para um melhor entendimento sobre a evolução cromossômica dos representantes de morcegos da família Phyllostomidae. Na Citogenética Humana o objetivo é investigar a interação dos nêutrons com sistemas biológicos e realizar a implementação da dosimetria biológica para nêutrons no Laboratório de Dosimetria Biológica (LDB) do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE/CNEN) afim de utilizá-la em futura prestação de serviços em dosimetria biológica de nêutrons. Na Mutagênese o objetivo é avaliar o potencial efeito genotóxico do fármaco formocresol em sangue periférico humano.

Áreas de atuação

1. Genética
2. Genética Animal
3. Citogenética Animal
4. Citogenética de Chiroptera
5. Citogenética Humana

Projetos

Projetos de
pesquisa**2013 - Atual** Polimorfismos Genéticos relacionados à Leishmaniose como fatores de risco para as Fendas Labiopalatais.

Descrição: Verificar a prevalência de fissuras labiopalatais não associadas a síndromes com a prevalência de Leishmaniose em um mesmo Município e mesmo período histórico para confirmar a associação de polimorfismos genéticos provocados pela Leishmaniose como fatores de risco para as fissuras labiopalatais.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado profissionalizante (1); Doutorado (2);

Integrantes: Merilane da Silva Calixto; Neide Santos; Aronita Rosenblatt (Responsável); Arnaldo Vasconcelos de Alencar Filho

2012 - Atual Análise cromossômica convencional e molecular em morcegos das famílias Phyllostomidae e Emballonuridae do Estado de Pernambuco.

Descrição: Este projeto visa descrever a macro-estrutura cromossômica, incluindo número diploide, mecanismo de determinação sexual em diferentes espécies de morcegos; Analisar o padrão de localização da heterocromatina constitutiva através do bandeamento C e coloração com fluorocromos base específicos (CMA3 e DAPI); Determinar a localização das RDNs através da impregnação com AgNO₃; Isolar e mapear as sequências nucleotídicas das famílias multigênicas de RNAs ribossomais (RNA 5S e 18S) em diferentes espécies de morcegos das famílias Phyllostomidae e Emballonuridae..

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);

Integrantes: Merilane da Silva Calixto; Neide Santos (Responsável); Vilma Loreto

2011 - 2013 AVALIAÇÃO IN VIVO DO PODER MUTAGENICO DO FORMOCRESOL EM PULPOTOMIAS DE DENTES DECIDUOSAS AO TEMPO DE EXPOSIÇÃO PULPAR

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);

Integrantes: Merilane da Silva Calixto; Neide Santos; Ana Catarina Gaioso Lucas Leite; Aronita Rosenblatt (Responsável); Arnaldo Vasconcelos de Alencar Filho

2010 - 2011 Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano irradiado em campo misto nêutron-gama com diferentes doses absorvidas.

Descrição: Este trabalho tem como objetivo dar continuidade ao estudo da relação entre as frequências de alterações cromossômicas instáveis e a irradiação por campo misto nêutron-gama, submetendo-se amostras a mais duas diferentes doses (0,50 Gy e 0,81 Gy).

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);

Integrantes: Merilane da Silva Calixto; Neide Santos; Eudice Correia Vilela; Fabiana Farias de Lima (Responsável); Priscilla Luna Góis de Souza; José Odnilson de Caldas Brandão; Mariana Esposito
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2009 - 2010 Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano irradiado em campo misto nêutron-gama com diferentes doses absorvidas.

Descrição: Com o crescimento contínuo da indústria de energia nuclear e a introdução de fontes de nêutrons na radioterapia, os problemas de proteção radiológica associados tendem a aumentar. A dosimetria física de nêutrons é reconhecida como um campo difícil, e uma vez que a sensibilidade da dosimetria citogenética aumenta com o LET, fica claro que a técnica biológica pode exercer uma importante contribuição na proteção radiológica. Todavia, pouco se têm discutido sobre os mecanismos físicos, associados aos nêutrons de baixa e alta energia, responsáveis por causar danos às células somáticas e germinativas (saudáveis ou tumorais). Logo, é de suma importância realizar uma investigação aprofundada sobre esse aspecto, tornando assim possível realizar uma avaliação mais precisa dos regimes terapêuticos envolvendo nêutrons. Dentre as alterações cromossômicas (AC) utilizadas na dosimetria citogenética destacam-se as alterações assimétricas ou instáveis (dicêntricos, cromossomos em anel e fragmentos acêntricos), capazes de fornecer uma estimativa real da dose absorvida, que duram por curto período de tempo e as alterações simétricas ou estáveis (translocações recíprocas, não-recíprocas e inserções) que persistem por muitos anos. Em trabalho anterior, no qual uma amostra de sangue periférico foi irradiada por uma fonte (241AmBe) de campo misto nêutron-gama com uma dose específica de 0,96 Gy, observou-se um aumento das alterações cromossômicas instáveis quando comparada ao controle, sugerindo a possibilidade de haver uma relação entre a dose absorvida e a frequência dessas alterações citogenéticas. Todavia, há necessidade de maiores esclarecimentos quanto ao comportamento dessas alterações quando a amostra é submetida a diferentes doses. Este trabalho se propõe a avaliar a variação das frequências de alterações cromossômicas instáveis quando submetidas a diferentes doses absorvidas (0,41 e 0,66 Gy) em campo misto nêutron-gama.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (2);

Integrantes: Merilane da Silva Calixto; Neide Santos; Eudice Correia Vilela; Fabiana Farias de Lima

(Responsável); Priscilla Luna Góis de Souza; José Odnilson de Caldas Brandão

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2009 - 2013 Mapeamento cromossômico de genes ribossomais 18S e 5S e de histonas H3 e H4 em espécies de morcegos da família Phyllostomidae do Estado de Pernambuco.

Descrição: Análise citogenética molecular comparativa em espécies de morcegos da família Phyllostomidae através da FISH, para contribuir com o mapeamento cromossômico de genes ribossomais 18S e 5S, e dos genes de histonas H3 e H4 nesses organismos, na tentativa de entender melhor a organização cromossômica estrutural e os mecanismos evolutivos dessa família taxonomicamente diversa.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Doutorado (1);

Integrantes: Merilane da Silva Calixto; Neide Santos; Maria José de Souza Lopes (Responsável)

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FAPEPE

2008 - 2009 Estabelecimento da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano periférico irradiado em campo misto nêutron-gama.

Descrição: O acompanhamento de alterações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico tem sido utilizado para determinar a dose de radiação absorvida em indivíduos expostos acidental ou ocupacionalmente à radiação gama. No entanto não há muitos estudos baseado nos efeitos do campo misto nêutron-gama. A radiobiologia de neutros tem grande importância porque em usinas nucleares a nível mundial há várias centenas de milhares de indivíduos monitorados como potencialmente recebendo doses de nêutrons. Neste trabalho, observou-se as frequências de alterações cromossômicas instáveis induzidas por um campo misto nêutron-gama. O sangue, obtido a partir de um doador saudável, foi exposto a duas fontes de campo misto nêutron-gama de 241AmBe (20 Ci), no Laboratório de Calibração de Nêutrons (LCN - CRCN / NE - PE - Brasil). Os cromossomos foram observados em metáfase, seguido do bloqueio de colcemid e 1000 metáfases viáveis foram analisadas quanto a presença de dicêntricos por dois experientes analistas. Os resultados sugerem que existe a possibilidade de uma relação diretamente proporcional entre dose absorvida de radiação campo misto nêutron-gama e a frequência de alterações cromossômicas instáveis analisadas neste trabalho.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1); Mestrado profissionalizante (1); Doutorado (2);

Integrantes: Merilane da Silva Calixto; Neide Santos; Eudice Correia Vilela; Fabiana Farias de Lima

(Responsável); Priscilla Luna Góis de Souza; José Odnilson de Caldas Brandão; Joelan Ângelo de Lucena Santos; Carlos Henrique Fulgêncio Pereira Vale

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2007 - 2009 Curva dose-resposta para sangue exposto a campo misto nêutron-gama pelo método citogenético convencional

Descrição: Há uma crescente preocupação quanto a tripulantes de companhias aéreas (cerca de um milhão em todo o mundo) ser expostos a doses mensuráveis de nêutrons. Historicamente, ensaios de biodosimetria citogenética têm sido baseados em quantificar alterações cromossômicas assimétricas (dicêntricos, anéis cromossômicos e fragmentos acêntricos) em mitose-estimulada de linfócitos T em sua primeira mitose após a exposição às radiações. O aumento dos níveis de danos no cromossomo de linfócitos do sangue periférico são um indicador sensível de exposição à radiação, e são rotineiramente exploradas para avaliar a dose absorvida de radiação após exposição acidental ou ocupacional. Uma vez que acidentes radiológicos não são comuns, nem todas as nações acham ser economicamente justificável manter um serviço de biodosimetria. No entanto, o acesso confiável a capacidade da dosimetria biológica é completamente crítico em caso de acidente. Neste documento, a curva dose-resposta foi medida pela indução de alterações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico após exposição crônica in vitro de campo misto nêutron-gama. O sangue foi obtido a partir de um doador saudável e foi exposto a um campo misto nêutrons-gama a partir de fontes 241AmBe (20 Ci), no Laboratório de Calibração de Nêutrons (LCN - CRCN / NE - PE - Brasil). As doses absorvidas foram avaliadas em 0,2 Gy, 1,0 Gy e 2,5 Gy. Os cromossomos dicêntricos foram observados em metáfase, seguido do bloqueio de colcemid e 1000 metáfases viáveis foram analisadas quanto a presença de dicêntricos após corados por Giemsa 5%. Nossos resultados preliminares mostraram uma dependência linear entre a dose de radiação absorvida e frequências de cromossomos dicêntricos. A curva dose-resposta descrita no presente documento contribuirá para a construção da curva de calibração, que será utilizado em nosso laboratório de dosimetria biológica.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1); Mestrado profissionalizante (1); Doutorado (1);

Integrantes: Merilane da Silva Calixto; Neide Santos; Eudice Correia Vilela (Responsável); Fabiana Farias de

Lima; Priscilla Luna Góis de Souza; José Odnilson de Caldas Brandão; Joelan Ângelo de Lucena Santos

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2006 - 2008 Análise Citogenética Comparativa entre *Glossophaga soricina*, *Platyrrhinus lineatus* e *Sturnira lilium* (Phyllostomidae, Chiroptera).

Descrição: Realizar uma análise citogenética comparativa entre três espécies da família Phyllostomidae através de marcadores citogenéticos diferenciais para um melhor entendimento sobre a evolução cromossômica da família Phyllostomidae.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Merilane da Silva Calixto; Maria José de Souza (Responsável); Neide Santos

Número de produções C,T & A: 2/

2003 - 2004 Caracterização Cromossômica em *Platyrrhinus lineatus* (Phyllostomidae, Chiroptera).

Descrição: Realizar análise citogenética em *Platyrrhinus lineatus* (Phyllostomidae, Chiroptera) através de diferentes técnicas citogenéticas.
 Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
 Alunos envolvidos: Graduação (1);
 Integrantes: Merilane da Silva Calixto; Maria José de Souza; Neide Santos (Responsável)
 Financiador(es): Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
 Número de produções C,T & A: 1/

Outros tipos de projetos**2007 - 2010** Implementação da Dosimetria Biológica para Nêutrons no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN-NE/CNEN

Descrição: Este projeto visa implementar a dosimetria biológica para nêutrons no Laboratório de Dosimetria Biológica (LDB) do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE/CNEN) a ser utilizada para ensaios futuros nas investigações relativas à interação dos nêutrons com sistemas biológicos e à prestação de serviço em dosimetria biológica de nêutrons.
 Situação: Em andamento Natureza: Outros tipos de projetos
 Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);
 Integrantes: Merilane da Silva Calixto; Neide Santos; Eudice Correia Vilela; Fabiana Farias de Lima (Responsável); Simey de Souza Leão Pereira Magnata; Priscilla Luna Góis de Souza

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1.  **CALIXTO, MERILANE DA SILVA**, ANDRADE, IZAQUEL SANTOS, CABRAL-DE-MELLO, DIOGO CAVALCANTI, Santos, Neide, MARTINS, CESAR, LORETO, VILMA, SOUZA, MARIA JOSÉ Patterns of rDNA and telomeric sequences diversification: contribution to repetitive DNA organization in Phyllostomidae bats. *Genetica* ('s-Gravenhage). **JCR**, v.141, p.NOS 10-12 - , 2013.
2.  de Lemos Pinto, Marcela, **DA SILVA CALIXTO, MERILANE**, de Souza, Maria José, de Araújo, Ana Paloma Tavares, Langguth, Alfredo, Santos, Neide Cytotaxonomy of the subgenus *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera) by characterization of species-specific markers. *Comparative Cytogenetics* (Print). **JCR**, v.6, p.17 - , 2012.
3.  Leite, ACGL, Rosenblatt, A, CALIXTO, MS, Silva, CM, Santos, Neide Genotoxic Effect of Formocresol Pulp Therapy of Deciduous Teeth.. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **JCR**, v.747, p.93 - 97, 2012.
4.  Brandao, JOC, Souza, PLG, CALIXTO, MS, Santos, JAL, SANTOS, N, **Lima, F. F.**, VILELA, E. C. Biological dosimetry for mixed gamma-neutron field.. *Scientia Plena*. , v.7, p.1 - 5, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. Brandao, JOC, Souza, PLG, CALIXTO, MS, SANTOS, N, VILELA, E. C., **Lima, F. F.** Analysis of Unstable Chromosome Alterations Frequency Induced by Neutron-Gamma Mixed Field Radiation In: International Nuclear Atlantic Conference – INAC 2009, 2009, Rio de Janeiro. **Trabalhos completos**. , 2009.
2. Brandao, JOC, Souza, PLG, CALIXTO, MS, Santos, JAL, SANTOS, N, **Lima, F. F.**, VILELA, E. C. Dose-Response Curve for Blood Exposed to Gamma-Neutron Mixed Field by Conventional Cytogenetic Method. In: International Nuclear Atlantic Conference – INAC 2009, 2009, Rio de Janeiro. **Trabalhos completos**. , 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. CALIXTO, MS, Andrade, IS, Diogo, Loreto, V, Souza, MJ Mapeamento cromossômico dos genes ribossomais 18S e 5S em morcegos Phyllostomidae (Chiroptera). In: XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012, Petrolina/Juazeiro. **XIX Encontro de Genética do Nordeste**. , 2012.
2. CALIXTO, MS, Andrade, IS, Diogo, SANTOS, N, Souza, MJ Mapeamento físico de sequências de DNAs repetitivos em *Phyllostomus elongatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). In: XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012, Petrolina/Juazeiro. **XIX Encontro de Genética do Nordeste**. , 2012.
3.  CALIXTO, MS, Cabral-de-Mello, DC, Andrade, IS, Loreto, V, Martins, C, SANTOS, N, Souza, MJ A centromeric repetitive L1-Like DNA is conserved among Phyllostomidae bats species (Chiroptera). In: 2a Reunião Brasileira de Citogenética, 2011, Águas de Lindóia. **Resumos**. , 2011.
4. CALIXTO, MS, Oliveira, KG, Andrade, IS, Cabral-de-Mello, DC, Loreto, V, Martins, C, SANTOS, N, Souza, MJ Chromosomal mapping of rDNA genes in *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae, Chiroptera) In: 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. **Resumos**. , 2011.
5. Andrade, IS, CALIXTO, MS, Oliveira, KG, Cabral-de-Mello, DC, Souza, LGR, SANTOS, N, Loreto, V, Martins, C, Souza, MJ Chromosomal mapping of rDNA genes and telomeric repeat in *Artibeus lituratus* and *A. planirostris* bats (Chiroptera: Phyllostomidae). In: 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. **Resumos**. , 2011.
6. Silva, RCS, Machado, CBS, **CALIXTO, MS** Análise Filogenética de morcegos do gênero *Artibeus* baseada em sequências de DNA mitocondrial citocromo B. In: XXV III Congresso Brasileiro de Zoologia, 2010, Belém. **Resumos**. , 2010.
7. Souza, PLG, Brandao, JOC, CALIXTO, MS, Silva, JR, Santos, JAL, SANTOS, N, VILELA, E. C., **Lima, F. F.** Taxa De Alterações Cromossômicas Devido À Irradiação Em Campo Misto Nêutron-Gama: Resultados Preliminares. In: VII Congresso da Sociedade Brasileira de Biociências Nucleares, 2010, Recife. **Resumos**. , 2010.

8. Souza, PLG, Brandao, JOC, CALIXTO, MS, SANTOS, N, VILELA, E. C., [Lima, F. F.](#)
Analysis of Unstable Chromosome Alterations Frequency Induced by Neutron-Gama Mixed Field Radiation
In: International Nuclear Atlantic Conference – INAC 2009, Rio de Janeiro.
Resumos., 2009.
9. Brandao, JOC, Souza, PLG, CALIXTO, MS, SANTOS, N, VILELA, E. C., [Lima, F. F.](#)
Dose-Response Curve for Blood Exposed to Gamma-Neutron Mixed Field by Conventional Cytogenetic Method. In: International Nuclear Atlantic Conference – INAC 2009, 2009, Rio de Janeiro.
Resumos., 2009.

Apresentação de trabalho e palestra

1. CALIXTO, MS, Andrade, IS, Diogo, Loreto, V, SOUZA, M. J.
Mapeamento cromossômico dos genes ribossomais 18S e 5S em morcegos Phyllostomidae (Chiroptera)., 2012. (Outra,Apresentação de Trabalho)
2. CALIXTO, MS, Andrade, IS, Diogo, SANTOS, N, SOUZA, M. J.
Mapeamento físico de sequências de DNAs repetitivos em Phyllostomus elongatus (Phyllostomidae, Chiroptera)., 2012. (Outra,Apresentação de Trabalho)
3. CALIXTO, MS, Andrade, IS, Diogo, Santos, Neide, Loreto, V, Martins, C, Souza, MJ
Physical mapping of repetitive sequences in three species of Phyllostomidae bats (CHIROPTERA), 2012. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
4. CALIXTO, MS, Andrade, IS, Cabral-de-Mello, DC, Santos, Neide, Loreto, V, Martins, C, Souza, MJ
Physical mapping of repetitive sequences in three species of Phyllostomidae bats (CHIROPTERA), 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
5. CALIXTO, MS, Cabral-de-Mello, DC, Andrade, IS, Loreto, V, Martins, C, SANTOS, N, Souza, MJ
A centromeric repetitive L1-Like DNA is conserved among Phyllostomidae bats species (Chiroptera)., 2011. (Outra,Apresentação de Trabalho)
6. CALIXTO, MS, Cabral-de-Mello, DC, Andrade, IS, Loreto, V, Martins, C, SANTOS, N, Souza, MJ
A centromeric repetitive L1-Like DNA is conserved among Phyllostomidae bats species (Chiroptera)., 2011. (Outra,Apresentação de Trabalho)
7. Andrade, IS, CALIXTO, MS, Oliveira, KG, Cabral-de-Mello, DC, Souza, LGR, SANTOS, N, Souza, MJ, Loreto, V
Chromosomal mapping of rDNA genes and telomeric repeat in Artibeus lituratus and A. planirostris bats (Chiroptera: Phyllostomidae)., 2011. (Outra,Apresentação de Trabalho)
8. Silva, RCS, Machado, CBS, **CALIXTO, MS**
Análise Filogenética de morcegos do gênero Artibeus baseada em sequências de DNA mitocondrial citocromo B, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
9. Souza, PLG, Brandao, JOC, CALIXTO, MS, Silva, JR, Santos, JAL, SANTOS, N, VILELA, E. C., [Lima, F. F.](#)
Taxa De Alterações Cromossômicas Devido À Irradiação Em Campo Misto Neutron-Gama: Resultados Preliminares., 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
10. Souza, PLG, Brandao, JOC, CALIXTO, MS, SANTOS, N, VILELA, E. C., [Lima, F. F.](#)
Analysis of Unstable Chromosome Alterations Frequency Induced by Neutron-Gama Mixed Field Radiation, 2009. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Ayda Cristina F. Oliveira. **Morcegos do Estado de Pernambuco, Brasil (Mammalia, Chiroptera): riqueza de espécies e distribuição**.. 2011. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco
2.  Kalyne Guimarães de Oliveria. **Mapeamento cromossômico de genes ribossomais 18S e da histona H3 em Carollia perspicillata**.. 2009. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Conferencista no(a) **II Ciclo de palestras em Genética**, 2013. (Seminário)
Mapeamento cromossômico de DNA repetitivos em espécies de morcegos da família Phyllostomidae..
2. **II Jornada de Pós-graduação em Genética**, 2012. (Outra)
Conservação da sequência centromérica MAZEL1-Like entre espécies de morcegos Phyllostomidae (Chiroptera)..
Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XIX Encontro de Genética do Nordeste**, 2012. (Encontro)
Mapeamento cromossômico dos genes ribossomais 18S e 5S em morcegos Phyllostomidae (Chiroptera)..
Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XIX Encontro de Genética do Nordeste**, 2012. (Encontro)
Mapeamento físico de sequências de DNAs repetitivos em Phyllostomus elongatus (Phyllostomidae, Chiroptera)..
Apresentação de Poster / Paineis no(a) **58º Congresso Brasileiro de Genética**, 2012. (Congresso)
Physical mapping of repetitive sequences in three species of Phyllostomidae bats (CHIROPTERA).
Apresentação de Poster / Paineis no(a) **I Simpósio Brasileiro de Identificação Molecular de espécies**, 2012. (Simpósio)
Physical mapping of repetitive sequences in three species of Phyllostomidae bats (CHIROPTERA).
Apresentação de Poster / Paineis no(a) **2ª Reunião Brasileira de Citogenética**, 2011. (Outra)
A centromeric repetitive L1-Like DNA is conserved among Phyllostomidae bats species (Chiroptera)..
Apresentação de Poster / Paineis no(a) **II Ciclo de palestras em Genética**, 2013. (Seminário)
Mapeamento cromossômico de DNA repetitivos em espécies de morcegos da família Phyllostomidae..

8. Apresentação Oral no(a) **2ª Reunião Brasileira de Citogenética**, 2011. (Outra)
A centromeric repetitive L1-Like DNA is conserved among Phyllostomidae bats species (Chiroptera)..
9. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **57º Congresso Brasileiro de Genética**, 2011. (Congresso)
CHROMOSOMAL MAPPING OF rDNA GENES AND TELOMERIC REPEAT IN *Artibeus lituratus* and *A. planirostris* bats (Chiroptera: Phyllostomidae).
10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **57º Congresso Brasileiro de Genética**, 2011. (Congresso)
Chromosomal mapping of rDNA genes in *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae, Chiroptera).
11. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **2ª Reunião Brasileira de Citogenética**, 2011. (Outra)
Chromosomal mapping of rDNA genes and telomeric repeat in *Artibeus lituratus* and *A. planirostris* bats (Chiroptera: Phyllostomidae)..
12. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **I Jornada de Pós-graduação em Genética**, 2011. (Outra)
Mapeamento cromossômico dos genes ribossomais 18S e 5S em espécies de morcegos (Phyllostomidae, Chiroptera)..
13. **II Simpósio de Inovação em Ciências Biológicas**, 2009. (Simpósio)

Organização de evento

1. Loreto, V, **CALIXTO, MS**, Regueira-Neto, MS, Cipriano, LSN
III Curso de Práticas em Citogenética Animal, 2013. (Outro, Organização de evento)
2. Balbino, VQ, Santos, Neide, **CALIXTO, MS**, Regueira-Neto, MS
III Jornada de Pós-graduação em Genética, 2013. (Outro, Organização de evento)
3. **CALIXTO, MS**, Loreto, V
II Curso de Inverno: Práticas em Citogenética Animal, 2012. (Outro, Organização de evento)
4. Balbino, VQ, Bispo, AVS, **CALIXTO, MS**, Regueira-Neto, MS
II Jornada de Pós-graduação em Genética, 2012. (Outro, Organização de evento)
5. Loreto, V, **CALIXTO, MS**
Curso de Inverno: Práticas em Citogenética Animal, 2011. (Outro, Organização de evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Curso de aperfeiçoamento/especialização

1. **CALIXTO, MS**, Beltrão, ACM, SANTOS, N, Guerra, DQ
Participação em banca de Milton da Silva Júnior. **Morcegos do Vale do Catimbau, Buíque, Pernambuco, Brasil: Uma Síntese Bibliográfica.**, 2009
(Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente) Universidade de Pernambuco
2. **CALIXTO, MS**, Beltrão, ACM, Moura, RC, Guerra, DQ
Participação em banca de Alfred César Freire Dantas. **Morcegos insetívoros da Reserva Biológica de Saltinho, Rio Formoso/Tamandaré, Pernambuco, Brasil: Uma Síntese Bibliográfica.**, 2009
(Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente) Universidade de Pernambuco

Graduação

1. SANTOS, N, **CALIXTO, MS**, Santos, LO, Bispo, AVS
Participação em banca de Camila Barbosa Muniz. **Avaliação da mutagenicidade do formocresol em linfócitos de sangue periférico do teste de metáfase: análise citogenética in vitro.**, 2014
(Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco
2. Santos, JAL, Santos, Neide, **CALIXTO, MS**
Participação em banca de Paula Bruno Monteiro. **Validação da curva de calibração dose-resposta para campo misto nêutron-gama do Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE/CNEN.**, 2013
(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco
3. **CALIXTO, MS**, Amaral, BAS, Melo, MEB
Participação em banca de Cristiane Vasconcelos Chaves. **Investigação genotóxica do fármaco antiparasitário Praziquantel utilizado no tratamento da Esquistossomose.**, 2012
(Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco
4. Rocha, MF, **CALIXTO, MS**, Souza, MJ, Bispo, AVS
Participação em banca de Allison Kleiton dos Anjos. **Dinâmica evolutiva de genes ribossomais e histona H4 no gênero *Radacridium* (Romaleidae).**, 2011
(Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco
5. Moura, RC, **CALIXTO, MS**, Barros, HDR, Souza, MJ
Participação em banca de Izaquiel Santos de Andrade. **Mapeamento cromossômico dos genes ribossomais DNAr 45S, 5S e sítios teloméricos nos morcegos *Artibeus lituratus* e *Artibeus planirostris* (Chiroptera, Phyllostomidae).**, 2011
(Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco
6. SANTOS, N, **CALIXTO, MS**
Participação em banca de Mariana Esposito Mendes. **Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano com diferentes doses absorvidas em feixe gama.**, 2011
(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco
7. **CALIXTO, MS**, Garcia, PS, SANTOS, N
Participação em banca de Suelen Fernanda Gomes Lourenço. **Associação entre os polimorfismos do cromossomo 9 e alterações fenotípicas em pacientes com suspeita de Síndrome de Turner.**, 2010
(Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco
8. SANTOS, N, CORNELIO, M. T. M. N., Burégio, FF, **CALIXTO, MS**
Participação em banca de Luana Oliveira dos Santos. **Sequências do Cromossomo Y na Síndrome de Turner e o Risco de Gonadoblastoma.**, 2010
(Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco
9. SANTOS, N, **CALIXTO, MS**
Participação em banca de Priscilla Lunba Góis de Souza. **Verificação da taxa de alterações**

crômossômicas em sangue periférico em campo misto nêutron-gama., 2010
(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1. Feira Científico Cultural da UFPE e Colégio de Aplicação 2013: "Experimentação: Vamos fazer ciência", 2014
Universidade Federal de Pernambuco
2. Universidade/Sociedade em diálogo: Tradição e Inovação na Extensão Universitária, 2013
Universidade Federal de Pernambuco
3. XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE (JEPEX 2013), 2013
Universidade Federal Rural de Pernambuco
4. XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE (JEPEX 2012), 2012
Universidade Federal Rural de Pernambuco
5. Feira Científico-Cltural "Ciência Recife 011 - O jovem como agente de transformação", 2011
Colégio de Aplicação - UFPE
6. XVII Congresso de Iniciação Científica da UFPE, 2009
Universidade Federal de Pernambuco

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 07/03/2014 às 00:10:39.