

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**TEILOR CARVALHO KOSCREVIC**

**DIVERSIDADE DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS EM TRÊS ESPÉCIES DE  
LAGARTOS NO SUL DO BRASIL, COM ÊNFASE EM *Homonota uruguayensis*:  
(Phyllodactylidae: Squamata)**

**São Gabriel  
2022**

**TEILOR CARVALHO KOSCREVIC**

**DIVERSIDADE DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS EM TRÊS ESPÉCIES DE  
LAGARTOS NO SUL DO BRASIL, COM ÊNFASE EM *Homonota uruguayensis*:  
(Phyllodactylidae: Squamata)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pimentel Torres.

**São Gabriel  
2022**

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

K262d Koscrevic, Teilor Carvalho  
DIVERSIDADE DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS EM TRÊS ESPÉCIES DE  
LAGARTOS NO SUL DO BRASIL, COM ÊNFASE EM *Homonota*  
*uruguayensis*: (Phyllodactylidae: Squamata) / Teilor Carvalho  
Koscrevic.  
50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -- Universidade  
Federal do Pampa, CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2022.  
"Orientação: Fabiano Pimentel Torres".

1. Biologia Molecular. 2. Elemento Transponível. 3.  
Squamata. I. Título.

**TEILOR CARVALHO KOSCREVIC**

**DIVERSIDADE DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS EM TRÊS ESPÉCIES DE LAGARTOS NO SUL DO BRASIL, COM ÊNFASE EM *Homonota uruguayensis*: (Phyllodactylidae: Squamata)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 11 de agosto de 2022.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Fabiano Pimentel Torres  
UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Analía del Valle Garnero  
UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo  
UNIPAMPA

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, principalmente ao meu Pai por todo o apoio durante esses anos de graduação. Gratidão eterna. Aos meus irmãos, que foram fundamentais para a minha formação. A minha vó por ter sido a primeira pessoa a me incentivar a entrar em uma faculdade e me apoiar em todos os momentos. E a minhas tias, em especial, Catia, Joyce e Jane por todo o suporte.

Aos meus amigos que fiz no começo da graduação, e permanecem comigo até hoje, Sabrina, João e Vitor, obrigado pela troca de conhecimento e companheirismo. E para os amigos que construí ao decorrer da graduação, Pâmela, Raissa, Guilherme, e em especial a Sara e Diodana por terem me ajudado no meu TCC (embora eu não aceitasse todas as suas sugestões).

Agradeço ao Prof. Fabiano Pimentel Torres, pela paciência e orientação durante os quase 5 anos de graduação e por todo ensinamento que adquiri até aqui. Obrigado!

A Prof. Analía e Prof. Ricardo pelos conselhos, incentivo e aprendizado.

Aos integrantes do Laboratório de Diversidade Genética Animal, por todos esses anos de apoio, em especial ao Nairo por todo o auxílio em experimentos de bancada.

Ao grupo de Pesquisa em Apicultura do Pampa, principalmente ao prof. Andrés Delgado Cañedo, por todo o material/reagente concedido de bom grado. Gratidão!

Ao Prof. Tiago Gomes, pela sugestão do organismo de estudo e suas coletas e por ser de grande importância no desenvolvimento do meu estágio. E pela ajuda nas identificações de espécies. Obrigado!

A Prof. Analía e Prof. Andrés, por aceitarem fazer parte da banca examinadora, com certeza as suas sugestões serão de grande importância para o meu trabalho.

A Natasha por todo o ensinamento para as análises *in silico*. E a Prof. Dr. Vera Valente e Prof. Dr. Marindia Depra, pelos *primers* cedidos gentilmente.

Obrigado a UNIPAMPA por ser a minha segunda casa durante todos esses anos. Por fim, a todos que participaram e contribuíram, direta ou indiretamente, no desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

“As grandes ideias surgem da observação dos  
pequenos detalhes”.

Augusto Cury

## RESUMO

Os elementos transponíveis (TEs) são sequências de DNA repetitivo que apresentam a característica de mudar de posição nos cromossomos, podendo influenciar toda a estrutura do genoma. São classificados em duas Classes com base no seu sistema de transposição: os retrotransposons, transpõem via intermediário de RNA; e os transposon, transpõem via intermediário de DNA. O mobiloma reptiliano, apresenta uma rica diversidade de TEs, em particular, os répteis Squamata têm apresentado um panorama diferente na composição, diversidade e atividade de TEs em relação a outros vertebrados, o que torna o estudo dessas sequências repetitivas, no genoma dessas espécies, bastante interessantes e promissoras. A lagartixa *Homonota uruguayensis*, mais conhecida como Gekko-do-campo, pertence à família Phyllodactylidae, possui uma distribuição restrita à parte da região pampeana do Rio Grande do Sul - RS e Uruguai, e tem despertado interesse de pesquisadores sob perspectivas ecológicas, taxonômicas e de genética de populações. No entanto, sobre a diversidade genética dessa espécie, do ponto de vista dos TEs, nenhum estudo foi realizado até o momento. As outras espécies analisadas, *Salvator merianae* que possui uma distribuição mais ampla na RS e *Hemidactylus mabouia* uma espécie exótica, foram analisadas de forma preliminar e utilizadas como modelos comparativos. Com isso, o presente trabalho visa, investigar os elementos transponíveis em répteis escamados, como forma de contribuir para a diversidade genética de espécies encontradas no Bioma Pampa. As amostras do tecido caudal das lagartixas foram coletadas, sem necessidade de sacrifício dos animais. As extrações de DNA genômico foram realizadas a partir de amostras do tecido caudal com kit de purificação comercial, seguindo recomendações do fabricante e ou pelo método de purificação com fenol - clorofórmio. A identificação dos elementos transponíveis de interesse foi feita por amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando-se primers específicos para cada elemento (14 conjuntos de *primers*). Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, visualizados e registrados em fotodocumentador sob luz ultravioleta. Como resultados, 12 TEs diferentes foram detectados em *H. uruguayensis*, de ambas as classes e menos de 10 TEs amplificados em *S. merianae* e *H. mabouia*. Ainda que preliminarmente, estes são os primeiros TEs identificados no genoma de *H. uruguayensis*, inclusive, a presença de um elemento possivelmente envolvido em transferência horizontal. Diante dos resultados obtidos, fica clara a importância dos estudos de elementos transponíveis nos diversos grupos eucarióticos, para compreender a diversidade que os mesmos possuem nos genomas, principalmente em espécies pouco estudadas, visto que tais espécies podem esconder uma fonte rica de informações pouco explorada.

Palavras-Chave: Biologia Molecular; Elemento Transponível; Squamata.

## ABSTRACT

Transposable elements (TEs) are repetitive DNA sequences that have the characteristic of changing their position in chromosomes, which can influence the entire genome structure. They are classified into two Classes based on their transposition system: retrotransposons, transpose via an RNA intermediary; and the transposons, transpose via the DNA intermediate. The reptilian mobiloma presents a rich diversity of TEs, in particular, the Squamata reptiles have presented a different panorama in the composition, diversity and activity of TEs in relation to other vertebrates, which makes the study of these repetitive sequences in the genome of these species, quite interesting and promising. The gecko *Homonota uruguayensis*, better known as Gekko-do-campo, belongs to the Phyllodactylidae family, has a distribution restricted to part of the Pampean region of Rio Grande do Sul - RS and Uruguay, and has aroused the interest of researchers from ecological, taxonomic and ecological perspectives. of population genetics. However, on the genetic diversity of this species, from the point of view of the TEs, no study has been carried out so far. The other species analyzed, *Salvator merianae* which has a wider distribution in RS and *Hemidactylus mabouia* an exotic species, were analyzed in a preliminary way and used as comparative models. Thus, the present work aims to investigate the transposable elements in Squamata reptiles, as a way of contributing to the genetic diversity of species found in the Pampa Biome. Samples of the geckos' caudal tissue were collected, without the need to sacrifice the animals. Genomic DNA extractions were performed from caudal tissue samples with a commercial purification kit, following the manufacturer's recommendations or by the phenol - chloroform purification method. The identification of transposable elements of interest was performed by amplification via PCR (Polymerase Chain Reaction), using specific primers for each element (14 sets of *primers*). The amplified DNA fragments were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel, visualized and recorded in a photodocumentator under ultraviolet light. As a result, 12 different TEs were detected in *H. uruguayensis*, of both classes and less than 10 TEs amplified in *S. merianae* and *H. mabouia*. Although preliminary, these are the first TEs identified in the genome of *H. uruguayensis*, including the presence of an element possibly involved in horizontal transfer. In view of the results obtained, it is clear the importance of studies of transposable elements in the various eukaryotic groups, to understand the diversity they have in the genomes, especially in poorly studied species, since such species can hide a rich source of little explored information.

Keywords: Molecular Biology; Transposable Element; Squamata.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Proporção de elementos transponíveis nos eucariotos .....	16
Figura 2 – Classificação dos elementos transponíveis .....	17
Figura 3 – Mecanismo de transposição dos elementos transponíveis .....	18
Figura 4 – Ciclo de vida de um TE.....	21
Figura 5 – Principais TEs identificados nos amniotas.....	24
Figura 6 – Mapa de distribuição de <i>Homonota uruguayensis</i> e morfologia .....	25
Figura 7 – Detecção dos Transposons de DNA analisados, por PCR.....	31
Figura 8 – Detecção dos Retrotransposon analisados, por PCR.....	32
Figura 9 – Alinhamento do <i>SPIN_Og</i> com o <i>SPIN_Hu</i> .....	34
Figura 10 – Relação filogenética entre os elementos <i>SPINs</i> . .....	35
Figura 11 – Relações filogenéticas entre os Squamata .....	37

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 – Elementos transponíveis investigados no presente trabalho.....	28
Tabela 1 – Distribuição de TEs em três espécies de Squamata .....	33
Tabela 2 – Distância $p$ dos elementos <i>SPINs</i> .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLO E SIGLAS

M – molar

ng – nanograma

μl – microlitros

pb – pares de bases

U – unidade

*Ac - Activator*

*Ds - Dissociation*

*TE - Elemento transponível*

*TEs- Elementos transponíveis*

*RNA – Ácido ribonucleico*

*DNA – Ácido desoxirribonucleico*

*LTR – Repetições terminais longas*

*GAG – Proteína do nucleocapsídeo*

*ENV – Proteína do envelope*

*PRO – Protease*

*IN – Integrase*

*RT – Transcriptase reversa*

*RH – RnaseH*

*ORF - do inglês Open Reading Frame*

*EN – Endonuclease*

*TPASE – Transposase*

*ZnF – Dedo de Zinco*

*REPL – Replicase*

*HELI – Helicase*

*PolB – Polimerase B*

*ATPase – Adenosinatrifosfatase*

*ATP – Adenosina trifosfato*

*mRNA – RNA mensageiro*

*LINE –Elementos nucleares longos intercalados*

*SINE –Elementos nucleares curtos intercalados*

*FHY3 – do inglês FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3*

*FAR1 – do inglês FAR-RED-IMPAIRED RESPONSE1*  
*LINE/L1 - Elemento nuclear longo intercalado 1*  
*APC – Polipose adenomatoses*  
*ERVs- Retrovírus endógeno*  
*scnRNA – RNA não codificante pequeno*  
*HT – Transferência Horizontal*  
*Bov-B – Elemento longo nuclear intercalado Bovine-B*  
*CRI – do inglês Chicken repeat 1*  
*SDS - do inglês sodium dodecyl sulfate*  
*EDTA – do inglês ethylenediaminetetraacetic acid*  
*TRIS-HCl – Tampão base*  
*NaCl – Cloreto de sódio*  
*PCR – Reação em cadeia da polimerase*  
*NCBI – do inglês National Center for Biotechnology Information*  
*Tb - Thermophis bailey*  
*Pm - Protobothrops mucrosquamatus*  
*Pf - Protobothrops flavoviridis*  
*Gj - Gekko japonicus*  
*Bj - Bothrops jararaca*  
*Ca - Crotalus adamanteus*  
*Ae - Arizona elegans*  
*Cvv - Crotalus viridis viridis*  
*Ab - Anilius bituberculatus*  
*Ptm - Ptyas mucosa*  
*Ct - Crotalus tigris*  
*Pg - Pantherophis guttatus*  
*Dps - Diadophis punctatus similis*  
*Emw/Em - Elgaria multicaerinata webbii*  
*Po - Pantherophis obsoletus*  
*Ch - Crotalus horridus*  
*Pcp - Pituophis catenifer pumilus*  
*St - Sphaerodactylus townsendi*  
*Pom - Podarcis muralis*

*Pomn - Padarcis muralis nigriventris*

*Mt - Myanophis thanlyinensis*

*Su - Sceloporus undulatus*

*Ac - Anolis carolinensis*

*Te - Thamnophis elegans*

*So - Sceloporus occidentalis*

*Ts - Thamnophis sirtalis*

*Ats - Aspidoscelis tigris*

*Pv - Phrynocephalus versicolor*

*Am - Aspidoscelis marmoratus*

*Cs - Calyptommatus sinebrachiatus*

*Pp1/Pp2(2) - Paroedura picta*

*Pp2/Pp3 - Phrynosoma platyrhinos*

*To - Tretioscincus oriximinensis*

*SPIN - do inglês Space Invaders transposon*

*HuSPIN/SPIN\_Hu - sequência do transposon SPIN de Homonota uruguayensis*

*SPIN\_Md - sequência do transposon SPIN de Monodelphis domestica*

*SPIN\_Xt - sequência do transposon SPIN de Xenopus tropicalis*

*SPIN\_Ml - sequência do transposon SPIN de Myotis lucifugus*

*SPIN\_Og - sequência do transposon SPIN de Otolemur garnettii*

*SPIN\_Et - sequência do transposon SPIN de Echinops telfairi*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 Elementos Transponíveis</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1.1 Classificação dos TEs</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1.2 Impactos dos TEs no genoma</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1.3 Efeitos Benéficos</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1.4 Efeitos Deletérios</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1.5 Regulação</b> .....	<b>20</b>
<b>1.2 Mobiloma Reptiliano</b> .....	<b>21</b>
<b>1.2.1 Testudines</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2.2 Arcossauros</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2.3 Squamata</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2.4 Gekko-do-campo: <i>Homonota uruguayensis</i></b> .....	<b>24</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos</b> .....	<b>26</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Coleta de campo</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2 Extração de DNA</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4 Purificação e Sequenciamento</b> .....	<b>29</b>
<b>3.5 Análises de Sequências</b> .....	<b>30</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1 <i>Screening</i> de TEs por PCR</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2 <i>SPIN</i> autônomo</b> .....	<b>34</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>43</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Elementos Transponíveis

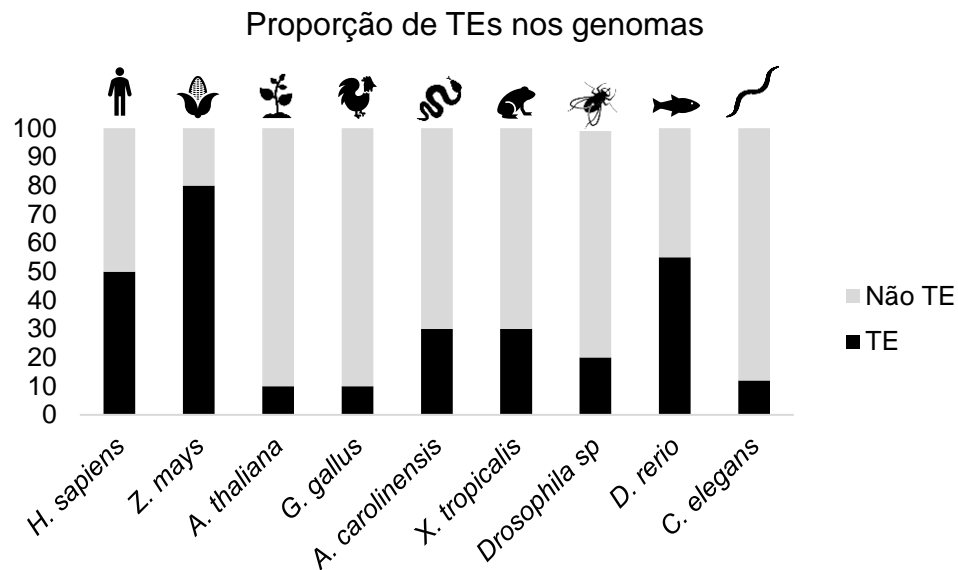
A geneticista norte-americana Barbara McClintock propôs, na década de 1940, que alguns genes apresentavam a característica de mudar de posição nos cromossomos, podendo influenciar toda a estrutura do genoma. Essa descoberta baseou-se em estudos de padrões da coloração do pericarpo do milho, no qual, posteriormente, com dados moleculares e citogenéticos, foi observada a quebra cromossômica no cromossomo 9 envolvendo dois fatores, denominados: *Ac* (do inglês, “*Activator*”) e *Ds* (do inglês, “*Dissociation*”). McClintock observou que esses dois elementos (*Ds* dependendo de *Ac* para sua transposição) ocasionavam os rearranjos cromossômicos devido a sua mobilização aleatória no genoma, sendo assim, nomeados de elementos controladores (McCLINTOCK, 1945).

Embora a pesquisa feita por McClintock fosse promissora, seus achados foram deixados de lado. Entretanto, com o avanço da genética, a manipulação de genes e cromossomos em laboratório, se tornou possível realizar análises mais precisas do material genético (CARARETO *et al.*, 2015). Com isso, diversas outras pesquisas corroboraram com a existência dos “elementos controladores” no genoma de outros organismos, sendo renomeado posteriormente de Elementos Transponíveis (TEs). À geneticista Barbara McClintock foi concedido o prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina, em 1983 (décadas depois) pela sua descoberta.

Embora ainda exista uma baixa representatividade de sequenciamento de genomas, é possível observar a proporção de TEs no genoma de alguns organismos, principalmente nos eucariotos. Nota-se, na Figura 1, a proporção de elementos transponíveis no genoma dos principais grupos eucariotos, onde os seres humanos apresentam cerca de 50% de TEs (LANDER *et al.*, 2001; VENTER *et al.*, 2001), enquanto o genoma de *Gallus gallus* apresenta apenas 10% (INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM *et al.*, 2004). Percebe-se, que em alguns dos principais organismos modelos para estudos moleculares, bioquímicos ou citogenéticos, a porcentagem de TEs varia em torno de 55% para o zebrafish (*Danio rerio*) (HOWE *et al.*, 2013), 20% para drosófilas (BARRÓN *et al.*, 2014) e apenas 12% no genoma de *Caenorhabditis elegans* (LARICCHIA *et al.*, 2017). Ainda, ao comparar a quantidade de TEs no genoma do milho (*Zea mays*) com outras plantas (SCHNABLE *et al.*, 2009), é notável uma grande variação em seu conteúdo repetitivo, aproximadamente 80%, comparado ao observado na espécie *Arabidopsis thaliana* com somente cerca de 10% de seu genoma constituído por TEs (LOCKTON & GAUT, 2010). Porém, outros grupos pouco estudados, e que não são de

interesse econômico, mostram que os TEs ocupam um percentual de aproximadamente 30% como, por exemplo, no genoma de *Anolis carolinensis* ou *Xenopus tropicalis* (HELLSTEN *et al.*, 2010; ALFOLDI *et al.*, 2011; SOTERO-CAIO *et al.*, 2016).

**Figura 1:** Porcentagem de Elementos Transponíveis nos principais grupos de eucariotos: *Homo sapiens*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Gallus Gallus*, *Anolis carolinensis*, *Xenopus tropicalis*, *Drosophila sp*, *Danio rerio*, *Caenorhabditis elegans*.



Fonte: Autor (2022).

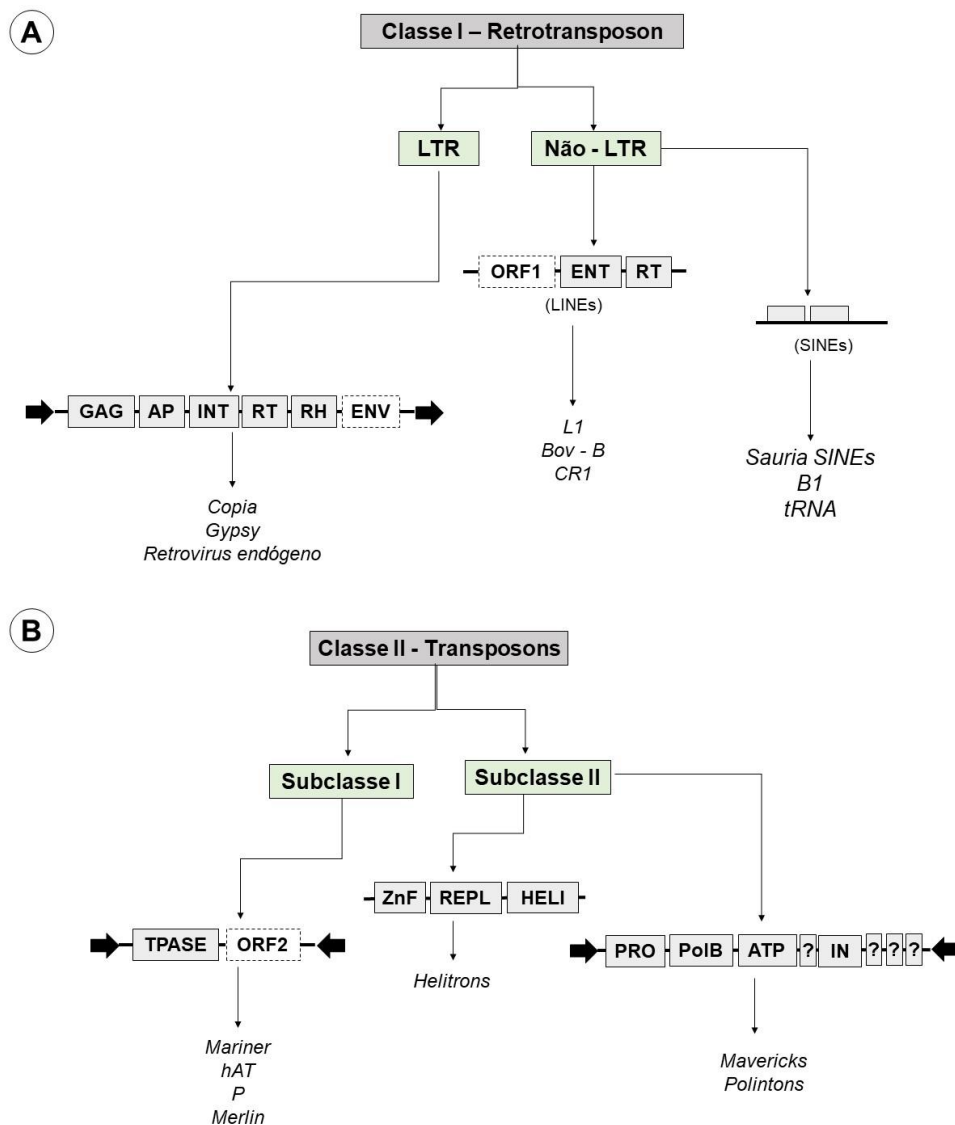
### 1.1.1 Classificação dos TEs

À medida que o sequenciamento de DNA permitiu que os genomas de distintas espécies fossem analisados, a investigação desses genomas demonstrou a diversidade surpreendente de TEs. Com isso, foi necessário a criação de um sistema de classificação e nomenclatura para os elementos, pois, muitas vezes, cópias de um elemento podem estar presentes em espécies separadas filogeneticamente, o que acaba causando um importuno em sua classificação (BAO *et al.*, 2015).

Os TEs são classificados com base na estrutura de suas sequências e em seu mecanismo de transposição. Os elementos são divididos em duas classes: elementos de Classe I ou Retrotransposons, sendo estes compostos por retroelementos que utilizam o ácido ribonucleico (RNA) como intermediário para sua transposição (Figura 2A); e os de Classe II ou Transposons, que por sua vez, utilizam diretamente o DNA como intermediário para transposição (Figura 2B).



**Figura 2:** Esquema de classificação de TE, representando as duas classes e seus principais elementos, de acordo com a sua estrutura: A - Retrotransposons LTR – proteína do nucleocapsídeo (GAG), proteína do envelope (ENV), protease (PRO), integrase (IN), transcriptase reversa (RT) e uma Rnase H (RH). Retrotransposons não LTR – “do inglês Open Reading Frame” (ORF1), domínio endonuclease (EN), promotor de RNA polimerase III (☐). B - Elementos de classe II - transposase (TPASE), domínio de dedo de zinco (ZnF), replicase (REPL), helicase (HELI), polimerase B (PolB), ATPase (ATP), proteínas de função desconhecida (?) e integrase (INT). As regiões de codificação são representadas como caixas (☐). As regiões não codificantes são representadas como linhas (—). Em alguns casos, o gene ENV e as ORFs podem estar ausente (linha pontilhada). As setas representam sequências repetidas de DNA e as suas orientação reflete as repetições terminais.

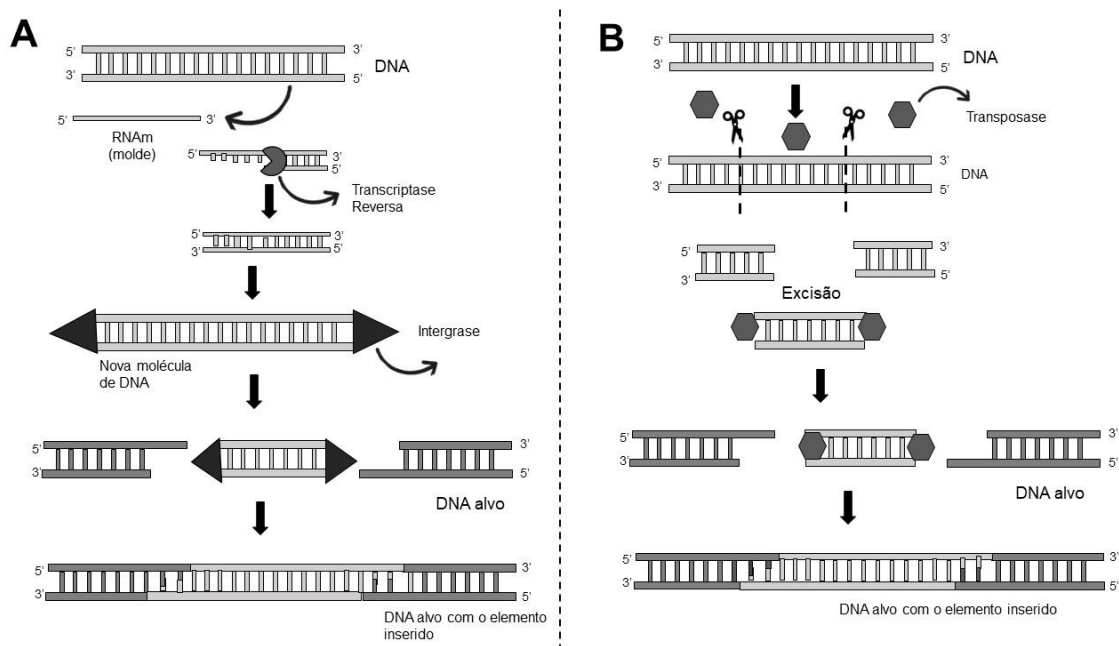


Fonte: Adaptado de Wicker *et al.*, (2007); SOTERO-CAIO *et al.*, (2016).

A transposição dos elementos de Classe I é fornecida pela sequência do retroelemento, onde estará presente a enzima RT (Transcriptase reversa), que fornecerá uma nova cópia de DNA utilizando um RNA molde. Com isso, essa nova molécula de DNA, com as enzimas para

transposição, é direcionada para o núcleo, no qual irá ocorrer a inserção do elemento no DNA alvo (Figura 3A). Os elementos de Classe II se transpõem através da enzima transposase, onde a mesma corta o elemento de um sítio doador e o insere em um novo sítio receptor característico, transpondo o elemento diretamente via DNA (Figura 3B) (WICKER *et al.*, 2007).

**Figura 3:** Mecanismo de transposição dos Elementos Transponíveis: A - Transposição de retroelementos (Classe I), via RNAm; B - Transposição de transposons (Classe II), via DNA.



Fonte: Adaptado de BAO *et al.*, (2015).

Ambas as classes podem conter cópias autônomas ou não-autônomas para a sua transposição no genoma de seu hospedeiro. Os TEs que são autônomos apresentam em sua sequência toda a maquinaria enzimática para a mobilização completa, enquanto os não-autônomos apresentam deleções em sua estrutura para a codificação de enzimas para mobilização (WICKER *et al.*, 2007), necessitando da maquinaria enzimática dos seus parceiros autônomos para sua transposição. Essa característica estrutural pode ser observada na Figura 1, onde os elementos não-LTR demonstram diferenças nas suas estruturas (*LINES* –autônomos e *SINES* – não-autônomos).

### 1.1.2 Impactos dos TEs no genoma

Os TEs podem impactar o genoma de seu hospedeiro de diferentes formas, dependendo do local onde ocorre a transposição: em sítios regulatórios e ou não regulatórios, em regiões

codificadoras ou não codificadoras de genes e, ainda, causarem rearranjos cromossômicos (WICKER *et al.*, 2007; JANGAM *et al.*, 2017; NICOLAU *et al.*, 2021).

### 1.1.3 Efeitos Benéficos

A exaptação de sequências codificadoras de proteínas derivadas por TEs é um dos efeitos benéficos proporcionados por eles, pois origina novos genes funcionais para o hospedeiro (NICOLAU *et al.*, 2021). LIN *et al.*, (2007), demonstrou que as proteínas FHY3 e FAR1 presentes em *A. thaliana*, são derivadas da transposases de *Mutator* – like. Com isso, essas proteínas trabalham em conjunto com o fotorreceptor fitocromo A, modulando indiretamente a expressão do gene reativo à luz vermelha. Recentemente, foi reforçado que essa ligação entre FHY3 e FAR1 é específica (LIU *et al.*, 2020).

Um outro caso comum de efeito benéfico causado pelos TEs, pode ser observado na espécie *Drosophila melanogaster*, onde o gene da telomerase foi perdido e sendo cooptado por três retrotransposons não-LTR (*HeT-A*, *TART* e *TAHRE*), sendo referido por HTTs. Esses elementos apresentam o papel de alongamento dos telômeros, que protegem as extremidades dos cromossomos do atrito genético devido ao problema de replicação final e impedem que as extremidades dos cromossomos sejam aderidas umas às outras (MCGURK *et al.*, 2021).

### 1.1.4 Efeitos Deletérios

Os efeitos deletérios são mais observados no genoma humano, pois muitos dos eventos envolvendo os TEs, estão relacionados ao câncer, onde estudos mostram que os TEs fornecem um meio alternativo (promotor) para a ativação de oncogenes (JANG *et al.*, 2019). Pode ser observado, que a ativação do elemento nuclear longo intercalado 1 (*LINE-1/L1*) promove possivelmente o desenvolvimento do câncer de cólon, devido a uma nova inserção em um locus específico no cromossomo 5, interrompendo o último códon do gene supressor de tumor que codifica a proteína polipose adenomatosa (APC) (BURNS, 2020).

Estudos de doenças neurodegenerativas, principalmente Alzheimer (DA), demonstraram que distúrbios na proteína Tau (proteínas que estabilizam os microtúbulos dos neurônios no sistema nervoso) hipoteticamente promove o relaxamento da cromatina e a ativação dos TEs, incluindo o elemento *L1*, *SINEs* e retrovírus endógenos (*ERVs*) em humanos (FROST *et al.*, 2014). Porém, seus dados eram inconclusivos, não sabendo se a ativação do TEs estava relacionada ao defeito da proteína Tau, ou se era devido ao avanço da Alzheimer. Com isso, um estudo similar, envolvendo

drosófila transgênicas (proteína Tau humana selvagem), demonstrou positivamente que a ativação dos TEs era dependente do patógeno Tau, e reforçada após o envelhecimento das moscas, sendo em sua maioria os retrotransposons LTR e não-LTR (GUO *et al.*, 2018).

### 1.1.5 Regulação

Conforme apresentado anteriormente, os TEs podem ser potencialmente prejudiciais ao hospedeiro, no entanto eles acabam sendo reprimidos por diferentes meios. Alguns, aspectos que promovem o silenciamento, inclui vias epigenéticas, como metilação do DNA e modificação das histonas (NICOLAU *et al.*, 2021). Outro recurso de silenciamento de TE, é proporcionado pelo próprio elemento, onde RNAs derivados de TEs se tornam um dos artifícios para regulação do genoma de eucariotos (ETCHEGARAY *et al.*, 2021).

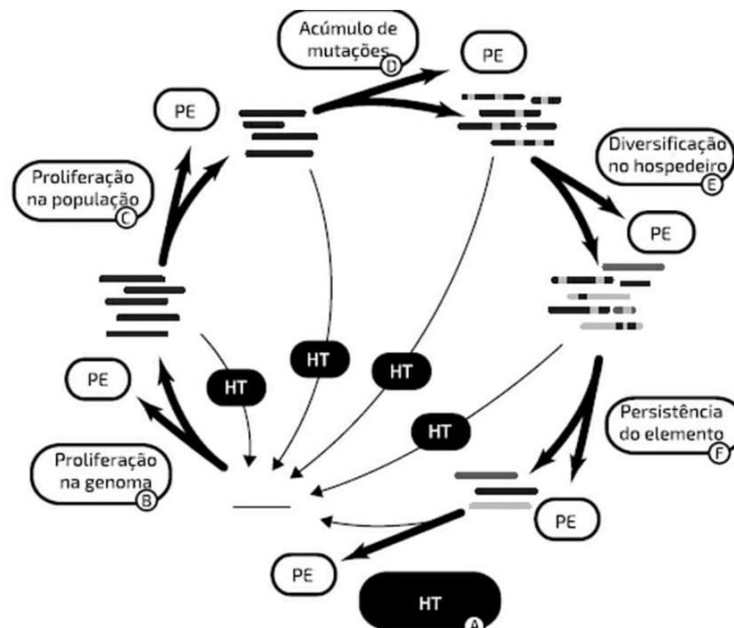
Os RNAs não codificantes (scnRNA) são alguns dos exemplos de RNA derivados de TEs, no qual inclui miRNA e piRNA. Além de silenciar os elementos, os scnRNA são importantes reguladores genômicos, pois regulam a degradação e tradução do mRNA (ETCHEGARAY *et al.*, 2021).

A distribuição dos miRNAs no genoma dos vertebrados varia em alguns grupos. A análise dos genomas de *D. rerio*, *Xenopus tropicalis*, *G. gallus*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Macaca mulatta* e *Pan troglodytes*, mostrou que a única espécie que não apresentou miRNAs derivados de TE foi *X. tropicalis*. Com esse estudo, percebe-se a importância dos sncRNAs na regulação do genoma de vertebrados, principalmente nos mamíferos, no qual apresentou o maior índice de miRNA derivados de TEs (QIN *et al.*, 2015).

A capacidade que o genoma do hospedeiro tem de promover o silenciamento dos TEs é surpreendente. Porém, vale ressaltar que os elementos podem fornecer uma fonte de variabilidade genética, mesmo com as espécies sendo isoladas reprodutivamente, mecanismo esse denominado de Transferência Horizontal (HT) (GILBERT *et al.*, 2012). Embora esse mecanismo seja mais elucidado nos procaríotos, estudos vêm demonstrando diversos casos de HT em eucariotos. Como por exemplo, em ruminantes e répteis, grupos distantes que apresentam o elemento *Bov-B LINE* (KORDIS & GUBENSEK, 1998).

Com isso, deve-se notar que o ciclo de vida desses elementos é bastante complexo (Figura 4). Mesmo podendo invadir novos genomas e promover diversas mutações, os mesmos podem ser silenciados ou “varridos” pelo genoma hospedeiro.

**Figura 4:** Ciclo de vida de um TE. A – Um evento de HT pode ser o início ou fim do ciclo de vida de TE no genoma; B – Após a invasão do genoma há proliferação do TE no genoma; C – Durante a proliferação genômica esse TE pode se dispersar pela população; D – Ao longo do tempo esse TE acumulará mutações; E – Como consequência, pode diversificar-se; F – E, por fim, uma ou mais famílias podem persistir no genoma ou sofrer um evento de HT. Em todos os passos do ciclo, o TE pode ser perdido ou sofrer HT.



Fonte: WALLAU *et al.*, (2011).

## 1.2 Mobiloma Reptiliano

Os estudos voltados à fração repetitiva do DNA, sempre foi focado durante muito tempo em espécies de interesse econômico, como os mamíferos e aves. Os répteis, por outro lado, além de apresentarem uma alta diversidade de espécies - estima-se cerca de 10.700 mil espécies registradas no mundo, no qual inclui tartarugas, crocodilos, cobras, lagartos e anfisbenas (UETZ & HOSEK, 2018) - não apresentam um conjunto de genomas sequenciados com qualidade, o que implica em uma falta de informação sobre o conteúdo repetitivo (SOTERO-CAIO *et al.*, 2016). Somente em 2011 foi possível ter um sequenciamento completo, do genoma do lagarto *Anolis carolinensis*, podendo-se assim começar a elucidar a diversidade de TEs que os répteis apresentam (ALFOLDI *et al.*, 2011).

### 1.2.1 Testudines

Recentemente, foi demonstrado a porcentagem de TEs que os testudines apresentam, no qual com análises comparativas do genoma de *Chelonia mydas*, *Chrysemys picta*, *Pelodiscus sinensis* e *Gopherus agassizii*, foi determinado que cerca 30% dos seus genomas constituíam de elementos transponíveis, incluindo Transposons de DNA, LTR, *LINE* e *SINE*. Ao comparar a abundância de cada classe dos elementos, entre o genoma das 4 tartarugas, a única classe que apresentou maior número de significância, foi a de Transposons de DNA, com cerca de 12% na espécie *G. agassizii* (TOLLIS *et al.*, 2017).

### 1.2.2 Arcossauros

Os arcossauros (crocodilianos e aves) apresentam diferenças do conteúdo de TEs (SOTERO-CAIO *et al.*, 2016; BOISSINOT *et al.*, 2019). Ao compararem o genoma de três crocodilianos: *Alligator mississippiensis*, *Crocodylus porosus* e *Gavialis gangeticus*, foi possível perceber que o genoma desse grupo correspondia a TEs mais antigos, dando a entender que a taxa de invasão e evolução de novos TEs vem diminuindo nos crocodilianos e, ao determinar a proporção de cada classe de elementos, o genoma dos crocodilianos é em sua maior parte de Retrotransposons não-LTR e Transposons de DNA (GREEN *et al.*, 2014).

As aves, além de ter escassez de atividade genômica de TEs, apresentam o genoma pequeno e conservado em relação aos outros répteis, acredita-se que essa característica genômica esteja ligada ao metabolismo do vôo (ZHANG *et al.*, 2014). Embora a grande maioria dos genomas sequenciados de aves apresentem, de modo geral, aproximadamente 10% de TEs, foi possível observar uma exceção nessa porcentagem para a Ordem Piciformes (pica-paus), com cerca de 20% de TEs, acima da média apresentada pelas aves analisadas até o momento (ZHANG *et al.*, 2014; SUH *et al.*, 2014).

As aves, como também os crocodilianos, apresentam maior proporção de elementos não-LTR, sendo representados pelos retrotransposons *CRI*, onde nas aves eles compreendem de 2 a 7% na maioria dos genomas e nos crocodilianos compreendem aproximadamente 10% (BOISSINOT *et al.*, 2019).

### 1.2.3 Squamata

Pesquisas voltadas às sequências repetitivas sobre a perspectiva de TEs, no genoma dos Squamata vem sendo demonstrado um panorama diferente em relação à diversidade, composição, variação e atividade dos elementos, que não são observados em outros vertebrados, como aves (*G. gallus*) e mamíferos (*Bos taurus*) (YIN *et al.*, 2016). Por apresentarem uma alta diversidade de TEs, porém com um baixo número de cópias, a distribuição de TEs em seu genoma se torna mais semelhante a peixes do que mamíferos (SOTERO-CAIO *et al.*, 2016).

O genoma de *Anolis carolinensis*. é composto por aproximadamente 30% de elementos transponíveis, sendo que os elementos que apresentam maior atividade são os retrotransposons não-LTR. No caso dos transposons, *A. carolinensis*. apresenta 5 superfamílias com dominância: *hAT*, *Chapaev*, *Maverick*, *Mariner* e *Helitron*. Tanto os retrotransposons quanto transposons apresentam, em sua maior parte, elementos jovens (ALFOLDI *et al.*, 2011). O lagarto *A. carolinensis*, por ser o primeiro réptil a ter um genoma sequenciado, é utilizado como referências para estes estudos.

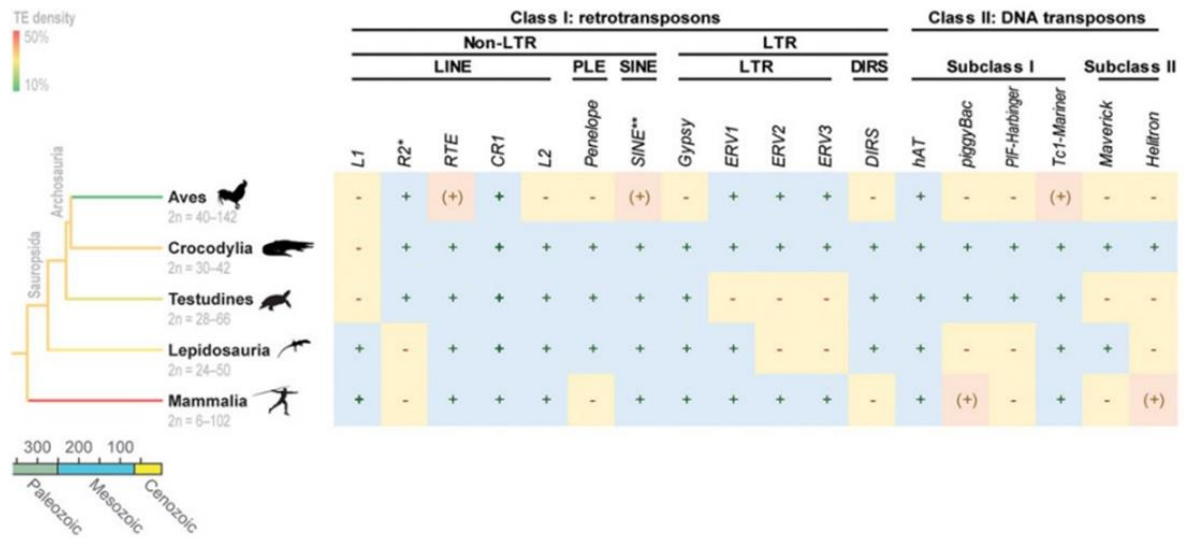
A família *Sauria SINEs*, identificado primeiramente no genoma de *A. carolinensis* (BOISSINOT *et al.*, 2019), é um dos retrotransposons mais diversificados e restritos no genoma de lepidosauria (KORDIS, 2009), sendo encontrado nas principais famílias de répteis: Iguanidae, Gekkonidae, Colubridae, Elapidae, Viperidae e nas duas espécies de Tuataras. Por ser um elemento restrito, pode ser utilizado como marcador molecular para rastrear eventos evolutivos no genoma desse grupo (PISKURE *et al.*, 2006).

Dentro da Ordem Squamata, as serpentes são as que melhor contribuem para a diversidade em paisagem genômica de TEs (CASTOE *et al.*, 2013). Uma comparação do genoma de três serpentes demonstra a diferença no conteúdo de repetições: *Python molurus bivittatus* (21% de TE), *Agkistrodon contortrix* (45% de TE) (CASTOE *et al.*, 2011) e *Deinagkistrodon acutus* (47,47% de TE) (YIN *et al.*, 2016). Os três genomas de serpentes demonstraram ter maior abundância de *LINES*, embora a *P. molurus bivittatus* apresente a porcentagem mais baixa que as outras espécies. Com isso, a diversidade da paisagem genômica é atribuída à quantidade de famílias e subfamílias de elementos (CASTOE *et al.*, 2011; YIN *et al.*, 2016).

O lagarto *Salvator merienae* é uma espécie presente no bioma pampa, no qual apresenta uma montagem do genoma de alta qualidade. Com base nas análises, foi determinado aproximadamente 44% de conteúdo repetitivo. Como nos outros Squamata analisados, o *S. merienae* contém em sua maior proporção retrotransposons *LINES* (ROSCITO *et al.*, 2018). Por ter seu genoma sequenciado, *S. merienae* poderia ser utilizado como genoma comparativo para espécies catalogadas em regiões pampeanas.

Analisando a Figura 5, podemos ver as principais famílias de elementos transponíveis identificados nos reptilianos em comparação com os mamíferos.

**Figura 5:** Principais TEs identificados nos amniotas: Presença com sinal positivo e caixa com coloração azul; Ausência com sinal negativo e caixa com coloração vermelhas.



Fonte: Adaptação de KAPUSTA & SUH (2017).

#### 1.2.4 Gekko-do-campo: *Homonota uruguayensis*

A superfamília Gekkota representado pelas lagartixas apresenta aproximadamente 1935 espécies catalogadas no mundo inteiro, sendo que a Australásia contém a maior riqueza de espécies. Gekkota possui 7 famílias, dentre elas encontra-se a família Phyllodactylidae que inclui 10 gêneros com 148 espécies de lagartixa. O gênero *Homonota*, entre os 10 gêneros, compreende cerca de 14 espécies catalogadas, distribuídas pela América do Sul (UETZ *et al.*, 2020).

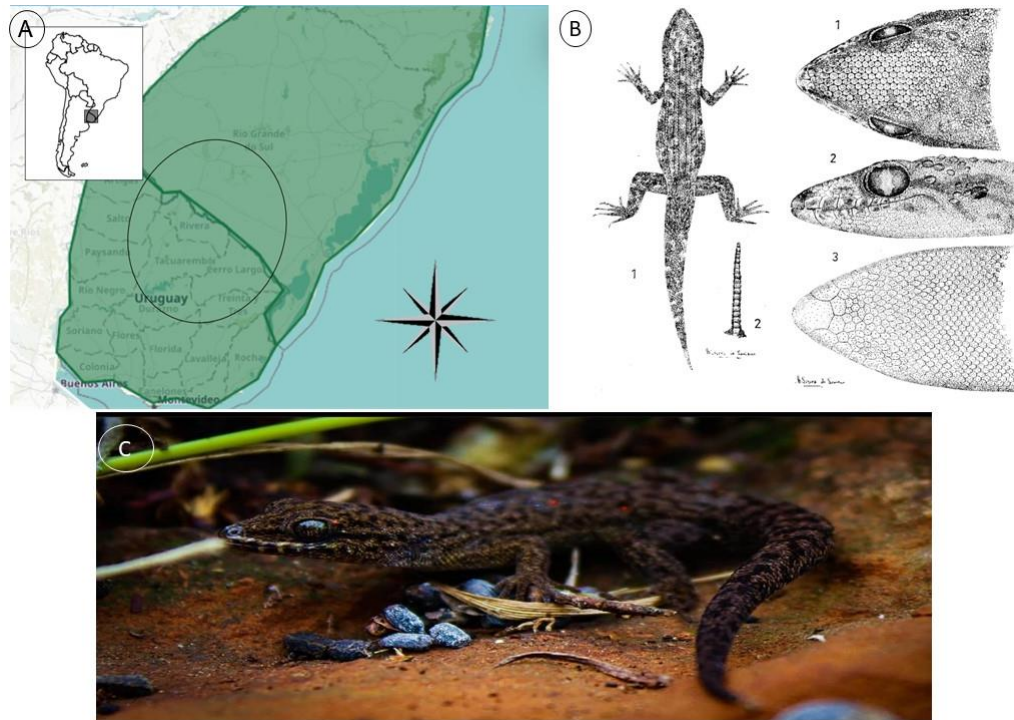
A lagartixa *Homonota uruguayensis* mais conhecida como Gekko-do-campo, possui uma distribuição restrita no Bioma Pampa do Rio Grande do Sul (RS) e norte do Uruguai (Figura 6). *H. uruguayensis* é um pequeno lagarto que ocupa afloramentos rochosos, utilizados como abrigo e local de nifitação (VAZ-FERREIRA *et al.*, 1961).

Alguns estudos demonstram que a espécie é sensível a pequenas mudanças em seu habitat e, por causa do avanço da agropecuária, esta espécie entrou na lista de fauna ameaçadas de extinção



no RS, sendo considerada como Preocupação Menor (LC) tanto em escala global como local (NUNES *et al.*, 2009; VIEIRA, 2012).

**Figura 6:** A - Mapa de distribuição de *Homonota uruguayensis* no RS e Uruguai; B – Características Morfológicas da cabeça e corpo de *H. uruguayensis* (VAZ-FERREIRA *et al.*, 1961); C - Exemplar de *H. uruguayensis*.



Fonte: A) Autor (2022); B) Adaptado de VAZ-FERREIRA *et al.*, (1961); C) Guilherme Castro Franco de Lima.

Apesar dessas ameaças atuais e de sua riqueza biológica, poucos estudos examinaram a diversidade genética que essa espécie abriga, com somente uma publicação voltada a genética de populações (FELAPPI *et al.*, 2015), sendo a maioria dos estudos sobre a perspectiva ecológica (NUNES *et al.*, 2009) e taxonômica (VAZ-FERREIRA *et al.*, 1961) e dada a reconhecida importância dos elementos transponíveis para a organização e evolução dos genomas, incluindo-se os répteis, fica clara a necessidade de aprofundamento do tema.

## **2 OBJETIVO GERAL**

- Investigação de Elementos Transponíveis em répteis escamados, como forma de contribuir para a diversidade genética de espécies encontradas no Bioma Pampa.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Conhecer a fração repetitiva móvel do genoma de *H. uruguayensis*, do ponto de vista da diversidade, distribuição, integridade estrutural/funcional e evolução de elementos transponíveis;
- Comparar a presença de elementos transponíveis de *H. uruguayensis* em relação a *Hemidactylus mabouia* e *Salvator merianae* analisados de forma preliminar.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta de campo**

A coleta de tecido caudal de *H. uruguayensis* foram realizadas no município de Rosario do Sul – RS, coordenadas (30°21'41.16 S 55°15'53.15 W). A coleta foi realizada no período da manhã e tarde, os indivíduos capturados são pegos na região peitoral, para impedir autotomia caudal. Após, é retirado um pequeno fragmento da cauda (utilizado bisturi, luvas e álcool 70% para prevenir qualquer contaminação), sem necessidade do sacrifício dos animais. Ao todo foram coletadas 16 amostras que foram armazenadas em microtubos de centrifuga e levadas posteriormente para laboratório.

As duas amostras do tecido caudal da lagartixa *Hemidactylus mabouia* foram coletadas em São Gabriel/ RS, seguindo o mesmo método de coleta de *H. uruguayensis*. A amostra de *S. merianae* estava disponível no laboratório de Diversidade Genética Animal – DGA. Todas as coletas são aprovadas pela licença da SISBIO (SISBIO 58966-1).

#### **3.2 Extração de DNA**

Os DNAs genômicos das amostras foram isolados utilizando-se dois métodos, com kit de purificação comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante ou pelo método de purificação com fenol-clorofórmio, de acordo com SASSI *et al.*, (2005). Basicamente, este protocolo, utiliza um tampão de lise (SDS 10%, EDTA 0,5M, TRIS-HCl 1M e NaCl 1M) para o rompimento dos tecidos e membranas celulares; fenol equilibrado (pH 8,0) e clorofórmio para a purificação do DNA; e etanol absoluto para a precipitação do mesmo. A quantificação dos DNAs purificados foi feita em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences).

#### **3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese**

Para analisar a diversidade de TEs nas espécies amostradas, foi empregada a técnica de PCR, utilizando-se um total de 14 conjuntos diferentes de primers específicos de TEs: sete para amplificação de Transposons de DNA e sete para amplificação de Retrotransposons, cujas informações podem ser encontradas na Tabela 1. As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 15ul, contendo: 15ng de DNA, 1,5 mM de Buffer 10x, 1 mM de dNTPs, 10

pmol de cada primer, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,3 U de Taq DNA polimerase. As condições de ampliações para cada conjunto de primers estão descritas no Quadro 1.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, juntamente com marcador de peso molecular de 100pb, corados com gel RED, e visualizados sobre luz UV e fotografados no fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotecnologia).

**Quadro 1:** Elementos transponíveis investigados no presente trabalho, indicando sua Classe, *primers* específicos, etapas da PCR, tamanho esperado do produto amplificado e referências bibliográficas dos mesmos.

Nome	Classe	Primers	Etapas da PCR	Tamanho esperado	Referências
<i>Mariner</i>	Transposon de DNA	diretoMAR-188F: 5'ATCAAAAGCTGR TATTCATC 3' reversoMAR-251R: 5'CAAAGATGTGTG TGGCCTTG 3'	94°C/5 min; 30 ciclos de: 94°C/40 s; 55°C/30 s; 72°C/60 s; 5 min/72°C.	235 pb	Oliveira et al, 2013 Molecular Cytogenetics, 6:54 Lampe, DJ. et. al, 2003 MolBiolEvol
<i>hAT 1</i>	Transposon de DNA	hAT-HT1, direto: 5'CTCTACAAATTT AACATCWG 3' hAT-HT1 reverso: 5'AATCAACYTCC WGTAAGT 3'	94°C/5 min; 30 ciclos de: 94°C/30 s; 49°C/30 s; 72°C/30 s; 7 min/72°C.	~600	Novick, P. et al, 2010 Gene 449: 85–94
<i>hAT 2</i>	Transposon de DNA	direto hAT-HT2: 5'TTCCTATTTTTCC TTGGCAC 3' reverso hAT-HT2: 5'AAGCTCTTAAA TCTVADTTG 3'	94°C/5 min; 30 ciclos de: 94°C/30 s; 49°C/30 s; 72°C/30 s; 7 min/72°C.	~900 pb	Novick, P. et al, 2010 Gene 449: 85–94
<i>hAT 3</i>	Transposon de DNA	direto hAT-HT3: 5'AGTTCCCAAATT TATCAGGAG 3' reverso hAT-HT3: 5'GCAATTAAACA GAAAGATAT 3'	94°C/5 min; 30 ciclos de: 94°C/30 s; 49°C/30 s; 72°C/30 s; 7 min/72°C.	~800 pb	Novick, P. et al, 2010 Gene 449: 85–94
<i>Galluho p</i>	Transposon de DNA	diretoGhop574S: 5'CACAGCTGTCAC ACCACAAA 3' reversoGhop574A: 5'AGTGTGCTCCAT GGTCTTCA 3'	94°C/5 min; 30 ciclos de: 94°C/40 s; 55°C/30 s; 72°C/60 s; 5 min/72°C.	550 pb	Comunicação pessoal Bertocchi, N. A
<i>SPIN não-autônomo</i>	Transposon de DNA	direto NAF2: 5'CGAACGACCCTT TCACAGG 3' reverso NAR2: 5'CAGTTCCTCATG TTGTGGTGAC 3'	94°C/5 min; 30 ciclos de: 94°C/30 s; 54°C/30 s; 72°C/60 s; 10 min/72°C.	-	Gilbert et al, 2012 Mol. Biol. Evol. 29(2):503–515
<i>SPIN autônomo</i>	Transposon de DNA	direto SPINtpaseF2: 5'CATGTTGCCTAC CTTATCTGC 3' reverso SPINtpaseR2: 5'ACTTGATAACCA ACAAGCTGG 3'	94°C/5 min; 30 ciclos de: 94°C/30 s; 54°C/30 s; 72°C/60 s; 10 min/72°C.	~400pb	Gilbert et al, 2012 Mol. Biol. Evol. 29(2):503–515

<i>SauriaSINE</i>	SINE	direto SQ1F: 5'CCCWGCTCCTGC CAACCTAGC 3' reverse SQ1R: 5'TAGTCATGCTGG CCACATGACC 3'	94°C/3 min; 33 ciclos de: 94°C/30 s; 50°C/50 s; 72°C/30 s; 5 min/72°C.	~350 pb	Piskurek, O. et al, 2006 Mol. Evol. 62:630–644
<i>Bov-B 1</i>	LINE	REPsense 5'ATCGGAATTCTT GCGAAGTCGTGTC CGAC 3' REPantisense 5'ATCGGAATTCGC TCCAAGATCACCG CAGA 3'	94°C/5 min; 30 ciclos de: 94°C/45 s; 50°C/45 s; 72°C/60 s; 5 min/72°C.	~550 pb	Kordis, D. et al, 1998 Evolution 95:10704– 10709
<i>Bov-B 2</i>	LINE	LIZ sense: 5'ATCGAATTCATC TCATCCTCTGTGCG T 3' LIZ antisense 5'ATCGAATTCCCA GTAGTAATGTATG G 3'	94°C/5 min; 30 ciclos de: 94°C/45 s; 50°C/45 s; 72°C/60 s; 5 min/72°C.	~310 pb	Kordis, D. et al, 1998 Evolution 95:10704– 10709
<i>Bov-B (G62/G63)</i>	LINE	G2262F: 5'AGCCACAGCCCT TAGTCTGC 3' G2263R: 5'GCTCCTCCTATT TGCCCATCTAT 3'	94°C/5 min; 34 ciclos de: 94°C/45 s; 55°C/45 s; 72°C/60 s; 5 min/72°C.	-	Walsh, A.M. et al, 2013 PNAS 110(3):1012-1016 <i>Supplementary Material (Table3)</i>
<i>Bov-B (G77/G78)</i>	LINE	G2277, direto: 5'AAAGGTCAGTTT ACATCCCAATC 3' G2278, reverso: 5'TCTCTTGAAGGA CTTGCCATAG 3'	94°C/5 min; 34 ciclos de: 94°C/45 s; 55°C/45 s; 72°C/60 s; 5 min/72°C.	-	Walsh, A.M. et al, 2013 PNAS 110(3):1012-1016 <i>Supplementary Material (Table3)</i>
<i>CR1 J3</i>	LINE	direto CR1_J3S: 5'TTGACAGGCTGG ACAGATG 3' reverso CR1_J3A: 5'GTTGCCTGGGAG AAGAGAC 3'	94°C/5 min; 30 ciclos de: 94°C/40 s; 55°C/30 s; 72°C/60 s; 5 min/72°C.	~500 pb	Comunicação pessoal Bertocchi, N. A
<i>CR1 E</i>	LINE	direto CR1_E500S: 5'ATGGACAGTGG CATTGAGTG 3' reverso CR1_E500A: 5'GCCCTCTGATCA TCTTGTG 3'	94°C/5 min; 30 ciclos de: 94°C/40 s; 55°C/30 s; 72°C/60 s; 5 min/72°C.	540pb	Bertocchi et al, 2018_Distri butionOfCR1- likeTranspos Chromosome Research

Fonte: Autor (2022).

### 3.4 Purificação e Sequenciamento

Os produtos de PCR de interesse foram purificados da banda de gel de agarose 1% com Kit PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo (Invitrogen), seguindo as recomendações do fornecedor. Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciamento, pelo serviço da ACTGene, em Alvorada/RS, seguindo suas especificações.

### 3.5 Análises de Sequências

As sequências obtidas foram visualizadas no software Chromas e editadas utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Para confirmação da identificação dos elementos foi realizada uma busca por similaridade inicialmente no Replibase (JURKA *et al.*, 2005) utilizando a ferramenta CENSOR e, posteriormente no Genbank (NCBI) por meio da ferramenta BLASTn. Devido à limitação de acesso do Replibase, uma busca na literatura por sequências de outros elementos disponíveis do mesmo tipo foi realizada. Tais sequências obtidas da literatura, juntamente com a obtida no presente trabalho, foram alinhadas na ferramenta MAFFT v.7 (KATOHI & STANDLEY, 2013) e, posteriormente, o alinhamento foi avaliado e refinado manualmente.

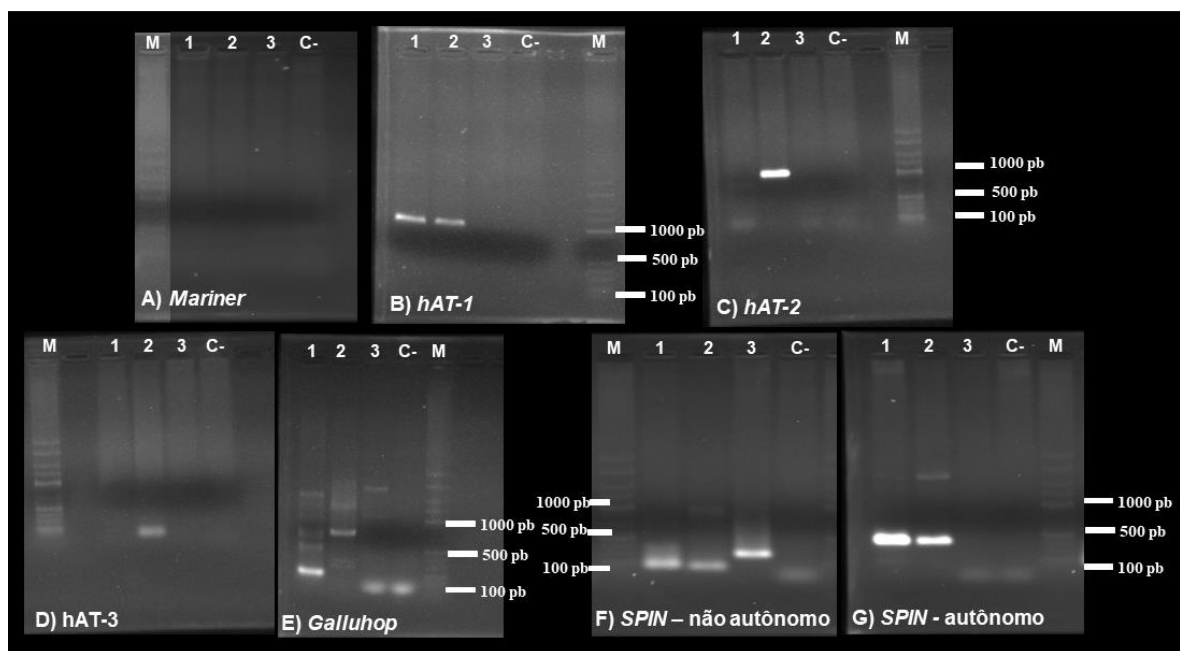
A partir das respectivas sequências, foram realizadas análises evolutivas filogenéticas e moleculares usando o software MEGA versão 11 (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021). As sequências alinhadas foram carregadas no programa e agrupadas em nível de espécie, para que seja possível calcular a distância  $p$  entre os grupos. Com isso, o programa obteve os melhores parâmetros (distância evolutiva) para a montagem da filogenia (Tamura-3-parameter). Após estas etapas, a árvore foi construída usando o método Neighbor-Joining. A árvore de consenso bootstrap inferida a partir de 1000 réplicas foi utilizada para representar a história evolutiva dos táxons analisados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Screening de TEs por PCR

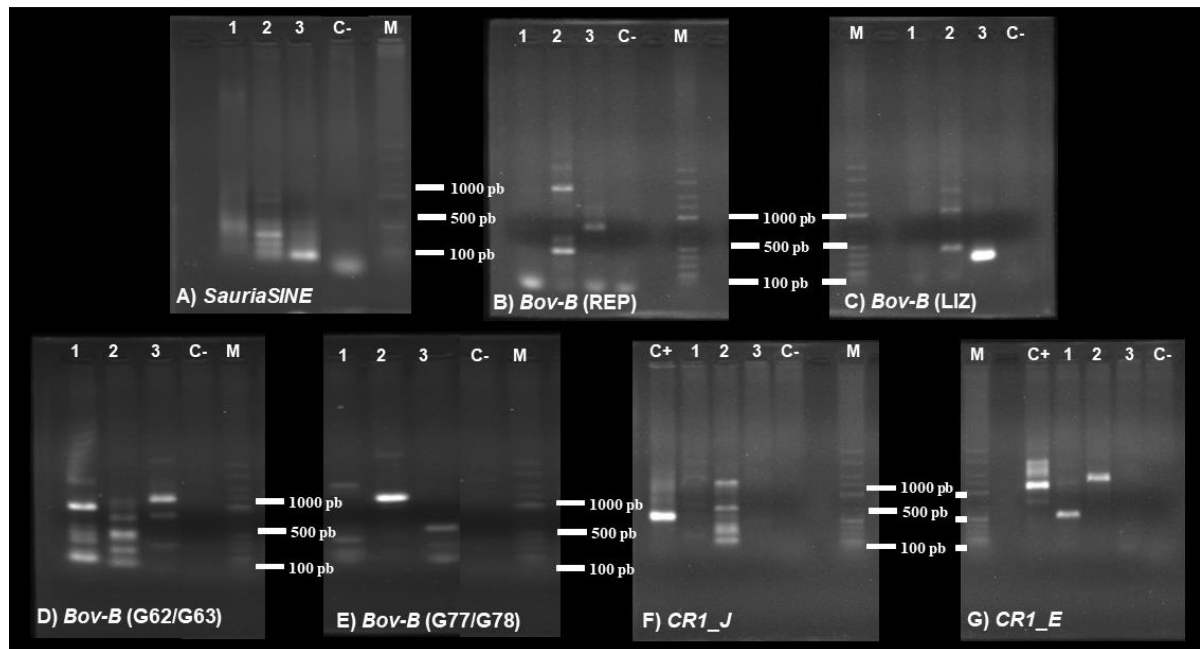
Por meio da técnica de PCR, utilizando-se 14 conjuntos de primers específicos para TEs, que representam um total de 8 famílias de elementos, foi possível detectar a amplificação em 12 dos 14 fragmentos esperados, na espécie alvo desse estudo - *H. uruguayensis* (Figura 7; Figura 8 e Tabela 1).

**Figura 7:** Detecção dos Transposons de DNA analisados, por PCR. As letras correspondem aos elementos: A- *Mariner*; B- *hAT-1*; C- *hAT-2*; D- *hAT-3*; E- *Galluhop*; F- *SPIN* não - autônomo; G- *SPIN* - autônomo. Enquanto os números são as espécies: 1- *S. merianae*, 2- *H. uruguayensis*, 3- *H. mabouia*. C-: controle negativo; M: Ladder: marcador de tamanho molecular (DNA ladder 100pb) - fabricado pela empresa Quadro G P&D Ltda.



Fonte: Autor (2022).

**Figura 8:** Detecção dos Retrotransposon analisados, por PCR. As letras correspondem aos elementos: A- *SauriaSINE*; B- *Bov-B* (REP); C- *Bov-B* (LIZ); D- *Bov-B* (G62/G63); E- *Bov-B* (G77/G78); F- *CR1-J*; G- *CR1-E*. Enquanto os números são as espécies: 1- *S. merianae*, 2- *H. uruguayensis*, 3- *H. mabouia*. Controle positivo (C+): *Veniliornes spilogaster*; C-: controle negativo; M: Ladder: marcador de tamanho molecular (DNA ladder 100pb) - fabricado pela empresa Quadro G P&D Ltda.



Fonte: Autor (2022).

Dentre esses elementos analisados da Classe I e Classe II os elementos *Mariner* e *hAT-3* não apresentaram amplificação, sendo assim considerados potencialmente ausentes nos genomas. Outros elementos, como *hAT-1*, *hAT-2*, *Galluhop*, *SPIN* não-autônomo, *SPIN* - autônomo, *SauriaSINE*, *Bov-B* (REP), *Bov-B* (LIZ), *Bov-B* (G62/G63), *CR1-J* e *CR1-E*, apresentaram bandas de tamanho esperado e ou bandas adicionais de tamanhos maiores ou menores, sendo considerados como presentes no genoma (Tabela 1; Figura 7 e Figura 8).



**Tabela 1:** Distribuição de elementos transponíveis em três espécies de Squamata. Presença (+) e Ausência (-).

Espécies	<i>Homonota uruguayensis</i>	<i>Salvator merianae</i>	<i>Hemidactylus mabouia</i>
<b>Elementos Transponíveis</b>			
<b>Transposons de DNA</b>			
<i>Mariner</i>	-	-	-
<i>hAT-1(Ac)</i>	+	+	-
<i>hAT-2(Ac)</i>	+	-	-
<i>hAT-3(Ac)</i>	-	-	-
<i>Galluhop</i>	+	+	-
<i>SPIN</i> não – autônomo	+	+	+
<i>SPIN</i> - autônomo	+	+	-
<b>Retrotransposons</b>			
<i>SauriaSINE</i>	+	-	+
<i>Bov – B (REP)</i>	+	-	+
<i>Bov – B (LIZ)</i>	+	-	+
<i>Bov – B (G62/G63)</i>	+	+	+
<i>Bov – B (G77/G78)</i>	+	+	+
<i>CR1-J</i>	+	-	-
<i>CR1-E</i>	+	+	-

Fonte: Autor (2022).

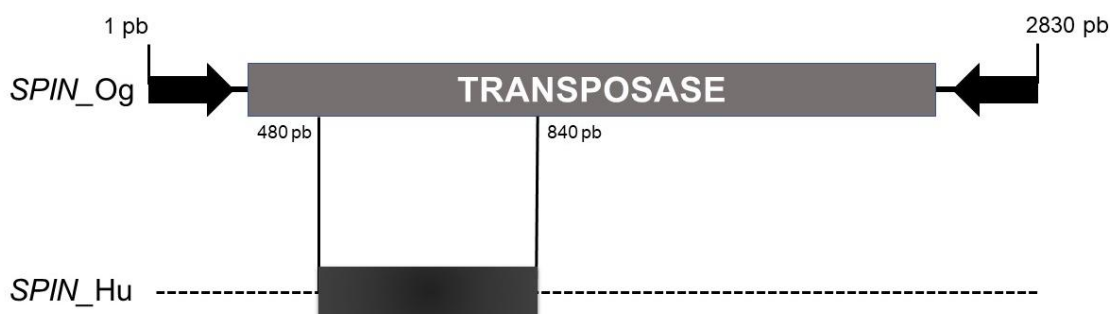
A presença de elementos transponíveis nos genomas das espécies *S. merianae* e *H. mabouia* só foi investigada pela técnica de PCR. O lagarto *S. merianae* apresentou a metade dos 14 elementos transponíveis estudados: *hAT-1*, *Galluhop*, *SPIN* não-autônomo, *SPIN* - autônomo, *Bov-B (G62/G63)*, *Bov-B (G77/G78)*, *CR1-E* (Tabela 1; Figura 7 e Figura 8).

Para a lagartixa *H. mabouia*, houve a confirmação da ocorrência de seis dos elementos transponíveis investigados. Os elementos detectados no genoma, foram *SPIN* não-autônomo, *SauriaSINE*, *Bov-B1 (REP)*, *Bov-B2 (LIZ)*, *Bov-B (G62/G63)* e *Bov-B (G77/G78)* (Tabela 1; Figura 7 e Figura 8).

## 4.2 *SPIN* autônomo

Dentre os TEs detectados, o fragmento amplificado de tamanho esperado, de aproximadamente 400 pb do elemento *SPIN* autônomo (*SPACE INVADERS*) de *H. uruguayensis* (GILBERT *et al.*, 2012) foi purificado da banda do gel de agorose 1% e enviado para sequenciamento. A sequência obtida resultou em uma leitura com qualidade de aproximadamente 360 pb, então denominada de *SPIN*\_Hu. Para a confirmação do elemento, foi feita uma busca por similaridade no banco de dados Repbase, onde demonstrou alta similaridade com o elemento *SPIN*\_Og (98% de similaridade), descrito por PACE *et al.*, (2008). O *SPIN*\_Hu fica alinhado com o começo da região da transposase do *SPIN*\_Og (Figura 9).

**Figura 9:** Alinhamento do *SPIN*\_Og com o *SPIN*\_Hu. O alinhamento começa em 480 pb e termina em 840 pb, pegando somente o início da região da transposase de *SPIN*\_Og.



Fonte: Autor (2022).

Após a confirmação do elemento, foi realizada uma busca de todos os transposons *SPINS* – autônomos disponíveis na literatura (PACE *et al.*, 2008; GILBERT *et al.*, 2012), os transposons encontrados foram: *SPIN*\_Md: *Monodelphis domestica*; *SPIN*\_Xt: *Xenopus tropicalis*; *SPIN*\_Ml: *Myotis lucifugus*; *SPIN*\_Og: *Otolemur garnettii*; *SPIN*\_Et: *Echinops telfairi* e um elemento *SPIN* consenso (*SPIN*\_super\_consenso).

Com a busca das sequências, foi avaliado as distâncias *p* calculadas entre essas sequências *SPINs* (Tabela 2). Com base nos resultados, foi realizado uma análise filogenética entre as sequências *SPINs* disponíveis, incluindo o a sequência de *SPIN*\_Hu de *H. uruguayensis*, possibilitando investigar a relação filogenética dos mesmos (Figura 10). Esta análise demonstrou que a sequência avaliada de *SPIN*\_Hu tem maior relação com a sequência *SPIN*\_Md.

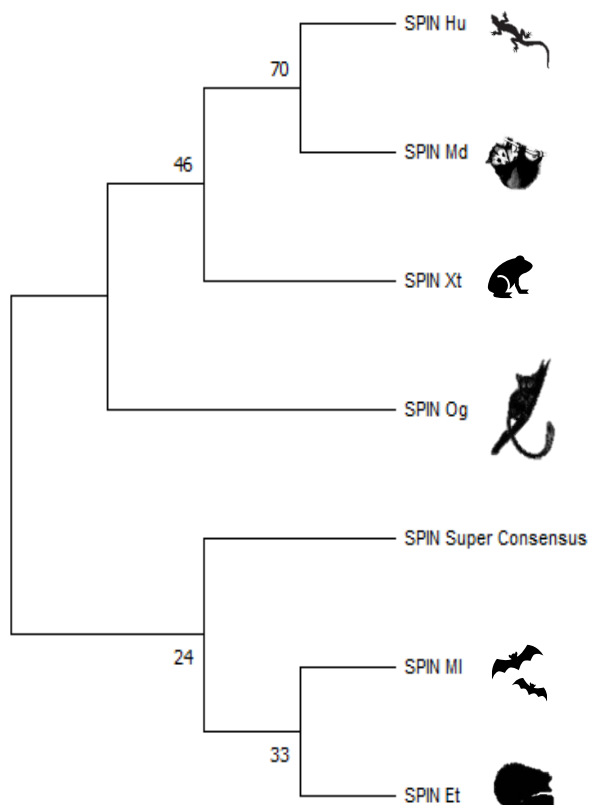
**Tabela 2:** Matriz das distâncias  $p$  entre as seqüências *SPINs* descrita nos vertebrados.

	<i>SPIN_Hu</i>	<i>SPIN_Og</i>	<i>SPIN_Sc</i>	<i>SPIN_MI</i>	<i>SPIN_Et</i>	<i>SPIN_Xt</i>	<i>SPIN_Md</i>
<i>SPIN_Hu</i>	-						
<i>SPIN_Og</i>	0,011268	-					
<i>SPIN_Sc</i>	0,011268	0,000000	-				
<i>SPIN_MI</i>	0,016854	0,002809	0,002809	-			
<i>SPIN_Et</i>	0,016854	0,002809	0,002809	0,005602	-		
<i>SPIN_Xt</i>	0,031161	0,022663	0,022663	0,025424	0,025424	-	
<i>SPIN_Md</i>	0,102564	0,100000	0,100000	0,099715	0,105413	0,117816	-

Fonte: Autor (2022).

**Figura 10:** Relação filogenética entre os elementos *SPINs*. A árvore foi construída usando o método Neighbor-Joining. A árvore de consenso bootstrap inferida a partir de 1000 réplicas é utilizada para representar a história evolutiva dos táxons analisados. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostrados ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-3-parameter. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA11.

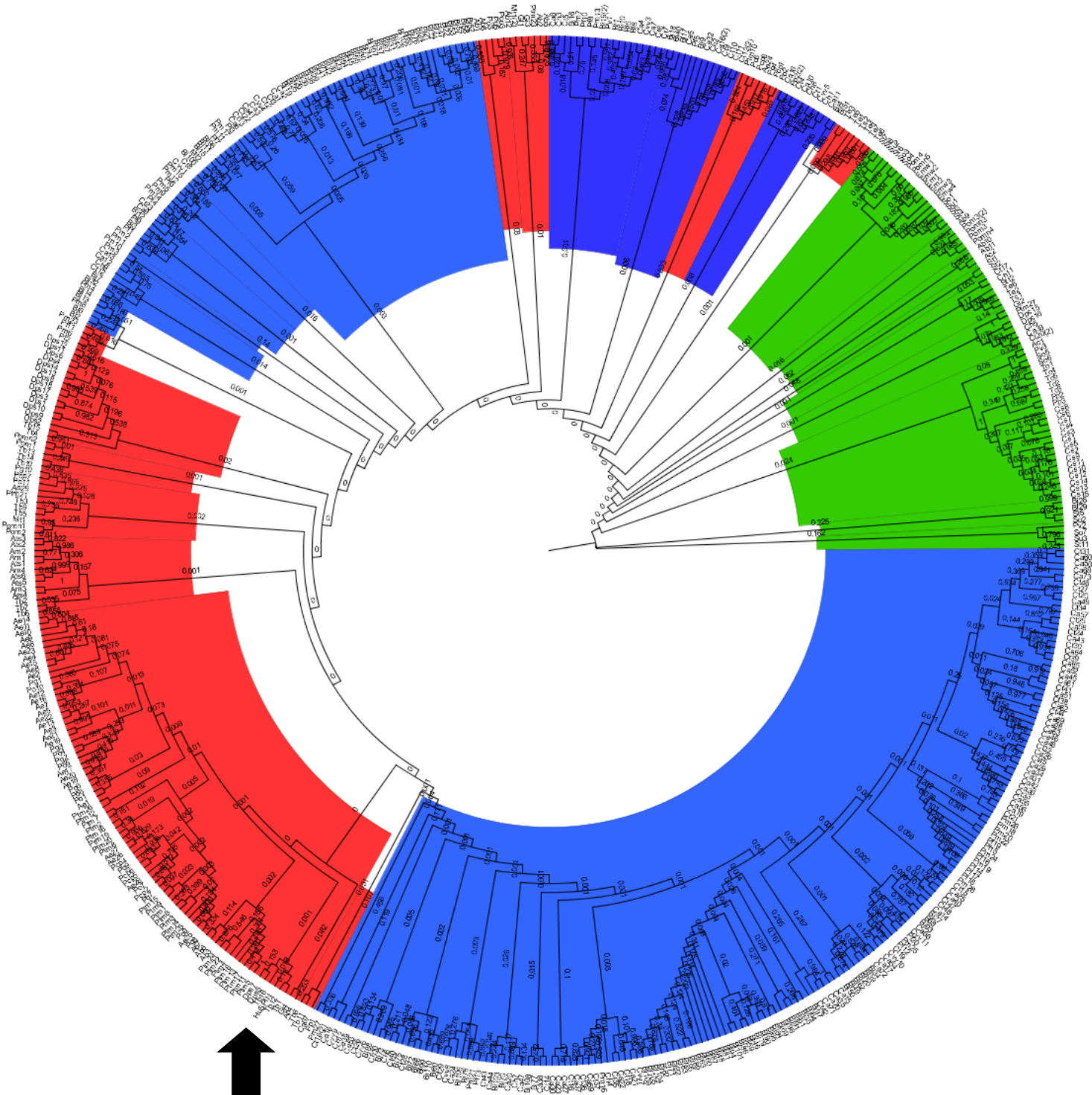
Hu: *Homonota urugauensis*; Md: *Monodelphis domestica*; Xt: *Xenopus tropicalis*; MI: *Myotis lucifugus*; Og: *Otolemur garnettii*; Et: *Echinops telfairi*; *SPIN\_Super\_Consensus*: Transposon *SPIN* completo.



Fonte: Autor (2022).

Com a confirmação do elemento *SPIN*<sub>Hu</sub> e a sua relação filogenética com os elementos do mesmo grupo, foi realizada uma busca por similaridade no banco de dados GenBank dentro da Ordem Squamata. Seguindo a regra 80-80-80 proposta por WICKER *et al.*, (2007), de que as sequências devem apresentar pelo menos 80% de similaridade em pelo menos 80% de cobertura da sequência e ter um tamanho mínimo de 80 pb para serem consideradas da mesma família, foram encontradas um total de 529 sequências, que se encaixava nesta regra (similaridades de 80% a 98%). Essas sequências estão distribuídas em 33 espécies de Squamata, sendo 18 espécies de serpentes - *Anilius bituberculatus*, *Arizona elegans*, *Bothrops jararaca*, *Crotalus adamanteus*, *Crotalus horridus*, *Crotalus tigris*, *Crotalus viridis viridis*, *Diadophis punctatus similis*, *Pantherophis guttatus*, *Pantherophis obsoletus*, *Protobothrops flavoviridis*, *Protobothrops mucrosquamatus*, *Ptyas mucosa*, *Pituophis catenifer pumilus*, *Thamnophis elegans*, *Myanophis thanlyinensis*, *Thermophis bailey* e *Thamnophis sirtali*; e 15 espécies de lagartos - *Anolis carolinensis*, *Sceloporus occidentalis*, *Aspidoscelis tigris*, *Gekko japonicus*, *Elgaria multicarinata webbiai*, *Sphaerodactylus townsendi*, *Podarcis muralis*, *Podarcis muralis nigriventris*, *Sceloporus undulatus*, *Paroedura picta*, *Phrynosoma platyrhinos*, *Tretioscincus oriximinensis*, *Aspidoscelis marmoratus*, *Phrynocephalus versicolor* e *Calyptommatus sinebrachiatus*. Com base nas análises filogenéticas, percebe-se que o elemento *SPIN* isolado de *H. Uruguayensis* possui agrupamento com duas espécies de serpentes (*D. punctatus similis* e *T. bailey*), demonstrando assim, ter maior relação com as serpentes do que com o seu próprio grupo de lagartos (Figura 11).

Figura 11: Relações filogenéticas entre os Squamata. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostrados acima dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-3-parameter e estão nas unidades do número de substituições de bases por sítio. A variação da taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). Esta análise envolveu 530 sequências de nucleótidos. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA11. As 530 sequências são representadas por 34 espécies, sendo elas - **Tb**: *Thermophis bailey*; **Pm**: *Protobothrops mucrosquamatus*; **Pf**: *Protobothrops flavoviridis*; **Gj**: *Gekko japonicus*; **Bj**: *Bothrops jararaca*; **Ca**: *Crotalus adamanteus*; **Ae**: *Arizona elegans*; **Cvv**: *Crotalus viridis viridis*; **Ab**: *Anilius bituberculatus*; **Ptm**: *Ptyas mucosa*; **Ct**: *Crotalus tigris*; **Pg**: *Pantherophis guttatus*; **Dps**: *Diadophis punctatus similis*; **Emw/Em**: *Elgaria multicarinata webbiai*; **Po**: *Pantherophis obsoletus*; **Ch**: *Crotalus horridus*; **Pcp**: *Pituophis catenifer pumilus*; **St**: *Sphaerodactylus townsendi*; **Pom**: *Podarcis muralis*; **Pomn**: *Podarcis muralis nigriventris*; **Mt**: *Myanophis thanlyinensis*; **Su**: *Sceloporus undulatus*; **Ac**: *Anolis carolinensis*; **Te**: *Thamnophis elegans*; **So**: *Sceloporus occidentalis*; **Ts**: *Thamnophis sirtalis*; **Ats**: *Aspidoscelis tigris*; **Pv**: *Phrynocephalus versicolor*; **Am**: *Aspidoscelis marmoratus*; **Cs**: *Calyptommatus sinebrachiatus*; **Pp1/Pp2(2)**: *Paroedura picta*; **Pp2/Pp3**: *Phrynosoma platyrhinos*; **To**: *Tretioscincus oriximinensis*; **HuSPIN**: *Homonota uruguayensis*. A seta indica a posição do *SPIN*<sub>Hu</sub>.



↑  
SPIN\_Hu

6.0

Azul: Viperidae; Vermelho: Colubridae; Verde: Lagarto.

Fonte: Autor (2022).

Para outros grupos de invertebrados e vertebrados, só foi verificado o grau de similaridade entre as sequências depositadas no banco de dados com a sequências do elemento *SPIN\_Hu*. Dentre os invertebrados, somente quatro grupos apresentaram semelhança com o elemento - **1**) Cnidários: *Hydra vulgaris* (87%), *Hydra veridissima* (87%), *Henneguya salminicola* (80%), *Myxobolus squamalis* (80%) e *Thelohanellus kitauei* (80%); **2**) Platelminetos: *Trichobilharzia regenti* (91%) e *Schmidtea mediterrânea* (80%); **3**) Moluscos: *Radix auricularia* (94%), *Lymnaea stagnalis* (93%), *Arion vulgaris* (92%) e *Ampullaceana balthica* (91%); e **4**) Insetos: *Rhodnius prolixus*, *Laupala kohalensi*, *Ladona fulva* e *Apteronomobius asahinai* apresentaram em torno de 88% de similaridade.

Nos vertebrados, além dos Squamata, outros cinco grupos apresentaram similaridade com o elemento *SPIN\_Hu* - **1**) Peixes teleosteos: *Erpetoichthys calabaricus* (98%), *Paramormyrops kingsleyae* (98%), *Stomatorhinus ivindoensis* (90%), *Polypterus senegalus* (97%) e *Corydoras maculifer* (87%); **2**) Anfíbios: *Limnodynastes dumerilii* (96%), *Pipa carvalhoi* (95%), *Xenopus borealis* (95%), *Xenopus tropicalis* (95%) e *Geotrypetes seraphini* (95%). Para os sauropsídeos existentes, além dos Squamata, apenas os **(3)** testudines apresentaram similaridade com o elemento *SPIN\_Hu*, onde as espécies *Mesoclemmys tuberculata*, *Chelydra serpentina* e *Dermatemys mawii* apresentaram 90% de similaridade. Nos mamíferos, dentre os três grupos, somente os **(4)** marsupiais e **(5)** eutérios apresentaram espécies com alta similaridade. Para os marsupiais, apenas a espécie *Monodelphis domestica* com 89% de similaridade. Nos eutérios, as espécies *Tadarida brasiliensis* (97%), *Myotis lucifugos* (97%), *Molossus molossus* (97%), *Hipposideros pendleburyi* (96%) e *Loris tardigradus* (97%) foram as que apresentaram maiores similaridades.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo traz os primeiros dados em relação à diversidade de elementos transponíveis na espécie *H. uruguayensis*. Com a análise dos 14 TEs alvos do estudo, 12 foram detectados pela PCR, sendo cinco Transposons de DNA e sete Retrotransposons, mais que nas espécies *S. merianae* e *H. mabouia*, no qual apresentaram menos de 10 ampliações pela PCR. Nota-se a amplificação de todos os retrotransposons alvo, o que é comum nos Squamata, onde apresentam uma maior diversidade de elementos da Classe I (ALFOLDI *et al.*, 2011; CASTOE *et al.*, 2011; ROSCITO *et al.*, 2018).

Partindo para a análise dos TEs amplificados apenas em *H. uruguayensis*, em relação aos Transposons de DNA foram detectados elementos das superfamílias *TC1/mariner* e *hAT* (*hobo/Activator/Tam3*), descritas para os répteis e outros vertebrados (SOTERO-CAIO *et al.*, 2016). Embora o elemento *mariner* canônico não tenha sido detectado, outro elemento desta superfamília mostrou amplificação, juntamente com *S. merianae*. O elemento *galluhop* pertencente à família *mariner*, foi originalmente descrito a partir do genoma de *Gallus gallus* (HILLIER *et al.*, 2004) e encontrado por Bertocchi *et al.*, (2017) em apenas outros 5 genomas de aves, dentre 72 genomas analisados. Ainda, os autores evidenciam um dos poucos casos de transferência horizontal dentro da classe Aves envolvendo esse elemento, bem como os descrevem em uma nova subfamília de *mariner*, específica de aves. Portanto, a detecção desse possível MITE *galluhop* no genoma de Squamata amplia a distribuição do elemento e abre perspectivas interessantes para sua análise mais detalhada nessas espécies.

Com relação aos elementos da superfamília *hAT*, o elemento *hAT-1*, um membro da família *Ac*, foi detectado em *H. uruguayensis* e *S. merianae*. Esse resultado vai de encontro ao observado por Novick *et al.*, (2010), que identificou o elemento no genoma do lagarto verde *Anolis carolinensis*; porém, surpreendentemente, em apenas outras duas espécies de mamíferos (marsupial e morcego), numa análise em 40 genomas de animais vertebrados e invertebrados. O elemento *hAT-2*, outro membro da família *Ac*, foi detectado somente em *H. uruguayensis*. Contudo, Novick *et al.*, (2010), demonstraram uma distribuição mais ampla do elemento, tanto em invertebrados como vertebrados, sendo mais representados pelos vertebrados, no qual oito genomas de 40 analisados (20%), apresentaram o elemento *hAT-2* (mamífero, Squamata e anfíbios).

Outros elementos da superfamília *hAT* - os *SPINs* - foram amplificados tanto nas suas versões autônomas (em *H. uruguayensis* e *S. merianae*) quanto não-autônomas (*H. uruguayensis*, *S. merianae* e *H. mabouia*), confirmando a ampla distribuição do elemento nos

vertebrados. A partir do sequenciamento do produto amplificado purificado de *SPIN* autônomo de *H. uruguayensis*, foi possível uma análise mais detalhada desta sequência nesta espécie. A leitura com qualidade revelou uma sequência de aproximadamente 360 pb que apresenta alta similaridade com os transposons da mesma família descritos anteriormente (PACE *et al.*, 2008) sendo, portanto, denominada de *SPIN\_Hu*.

A figura 10, demonstra a árvore filogenética dos transposons da família *SPIN*, em comparação com a sequência obtida no estudo. As sete sequências *SPINs* apresentaram alta similaridade com o *SPIN\_Hu*, principalmente o *SPIN\_Md* com o qual formou agrupamento. Porém, destaca-se que esses elementos são detectados em espécies de mamíferos e anfíbios, espécies distantes filogeneticamente. Possivelmente, ambas as espécies apresentaram a inserção do elemento em períodos muito próximos, indicando assim, um caso de transferência horizontal. O mesmo caso foi documentado por PACE *et al.*, (2008), onde diferentes linhagens de tetrápodes apresentaram sequências *SPINs* muito similares uma das outras, os autores sugerem que houve uma explosão de inserção do elemento nos tetrápodes em períodos muito próximos, e como os Transposons de DNA apresentam uma característica típica, que é a taxa de substituição lenta, impedindo assim, que ocorra diferenças significativas do elemento nesses grupos de animais.

A superfamília *hAT*, da qual o *SPIN* faz parte, caracteriza-se por possuir elementos capazes de se inserir em genomas de espécies distantes filogeneticamente, por não haver uma grande barreira que os impeçam disso. Novick *et al.*, (2010), sugere que alguns genomas são mais suscetíveis a HT, porque não apresentam mecanismos de defesa ou não desenvolveram mecanismos para tolerar o seu impacto. Outros estudos também fortalecem essa hipótese, pois a maioria das mutações provocadas por Transposons de DNA são neutras, o que possibilita essa tolerância do genoma do hospedeiro (YOSHIYAMA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2004).

Tendo em vista, essa característica típica de um Transposon de DNA, fica claro a filogenia entre apenas as espécies de Squamata, no qual apresenta várias sequências similares ao *SPIN\_Hu*. Os agrupamentos de diferentes espécies, indica que houve diferentes tempo de amplificação do elemento nesse grupo, e possivelmente o elemento tenha se inserido por HT nas mesmas espécies mais de uma vez. Corroborando, com o trabalho de Gilbert *et al.*, (2012), onde demonstrou, com base em seus resultados, 13 eventos de transferência independentes do elemento *SPIN* durante a evolução do Squamata.

Percebe-se, que as serpentes da família Viperidae em sua maior parte apresentam agrupamento na filogenia exclusivos para espécies da família, o que teoricamente possibilita



que a transferência horizontal tenha ocorrido no ancestral comum dessas espécies. O mesmo foi documentado por Gilbert *et al.*, (2012), onde três espécies de serpentes da família Viperidae ficaram agrupadas na filogenia, fortalecendo a ideia que a cópia do elemento *SPIN* tenha sido transferida horizontalmente ao ancestral comum destas espécies. A outra hipótese levantada, sugere que essa cópia do elemento acabou transferido em um período muito próximo da divergência das espécies, sendo assim, as cópias do elemento não apresentariam diferença abrupta em suas sequências. O mesmo ocorre com os lagartos e serpentes (Colubridae) onde a maioria dos agrupamentos são exclusivo para estas espécies. Possivelmente, o que foi observado nas espécies de Viperidae, tenha ocorrido também nestes grupos de Squamata.

Observa-se, que o transposon *SPIN\_Hu* apresenta maior similaridade com espécies de serpentes da família colubridae. Lembrando, que o *SPIN\_Hu* foi isolado de uma lagartixa, e quando analisamos a árvore filogenética das sequências dos Squamata, percebemos que quando ocorre agrupamento entre serpentes e lagartos, na maioria dos casos, são entre lagartixas e serpentes, como foi o caso das espécies de lagartixa, *G. jabonicus*, *P. muralis*, *P. muralis nigriventris* e *P. picta* que se agruparam com espécies de serpentes de ambas famílias. Em raras exceções, a espécie de lagarto *P. versicolor* teve agrupamento com serpentes da família Viperidae (*C. adamanteus*, *P. mucrosquamatus* e *B. jararaca*). Provavelmente, o tempo de amplificação do elemento teria sido mais tardio em indivíduos desta espécie, ou um evento de TH em períodos mais recentes. Ponderando, que serpentes apresentam taxa de invasão por TEs em seu genoma mais recentes do que em lagarto (CASTOE *et al.*, 2011; YIN *et al.*, 2016; PERRY *et al.*, 2018).

Outra hipótese sugerida, foi com base na sobreposição dos períodos de isolamento do ancestral de serpentes e do ancestral de Homonota na América do Sul. A pesquisa realizada por Morando *et al.*, (2014), demonstrou que o gênero Homonota é dividido em três grupos, borellii, fasciata e whitii. O grupo *H\_borellii*, devido às transgressões marinhas ocorridas no final do Mioceno (5 – 10 milhões de anos) poderia ter isolado o seu ancestral nos pampas Uruguaios, em qual é hoje a área de distribuição de *H. uruguayensis*, que mais tarde, colonizou as áreas do RS. Em contrapartida, se analisarmos o período de colonização do Continente Americano pelas serpentes da família Colubridae e Viperidae, também ocorreu no período Mioceno (10 – 23 milhões de anos) (WÜSTER *et al.*, 2002), possibilitando a HT do elemento *SPIN\_Hu* entre os ancestrais das serpentes e do Homonota.

Por último, o *SPIN\_Hu* não demonstrou ter alto nível de similaridade somente com os Squamata. Pela busca de dados no Genbank, foram encontradas tanto espécies de invertebrados como de vertebrados, com níveis de similaridade acima de 90%. Nos vertebrados, tantos os peixes

como os mamíferos apresentaram espécies com similaridade acima de 97% com a sequência *SPIN\_Hu*, sendo que a maioria dos mamíferos encontrados são morcegos, espécies que apresentam grande contaminação por vírus, que por sua vez, podem ser intermediários para transferência de TEs para outras espécies. Por fim, com base nesses resultados, espécies que apresentaram alta similaridade com o *SPIN\_Hu*, provavelmente apresentam o mesmo em seus genomas, ampliando assim, a distribuição deste elemento nos eucariotos.

Com isso, destaca-se que relatos de HT são escassos em eucariotos comparados com os procariotos, e a maioria dos casos envolvendo os eucariotos são com espécies intimamente relacionadas, como foi relatado em insetos, onde ocorre a transferência de um elemento *Mariner* presente na mariposa, para o seu parasita (larva de vespa) (YOSHIYAMA *et al.*, 2001). Um outro caso, nos vertebrados, foi relatado entre serpentes e camundongos, onde um vírus que possui como hospedeiro ambas as espécies, foi intermediário para HT de um retrotransposon presente na serpente, para o camundongo (PISKUREK & OKADA, 2017).

Em conclusão, os elementos transponíveis apresentam uma diversidade surpreendente em diferentes grupos de eucariotos, e a sua evolução geralmente demonstra padrões complexos, com sequências muito similares umas as outras, e principalmente a distribuição irregular entre os grupos de eucariotos, o que caracteriza à um evento de transferência horizontal.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos, fica clara a importância dos estudos de elementos transponíveis nos diversos grupos eucarióticos, para compreender a diversidade que os mesmos possuem nos genomas, principalmente em espécies pouco estudadas, visto que tais espécies podem esconder uma fonte rica de informações pouco explorada.

Por se tratar de uma espécie endêmica do Bioma Pampa, que apresenta poucos estudos genômicos, a lagartixa *H. uruguayensis* demonstrou ter uma diversidade surpreendente de elementos transponíveis revelando, inclusive, a presença de um elemento possivelmente envolvido em transferência horizontal.

## 7 PERSPECTIVAS

- Analisar mais detalhadamente o elemento *SPIN*\_Hu:
  - aumentar o tamanho do produto amplificado por meio de *primers* para TIRs (por exemplo);
  - análises de integridade, funcionalidade, etc;
  - analisar as demais populações de *H. uruguayensis*.
- Analisar *SPIN* não autônomo (MITE) de *H. uruguayensis*;
- Analisar sequências de *hAT-1* disponível.

## REFERÊNCIAS

- ALFÖLDI, J., DI PALMA, F.; GRABHERR, M.; WILLIAMS, C.; KONG, L.; MAUCELI, E.; *et al.* **The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals.** *Nature*, v. 477, n. 7366, p. 587-591, 2011;
- BAO, W.; KOJIMA, K. K.; KOHANY, O. **Rebase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes.** *Mobile DNA*, v. 6, p. 11, 2015;
- BARRÓN, M. G.; FISTON-LAVIER, A. S.; PETROV, D. A.; GONZÁLEZ, J. **Population genomics of transposable elements in *Drosophila*.** *Annual review of genetics*, v. 48, p. 561-581, 2014;
- BERTOCCHI, N. A.; DE OLIVEIRA, T. D.; DEL VALLE GARNERO, A.; COAN, R. L. B.; GUNSKI, R. J.; MARTINS, C.; TORRES, F. P. **Distribution of CR1-like transposable element in woodpeckers (Aves Piciformes): Z sex chromosomes can act as a refuge for transposable elements.** *Chromosome Research*, v. 26, n. 4, p. 333-343, 2018;
- BERTOCCHI, N. A.; TORRES, F. P.; GARNERO, A. D. V.; GUNSKI, R. J.; WALLAU, G. L. **Evolutionary history of the mariner element galluhop in avian genomes.** *Mobile DNA*, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2017;
- BOISSINOT, S.; BOURGEOIS, Y.; MANTHEY, J. D.; RUGGIERO, R. P. **The mobilome of reptiles: Evolution, structure, and function.** *Cytogenetic and genome research*, v. 157, n. 1-2, p. 21-33, 2019;
- BURNS, K. H. **Our conflict with transposable elements and its implications for human disease.** *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 15, p. 51-70, 2020;
- CARARETO, C. M. A., MONTEIRO-VITORELLO, C. B., and SLUYS, M. A. V., orgs. **Elementos de transposição: diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos [online].** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2015. ISBN: 978-85-7541-567-2;
- CASTOE, T. A.; DE KONING, A. J.; HALL, K. T.; CARD, D. C.; SCHIELD, D. R.; FUJITA, M. K. *et al.* **The Burmese python genome reveals the molecular basis for**

**extreme adaptation in snakes.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 110, n. 51, p. 20645-20650, 2013;

CASTOE, T. A.; HALL, K. T.; GUIBOTSY MBOULAS, M. L.; GU, W.; DE KONING, A. P.; FOX, S. E. *et al.* **Discovery of highly divergent repeat landscapes in snake genomes using high-throughput sequencing.** Genome Biology and Evolution, v. 3, p. 641-653, 2011;

ETCHEGARAY, E.; NAVILLE, M.; VOLFF, J. N.; HAFTEK-TERREAU, Z. *et al.* **Transposable element-derived sequences in vertebrate development.** Mobile DNA, v. 12, n. 1, p. 1-24, 2021;

FELAPPI, J. F.; VIEIRA, R. C.; FAGUNDES, N. J.; VERRASTRO, L. V. *et al.* **So far away, yet so close: strong genetic structure in *Homonota uruguayensis* (Squamata, Phyllodactylidae), a species with restricted geographic distribution in the Brazilian and Uruguayan pampas.** PLoS One, v. 10, n. 2, p. e0118162, 2015;

FROST, B.; HEMBERG, M.; LEWIS, J.; FEANY, M. B. **Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation.** Nature neuroscience, v. 17, n. 3, p. 357-366, 2014;

GILBERT, C.; HERNANDEZ, S. S.; FLORES-BENABIB, J.; SMITH, E. N.; FESCHOTTE, C. **Rampant horizontal transfer of SPIN transposons in squamate reptiles.** Molecular biology and evolution, v. 29, n. 2, p. 503-515, 2012;

GREEN, R. E.; E., BRAUN, E. L.; ARMSTRONG, J.; EARL, D.; NGUYEN, N.; HICKEY, G. *et al.* **Three crocodylian genomes reveal ancestral patterns of evolution among archosaurs.** Science, v. 346, n. 6215, p. 1254449, 2014;

GUO, C.; JEONG, H. H.; HSIEH, Y. C.; KLEIN, H. U.; BENNETT, D. A.; DE JAGER, P. L. *et al.* **Tau activates transposable elements in Alzheimer's disease.** Cell reports, v. 23, n. 10, p. 2874-2880, 2018;

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** In: Nucleic acids symposium series. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98;

HELLSTEN, U.; HARLAND, R. M.; GILCHRIST, M. J.; HENDRIX, D.; JURKA, J.; KAPITONOV, V. **The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*.** Science, v. 328, n. 5978, p. 633-636, 2010;

HOWE, K.; CLARK, M. D.; TORROJA, C. F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; *et al.* **The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.** *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013;

INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM *et al.* **Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution.** *Nature*, v. 432, n. 7018, p. 695-716, 2004;

JANG, H. S.; SHAH, N. M.; DU, A. Y.; DAILEY, Z. Z.; PEHRSSON, E. C.; GODOY, P. M.; *et al.* **Transposable elements drive widespread expression of oncogenes in human cancers.** *Nature genetics*, v. 51, n. 4, p. 611-617, 2019;

JANGAM, D.; FESCHOTTE, C.; BETRÁN, E. **Transposable element domestication as an adaptation to evolutionary conflicts.** *Trends in Genetics*, v. 33, n. 11, p. 817-831, 2017;

KAJIKAWA, M.; OHSHIMA, K.; OKADA, N. **Determination of the entire sequence of turtle CR1: the first open reading frame of the turtle CR1 element encodes a protein with a novel zinc finger motif.** *Molecular biology and evolution*, v. 14, n. 12, p. 1206-1217, 1997;

KAPUSTA, A.; SUH, A. **Evolution of bird genomes—a transposon's-eye view.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1389, n. 1, p. 164-185, 2017;

KORDIS, D. **Transposable elements in reptilian and avian (sauropsida) genomes.** *Cytogenetic and genome research*, v. 127, n. 2-4, p. 94-111, 2009;

KORDIS, D.; GUBENSEK, F. **Unusual horizontal transfer of a long interspersed nuclear element between distant vertebrate classes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 18, p. 10704-10709, 1998;

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C.; BALDWIN, J.; *et al.* **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature*, 2001;

LARICCHIA, K. M.; ZDRALJEVIC, S.; COOK, D. E.; ANDERSEN, E. C. **Natural variation in the distribution and abundance of transposable elements across the *Caenorhabditis elegans* species.** *Molecular biology and evolution*, v. 34, n. 9, p. 2187-2202, 2017;

LIN, R.; DING, L.; CASOLA, C.; RIPOLL, D. R.; FESCHOTTE, C.; WANG, H. **Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in Arabidopsis**. *Science*, v. 318, n. 5854, p. 1302-1305, 2007;

LIU, Y.; MA, M.; LI, G.; YUAN, L.; XIE, Y.; WEI, H.; *et al.* **Transcription factors FHY3 and FAR1 regulate light-induced CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 gene expression in Arabidopsis**. *The Plant Cell*, v. 32, n. 5, p. 1464-1478, 2020;

LOCKTON, S.; GAUT, B. S. **The evolution of transposable elements in natural populations of self-fertilizing Arabidopsis thaliana and its outcrossing relative Arabidopsis lyrata**. *BMC Evolutionary Biology*, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2010;

MCCLINTOCK, B. **Cytogenetic studies of maize and Neurospora**. *Carnegie Inst Washington Year Book*, v. 46, p. 146-152, 1947;

MCGURK, M. P.; DION-CÔTÉ, A.; BARBASH, D. A. **Rapid evolution at the Drosophila telomere: transposable element dynamics at an intrinsically unstable locus**. *Genetics*, v. 217, n. 2, p. iyaa027, 2021;

NICOLAU, M.; PICAULT, N.; MOISSIARD, G. **The Evolutionary Volte-Face of Transposable Elements: From Harmful Jumping Genes to Major Drivers of Genetic Innovation**. *Cells*, v. 10, n. 11, p. 2952, 2021;

NOVICK, P.; SMITH, J.; RAY, D.; BOISSINOT, S. **Independent and parallel lateral transfer of DNA transposons in tetrapod genomes**. *Gene*, v. 449, n. 1-2, p. 85-94, 2010.

NUNES, V. A. **Dieta e estratégia alimentar de Homonota uruguayensis Vaz-Ferreira e Sierra de Soriano, 1961 (Squamata, Gekkota, Phyllodactylidae) nos pampas do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2009;

PACE, J. K.; GILBERT, C.; CLARK, M. S.; FESCHOTTE, C. **Repeated horizontal transfer of a DNA transposon in mammals and other tetrapods**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 44, p. 17023-17028, 2008;

PERRY, B. W.; CARD, D. C.; MCGLOTHLIN, J. W.; PASQUESI, G. I.; ADAMS, R. H.; SCHIELD, D. R. **Molecular adaptations for sensing and securing prey and insight into amniote genome diversity from the garter snake genome**. *Genome biology and evolution*, v. 10, n. 8, p. 2110-2129, 2018;

PISKUREK, O.; AUSTIN, C. C.; OKADA, N. **Sauria SINEs: novel short interspersed retroposable elements that are widespread in reptile genomes.** Journal of molecular evolution, v. 62, n. 5, p. 630-644, 2006;

PISKUREK, O.; OKADA, N. **Poxviruses as possible vectors for horizontal transfer of retroposons from reptiles to mammals.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 104, n. 29, p. 12046-12051, 2007;

QIN, S.; JIN, P.; ZHOU, X.; CHEN, L.; MA, F. **The role of transposable elements in the origin and evolution of microRNAs in human.** PLoS One, v. 10, n. 6, p. e0131365, 2015;

REBOLLO, R.; KARIMI, M. M.; BILENKY, M.; GAGNIER, L.; MICELI-ROYER, K.; ZHANG, Y. *et al.* **Retrotransposon-induced heterochromatin spreading in the mouse revealed by insertional polymorphisms.** PLoS genetics, v. 7, n. 9, p. e1002301, 2011;

ROSCITO, J. G.; SAMEITH, K.; PIPPEL, M.; FRANCOIJS, K. J.; WINKLER, S.; DAHL, A. *et al.* **The genome of the tegu lizard *Salvator merianae*: combining Illumina, PacBio, and optical mapping data to generate a highly contiguous assembly.** Gigascience, v. 7, n. 12, p. giy141, 2018;

SCHNABLE, P. S.; WARE, D.; FULTON, R. S.; STEIN, J. C.; WEI, F.; PASTERNAK, S.; *et al.* **The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics.** science, v. 326, n. 5956, p. 1112-1115, 2009;

SILVA, J. C.; LORETO, E. L.; CLARK, J. B. **Factors that affect the horizontal transfer of transposable elements.** Current issues in molecular biology, v. 6, n. 1, p. 57-72, 2004;

SOTERO-CAIO, Cibele G.; PLATT, R. N.; SUH, A.; RAY, D. A. **Evolution and diversity of transposable elements in vertebrate genomes.** Genome biology and evolution, v. 9, n. 1, p. 161-177, 2017;

SUH, A.; CHURAKOV, G.; RAMAKODI, M. P.; PLATT, R. N.; JURKA, J.; KOJIMA, K. K. *et al.* **Multiple lineages of ancient CR1 retroposons shaped the early genome evolution of amniotes.** Genome biology and evolution, v. 7, n. 1, p. 205-217, 2015;

TAMURA K, STECHER G, AND KUMAR S. **MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11.** Molecular Biology and Evolution 38:3022-3027, 2021;



TOLLIS, M.; DENARDO, D. F.; CORNELIUS, J. A.; DOLBY, G. A.; EDWARDS, T.; HENEN, B. T. *et al.* **The Agassiz's desert tortoise genome provides a resource for the conservation of a threatened species.** PLoS One, v. 12, n. 5, p. e0177708, 2017;

UETZ, P.; HOŠEK, J, **The Reptile Database.** Disponível em: [www.reptile-database.org](http://www.reptile-database.org). Acesso em: 28 de maio de 2022.

UETZ, P.; SLAVENKO, A.; MEIRI, S.; HEINICKE, M. **Gecko diversity: a history of global discovery.** Israel Journal of Ecology and Evolution, v. 66, n. 3-4, p. 117-125, 2020;

VAZ-FERREIRA, R.; DE SORIANO, B. S. **Un nuevo Gekkonidae del Uruguay: Wallsurus uruguayensis n. sp.** 1961;

VENTER, J.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; *et al.* Craig *et al.* **The sequence of the human genome.** science, v. 291, n. 5507, p. 1304-1351, 2001;

VIEIRA, R. C. **Aspectos Ecológicos de uma População de Homonota uruguayensis Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961 (Squamata, Phyllodactylidae) no Rio Grande do Sul, Brasil.** 2012;

WALSH, A. M.; KORTSCHAK, R. D.; GARDNER, M. G.; BERTOZZI, T.; ADELSON, D. L. **Widespread horizontal transfer of retrotransposons.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 110, n. 3, p. 1012-1016, 2013;

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; *et al.* **A unified classification system for eukaryotic transposable elements.** Nature Reviews Genetics, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007;

WÜSTER, W.; SALOMÃO, M. D. G.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; THORPE, R. S.; DUCKETT, G. J.; PUORTO, M. G. **Origins and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis.** Biology of the Vipers, p. 111-128, 2002.

YIN, W.; WANG, Z. J.; LI, Q. Y.; LIAN, J. M.; ZHOU, Y.; LU, B. Z. *et al.* **Evolutionary trajectories of snake genes and genomes revealed by comparative analyses of five-pacer viper.** Nature communications, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016;

YOSHIYAMA, M.; TU, Z.; KAINOH, Y.; HONDA, H.; SHONO, T.; KIMURA, K.  
**Possible horizontal transfer of a transposable element from host to parasitoid.** *Molecular biology and evolution*, v. 18, n. 10, p. 1952-1958, 2001;

ZHANG, G.; LI, C.; LI, Q.; LI, B.; LARKIN, D. M.; LEE, C. *et al.* **Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation.** *Science*, v. 346, n. 6215, p. 1311-1320, 2014.