



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM CROMOSSOMOS HOLO E
MONOCÊNTRICOS DE ESCORPIÕES AMAZÔNICOS

Bruno Rafael Ribeiro de Almeida

BELÉM-PA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM CROMOSSOMOS HOLO E
MONOCÊNTRICOS DE ESCORPIÕES AMAZÔNICOS

DISCENTE: Bruno Rafael Ribeiro de Almeida

ORIENTADOR: Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da UFPA como
requisito parcial para obtenção do grau de Doutor
em Genética e Biologia Molecular

BELÉM-PA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

Bruno Rafael Ribeiro de Almeida

ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM CROMOSSOMOS HOLO E
MONOCÊNTRICOS DE ESCORPIÕES AMAZÔNICOS

Banca Examinadora:

Dr. Julio Cesar Pieczarka (Presidente)

Dra. Cleusa Yoshiko Nagamachi (avaliador)

Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha (avaliador)

Dr. Diogo Cabral de Mello (avaliador)

Dr. Marcelo Ricardo Vicari (avaliador)

BELÉM-PA

2021

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a meus pais Angela Dias e Edward Almeida, dos quais recebi a melhor herança que um filho pode ter, o incentivo ao estudo, e à minha esposa Andrea de Almeida, cujo amor foi minha força motriz para galgar com êxito os degraus da minha vida acadêmica.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu Deus por estar sempre ao meu lado, me iluminando, renovando minhas forças, e sendo a inspiração necessária para trilhar este caminho chamado vida.

Em segundo lugar, agradeço a minha esposa Andrea de Almeida, que foi minha maior incentivadora durante o doutorado. Sem o amor, o carinho e o apoio incondicional dedicados a mim neste período, certamente esta tese não teria sido concluída. Obrigado por sua compreensão nos momentos em que estive ausente para redigir esta monografia, e nos dias que precisei trabalhar no laboratório até tarde. Muito obrigado meu amor por seu apoio na organização logística das coletas (em alguns casos indo comigo), pelo cuidado do nosso lar quando não pude estar presente, por me acalmar quando a ansiedade me tirava o sono, e por ser meu porto seguro. Todos estes gestos denotam o seu amor por mim. Amo você e nossa filha Maria Luiza!

Agradeço aos meus pais Angela Dias e Edward Almeida pelo incentivo e compreensão durante a realização deste trabalho, e por vocês terem decidido conceder a meu irmão e eu, a maior herança que um filho pode receber: a educação. Obrigado por terem sido meus pilares durante minha vida acadêmica (desde o ensino infantil até o superior), por vezes se desdobrando no trabalho, para que pudéssemos um dia ter uma vida próspera e feliz. De igual forma, agradeço ao meu irmão André Almeida, meu grande companheiro de estudos e melhor amigo. E a todos os demais integrantes da minha família, em especial minha tia/madrinha Olga Dias, que muitas vezes levantava cedo para fazer meu almoço e deixava tudo pronto em casa, para que eu me dedicasse integralmente aos estudos, muito obrigado!

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Julio Cesar Pieczarka, por me aceitar como seu orientado, e por ter sido um grande incentivador das ideias que contribuíram para construção desta tese, bem como, pelos ensinamentos, orientações, correções, críticas, debates, conselhos, sugestões e amizade. Sua contribuição foi e continua sendo fundamental para minha formação profissional.

Agradeço também a Dra. Cleusa Nagamachi pelo apoio empregado à realização deste trabalho, principalmente na organização de coletas, e disponibilidade de reagentes para as técnicas laboratoriais, bem como, pela troca de experiências e conselhos a respeito do mundo da ciência, que me ajudaram a crescer como profissional. Muito obrigado!

Sou grato a Dra. Renata Noronha por ter sido uma grande amiga e professora durante meu percurso acadêmico. Me ensinou muito a respeito do ciclo meiótico e da biologia molecular, e por vezes, nos ajudou contribuindo com novas ideias, no estabelecimento de técnicas e a responder algumas questões. Obrigado pela amizade, pela preocupação, e por me dar forças para prosseguir até este dia!

Sou grato a equipe técnica do laboratório composta pelo Msc. Jorge Rissino, Msc. Shirley Nascimento e Conceição Mandu, que sempre tiveram paciência para me ensinar conhecimentos de cultura celular, química, produção de reagentes, organização laboratorial, biossegurança e uso dos equipamentos. Sem as atividades de excelência desempenhadas por essa equipe em nosso laboratório, esta tese, e tantas outras, não teriam sido realizadas. Muito obrigado!

Agradeço aos amigos Dra. Stella Malcher, Dr. Adenilson Pereira, Msc. Manoella Cavalcante, Msc. Luan Frade, Dra. Thayse Bernathar, Dr. Marlyson Rodrigues, e aos biólogos Flávia Tavares e Carlos Eduardo, por coletarem parte das amostras da presente monografia, sugerir ideias e melhorias para o estudo, e por todo companheirismo e amizade, troca de experiências, conversas e brincadeiras, entre outras formas de auxílio que contribuíram direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Luis Reginaldo que organizou e me acompanhou nas coletas em Santarém e Alter do Chão, por sua hospitalidade e generosidade durante os dias que estive na referida cidade, além de ceder reagentes e infraestrutura de seu laboratório na UFOPA. Ao Msc. Luan Aecio que me auxiliou nas preparações cromossômicas e coletas em Santarém.

Ao Msc. Jonas Gama e ao Dr. Rude Procópio, grandes parceiros em Manaus, que contribuíram para esta tese indo a campo para coletar escorpiões, identificando espécimes, debatendo os resultados, e cedendo reagentes e infraestrutura laboratorial para as diversas análises realizadas na UEA. Muito obrigado!

Ao Dr. Pedro Parda, meu grande mestre, a quem tenho um profundo respeito e admiração pelo grande ser humano que ele é, e por todo seu conhecimento e ativismo no estudo de animais peçonhentos na Amazônia. Muito obrigado por todo ensinamento acerca da biologia de escorpiões, pela identificação dos espécimes e por todas as amostras cedidas.

Ao professor Dr. Cesar Martins por ter me proporcionado aprender e realizar a técnica de RT-PCR, utilizando toda a infraestrutura do Laboratório de Genômica Integrativa da UNESP-Botucatu. Sou grato ao Dr. Adauto Cardoso pela dedicação e

paciência em me ensinar a RT-PCR, e inclusive por ir a campo conosco durante o período da noite, bem como, por sua hospitalidade incrível, conversas e brincadeiras, que fizeram a ida a Botucatu, dias memoráveis!

Agradeço ao professor Dr. Christian Araya-Jayme da Universidad de Chile, pelas suas valiosas contribuições feitas a este trabalho, suas sugestões para o melhoramento da técnica de imunodeteção, e por sua incrível disponibilidade em todos os momentos para esclarecimento de dúvidas. Muito obrigado!

Finalmente, agradeço aos meus amigos-irmãos da minha igreja pela amizade, apoio e por suas orações a meu favor. A todos aqueles que não foram citados aqui, mas que contribuíram de alguma forma para este trabalho, muito obrigado!

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Características morfológicas da Ordem Scorpiones. (a) Região ventral do escorpião *Tityus martinpaechi* demonstrando os pentes e o télson (b) Diferentes padrões de esterno presentes nas famílias de escorpiões da fauna brasileira. (Foto: Denise Candido). Modificado de Soleglad e Fet (2003a)..... 20

Figura 2: Aspectos ecológicos e reprodutivos dos escorpiões. (a) O escorpião *Tityus kury* predando uma aranha. (b) Espécime de *Ananteris balzani* e parte do pós-abdômen após autotomia. (c) *Tityus kury* sob luz ultravioleta. (d) Casal de *Tityus matogrossensis* durante acasalamento. (e) Espermatóforo depositado por macho de *Tityus brazilaie*. (f) Escorpião partenogenético *Tityus serrulatus* com filhotes no dorso. Modificado de Mattoni *et al.* (2015) e Brazil e Porto (2011)..... 21

Figura 3: Hipótese filogenética proposta por Sharma *et al.* (2015) para a Ordem Scorpiones. As famílias presentes na fauna brasileira são indicadas com círculo escuro. A palavra “*partim*” refere-se subgrupos de famílias não monofiléticas que agrupam em diferentes regiões da árvore filogenética. Nesta hipótese evolutiva, Chactidae, Vaejovidae e Hormuridae são consideradas polifiléticas. 22

Figura 4: Diversidade de escorpiões do Brasil. (a) *Ischinotelson guanabiensis*; (b) *Jaguajir rochae*; (c) *Physoctonus debilis*; (d) *Rophalurus laticauda*; (e) *Trogloorophalurus translucidus*; (f) *Tityus bahiensis*; (g) *Tityus matogrossensis*; (h) *Tityus obscurus*; (i) *Ananteris mauriyi*; (j) *Isometrus maculatus*; (k) *Brazilobothriurus pantanalensis*; (l) *Bothriurus bonariensis*. (m) *Chactopsoides gonzalezspingai*. (n) *Megachactopsis kuemoui*. (o) *Guyanochactas flavus*. (p) *Brotheas granulatus*. (q) *Brotheochactas delicatus*. (r) *Hadrurochactas schaumii*. (s) *Chactopsis amazonica*. (t) *Opisthacanthus cayaporum*. Modificado de: Kury *et al.* (2010); Porto *et al.* (2010); Ochoa *et al.* (2013); Carvalho *et al.* (2017); Ythier *et al.* (2018) 24

Figura 5: Diferenças entre cromossomos holo e monocêntricos durante metáfase e anáfase da mitose. (a) Em monocêntricos centrômeros (vermelho) são localizados em apenas uma única região, e na anáfase apresentam atividade monocinética, enquanto em holocêntricos. (b) O centrômero encontra-se disperso ao longo de todo cromossomo, permitindo atividade holocinética na anáfase. (c) Quebra de cromossomo monocêntrico, e perda do segmento fissionado. (d) Quebra de cromossomo holocêntrico e conservação do fragmento gerado. Retirado de Cuacos *et al.* (2015)..... 25

Figura 6: Adaptações meióticas em sistemas holocêntricos para evitar erros de disjunção em bivalentes cruciformes. (a) Restrição da atividade cinética às extremidades cromossômicas. (b) Meiose invertida. Adaptado de Melters *et al.* (2012)..... 28

Figura 7: Representação esquemática de meiose quiasmática e aquiasmática em plantas do gênero *Rhynchospora*. Notar a presença de quiasmas em *R. pubera* ($2n=10$) e ausência dos mesmos em *R. tenuis* ($2n=4$), cujos cromossomos permanecem como univalentes. Adaptado de Cabral *et al.* (2014)..... 29

Figura 8: Processo de recombinação em eucariotos. As principais enzimas que atuam em cada etapa são mostradas na parte inferior da imagem. Modificado de Mirzaghaderi e Hörandl (2016). 30

Figura 9: Estrutura do complexo sinaptonêmico. Notar os dois elementos laterais (LE) unidos a cromatina, e o elemento central (CE). Retirado de Popa (2010). 31

CAPÍTULO 1

Figura 1: Discriminação de populações de *T. metuendus* sobre plano multivariado baseada em 15 proporções morfométricas..... 80

Figura 2: Cariótipos dos citótipos A ($2n=18$) e B ($2n=12$) de *T. metuendus* submetidos a coloração convencional (a,b) e bandeamento C (c,d). 81

Figura 3: Mapeamento cromossômico de 45S rDNA (a,b) e sequências teloméricas (c,d) em citótipos A e B de *T. metuendus*. 82

Figura 4: Organização cromossômica da fração C0t-1 DNA (a,b) e transposon Mariner (c,d) em citótipos A e B de *T. metuendus*..... 83

Figura 5: Árvore filogenética de citótipos de *T. metuendus* e linhagens de *T. obscurus* obtida por Máxima Verosimilhança e Inferência Bayesiana com gene 16S rDNA. Os valores de suporte de cada ramo são representados pelo bootstrap/probabilidade a posteriori. Nota: Tmet 1-5 (Citótipo A); Tmet 6-10 (Citótipo B); Tobs_E1-5 (Linhagem Leste de *T. obscurus*); Tobs_W1-5 (Linhagem Oeste de *T. obscurus*) 84

Figura 6: Árvore filogenética de citótipos de *T. metuendus* e linhagens de *T. obscurus* obtida por Máxima Verosimilhança e Inferência Bayesiana com gene COI. Os valores de suporte de cada ramo são representados pelo bootstrap/probabilidade a posteriori. Nota: Tmet 1-5 (Citótipo A); Tmet 6-10 (Citótipo B); Tobs_E1-5 (Linhagem leste de *T. obscurus*); Tobs_W1-5 (Linhagem oeste de *T. obscurus*); Tobs_Moron (*T. obscurus* do Equador) 85

CAPÍTULO 2

Figura 1: Células meióticas em diferentes espécies de *Brotheas*. (a) *B. silvestris*, $2n=40$. (b) *B. paraensis*, $2n=48$. (c) *B. amazonicus* citótipo A, $2n=50$. (d) *B. amazonicus* citótipo B, $2n=52$. (e) Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador de uma associação meiótica hexavalente. (f) Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador de uma

associação meiótica quadrivalente. As setas em (e) e (f) sinalizam associações multivalentes..... 106

Figura 2: FISH com sonda 45S rDNA em *Brotheas*. (a) *B. silvestris*. (b) *B. paraensis*. (c) *B. amazonicus* citótipo A. (d) *B. amazonicus* citótipo B; o inserto mostra o par 4 de uma célula mitótica evidenciando a diferença de tamanho entre os clusters 45S rDNA. (e) Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador do quadrivalente. (f) Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador do hexavalente..... 107

Figura 3: FISH com sonda telomérica TTAGG em *Brotheas*. (a) *B. silvestris*. (b) *B. paraensis*. (c) *B. amazonicus* citótipo A. (d) *B. amazonicus* citótipo B; o inserto mostra o par 4 de uma célula mitótica evidenciando a diferença de tamanho entre os clusters 45S rDNA. (e) Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador do quadrivalente. (f) Célula em início de Anáfase I do indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador do hexavalente; o inserto em (g) mostra o hexavalente em metáfase I. 108

Figura 4: Distribuição de U2 snRNA em escorpiões *Brotheas*. (a) *B. paraensis*. (b) citótipo A de *B. amazonicus*. (c) Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador do quadrivalente. 109

Figura 5: Hipótese para dinâmica do 45S rDNA nas três espécies de *Brotheas* analisadas citogeneticamente no presente estudo. 110

Figura 6: Interpretação esquemática para translocações observadas no citótipo B de *B. amazonicus*. (a) origem e (b) pareamento em metáfase I da associação quadrivalente; (c) origem e (d) pareamento em metáfase I da associação hexavalente. Regiões em amarelo nos esquemas corresponde a sítios 45S rDNA. 111

CAPÍTULO 3

Figura 1: Cariótipo de *N. parvulus*. Notar a diferença de tamanho entre os microcromossomos e os macrocromossomos..... 130

Figura 2: Bandeamento C em cromossomos de *N. parvulus*. A seta no par 2 indica a banda C adicional no braço curto. No inserto, alguns exemplares de microcromossomos submetidos a coloração por DAPI após o bandeamento C..... 131

Figura 3: Comportamento meiótico em *N. parvulus*. (a) Zigóteno. (b) o mesmo núcleo zigotênico em “a” submetido a FISH com sonda telomérica; notar a disposição polarizada dos telômeros. (c) Paquíteno. Setas indicam microbivalentes. (d) Bivalentes paquitênicos isolados; a seta indica os múltiplos domínios heterocromáticos na região pericentromérica. O inserto mostra uma representação esquemática do bivalente indicado pela seta. (e) Pós-paquíteno. (f) Anáfase I..... 132

Figura 4: Mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos em *N. parvulus*. (a) 45S rDNA (seta); blocos heterocromáticos DAPI+ são indicados pelas cabeças-de-setas. (b)

Repetições TTAGG. (c) U2 snRNA. (d) 45S rDNA em interfase; a seta indica 45S rDNA, e as cabeças-de-seta indicam heterocromatina de macrocromossomos na periferia do núcleo. (e) U2 snRNA em núcleo interfásico (seta). 133

CAPÍTULO 5

Figura 1: Cromossomos meióticos em *T. maranhensis*. (a) Metáfase I; (b) Metáfase II. 167

Figura 2: Organização do complexo sinaptonêmico em *T. maranhensis*. Em vermelho SMC3, e em verde, telômeros. (a) Transição leptóteno/zigóteno; eixos SMC3 e telômeros arranjados em configuração bouquet. (b) Zigóteno tardio. (c) Paquíteno inicial; setas indicam regiões do quadrivalente assinápticas. (d) Representação esquemática dos eixos SMC3 apontados pelas setas em “c”. (e) Paquíteno intermediário; setas indicam regiões do quadrivalente em processo de sinapse. (f) Representação esquemática dos eixos SMC3 apontados pelas setas em “e”. (g) Paquíteno tardio; setas indicam regiões do quadrivalente em processo de sinapse. (h) Metáfase I; seta indica o quadrivalente. (i) Anáfase I; setas indicam componentes do quadrivalente iniciando segregação. 168

Figura 3: Imunodeteção de γ H2AX ao longo da prófase I de *T. maranhensis*. (a-c) Leptóteno. (d-f) Zigóteno inicial. (g-i) Zigóteno tardio. (j-l) Paquíteno inicial/intermediário. (m-o) Paquíteno tardio. 169

Figura 4: Imunodeteção de tubulina ao longo da prófase I em *T. maranhensis*. Em vermelho tubulina, e verde telômeros. (a-d) Zigóteno; setas indicam união de telômeros e fibras de tubulina. (e-h) Paquíteno; setas indicam união de telômeros e fibras de tubulina. (i-l) Metáfase I. (m-p) Anáfase I; seta indica o quadrivalente. (q-t) Metáfase II. (u-z) Anáfase II; setas indicam união de telômeros e fibras de tubulina. (a', a'') Bivalente metafásico ampliado. (b', b'') quadrivalente ampliado. (c', c'') cromátides-irmãs ampliadas em início de Anáfase II. 170

Figura 5: Cromossomos meióticos em citótipo A ($2n = 24$) de *T. silvestris*. (a) Bandeamento C. (b) FISH com sonda 45S rDNA. (c) FISH com sonda telomérica.... 171

Figura 6: Expressão de genes de reparo mismatch em gônadas e embriões de *T. silvestris* citótipo A ($2n = 24$). 172

Figura 7: Cromossomos meióticos em citótipo B ($2n = 16$) de *T. silvestris*. (a) FISH com sonda 45S rDNA em indivíduo portador apenas de bivalentes. (b) 45S rDNA em indivíduo portador do quadrivalente. (c) FISH com sonda telomérica. Setas em a e b indicam cluster ribossomal. 173

Figura 8: Distribuição de ATR durante prófase I de *T. silvestris* citótipo B ($2n = 16$). (a-c) Transição Leptóteno/Zigóteno. (d-f) Zigóteno tardio. (g-i) Paquíteno inicial. (j-l) Paquíteno tardio. 174

CAPÍTULO 6

Figura 1: Cariótipo meiótico de <i>O. cayaporum</i> $2n = 50$	195
Figura 2: Distribuição de heterocromatina e DNAs repetitivos no genoma de <i>O. cayaporum</i> . (a) Bandeamento C; setas indicam blocos C positivos. (b) Telômeros; setas demonstram ITS. (c) Localização cromossômica de cópias do transposon Mariner. (d) 45S rDNA.	196
Figura 3: Dinâmica da coesina SMC3 e telômeros durante meiose I de <i>O. cayaporum</i> . (a-d) Célula pré-meiótica. (e-h) Leptóteno. (i-l) Zigóteno inicial. (m-p) Zigóteno tardio. (q-t) Paquíteno inicial/intermediário; a seta indica o ITS na região pericentromérica do par 2. (u-z) Metáfase I.	197
Figura 4: Distribuição espacial de foci Rad51 durante Prófase I de <i>O. cayaporum</i> . (a) Leptóteno tardio. (b) Zigóteno inicial. (c) Zigóteno tardio. (d) Paquíteno inicial. (e) Paquíteno intermediário. (f) Paquíteno tardio.	198
Figura 5: Análise quantitativa de (a) associações teloméricas meióticas e (b) quantidade de foci Rad51 distribuídos em regiões terminais e intersticiais durante paquíteno inicial/intermediário.....	199

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1: Resumo de dados citogenéticos da Ordem Scorpiones.	32
---	----

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 2: Informações gerais sobre a amostra coletada no presente estudo.	37
--	----

Tabela 3: Iniciadores utilizados no isolamento de sequencias repetitivas em escorpiões	42
---	----

Tabela 4:Dados gerais sobre os iniciadores utilizados para PCR quantitativa.....	46
--	----

Tabela 5:Iniciadores utilizados para DNA barcode.....	47
---	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Informações gerais sobre amostra de <i>T. metuendus</i> utilizada para análise morfométrica no presente estudo. N = tamanho amostral.	73
--	----

Tabela 2: Contagem do número de dentes dos pentes e séries de grânulos do pedipalpo em indivíduos machos de <i>T. metuendus</i>	74
--	----

Tabela 3: Médias de proporções morfométricas calculadas para os quatro grupos de <i>T. metuendus</i> analisados no presente estudo.....	75
---	----

Tabela 4: Coeficiente das funções discriminantes obtidas para as amostras de <i>T. metuendus</i>	76
---	----

Tabela 5: Estimativa de divergência genética entre citótipos de <i>T. metuendus</i> e linhagens de <i>T. obscurus</i> . As médias das distancias genéticas calculadas para 16S rDNA e COI são mostradas respectivamente, acima e abaixo da diagonal.	77
---	----

Tabela 6: Classificação morfológica dos espécimes machos de <i>T. metuendus</i> através de análise de funções discriminantes.....	78
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Dados gerais sobre a amostra utilizada no presente estudo.....	106
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

SMC3: Structural maintenance of chromosomes protein 3

γ H2AX: Proteína H2AX fosforilada na serina 139

Rad51: Radiation sensitive 51

H3K27me3: Histona H3 tri-metilada na lisina 27

H3K27ac: Histona H3 com lisina 27 acetilada

H3K4me3: Histona H3 tri-metilada na lisina 4

H3K9ac: Histona H3 acetilada na lisina 9

ATR: Serine/threonine-protein kinase ATR

DMC1: Disrupted meiotic cDNA1

MLH1: MutL homolog 1

MLH3- MutL homolog 3

MSH4- MutS homolog 4

MSH5- MutS homolog 5

MUS81- Crossover junction endonuclease MUS81

SPO11- SPO11 initiator of meiotic double stranded breaks

DSB- DNA double stranded breaks

45S rDNA – gene ribossomal 45S

COI- Citocromo Oxidase I

16S rDNA- gene ribossomal 16S

U2 snRNA - small nuclear RNA U2

Cot-1 DNA- fração do DNA composto por sequencias altamente e moderadamente repetitivas

SUMÁRIO

RESUMO.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ORDEM SCORPIONES, COM ÊNFASE NAS FAMÍLIAS COM OCORRÊNCIA NO BRASIL	20
1.2. CROMOSSOMOS HOLOCÊNTRICOS	24
1.3. MEIOSE AQUIASMÁTICA	28
1.4. CITOGENÉTICA DE ESCORPIÕES.....	31
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. OBJETIVO GERAL.....	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. AMOSTRA	37
3.2. OBTENÇÃO DE PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS DE GÔNADAS.....	38
3.3. OBTENÇÃO DE PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS DE EMBRIÕES	38
3.4. ORGANIZAÇÃO E MONTAGEM DOS CARIÓTIPOS.....	39
3.5. BANDEAMENTO C.....	39
3.6. OBTENÇÃO DE COMPLEXOS SINAPTONÊMICOS	39
3.7. ANTICORPOS.....	40
3.8. IMUNOCITOGENÉTICA.....	40
3.9. CITOGENÉTICA MOLECULAR.....	41
3.10. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE RECOMBINAÇÃO	44
3.11. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	47
3.12. MORFOMETRIA.....	48
4. RESULTADOS	50
CAPÍTULO 1: Evidências genéticas e morfológicas apoiam a existência do complexo de espécies <i>Tityus metuendus</i> (Scorpiones, Buthidae).....	51
RESUMO	52
1. INTRODUÇÃO	52
2. MATERIAL E MÉTODOS	54
3. RESULTADOS.....	57
4. DISCUSSÃO.....	60
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS	64
CAPÍTULO 2:Diversidade cariotípica e dinâmica genômica de sítios 45S rDNA em escorpiões <i>Brotheas</i> (Scorpiones, Chactidae) da Amazônia Brasileira.....	86
1. INTRODUÇÃO	87
2. MATERIAL E MÉTODOS	89
3. RESULTADOS.....	90
4. DISCUSSÃO.....	92

5.	CONCLUSÃO	96
6.	REFERENCIAS	96
CAPÍTULO 3: Microcromossomos em Scorpiones? O caso do cariótipo bimodal de <i>Neochactas parvulus</i> (Chactidae).....		112
	RESUMO	113
1.	INTRODUÇÃO	113
2.	MATERIAL E MÉTODOS	115
3.	RESULTADOS.....	116
4.	DISCUSSÃO.....	117
5.	CONCLUSÃO	121
6.	REFERÊNCIAS	121
CAPÍTULO 4: Meiosis in the scorpion <i>Tityus silvestris</i>: new insighths into achiasmatic chromosome		134
CAPÍTULO 5: Meiose aquiasmática em <i>Tityus</i> (Scorpiones, Buthidae): comportamento meiótico de multivalentes e expressão de genes de reparo <i>mismatch</i> 144		
	RESUMO	145
1.	INTRODUÇÃO	145
2.	MATERIAL E MÉTODOS	147
3.	RESULTADOS.....	149
4.	DISCUSSÃO.....	152
5.	CONCLUSÃO	157
6.	REFERÊNCIAS	157
CAPÍTULO 6: Sequências teloméricas intersticiais em <i>Opisthachantus cayaporum</i> (Scorpiones, Hormuridae) são importantes para o pareamento meiótico		175
	RESUMO	176
1.	INTRODUÇÃO	176
2.	MATERIAL E MÉTODOS	178
3.	RESULTADOS.....	180
4.	DISCUSSÃO.....	182
5.	CONCLUSÃO	185
6.	REFERÊNCIAS	185
5.	CONCLUSÕES	200
6.	REFERÊNCIAS.....	201

RESUMO

A Ordem Scorpiones reúne cerca de 1950 espécies, com distribuição em quase todos os continentes do mundo, a exceção da Antártida. Do ponto de vista citogenético, Scorpiones apresenta: (1) cromossomos holocêntricos em Buthidae e monocêntricos nas demais famílias; (2) meiose aquiasmática em indivíduos machos; (3) alta frequência de rearranjos do tipo fusão/fissão, translocações e inversões em estado heterozigoto; (4) presença de multivalentes meióticos, que podem exibir configurações distintas aos níveis inter ou intrapopulacional. Até o presente momento, os mecanismos moleculares e cromossômicos responsáveis pela manutenção deste sistema genético ainda são pouco compreendidos. O presente estudo visou estudar a organização genômica, comportamento meiótico e evolução dos cromossomos holo e monocêntricos de escorpiões amazônicos, utilizando imunocitogenética, cariotipagem, mapeamento de DNAs repetitivos por FISH, análise filogenética e RT-PCR em 8 espécies pertencentes às famílias Buthidae (*Tityus metuendus*, *Tityus silvestris* e *Tityus maranhensis*), Chactidae (*Neochactas parvulus*, *Brotheas amazonicus*, *Brotheas silvestris* e *Brotheas paraensis*) e Hormuridae (*Opisthacanthus cayaporum*). Nossos resultados mostraram variações geográficas nos cariótipos de *T. metuendus* ($2n = 12$ ou 18), *B. amazonicus* ($2n = 50$ ou 52) e *Tityus silvestris* ($2n = 16$ ou 24). Durante meiose I em *T. maranhensis*, associações quadrivalentes apresentam atraso no processo sináptico em relação à bivalentes, porém regiões assinápticas no centro deste multivalente não sofrem inativação transcricional por γ H2AX. Nesta mesma espécie, cromossomos apresentam atividade holocinética em metáfase I, e telocinética em metáfase II. Quanto a meiose aquiasmática em *T. silvestris* observamos formação e reparo de DSBs, e expressão de enzimas de reparo *mismatch* (MLH1, MLH3, MSH5) e MUS81 em ambos os sexos. Neste escorpião o avanço da sinapse é associado a aumento da quantidade de formação de cromatina rica em H3K27me3. Multivalentes meióticos e extensos heteromorfismos de *clusters* 45S rDNA (com colocalização deste rDNA e U2 snDNA em alguns indivíduos) também foram registrados em *B. amazonicus* $2n = 52$ e sua origem pode estar relacionada a translocações múltiplas. Em *N. parvulus* ($2n = 56$), um cariótipo altamente bimodal foi observado, possivelmente resultante de fusão/fissão de cromossomos de tamanho regular. Finalmente, o cariótipo de *O. cayaporum* ($2n = 50$), demonstrou sequências teloméricas intersticiais de natureza heterocromática, que formam associações heterólogas

temporárias no paquíteno, contribuindo para segregação correta dos cromossomos homólogos. Em conjunto, nossos dados revelam possível formação de espécies crípticas, bem como diferentes tendências de evolução cromossômica específicas de cada família analisada no presente estudo, e um conjunto de adaptações que favorecem a ocorrência simultânea de meiose aquiasmática e rearranjos heterozigotos em Scorpiones.

Palavras-chave: Scorpiones, meiose aquiasmática, multivalente meiótico, cromossomos holocêntricos

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ORDEM SCORPIONES, COM ÊNFASE NAS FAMÍLIAS COM OCORRÊNCIA NO BRASIL

A Ordem Scorpiones reúne invertebrados popularmente conhecidos por escorpiões ou lacraus que pertencem ao Filo Arthropoda, ao subfilo Chelicerata e a Classe Arachnida. São animais considerados verdadeiros fósseis vivos, pois sua origem data desde o período Siluriano, a mais de 400 milhões de anos, no ambiente marinho (Howard *et al.*, 2019). Eles ocorrem em quase todos os continentes do mundo (com exceção da Antártida). Como sinapomorfias, os integrantes desta ordem apresentam: (1) um par de glândulas produtoras de veneno altamente tóxico para insetos e mamíferos, no interior do télson (mantido durante toda vida destes artrópodes), que é utilizado para paralisar as presas durante o forrageamento; (2) um par de órgãos sensoriais na região ventral, denominados pentes, que possuem funções mecanoreceptoras e quimiorreceptoras (Polis, 1990; Brasil, 2009) (Figura 01).

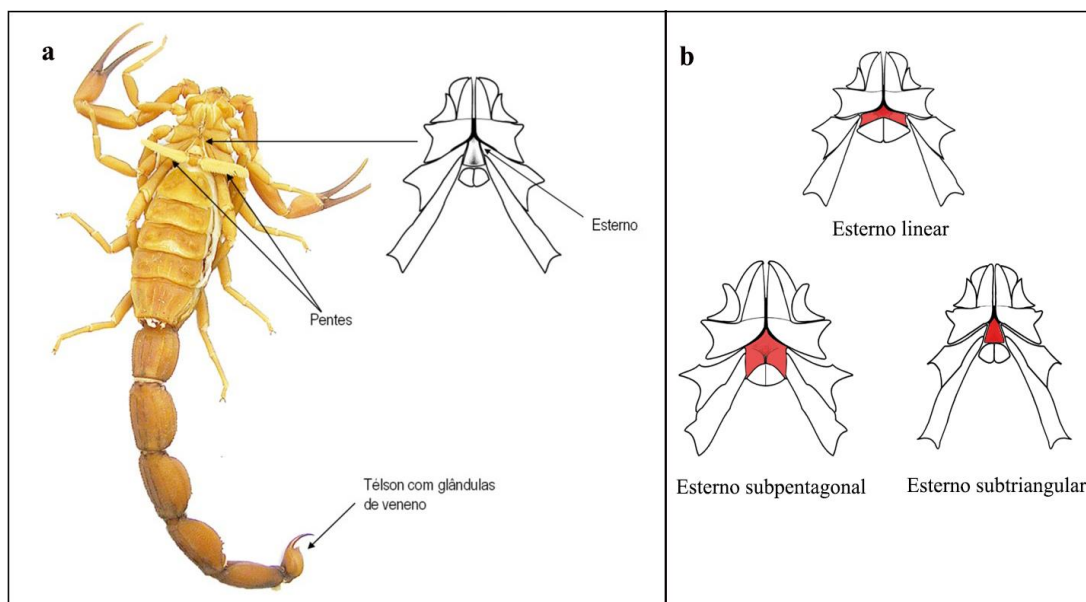


Figura 1: Características morfológicas da Ordem Scorpiones. (a) Região ventral do escorpião *Tityus martinpaechi* demonstrando os pentes e o télson (b) Diferentes padrões de esterno presentes nas famílias de escorpiões da fauna brasileira. (Foto: Denise Candido). Modificado de Soleglad e Fet (2003a)

Os escorpiões são carnívoros, alimentando-se principalmente de insetos, aranhas, miriápodes, pequenos vertebrados, e em algumas situações de escassez, podem capturar

e preda outros escorpiões (Figura 2) (Brazil e Porto, 2011). São noturnos e apresentam grande exigência quanto ao habitat, apesar de algumas espécies possuírem alta plasticidade ecológica, adaptando-se facilmente a ambientes urbanos (Brasil, 2009). Grande parte dos escorpiões não possui comportamento social, mas podem apresentar padrão de distribuição espacial agregado de suas populações em habitats com alta abundância de alimento e abrigo (Santos *et al.*, 2018). O veneno é a principal arma de defesa contra competidores e predadores (corujas, lagartos, morcegos, entre outros), entretanto, no gênero *Ananteris*, a autotomia do pós-abdômen também é utilizada (Figura 2) (Mattoni *et al.*, 2015). A fluorescência do exoesqueleto mediante irradiação da luz ultravioleta é um fenômeno comum a todos os escorpiões, e algumas hipóteses sugerem que esse processo possa ser utilizado como mecanismo de comunicação, atração de fêmeas, entre outras funções (Figura 2) (Brasil, 2009).

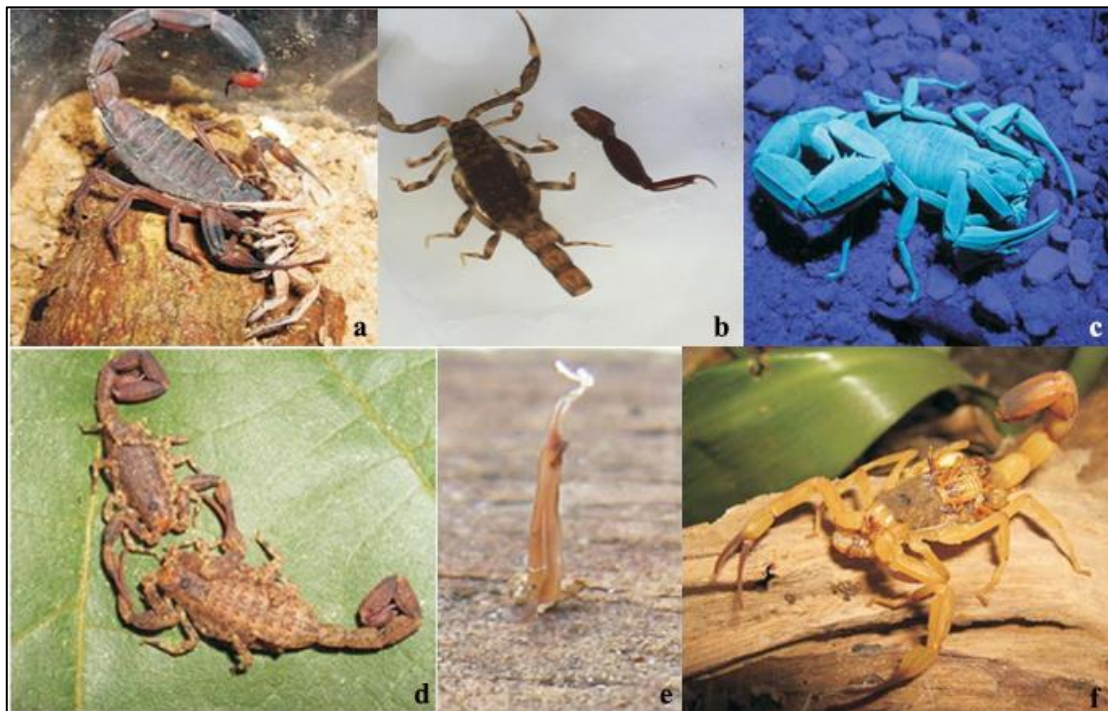


Figura 2: Aspectos ecológicos e reprodutivos dos escorpiões. (a) O escorpião *Tityus kury* predando uma aranha. (b) Espécime de *Ananteris balzani* e parte do pós-abdômen após autotomia. (c) *Tityus kury* sob luz ultravioleta. (d) Casal de *Tityus matogrossensis* durante acasalamento. (e) Espermatóforo depositado por macho de *Tityus brazilae*. (f) Escorpião partenogenético *Tityus serrulatus* com filhotes no dorso. Modificado de Mattoni *et al.* (2015) e Brazil e Porto (2011)

Com relação à reprodução destes aracnídeos, em geral os escorpiões possuem sexos separados (com transferência de espermatozoides via espermatóforo), são vivíparos, exibem elaborados rituais de acasalamento e as fêmeas apresentam grande cuidado parental (Figura 2) (Warburg *et al.*, 2011). Cerca de 15 espécies de escorpiões

reproduzem-se por partenogênese; na maioria destes casos, fêmeas podem gerar ninhadas compostas apenas por indivíduos fêmeas sem necessidade de acasalamento (telitoquia) (Lourenço *et al.*, 2015); nas espécies *Tityus metuendus* e *Tityus neblina*, foi sugerido ocorrência de partenogênese por arrenotoquia, em virtude da produção de ninhadas formadas apenas por machos, entretanto, são necessárias maiores evidências para confirmar esse fenômeno (Lourenço, 2018). Para algumas das espécies partenogenéticas, populações sexuadas têm sido descritas recentemente (Lourenço, 2018).

Atualmente a Ordem Scorpiones é formada por aproximadamente 2.545 espécies, distribuídas em 18 famílias (Rein, 2021). Diversas análises filogenéticas têm sido realizadas para compreender as relações evolutivas dentro desta ordem, utilizando caracteres morfológicos e moleculares; a proposta mais recente baseada em dados moleculares *multilocus* sugeriu que três famílias podem ser polifiléticas (Figura 3) (Sharma *et al.*, 2015). A fauna de escorpiões do Brasil é representada pelas famílias Buthidae, Chactidae, Hormuridae e Bothriuridae.

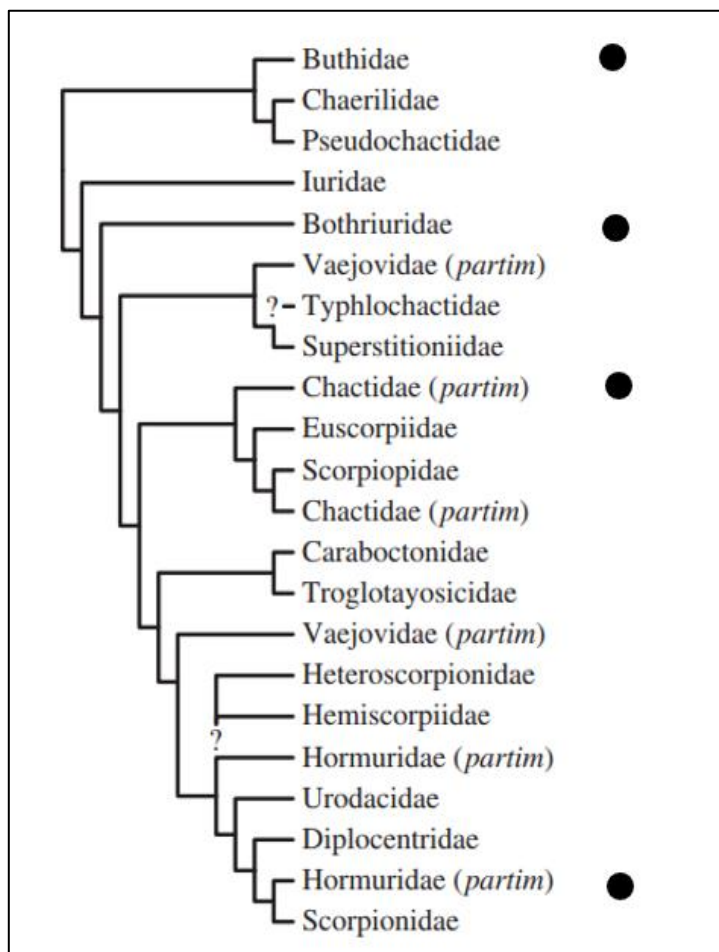


Figura 3: Hipótese filogenética proposta por Sharma *et al.* (2015) para a Ordem Scorpiones. As famílias presentes na fauna brasileira são indicadas com círculo escuro. A palavra “*partim*” refere-se subgrupos de famílias não monofiléticas que agrupam em diferentes regiões da árvore filogenética. Nesta hipótese evolutiva, Chactidae, Vaejovidae e Hormuridae são consideradas polifiléticas.

A família Buthidae ocupa uma das posições mais basais na filogenia desta ordem, juntamente com Pseudochactidae e Chaerilidae. Apresenta a placa esterno com formato subtriangular (Figura 1b) (Lourenço, 2002). Ela é a única que possui distribuição cosmopolita, bem como a maior diversidade, sendo constituída por 95 gêneros e 1214 espécies (Rein, 2021). Todos os escorpiões responsáveis por acidentes de alta gravidade pertencem a esta família, e correspondem a aproximadamente 9 gêneros, distribuídos em diversos países do Velho e Novo Mundo (Chippaux E Goyffon, 2008). No Brasil, há ocorrência dos seguintes gêneros de Buthidae: *Tityus*, *Ananteris*, *Isometrus*, *Microtityus*, *Rophalurus*, *Trogloorophalurus*, *Physoctonus*, *Jaguajir*, *Ischinetelson* e *Zabius* (Figura 4) (Esposito *et al.*, 2017).

A família Bothriuridae compreende espécies de pequeno a médio porte (2,5 a 6 cm de comprimento), caracterizadas pela presença de placa esterno linear, reduzida ou as vezes ausente (Figura 1b) (Lourenço, 2002). Sua distribuição geográfica abrange regiões temperadas e subtropicais da América do Sul, África, Ásia (Índia) e Oceania (Austrália) (Brazil e Porto, 2011). Reúne cerca de 17 gêneros e 154 espécies, dentre os quais cinco (*Bothriurus*, *Brazilobothriurus*, *Urophonius*, *Brachisthosternus* e *Thestylus*) estão presentes na fauna brasileira (nenhum na região Amazônica) (Figura 4) (Santos-Da-Silva *et al.*, 2017; Rein, 2021).

A família Chactidae reúne aproximadamente 15 gêneros e 209 espécies distribuídas ao longo do continente americano, estendendo-se desde a América do Norte até o Centro-Oeste do Brasil (Rein, 2021). Neste último, eles estão concentrados quase exclusivamente na região Amazônica, a exceção de *Hadrurochactas brejo*, encontrado no Nordeste (Lourenço, 2010). São animais de médio a grande porte, que apresentam o esterno subpentagonal (Figura 1b) e um esporão retrolateral na região tarsal das pernas (Lourenço, 2002). A análise filogenética realizada por Sharma *et al.* (2015) sugere que Chactidae não corresponde a um grupo monofilético. Os seguintes gêneros compõem a escorpiofauna brasileira: *Brotheas*, *Brotheochactas*, *Chactas*, *Chactopsis*, *Hadrurochactas*, *Neochactas*, *Teuthraustes*, *Vachoniochactas*, *Chactopsoides* e *Magachactops* (Figura 4) (Ochoa *et al.*, 2013).

A família Hormuridae é composta por 10 gêneros e cerca de 90 espécies, com distribuição na América, África, Ásia e Oceania (Rein, 2021). Eles apresentam esterno subpentagonal, mas diferem de Chactidae, pela ausência do esporão na região retrolateral tarsal (Lourenço, 2002). Em geral possuem o corpo achatado dorso-ventralmente, como

uma adaptação a vida em frestas e rochedos (Monod e Prendini, 2014). No Brasil, esta família é representada apenas pelo gênero *Opisthacanthus*, com três espécies descritas: *O. cayaporum* (em áreas de cerrado do sul do Estado do Pará, Tocantins e Goiás, habitando o interior de cupinzeiros), *O. surinamensis* (fronteira entre Brasil e Suriname) e *O. borboremai* (Estado do Amazonas) (Figura 4) (Lourenço, 2017).



Figura 4: Diversidade de escorpiões do Brasil. (a) *Ischinotelson guanabiensis*; (b) *Jaguajir rochae*; (c) *Physoctonus debilis*; (d) *Rophalurus laticauda*; (e) *Troglorophalurus translucidus*; (f) *Tityus bahiensis*; (g) *Tityus mattogrossensis*; (h) *Tityus obscurus*; (i) *Ananteris mauryi*; (j) *Isometrus maculatus*; (k) *Brazilobothriurus pantanalensis*; (l) *Bothriurus bonariensis*. (m) *Chactopsoides gonzalezspangai*. (n) *Megachactopsis kuemoui*. (o) *Guyanochactas flavus*. (p) *Brotheas granulatus*. (q) *Brotheochactas delicatus*. (r) *Hadrurochactas schaumii*. (s) *Chactopsis amazonica*. (t) *Opisthacanthus cayaporum*. Modificado de: Kury et al. (2010); Porto et al. (2010); Ochoa et al. (2013); Carvalho et al. (2017); Ythier et al. (2018)

1.2.CROMOSSOMOS HOLOCÊNTRICOS

Cromossomos holocêntricos são aqueles que possuem o centrômero disperso ou difuso ao longo de toda sua extensão (Figura 5); este tipo de cromossomo surgiu de forma independente em diversos clados de eucariotos, ocorrendo desde protistas até plantas e animais (Melters et al., 2012). Em plantas são observados principalmente em monocotiledôneas, especialmente em integrantes das famílias Juncaceae e Cyperaceae

(Chung *et al.*, 2011). Em nematódeos, eles são encontrados em todas as famílias, a exceção de Trichuridae (Subirana e Messegueur, 2013). Entre os artrópodes eles são presentes em miriápodes, diversas ordens de insetos e em aracnídeos (ordens Aranae, Acari e Scorpiones) (Marques e Pedrosa-Harand, 2016). Os mecanismos moleculares que originaram o holocentrismo em clados distintos não são bem compreendidos, entretanto, a distribuição desta característica na filogenia dos seres vivos mostra que na maior parte dos táxons eles surgiram a partir de ancestrais que apresentavam cromossomos monocêntricos (Melters *et al.*, 2012).

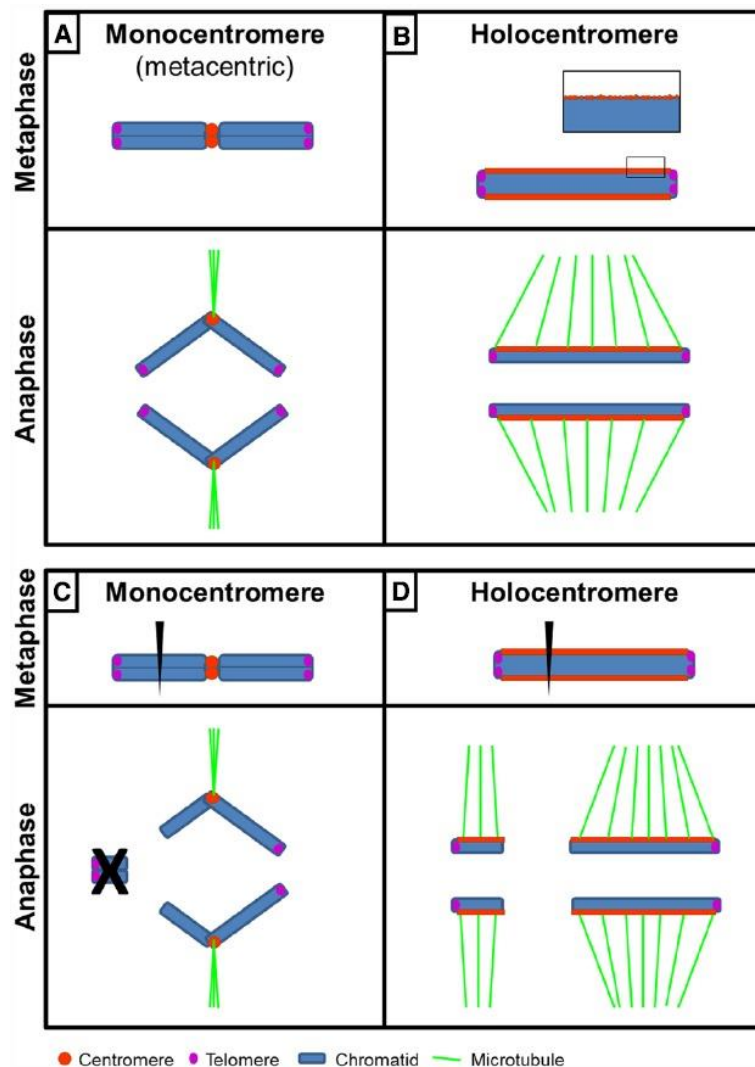


Figura 5: Diferenças entre cromossomos holo e monocêntricos durante metáfase e anáfase da mitose. (a) Em monocêntricos centrômeros (vermelho) são localizados em apenas uma única região, e na anáfase apresentam atividade monocinética, enquanto em holocêntricos. (b) O centrômero encontra-se disperso ao longo de todo cromossomo, permitindo atividade holocinética na anáfase. (c) Quebra de cromossomo monocêntrico, e perda do segmento fissionado. (d) Quebra de cromossomo holocêntrico e conservação do fragmento gerado. Retirado de Cuacos *et al.* (2015)

Durante a divisão mitótica, cromossomos holocêntricos podem ser identificados através da ausência de constrição primária e pela segregação paralela dos homólogos em direção aos polos durante a Anáfase (Mola e Papeschi, 2006) (Figura 5). Organismos com sistemas holocêntricos podem apresentar grande variação do número diploide. Isso se deve ao fato de os microtúbulos do fuso unirem-se ao longo das cromátides, permitindo que fragmentos gerados por fissões segreguem normalmente para as células filhas (Figura 5) (Marques e Pedrosa-Harand, 2016). Outra característica que favorece a alta diversidade cariotípica em organismos holocêntricos é a formação rápida de novos telômeros em regiões fissionadas, em virtude da expressão constitutiva do gene da telomerase, o que permite estabilizar as extremidades quebradas dos novos cromossomos (Jankowska *et al.*, 2015). Alguns estudos sugerem que estas características da morfologia holocêntrica foram importantes durante a colonização do ambiente terrestre, conferindo vantagem para alguns organismos, que conservavam os fragmentos cromossômicos resultantes de quebras induzidas pela radiação solar (Zedek e Bureš, 2017). O grande potencial destes cromossomos para tolerar rearranjos do tipo fusão/fissão permite uma acelerada evolução cariotípica em alguns clados. A comparação do genoma de duas espécies de Lepidoptera mostrou uma taxa de duas fissões por megabase de DNA por milhões de anos, superando a taxa de rearranjos fixados observados em insetos monocêntricos, como *Drosophila*, por exemplo (D'alençon *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2019).

A estrutura genômica de cromossomos holocêntricos difere daquela encontrada em monocêntricos. Os primeiros geralmente apresentam domínios de heterocromatina constitutiva e sítios 45S rDNA localizados nas regiões terminais dos cromossomos (Heckmann *et al.*, 2011). A distribuição de sequências satélites é variável entre os organismos holocêntricos. Em nematódeos holocêntricos, por exemplo, DNAs satélites são distribuídos ao longo do seu genoma, além de serem mais abundantes e diversificados em relação ao genoma de espécies monocêntricas (Subirana e Messeguer, 2013). Em plantas holocêntricas, eles geralmente são organizados em *clusters*, formando grandes blocos ao longo do cromossomo (Ribeiro *et al.*, 2016). A região subtelomérica de cromossomos holocinéticos é rica em variados tipos de DNAs repetitivos, que podem desempenhar funções diversas; em *Bombyx mori*, por exemplo, retroelementos TRAS 1 presentes na região subtelomérica são ativos, e em casos de fissões, passam a constituir o telômero, em virtude da presença de uma telomerase pouco funcional nesta espécie (Fujiwara *et al.*, 2005).

Em relação à estrutura do centrômero, a Histona H3 centromérica (CENH3 ou CENPA) é encontrada em quase todos os táxons holocêntricos, a exceção dos clados de insetos (Lepidoptera, Heteroptera, Thysanoptera, etc) nos quais houve perda desta proteína durante a transição da condição monocêntrica a holocêntrica (Drinnenberg *et al.*, 2014). Sequências de DNAs repetitivos centroméricos não foram observadas na maior parte dos organismos holocêntricos; em *C. elegans*, por exemplo, foi demonstrado que a inserção da CENH3 ocorre independente de sequência centromérica (Gassmann *et al.*, 2012); apenas em plantas do gênero *Rhynchospora*, foi descrito um retroelemento denominado *Tyba*, associado a CENH3 (Marques *et al.*, 2015). Interessantemente, em alguns organismos holocêntricos, a ligação dos microtúbulos do fuso pode ocorrer em regiões cromossômicas livres de CENH3, como observado em plantas do gênero *Cuscuta* (Oliveira *et al.*, 2020) e insetos (Drinnenberg *et al.*, 2014). Além disso, modificações epigenéticas de histonas, tais como H2AT120ph em plantas, são geralmente co-localizadas com holocentrômeros, e podem desempenhar importantes papéis na regulação desta região cromossômica (Cuacos *et al.*, 2015; Schubert *et al.*, 2020).

Durante a divisão meiótica, a ocorrência de um quiasma na região intersticial gera bivalentes cruciformes. No caso de cromossomos holocêntricos, bivalentes com esta disposição geométrica podem segregar para diferentes polos da célula durante a Anáfase I, levando a erros de disjunção (Melters *et al.*, 2012). Em virtude disso, diversos táxons holocêntricos apresentam adaptações em seus sistemas meióticos. Em insetos, algumas aranhas e nematódeos, frequentemente há bivalentes funcionalmente telocinéticos, em que microtúbulos unem-se apenas às extremidades cromossômicas, apesar de proteínas do centrômero ocuparem toda extensão das cromátides (Figura 6a) (Mola e Papeschi, 2006; Král *et al.*, 2019; Leo *et al.*, 2020). Em plantas e alguns insetos, por exemplo, ocorre meiose invertida, em que inicialmente há segregação das cromátides-irmãs, e posteriormente há separação dos cromossomos homólogos (Figura 6b) (Heckmann *et al.*, 2014; Lukhtanov *et al.*, 2018); por último, em alguns animais e plantas, a formação dos quiasmas é completamente suprimida, caracterizando meiose aquiasmática (Marques e Pedrosa-Harand, 2016).

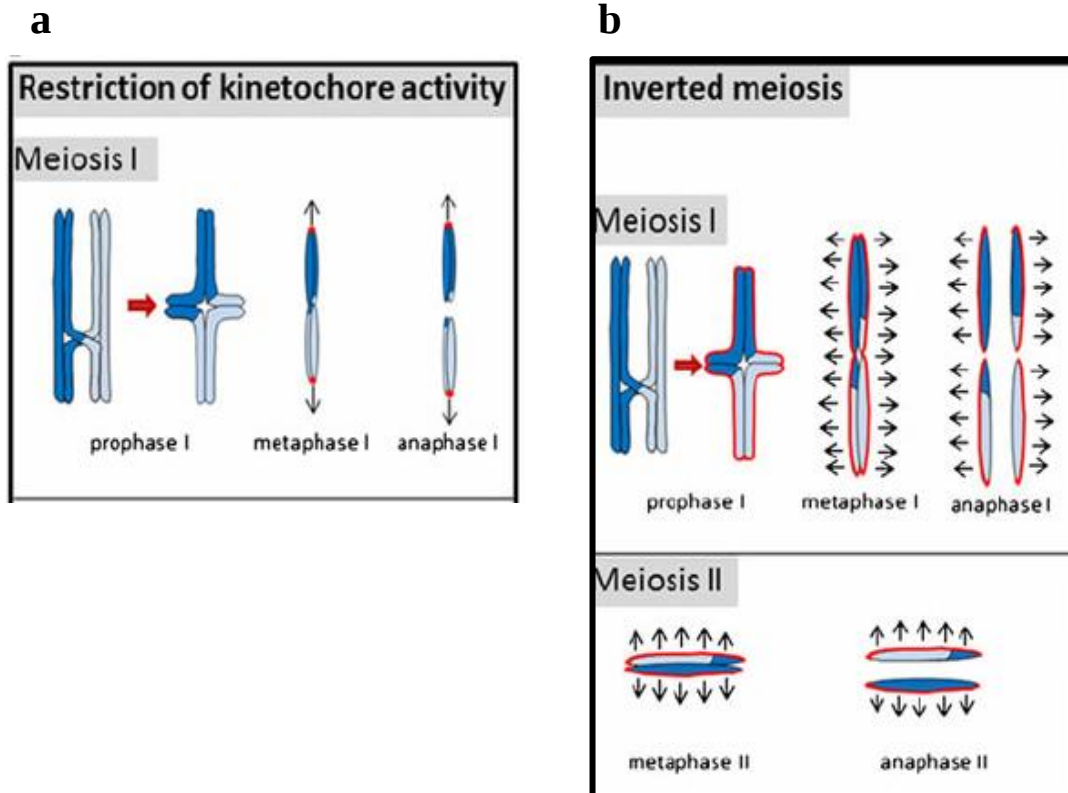


Figura 6: Adaptações meióticas em sistemas holocêntricos para evitar erros de disjunção em bivalentes cruciformes. (a) Restrição da atividade cinética às extremidades cromossômicas. (b) Meiose invertida. Adaptado de Melters *et al.* (2012).

1.3.MEIOSE AQUIASMÁTICA

Meiose aquiasmática é um fenômeno comum a diversos grupos de eucariotos, caracterizado pela ausência de quiasmas entre cromossomos homólogos durante o diplóteno (Figura 7). Nestes casos, citologicamente os bivalentes apresentam-se como duas hastes retilíneas e paralelas. Este tipo de meiose foi anteriormente descrito associado ao sexo heterogamético em plantas, tardígrados, crustáceos, insetos e aracnídeos, e em ambas as gônadas (testículo e ovário) de alguns anelídeos, platelmintos e moluscos hermafroditas (Altiero e Rebecchi, 2003; Cabral *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2017; Satomura *et al.*, 2019).

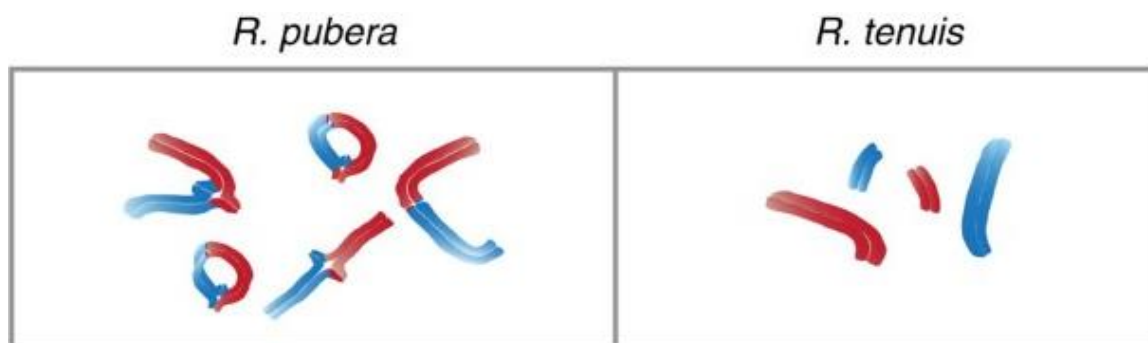


Figura 7: Representação esquemática de meiose quiasmática e aquiiasmática em plantas do gênero *Rhynchospora*. Notar a presença de quiasmas em *R. pubera* ($2n=10$) e ausência dos mesmos em *R. tenuis* ($2n=4$), cujos cromossomos permanecem como univalentes. Adaptado de Cabral *et al.* (2014).

O quiasma é uma das principais evidências da ocorrência de recombinação ou *crossing-over* durante a Prófase I, processo fundamental para geração de variabilidade genética entre as espécies. Sua formação está relacionada com indução de DNA *double-strand breaks* (DSBs) efetuadas pela enzima Spo11, durante o Leptóteno (Figura 8) (Moens *et al.*, 2007). Modificações epigenéticas na cromatina adjacentes às DSBs (como a inserção da variante γ H2AX) recrutam recombinases Rad51 e Dmc1 que se associam às extremidades quebradas e as conectam a fita de DNA homóloga (Gray e Cohen, 2016); este processo gera um heteroduplex (*Junção Holliday*), a fim de realizar o reparo de forma recíproca. Posteriormente, complexos de enzimas de reparo *mismatch* (MLH1, MLH3, MSH4 e MSH5) são recrutadas para estabilizar e resolver a *junção Holliday*, originando homólogos recombinantes (Moens *et al.*, 2007). A proteína MUS81, também atua na resolução da *Junção Holliday* através de um mecanismo distinto das enzimas citadas acima, realizando a formação de uma pequena fração de *crossing-over* (Hollingsworth e Brill, 2004). Dentre as DSBs formadas no Leptóteno, apenas uma pequena parte delas serão reparadas por recombinação homóloga, enquanto a maioria das quebras é reparada por mecanismos distintos do *crossing-over* (conversão gênica) (Gray e Cohen, 2016).

Não é possível afirmar que há ausência total de recombinação em todos os organismos que apresentam meiose aquiiasmática, uma vez que, até o presente momento, somente no afídeo *Myzus persicae* esta correlação foi verificada geneticamente através da análise de mapas de ligação baseados em microssatélites (Sloane *et al.*, 2001). Os processos moleculares que geram meiose aquiiasmática são pouco conhecidos e variáveis entre os grupos citados anteriormente, mas sabe-se que podem agir em quaisquer umas das etapas do processo de recombinação. Até o presente momento, apenas em espécies de Diptera há um padrão detalhado de genes envolvidos com a ausência de quiasmas em

machos. Em *Drosophila*, por exemplo, há perda de diversos genes importantes para o processo de recombinação (*hop2*, *mnd1*, *msh4* e *msh5*), e ganho de genes específicos do sexo masculino (*aust*, *mm*, *snm*, *aly*, *tomb* e *wuc*) que substituem as funções destes (Hawley, 2002; Kohl *et al.*, 2012).

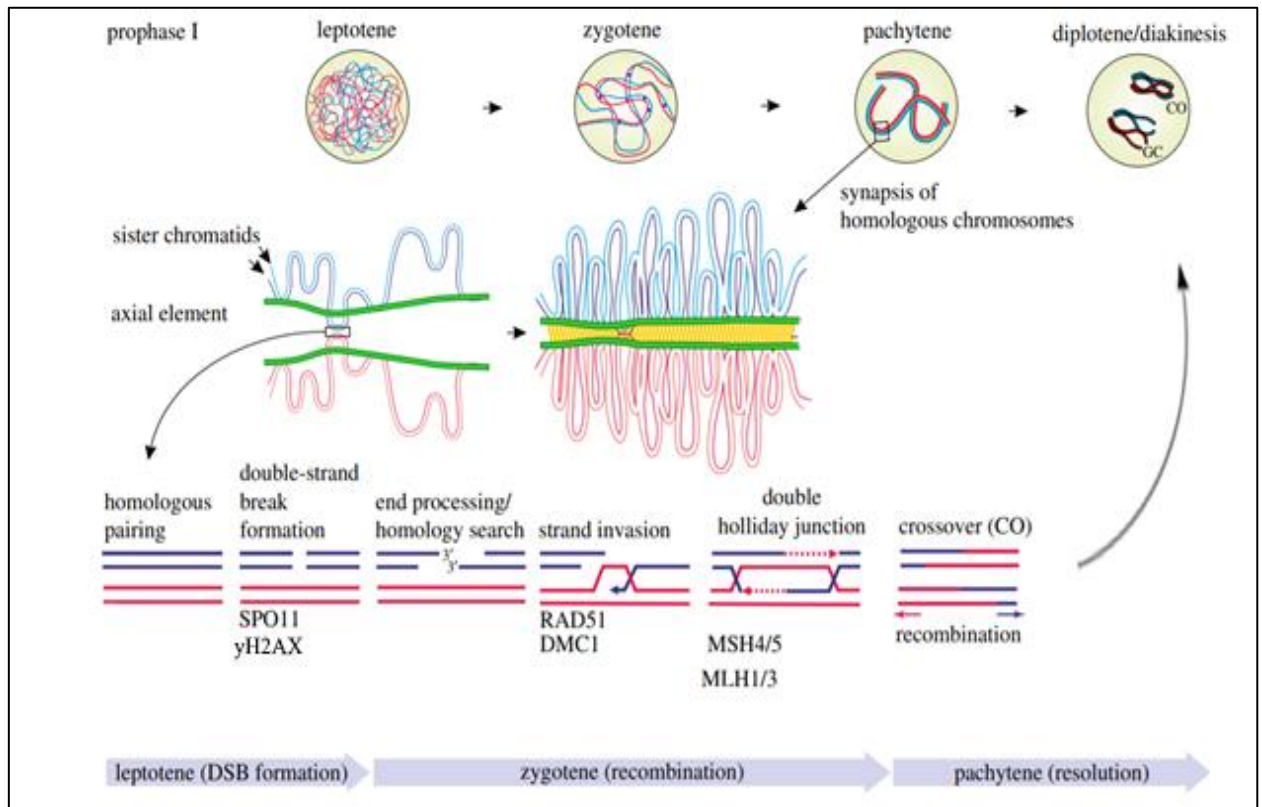


Figura 8: Processo de recombinação em eucariotos. As principais enzimas que atuam em cada etapa são mostradas na parte inferior da imagem. Modificado de Mirzaghaderi e Hörandl (2016).

Em certos organismos aquiasmáticos, como fêmeas de *Bombyx mori*, análises de microscopia eletrônica revelaram a presença de nódulos de recombinação iniciais durante o zigóteno (Holm e Rasmussen, 1980). Estes nódulos são basicamente compostos pelas recombinases Rad51 e Dmc1. A ocorrência de Rad51 também foi observada por imunocitogenética na planta aquiasmática *Rhynchospora tenuis* durante a Prófase I (Cabral *et al.*, 2014). Estes resultados podem ser indícios de que as etapas iniciais do processo de recombinação são preservadas mesmo durante meiose aquiasmática.

A ausência do quiasma pode trazer prejuízos à segregação dos cromossomos homólogos, uma vez que este atua na coesão do bivalente até a separação dos seus homólogos na Anáfase I. Por essa razão, organismos aquiasmáticos apresentam adaptações meióticas, que podem envolver o complexo sinaptonêmico, um conjunto de proteínas responsável pela sinapse (reconhecimento e união física) dos homólogos

durante o zigóteno; este complexo proteico é composto por dois elementos laterais que inicialmente se ligam aos eixos axiais de coesinas dos cromossomos homólogos, e posteriormente são unidos entre si por um elemento central (Figura 9) (Zickler, 2006). Durante o diplóteno, este complexo proteico se desorganiza e os bivalentes permanecem unidos por pontos de quiasmas. Em fêmeas de *Lepidoptera* e em outros insetos o complexo sinaptonêmico é mantido até fases tardias da Prófase I (Holm e Rasmussen, 1980). Em machos de *Diptera*, que não apresentam quiasmas e complexo sinaptonêmico, a sinapse dos homólogos e sua coesão até a Anáfase I é mantida por proteínas presentes em regiões de heterocromatina constitutiva e rDNAs 45S (Hawley, 2002). Em plantas aquiasmáticas do gênero *Luzula*, pontes constituídas por clusters de DNAs satélites terminais interligam os homólogos, permitindo sua segregação correta (Cabral *et al.*, 2014).

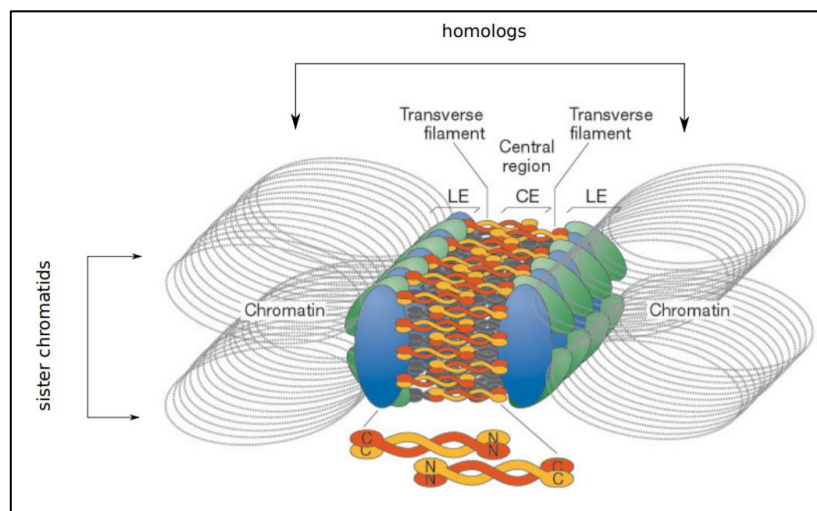


Figura 9: Estrutura do complexo sinaptonêmico. Notar os dois elementos laterais (LE) unidos a cromatina, e o elemento central (CE). Retirado de Popa (2010).

1.4.CITOGENÉTICA DE ESCORPIÕES

Análises citogenéticas em integrantes da Ordem Scorpiones foram realizadas apenas em 11 famílias (Tabela 1). Buthidae é a mais intensamente investigada e apresenta números cromossômicos relativamente baixos em detrimento as demais famílias (Schneider *et al.*, 2021). Em Buthidae, os cariótipos são constituídos de cromossomos holocêntricos, enquanto nas outras famílias apenas cromossomos monocêntricos foram observados até o presente momento (Schneider *et al.*, 2009b). Alta frequência de rearranjos estruturais do tipo fusão/fissão e translocações recíprocas foram registradas em

Scorpiones, e por essa razão, cariótipos com pares heteromórficos são comumente observados (Mattos *et al.*, 2013). Estas alterações cromossômicas também favorecem alta variação do número diploide em Scorpiones, especialmente em Buthidae, devido à natureza holocêntrica dos cromossomos. Entre as populações do butídeo *Tityus bahiensis*, por exemplo, o número de cromossomos pode variar de $2n = 5$ até $2n = 19$ (Schneider *et al.*, 2009a; Adilardi *et al.*, 2020). Alta diversificação do número diploide também foi observada em escorpiões portadores de sistemas monocêntricos, como observado para *Urodacus* (Shanahan, 1989b) e *Euscorpius* (Štundlová *et al.*, 2019).

Tabela 1: Resumo de dados citogenéticos da Ordem Scorpiones.

Família	Número de espécies analisadas	Número diploide (2n)	Morfologia Cromossômica
Buthidae	159	5-56	Holocêntrico
Bothriuridae	10	28-50	Monocêntrico
Chactidae	1	50	Monocêntrico
Chaerilidae	10	90-186	Monocêntrico
Euscorpiidae	16	46-112	Monocêntrico
Iuridae	1	Aproximadamente 100	Monocêntrico
Hormuridae	17	48-174	Monocêntrico
Scorpionidae	15	50-120	Monocêntrico
Scorpiopidae	19	48-147	Monocêntrico
Urodacidae	6	29-175	Monocêntrico
Vaejovidae	1	Aproximadamente 100	Monocêntrico

Fonte: Schneider *et al.*, (2021)

A presença de cromossomos sexuais heteromórficos em Scorpiones é rara. Até o presente momento, ocorrência do sistema XY foi proposta para *Hottentotta judaicus* (Buthidae), *Leiurus quinquestriatus* (Buthidae) e *Nebo hierichonticus* (Scorpionidae) baseada na existência de pares heteromórficos nos cariótipos de machos destas espécies (Qumsiyeh *et al.*, 2013; Qumsiyeh *et al.*, 2014). Adilardi *et al.* (2016) propuseram a presença de um sistema sexual múltiplo críptico no butídeo *Tityus confluens*; neste caso, a comparação citogenética de ambos os sexos e de embriões desta espécie, revelou que somente o cariótipo masculino apresenta pares heteromórficos decorrentes de translocações recíprocas durante a meiose, enquanto, cariótipos femininos são

constituídos apenas por pares homomórficos. Estes autores propuseram que este sistema de determinação sexual em *T. confluens* é derivado de um sistema XY ancestral, que evoluiu a partir de fusões e translocações em machos. Recentemente, a análise de populações sexuadas e partenogenéticas de *Tityus serrulatus*, demonstrou que machos possuem dois cromossomos portadores de sítios 45S rDNA, enquanto fêmeas apresentam apenas um, sugerindo um sistema ZZ/ZW para esta espécie (Lima *et al.*, 2020).

Os rearranjos cromossômicos citados anteriormente (translocações recíprocas, fusões e fissões) são comumente encontrados em heterozigose nas populações naturais de muitas espécies de Scorpiones (Shanahan, 1989b; Almeida *et al.*, 2017; Adilardi *et al.*, 2020). Consequências diretas de tais alterações são observadas durante os eventos da prófase I destes organismos, uma vez que são registradas anomalias no pareamento e sinapse dos homólogos, a exemplo de regiões assinápticas, estruturas similares a alças e alta frequência de heterosinapses (Shanahan, 1989b; Schneider *et al.*, 2009; Mattos *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2015). Além disso, quase todas os escorpiões analisados apresentaram extensas associações multivalentes durante a metáfase I, que podem envolver alguns ou todos os cromossomos do cariótipo (Schneider *et al.*, 2009b; Sadílek *et al.*, 2015; Mattos *et al.*, 2018). A configuração destas associações meióticas (números de bivalentes e de cadeias) também pode possuir variação interpopulacional, intrapopulacional ou mesmo intraindividual (Schneider *et al.*, 2009b; Adilardi *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017; Adilardi *et al.*, 2020). Estes comportamentos sinápticos anormais em Scorpiones são acompanhados por modificações no complexo sinaptonêmico. Em algumas espécies, por exemplo, são observados elementos laterais não sinapsados ou ausentes em algumas regiões, constituindo *gaps* (Shanahan e Hayman, 1990; Schneider *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2017). *Interlocks* também foram registrados durante a sinapse de duas espécies de escorpiões portadores de rearranjos estruturais heterozigotos (SCHNEIDER *et al.*, 2015). O estudo do complexo sinaptonêmico também tem auxiliado a definir com precisão o número de componentes de multivalentes.

Até o presente momento, a meiose feminina nestes artrópodes foi investigada em *Liocheles australasiae* (Yamazaki *et al.*, 2000), *Troglohrhopalurus translucidus* (Ubinski *et al.*, 2018), e *Zabius fuscus* (Adilardi *et al.*, 2015). Neste último, bivalentes unidos por estruturas similares a quiasmas foram observados. Em indivíduos machos a meiose é aquiasmática. Esta característica evita o problema de segregação meiótica decorrente do sistema holocêntrico destes animais (Marques e Pedrosa-Harand, 2016). De igual forma ao observado em outros artrópodes, nestes aracnídeos o complexo sinaptonêmico tende a

ser preservado até Metáfase I, substituindo o papel do quiasma na coesão dos bivalentes até sua separação na Anáfase I (Schneider *et al.*, 2015). A ausência de quiasmas em escorpiões também é importante para a ocorrência de segregação alternada dos cromossomos envolvidos nas cadeias meióticas (Mattos *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2017).

O conteúdo heterocromático dos cromossomos é variável entre as espécies desta Ordem. Em butídeos do gênero *Ananteris*, nenhum bloco de heterocromatina C positiva foi observado (Mattos *et al.*, 2013). Em espécies do gênero *Tityus*, pertencentes ao subgênero *Archaeotityus*, apenas foi descrito um bloco heterocromático em um par de cromossomos (Mattos *et al.*, 2013). Por sua vez, em *Tityus serrulatus*, a heterocromatina constitutiva é presente apenas em um cromossomo pequeno do cariótipo (Schneider e Cella, 2010). Em escorpiões portadores de sistemas monocêntricos, a heterocromatina é comumente visível na região pericentromérica (Shanahan, 1989b; Adilardi *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2009a). Em *T. obscurus* bandas C intersticiais foram observadas em cromossomos holocêntricos de tamanho extragrande em alguns citótipos, sugerindo pontos de fusões (Almeida *et al.*, 2017).

Estudos sobre organização genômica dos cromossomos de Scorpiones revelaram que os telômeros são compostos por repetições do pentanucleotídeo TTAGG, típico de artrópodes (Adilardi *et al.*, 2016; Šťáhlavský *et al.*, 2018). Apesar da alta ocorrência de fusões nesta ordem, sequências teloméricas intersticiais resultantes deste tipo de rearranjo não foram observadas em nenhuma espécie. Em relação ao rDNA 45S, esta sequência pode localizar-se na região terminal ou intersticial de um ou dois pares cromossômicos (Mattos *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2017; Šťáhlavský *et al.*, 2018). Recentemente, foi demonstrado que na família Buthidae, a posição intersticial do 45S rDNA é considerada basal, e que fissões podem ter originado a posição terminal desta sequência em integrantes mais filogeneticamente derivados desta família (Šťáhlavský *et al.*, 2020).

Outras sequências repetitivas foram localizadas *in situ* apenas no escorpião amazônico *Tityus obscurus* (Almeida *et al.*, 2017); nesta espécie, genes da Histona H3, juntamente com DNAs altamente repetitivos (C₀t-1 DNA), são localizados na região terminal de todos os cromossomos do cariótipo, enquanto o U2 snDNA foi mapeado na região intersticial do par 1. Esta organização é típica de cromossomos holocêntricos, nos quais sequências repetitivas tendem a se localizar nas extremidades, em detrimento a sequências de cópia única (Marques e Pedrosa-Harand, 2016). O padrão obtido com a hibridização da sonda C₀t-1 DNA também sugere ausência de sequências repetitivas

associadas ao centrômero nesta espécie (Almeida *et al.*, 2017). Em relação a elementos transponíveis, o único mapeado em escorpiões foi o *Mariner*, que mostrou cópias ao longo dos cromossomos de *T. obscurus*, bem como, organização compartimentalizada na heterocromatina em um citótipo desta espécie (Almeida *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Estudar a organização genômica, comportamento meiótico e evolução dos cromossomos holo e monocêntricos de escorpiões amazônicos.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar citogeneticamente escorpiões das famílias Buthidae, Hormuridae e Chactidae da fauna amazônica;
- b) Descrever a organização espacial, expressão e dinâmica temporal de proteínas meióticas relacionadas à sinapse e recombinação durante prófase I em Buthidae e Hormuridae;
- c) Analisar a distribuição de modificações epigenéticas durante meiose I em cromossomos holocêntricos de escorpiões Buthidae;
- d) Realizar mapeamento cromossômico e investigar a dinâmica evolutiva de diferentes classes de DNAs repetitivos em escorpiões Buthidae, Chactidae e Hormuridae.
- e) Propor hipóteses de evolução cariotípica em Buthidae, Hormuridae e Chactidae.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRA

Os espécimes utilizados para o presente estudo foram coletados em diversas localidades do Estado do Pará, Brasil, discriminadas na tabela 2. Este estudo foi conduzido segundo as recomendações éticas para uso e manejo de animais, mediante protocolo aprovado por Comitê de Ética em Pesquisa Experimental Animal (licença 68-2015) e autorização para coleta e transporte expedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (número da licença 42642-5). O método de coleta foi a busca ativa noturna com auxílio de lanterna de luz ultravioleta. Os espécimes foram identificados a nível de espécie segundo chave taxonômica descrita por Lourenço (2002), e tombados na coleção do Laboratório de Entomologia Médica e Artrópodes Peçonhentos, Núcleo de Medicina Tropical, UFPA.

Tabela 2: Informações gerais sobre a amostra coletada no presente estudo.

Família	Espécie	N	Localidade	Coordenada Geográfica
	<i>Tityus silvestris</i>	1♂, 1♀, 14 embriões	Manaus/AM	3° 06' 10"S/59°58'42"O
		1♂, 1♀	Mocajuba	2°38'21"S/49°30'38"O
		8♂	Rurópolis	4°06'02"S/54°54'34"O
		4♂, 6♀, 20 embriões	Santarém	1°24'16"S/48°27'12"O
		4♂, 4♀, 12 embriões	Belém	1°28'06"S/48°26'24"O
	<i>Tityus metuendus</i>	5♂, 1♀, 17 embriões	Óbidos	1°54'16"S/55°31'12"O
		2♂, 1♀, 14 embriões	Parintins	2°38'15"S/56°43'46"O
		1♂, 1♀	Curuçá/PA	0°46'40"S/47°49'40"O

	<i>Tityus maranhensis</i>	1♂	Marapanim/PA	0°56'12"S/47°38'39"O
	<i>Neochactas parvulus</i>	2♂, 1♀, 13 embriões	Óbidos/PA	1°54'16"S/55°31'12"O
	<i>Brotheas amazonicus</i>	1♂, 1♀, 16 embriões	Manaus/AM	3° 06' 10"S/59°58'42"O
Chactidae		7♂, 5♀, 9 embriões	Parintins/AM	2°38'15"S/56°43'46"O
	<i>Brotheas silvestris</i>	3♂, 1♀, 19 embriões	Óbidos/PA	3° 06' 10"S/59°58'42"O
	<i>Brotheas paraensis</i>	2♂, 1♀, 12 embriões	Óbidos/PA	3° 06' 10"S/59°58'42"O
Hormuridae	<i>Opisthacanthus cayaporum</i>	6♂, 1♀, 10 embriões	Conceição do Araguaia	8°11'17"S/49°27'10"O

3.2.OBTENÇÃO DE PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS DE GÔNADAS

Para obtenção de preparações cromossômicas foram utilizadas gônadas de indivíduos adultos, conforme o protocolo descrito a seguir:

- Remover gônadas e hipotonizar em solução salina hipotônica de KCl 0,075M, por 30 minutos.
- Fixar em solução Carnoy (proporção 3 metanol: 1 ácido acético).
- Dissociar fragmentos de gônadas em ácido acético 50%, com auxílio de agulhas.
- Espalhar suspensão de células em lâminas com auxílio de etanol, sobre placa aquecida à 45°C.
- Corar as lâminas com Giemsa 5%, em solução tampão bifosfato, pH 6,8.

3.3.OBTENÇÃO DE PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS DE EMBRIÕES

- Em fêmeas grávidas, cada embrião foi utilizado separadamente para obtenção de cromossomos mitóticos, seguindo a metodologia abaixo:
- Macerar embriões em 6 mL de solução de Hanks (pH 6.0) com auxílio de seringa de vidro.

- c) Retirar membranas e restos de tecidos não macerados.
- d) Centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos, e descartar sobrenadante.
- e) Hipotonizar em solução salina hipotônica de KCl 0,075M, por 40-50 minutos.
- f) Centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos, e descartar o sobrenadante.
- g) Fixar em solução Carnoy (proporção 3 metanol: 1 ácido acético).
- h) Espalhar suspensão de células em lâminas, sobre placa aquecida à 45°C.
- i) Corar as lâminas com Giemsa 5%, em solução tampão bifosfato, pH 6,8.

3.4.ORGANIZAÇÃO E MONTAGEM DOS CARIÓTIPOS

Medidas cromossômicas foram realizadas no software DRAWID (Kirov *et al.*, 2017). Para esta análise foram selecionadas cinco metáfases de cada citótipo. O tamanho cromossômico foi expresso como uma porcentagem relativa ao conjunto diploide total. A determinação da morfologia cromossômica seguiu a classificação de Levan *et al.* (1964).

3.5.BANDEAMENTO C

O bandejamento C foi realizado de acordo com Sumner (1972), com as adaptações descritas a seguir:

- a) Desnaturar cromossomos em solução de BaOH à 6%, à 60°C, durante 15 segundos
- b) Interromper a ação do BaOH com solução de HCl 1N, por 30 segundos, à 60°C.
- c) Mergulhar lâminas em solução salina 2XSSC à 60°C, por 20 minutos
- d) Corar com Giemsa 5% (em solução tampão bifosfato, pH 6,8), durante 3 minutos.

3.6.OBTENÇÃO DE COMPLEXOS SINAPTONÊMICOS

A obtenção de complexos sinaptonêmicos foi realizada de acordo com Viera *et al.* (2009).

- a) Remover gônadas e mantê-las em solução de Hanks (pH 6.0).
- b) Macerar em 200 µL de Sacarose 100 mM com auxílio de agulhas, até formarem uma suspensão de células.
- c) Espalhar aproximadamente 20 µL da suspensão celular sobre lâminas revestidas com paraformaldeído 2% (pH 8,2).
- d) Incubar as lâminas em câmara úmida durante 2 horas.

- e) Lavar a lâmina em Photo-Flo (pH 8.2) por cinco minutos.
- f) Armazenar as lâminas em -80°C.

3.7.ANTICORPOS

Os anticorpos primários utilizados na presente tese e suas respectivas diluições em PBS foram:

- a) Coelho anti-SMC3 (Abcam, ab9263) em 1:200
- b) Coelho anti- γ H2AX (Abcam, ab2893) em 1:50
- c) Coelho anti-Rad51 (Santa Cruz Biotechnology, H92 sc-8349) em 1:50
- d) Coelho anti-H3K27me3 (Cell Signal, 9733S) em 1:50
- e) Coelho anti-H3K27ac (Millipore, 07-360) em 1:50;
- f) Coelho anti-H3K4me3 (Millipore, 07-473) em 1:50
- g) Coelho anti-H3K9ac (Millipore, 07-352) em 1:50
- h) Camundongo anti- α -tubulina (Santa Cruz, sc-23948) em 1:50
- i) Camundongo anti-ATR (Santa Cruz, SC-515173) em 1:50

3.8.IMUNOCITOGENÉTICA

Para imunodeteção de proteínas cromossômicas foi adotado o protocolo descrito por Viera *et al.* (2009).

- a) Lavar lâminas três vezes em PBS 1x (cinco minutos cada), a temperatura ambiente.
- b) Realizar bloqueio com solução de BSA 5% (contendo Triton-20 0,01%, e PBS1x) a temperatura ambiente, por 30 minutos.
- c) Incubar lâminas com anticorpos primários por 2h (37°C) ou 18h (a 4°C), em câmara úmida.
- d) Lavar lâminas três vezes em PBS 1x (cinco minutos cada) a temperatura ambiente
- e) Incubar lâminas com anticorpos secundários correspondentes, diluídos em PBS-Tween na proporção 1:100, a 37°C, durante 2 horas.
- f) Contracorar cromossomos com antifading Vectashield, contendo DAPI.

3.9.CITOGENÉTICA MOLECULAR

3.9.1. Extração de DNA genômico

O DNA genômico de *Tityus metuendus*, *Tityus obscurus*, *Neochactas parvulus* e *Brotheas amazonicus* foi isolado através do kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (SIGMA), segundo as normas do fabricante.

- a) Macerar 25 mg de tecido muscular em um tubo eppendorf de 1,5 mL.
- b) Adicionar 180 µL de Solução de Lise T e 20 µL de Proteinase K; incubar por 2 a 4 horas, a 55°C.
- c) Adicionar 200 µL de Solução de Lise C à amostra e agitar em vórtex por 15 segundos.
- d) Incubar a 70°C por 10 minutos.
- e) Adicionar 500 µL de Solução de Preparação de Coluna a cada coluna de ligação e centrifugar por 12000 x g por 1 minuto.
- f) Adicionar 200 µL de Etanol (95 a 100%) ao lisado e agitar em vórtex por 5-10 segundos.
- g) Adicionar o lisado aos tubos contendo as colunas e centrifugar a 6.500 x g por 1 minuto.
- h) Descartar o tubo de coleta e transferir a coluna para um novo tubo.
- i) Adicionar 500 µL de Solução de lavagem a coluna e centrifugar a 6.500 x g por 1 minuto.
- j) Descartar o tubo de coleta e transferir a coluna para um novo tubo.
- k) Adicionar 500 µL de Solução de lavagem a coluna e centrifugar a 12000 x g por 1 minuto.
- l) Descartar o tubo de coleta e transferir a coluna para um novo tubo.
- m) Adicione 25-200 µL de Solução de Eluição a coluna e centrifugar a 6.500 x g por 1 minuto.
- n) Armazenar a -20°C.

A qualidade do DNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1%, e quantificação em espectrofotômetro de massas. Após isso, o DNA extraído foi utilizado para amplificação de DNAs repetitivos e de sequências mitocondriais utilizadas para DNA barcode.

3.9.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As sequências U2 snRNA, Histona H3 e repetições teloméricas TTAGG foram isoladas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando o conjunto de iniciadores descritos na tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores utilizados no isolamento de sequencias repetitivas em escorpiões

Tabela 1Iniciadores utilizados no isolamento de sequencias repetitivas em escorpiões

Sequência	Iniciador	Temperatura de Anelamento	Referência
U2 snRNA	F:5'-TCTCGGCCT(AT)(AT)TGGC TAA-3' R: 5'-G(AC)GGTA(GC)TGCAATAC CGG-3'	53°C	Colgan (1998)
Repetições teloméricas	F:5'-TTAGG ₍₅₎ -3' R:5'-CCTAA ₍₅₎ -3'	55°C	Sahara <i>et al.</i> (1999)
Transposon <i>Mariner</i>	F:5'-ATCTGRAGCTATAAATCACT R:5'-CAAAGATGTCCTTGGGTGTG	45°C	Lampe <i>et al.</i> (2003)

Cada reação de PCR foi realizada em volume de 25 µL, e foi constituída de:

- a) 16,25 µL de água estéril
- b) 2,5 µL de tampão da Taq Polimerase 10x
- c) 2 µL de DNTP mix (2mM)
- d) 1 µL de DNA genômico(100ng)
- e) 1 µL de MgCl₂
- f) 1 µL de primer foward (10mM)
- g) 1 µL de primer reverse (10mM)
- h) 0,25 µL de Taq Polimerase

As configurações termais de cada etapa da PCR foram:

- a) 94°C por 5 minutos

- b) 94°C por 1 minuto
 - c) 45°C-56°C (variável para cada iniciador) por 1 minuto
 - d) 72°C por 2 minutos
 - e) 72°C por 10 minutos
 - f) 4°C hold
- } 35x

Ao final de cada experimento de PCR, os produtos obtidos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1%. Em seguida, eles foram utilizados para sequenciamento ou produção de sondas para *hibridização in situ fluorescente* (FISH).

Obtenção da sequência 45S rDNA

Para obtenção da sonda 45S rDNA, foi utilizado o plasmídeo pTa71, que contém os genes 5.8S, 18S, 28S e seus respectivos espaçadores intergênicos, isolados do genoma de *Triticum aestivum* (GERLACH e BEDBROOK, 1979).

3.9.3. Produção de sondas

Sondas foram marcadas por *nick translation* com digoxigenina-14-dUTP ou biotina-11-dATP (Roche, Mannheim, Germany). Em ambos os casos, a reação foi composta de:

- a) 2,5 µL de DNTP mix
- b) 2,5 µL de mix da Enzima
- c) 1000ng de produto da PCR
- d) Volume de água para completar uma reação de 25µL

As configurações termais do termociclador foram: 1 ciclo a 16°C por 90 minutos, e 1 ciclo a 65°C por 10 minutos. Ao final do primeiro ciclo 1 µL de Stop buffer foi adicionado a reação.

3.9.4. Hibridização *in situ* fluorescente

Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com Cabral-de-Mello *et al.* (2010), com poucas modificações.

- a) Tratar lâminas com uma solução de RNase à temperatura de 37°C, por 1 hora.
- b) Lavar 3 vezes em 2xSSC (1 minuto cada) a temperatura ambiente.
- c) Tratar as lâminas em solução de pepsina 1% a 37°C, por 10 minutos.
- d) Lavar as lâminas em PBS1X, por 5 minutos, a temperatura ambiente.

- e) Fixar as lâminas em paraformaldeído 4% por 10 minutos, em temperatura ambiente.
- f) Lavar as lâminas em PBS 1X como descrito anteriormente.
- g) Desidratar lâminas em bateria de álcoois 70% (2 vezes por 2 minutos), 90% (2 vezes por 2 minutos) e 100% (1 vez por 4 minutos).
- h) Desnaturar sondas a 100°C, em solução de hibridização (composta de 2XSSC, formamida 50%, dextrano sulfato e)
- i) Adicionar a solução de hibridização com sonda sobre a lâmina e cobrir com lamínula.
- j) Desnaturar cromossomos a 70°C, por 1 a 2 minutos.
- k) Incubar em câmara úmida, overnight, a 37°C.
- l) Lavar em solução 2xSSC (por 2 minutos) e 4xSSC-Tween (por 2 minutos), a 40°C.
- m) Incubar lâminas com anti-digoxigenina-FITC ou avidina-CY3, a 37°C, por 30 minutos.
- n) Lavar em solução 4xSSC-Tween 3 vezes, por 2 minutos cada, a temperatura ambiente.
- o) Adicionar 7 µL de antifading Vectashield (Vector) contendo DAPI sobre as lâminas
- p) Cobrir com lamínula de vidro e analisar ao microscópio de epifluorescência

3.10. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE RECOMBINAÇÃO

3.10.1. Extração de RNA

Foram utilizados 4 testículos, 4 ovários e 4 embriões de *Tityus silvetris*. Amostras de RNA foram isolados através do uso de Trizol® Reagent (Thermo Fisher Scientific), conforme as informações do fabricante descritas a seguir.

- a) Remover gônadas e embriões e imediatamente mantê-las em 3 mL de solução de RNA *Later*.
- b) Adicionar 1 mL de Trizol® Reagent para cada 50-100mg de amostra de tecido.
- c) Homogeneizar os tecidos com uso de homogeneizador portando *beads* magnéticas, por 10 minutos.
- d) Incubar a amostra por homogeneizado por 5 minutos a temperatura ambiente.

- e) Agitar vigorosamente por 15 segundos
- f) Incubar por 2-3 minutos em temperatura ambiente
- g) Centrifugar a amostra por 12.000 x g por 15 minutos a 4°C.
- h) Remover a fase aquosa da amostra, e colocá-la em um novo tubo.
- i) Adicionar 0,5 mL de isopropanol 100% para cada 1 mL de Trizol® Reagent utilizado na homogeneização.
- j) Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos
- k) Centrifugar a amostra por 12.000 x g por 15 minutos a 4°C.
- l) Remover o sobrenadante do tubo.
- m) Lavar o pellet com 1 mL de etanol 75% para cada 1 mL de Trizol® Reagent utilizado na homogeneização.
- n) Centrifugar por 7500 x g por 5 minutos a 4°C.
- o) Secar ao ar por 5-10 minutos.
- p) Ressuspender o pellet de RNA em água livre de RNase.
- q) A qualidade do RNA extraído foi verificada através da quantificação em espectrofotômetro de massas. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I para remover quaisquer moléculas de DNA contaminante.

3.10.2. Transcrição Reversa

A transcrição reversa para produção de cDNA foi realizada através do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription da Applied Biosystems. Para cada amostra foi utilizada uma reação com volume final de 20 µL, contendo os seguintes componentes:

- a) 2 µL de Tampão RT 10x
- b) 0,8 µL de dNTP mix 25x (100 mM)
- c) 2,0 µL de Random primers RT 10x
- d) 1 µL de Transcriptase Reversa
- e) 4,2 µL de água livre de RNase
- f) 10 µL de amostra de RNA

As configurações termais da reação foram as seguintes:

- a) 25°C por 10 minutos
- b) 37°C por 120 minutos
- c) 85°C por 5 minutos
- d) Hold 4°C

Após finalizar a RT, quantificar em espectrofotômetro e diluir a amostra de cDNA para obter concentração de 4 ng/μL.

3.10.3. PCR quantitativa

Para PCR quantitativa foram utilizados os conjuntos de iniciadores listados na tabela 4, desenhados a partir sequencias dos genes MHL3, MLH1, MSH5 e MUS81 (envolvidos na formação do *crossing-over*) de aracnídeos depositados no Genbank. O gene da β-Actina foi utilizado com endógeno, para normalizar a expressão relativa dos demais (Guo *et al.*, 2018).

Tabela 4: Dados gerais sobre os iniciadores utilizados para PCR quantitativa.

Gene	Iniciador	Tm (°C)	Tamanho do produto amplificado
MLH1	F:5'-GATAGCGAGGAGAGTGGATGG-3'	59,5	88 pb
	R: 5'-CCGCCTTTGTCTGTAGGAAATC-3'	59,3	
MHL3	F:5'-CCTCTGCCTTCCGAAGTTGTT-3'	60,5	118 pb
	R: 5'-CGCAAACATTCGTAGCAAAAGC-3'	59,9	
MSH5	F:5'-GCGGGACCTAACGAACATTC-3'	59	117 pb
	R: 5'-GATGTCAACGGGCAACTCG-3'	59,2	
MUS81	F:5'-CGTACCTGGATCGGGAAGC-3'	59,9	161 pb
	R:5'-AAGCAGTGTAATGGCTACCAGG-3'	60,4	
β-Actina	F:5'-TGCGGTGGACAATGGAAGG-3'	62°C	109 pb
	R:5'-GTCTGGATTGGTGGCTCTATCT-3'	60°C	

As reações de PCR quantitativa foram realizadas utilizando-se o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega) em um volume final de 15 μL.

- 7,5 μL de Mix SYBR Green
- 0,6 μL de primer forward (400 nM)
- 0,6 μL de primer reverse (400 nM)
- 5,8 μL de água estéril
- 0,5 μL de cDNA

As configurações termais da PCR quantitativa foram:

- | | |
|--|-------|
| <ol style="list-style-type: none"> 95°C por 10 minutos 95°C por 15 segundos 60°C por 1 minuto | } 40x |
|--|-------|

A mensuração dos níveis de expressão foi realizada no sistema Step One Plus (Life). Os dados foram normalizados usando-se o programa Q-Gene (SIMON, 2003).

3.11. ANÁLISE FILOGENÉTICA

DNA genômico de dez indivíduos de *Tityus metuendus* pertencentes às populações Óbidos/PA e Parintins/AM (cinco de cada) foi extraído para isolamento de sequências mitocondriais (16S rDNA e Citocromo Oxidase I-COI), utilizando o conjunto de iniciadores descritos por Ojanguren-Affilastro *et al.* (2017), discriminados na tabela 5.

Tabela 5: Iniciadores utilizados para DNA barcode.

Sequência	Iniciador	Temperatura de anelamento	Tamanho do produto amplificado
COI	F5'-CAACATTTATTTTGATTTTGG-3'	50-53°C	330 pb
	R5'-GATATTAATCCTAAAAAATGTTGAGG-3'		
16S rDNA	F5'-CGATTTGAACTCAGATCA-3'	52-55°C	654 pb
	R5'-GTGCAAAGGTAGCATAATCA-3'		

Cada reação de PCR foi realizada com volume final de 25 µL. As concentrações e quantidade de cada reagente utilizado foram:

- 16,25 µL de água estéril
- 2,5 µL de tampão da Taq Polimerase 10x
- 2 µL de DNTP mix (2mM)
- 1 µL de DNA genômico(100ng)
- 1 µL de MgCl₂
- 1 µL de primer forward (10mM)
- 1 µL de primer reverse (10mM)
- 0,25 µL de Taq Polimerase

As configurações termais da PCR foram as seguintes:

- a) 94°C por 5 minutos
 - b) 94°C por 1 minuto
 - c) 50°C-56°C por 1 minuto
 - d) 72°C por 2 minutos
 - e) 72°C por 10 minutos
 - f) Hold 4°C
- } 35x

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. Após isso, cada produto de PCR foi enviado para sequenciamento Sanger, utilizando a plataforma AB 3500. Cada sequência foi analisada na ferramenta BLASTN, disponível no website NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmar sua identidade e similaridade (acima de 95%). Sequências de *Tityus obscurus* (espécie relacionada a *T. metuendus*) foram obtidas no banco de dados Nucleotide do NCBI (ver tabela 2) e adicionadas para enraizar a árvore filogenética. Em seguida, elas foram alinhadas de forma automática usando Clustal W presente no software BioEdit (Hall, 1999). O alinhamento foi corrigido manualmente. A escolha do modelo evolutivo mais apropriado foi realizada no software JModeltest 2.1.10 (Posada, 2008). Topologias foram construídas pelo método de máxima verossimilhança (MV) no software PhyML 3.0 (Guidon *et al.*, 2010), utilizando os modelos de substituição nucleotídica TIM2+I para COI e TIM1+I+G para 16S rRNA, com Bootstrap baseado em 1000 pseudoréplicas (Felsenstein, 1985). Inferência Bayesiana (IB) foi realizada no software MrBayes 3.2.7 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001) utilizando amostragem “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC) para cada gene separado, realizando 4 corridas simultâneas (1 fria e 3 quentes), cada uma com 107 gerações. O modelo HKY+I foi selecionado para IB de ambos os genes COI e 16S rRNA. Valores de suporte nodal foram avaliados com base nas probabilidades a posteriori. MEGA-X foi utilizado para cálculo de distâncias genéticas entre os grupos estudados, com base no modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros (Tamura *et al.*, 2013).

3.12. MORFOMETRIA

Análise morfométrica foi realizada em 28 espécimes machos de *T. metuendus* provenientes de diferentes localidades da região Amazônica. Fêmeas foram excluídas da análise em virtude da baixa amostragem. Eles foram classificados previamente em 4 grupos segundo a procedência: Pará, Amazonas, Rondônia e Acre

(Tabela 1). Medidas foram tomadas nos segmentos do lado direito dos indivíduos, e obtidas através do uso de um paquímetro digital (expressas em milímetros), sendo cada uma delas realizadas três vezes, com média posteriormente calculada. As mensurações foram: comprimento do fêmur do pedipalpo (FC); largura do fêmur do pedipalpo (FL); comprimento da tíbia do pedipalpo (TC); largura da tíbia do pedipalpo (TL); comprimento da quela do pedipalpo (QC); largura da quela do pedipalpo (QL); comprimento do dedo móvel do pedipalpo (DMC); comprimento do quarto segmento metassomal (MET4C); largura do quarto segmento metassomal (MET4L); comprimento do quinto segmento metassomal (MET5C); largura do quinto segmento metassomal (MET5L); comprimento da carapaça (CARC); largura posterior do carapaça (CARLP). Após isso, foram calculadas 15 proporções morfométricas entre as mensurações obtidas (tabela 2). Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de funções discriminantes (FDA) foram realizadas no *software* IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp. Released, 2013) para determinar as proporções morfométricas que explicam a maior parte da variação entre os grupos, e se elas são hábeis para distingui-los. Caracteres merísticos, como contagem do número de dentes do pente direito e de número de séries do dedo móvel do pedipalpo direito, foram analisados através de estereomicroscópio.

4. RESULTADOS

Os resultados da presente tese foram distribuídos em seis capítulos (artigos), organizados na seguinte sequência:

- **Capítulo 1:** Evidências genéticas e morfológicas apoiam a existência do complexo de espécies *Tityus metuendus* (Scorpiones, Buthidae)
- **Capítulo 2:** Diversidade cariotípica e dinâmica genômica de sítios 45S rDNA em escorpiões *Brotheas* (Scorpiones, Chactidae) da Amazônia Brasileira
- **Capítulo 3:** Microcromossomos em Scorpiones? O caso do cariótipo bimodal de *Neochactas parvulus* (Chactidae)
- **Capítulo 4:** Meiosis in the scorpion *Tityus silvestris*: new insights into achiasmatic chromosomes
- **Capítulo 5:** Meiose aquiasmática em *Tityus* (Scorpiones, Buthidae): comportamento meiótico de multivalentes e expressão de genes de reparo *mismatch*
- **Capítulo 6:** Sequências teloméricas intersticiais em *Opisthachantus cayaporum* (Scorpiones, Hormuridae) são importantes para o pareamento meiótico

CAPÍTULO 1: Evidências genéticas e morfológicas apoiam a existência do complexo de espécies *Tityus metuendus* (Scorpiones, Buthidae)

Bruno Rafael Ribeiro de Almeida¹; Renata Coelho Rodrigues Noronha¹; Pedro Pereira de Oliveira Pardal²; Marlyson Jeremias Rodrigues da Costa¹; Stella Miranda Malcher¹; Cleusa Yoshiko Nagamachi¹; Julio Cesar Pieczarka¹

¹Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Avenida Augusto Corrêa, nº01, 66075-900, Belém, Pará, Brasil.

² Laboratório de Entomologia Médica e Animais Peçonhentos, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Avenida Generalíssimo Deodoro, nº 92, 66055-240, Belém, Pará, Brasil.

***Corresponding author:** Julio Cesar Pieczarka

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Campus do Guamá

Av. Perimetral, s/n. Guamá

66075-900 Belém – Pará, Brazil

E-mail: juliopieczarka@gmail.com

RESUMO

Tityus metuendus Pocock, 1897 (Scorpiones, Buthidae) é uma espécie de grande importância médica, com distribuição geográfica no Peru e no norte do Brasil, sendo neste último amplamente encontrado nos estados Amazonas, Pará, Roraima, Rondônia, Acre e Mato Grosso. O objetivo do presente estudo foi verificar a existência de diferenciação morfológica e genética entre duas populações alopátricas de *T. metuendus*, provenientes de duas localidades da Amazônia brasileira, Óbidos, Pará (1°54'16"S/55°31'12"O) e Parintins, Amazonas (2°38'15"S/56°43'46"O), combinando dados moleculares, citogenéticos e morfológicos. Análise multivariada mostrou que estas populações são distintas quanto ao aspecto morfométrico, e que também divergem em relação a indivíduos de *T. metuendus* provenientes de outras regiões da Amazônia (Acre e Rondônia). A amostra de Óbidos apresentou cariótipos com $2n = 18$, três clusters 45S rDNA, e bandas C terminais nos pares 1, 2, 4, 7 e 8 (citótipo A), enquanto espécimes de Parintins mostraram $2n = 12$, quatro clusters 45S rDNA, e bandas C terminais/intersticiais nos pares 1, 2, 3, 4 e 5 (citótipo B). Análise filogenética utilizando dados moleculares revelou que estes citótipos constituem clados distintos, apoiados por alto valor de *bootstrap* e probabilidades *a posteriori*, com divergência genética de 10,5% e 0,6% entre eles com relação aos genes COI e 16S rDNA, respectivamente. Em conclusão, nossos dados confirmam que *T. metuendus* não é um táxon monotípico e que os citótipos A e B correspondem a duas espécies crípticas distintas.

Palavras-chave: *Tityus metuendus*, diferenciação genética, cromossomos holocêntricos, vicariância

1. INTRODUÇÃO

O escorpionismo é considerado um sério problema de saúde pública no Brasil. Em 2019, foram notificados mais de 150.000 casos de envenenamento por escorpiões em todo território nacional (Brasil, 2019). A maior parte dos acidentes envolve o gênero *Tityus*, de grande importância médica na América do Sul (Monteiro *et al.*, 2019; Torrez *et al.*, 2019).

Tityus abrange cerca de 222 espécies, com ocorrência desde a Argentina Central até a República Dominicana (Lourenço, 2015; Rein, 2021). Recentes estudos têm

demonstrado que a diversidade deste táxon é subestimada (Kovařík *et al.*, 2015; Román *et al.*, 2018; Moreno-González *et al.*, 2019; Borges *et al.*, 2020). Em virtude da alta diversidade e ampla distribuição geográfica, poucas revisões foram realizadas em integrantes deste gênero nos últimos anos (Moreno-González *et al.*, 2019). Ademais, a taxonomia de *Tityus* é de difícil realização, uma vez que algumas espécies apresentam variações geográficas em relação a caracteres morfométricos e padrões de coloração corporal (Lourenço, 2002, 2015; De Souza *et al.*, 2009). Variação morfológica entre indivíduos do mesmo sexo também foi descrita recentemente (Moreno-González *et al.*, 2019). Em muitos casos, a distribuição geográfica é o único fator de diagnóstico taxonômico entre estas (Lourenço, 2002). Estes fatos dificultam estudos clínicos e epidemiológicos sobre o escorpionismo em certas regiões, bem como a implantação eficiente de programas de controle deste agravo (Monteiro *et al.*, 2019). Assim, há necessidade de análises que permitam uma identificação taxonômica precisa das espécies de *Tityus*, especialmente daquelas de maior importância médica.

Estudos genéticos apresentam grande relevância para identificação molecular de escorpiões, bem como para compreender os processos biogeográficos que contribuíram para a história evolutiva destes aracnídeos (Ozkan *et al.*, 2010; Habel *et al.*, 2012; Quijano-Ravell *et al.*, 2019). Em *Tityus*, os genes mitocondriais 16S rRNA e Citocromo Oxidase I (COI) têm sido úteis para inferir as relações filogenéticas de parte das espécies deste gênero, além de permitir a descoberta de complexos de espécies crípticas (Borges *et al.*, 2010; Ojanguren-Affilastro *et al.*, 2017; Román *et al.*, 2018). Adicionalmente, compreender a estrutura genética das populações de escorpiões pode revelar eventos de especiação, que influenciam nas variações geográficas da composição química de venenos, e consequentemente na sintomatologia dos acidentes (Abdel-Rahman *et al.*, 2009; Guerrero-Vargas *et al.*, 2012; Pardal *et al.*, 2014a). Em alguns casos, a associação de sequências de DNA e dados cariotípicos tem promovido uma melhor compreensão da diversidade genética em *Tityus*. A descrição de *Tityus curupi* ($2n = 32$), bem como sua distinção de *Tityus uruguayensis* ($2n = 31$), por exemplo, foi corroborada pela combinação de métodos citogenéticos e moleculares (Ojanguren-Affilastro *et al.*, 2017). Assim, o uso de múltiplas análises genéticas e morfológicas são excelentes ferramentas para sistemática deste gênero.

Tityus metuendus Pocock, 1897 é uma das principais espécies responsáveis por casos graves de escorpionismo na Amazônia Brasileira (Queiroz *et al.*, 2015; Pardal *et*

al., 2017). A localidade tipo de *T. metuendus* é Iquitos (Peru), porém sua área de ocorrência se estende até o Norte do Brasil, sendo encontrado nos estados do Amazonas, Pará, Roraima, Rondônia, Acre e Mato Grosso (Lourenço, 2002). *T. metuendus* foi anteriormente revisado por diversos autores, que consideraram ser uma espécie morfológicamente monomórfica (Lourenço, 1983). Entretanto, a possibilidade de diversidade genética entre suas populações naturais não pode ser descartada, uma vez que, considerando sua vasta distribuição geográfica e a baixa vagilidade típica de escorpiões, populações diferentes desta espécie podem estar sujeitas a condições climáticas e micro-habitats distintos, bem como apresentar redução do fluxo gênico entre si em virtude de inúmeras barreiras geográficas (Meirmans, 2012; Wang e Bradburd 2014). Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar ocorrência de diferenciação genética entre duas populações de *T. metuendus*, através de análise citogenética, DNA mitocondrial e morfometria. Discutimos também as implicações destes dados para o escorpionismo na Amazônia Brasileira.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Morfometria

Análise morfométrica foi realizada em 28 espécimes machos de *T. metuendus* provenientes de diferentes localidades da região Amazônica (tabela 1). Fêmeas foram excluídas da análise em virtude da baixa amostragem. Eles foram classificados previamente em 4 grupos segundo a procedência: Pará, Amazonas, Rondônia e Acre (Tabela 1). Medidas foram tomadas nos segmentos do lado direito dos indivíduos, e obtidas através do uso de um paquímetro digital (expressas em milímetros), sendo cada uma delas realizadas três vezes, com média posteriormente calculada. As mensurações foram: comprimento do fêmur do pedipalpo (FC); largura do fêmur do pedipalpo (FL); comprimento da tíbia do pedipalpo (TC); largura da tíbia do pedipalpo (TL); comprimento da quela do pedipalpo (QC); largura da quela do pedipalpo (QL); comprimento do dedo móvel do pedipalpo (DMC); comprimento do quarto segmento metassomal (MET4C); largura do quarto segmento metassomal (MET4L); comprimento do quinto segmento metassomal (MET5C); largura do quinto segmento metassomal (MET5L); comprimento da carapaça (CARC); largura posterior do carapaça (CARLP). Após isso, foram calculadas 15 proporções morfométricas entre as mensurações obtidas (tabela 2). Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de funções discriminantes (FDA) foram realizadas no *software* IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp. Released, 2013) para determinar as proporções morfométricas que explicam a maior parte da

variação entre os grupos, e se elas são hábeis para distingui-los. Caracteres merísticos, como contagem do número de dentes do pente direito e de número de séries do dedo móvel do pedipalpo direito, foram analisados através de estereomicroscópio.

2.2. Análise do cariótipo

Os espécimes utilizados no presente estudo foram coletados em duas localidades distintas: 5 machos, 1 fêmea e 17 embriões provenientes de Óbidos, Pará, Brasil (1°54'16"S/55°31'12"O), e 2 machos, 1 fêmea e 14 embriões coletados em Parintins, Amazonas, Brasil (2°38'15"S/56°43'46"O). A identificação taxonômica foi realizada segundo Lourenço (2002). Todos os exemplares foram tombados na coleção do Laboratório de Entomologia Médica e Artrópodes Peçonhentos da UFPA. Preparações cromossômicas meióticas foram obtidas segundo Almeida *et al.* (2017). Para obtenção de cromossomos mitóticos de embriões, foi adotado o protocolo a seguir: cada embrião foi macerado em solução de Hanks, a temperatura ambiente; em seguida, células foram hipotonizadas em KCl 0,075M, durante 45 minutos e posteriormente fixadas em solução de metanol e ácido acético (proporção 3:1). Suspensão celular obtida de embriões ou gônadas foi espalhada em lâminas a 45°C. Após secagem, preparações cromossômicas foram coradas com Giemsa 5%. Cinco metáfases de cada citótipo de *T. metuendus* foram utilizadas para análises cariométricas através do software DRAWID (Kirov *et al.*, 2017). O tamanho de cada cromossomo foi expresso como uma porcentagem em relação ao conjunto diploide total. Bandeamento C foi realizado sequencialmente à montagem dos cariótipos, seguindo o protocolo descrito por Sumner (1975).

2.3. Produção de sondas

DNA genômico de *T. metuendus* foi extraído de tecido muscular das patas através do kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (SIGMA), segundo as normas do fabricante. Isolamento de DNAs repetitivos foi realizado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os primers (TTAGG)₅ e (CCTAA)₅ para sequências teloméricas (Sahara *et al.*, 1999); 5'-GACCCGTCTTGAAGCACG-3' R5'-TCGGAAGGAACCAGCTAC-3' para 28S rRNA (Ojanguren-Affilastro *et al.*, 2017); 5'-ATCTGRAGCTATAAATCACT-3' e 5'-CAAAGATGTCCTTGGGTGTG-3' para transposon *Mariner* (Lampe *et al.*, 2003). As reações de PCR foram constituídas de: 16,25 µL de água estéril, 2,5 µL de tampão da Taq Polimerase 10x, 2 µL de DNTP mix (2mM), 1 µL de DNA genômico(100ng), 1 µL de MgCl₂ (50mM), 1 µL de primer forward

(10mM), 1 µL de primer reverse (10mM), 0,25 µL de *Taq* Polimerase 1U. As configurações termais da PCR foram: 1 ciclo de 94°C (5 minutos); 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 49°C a 55°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto); 1 ciclo de 72°C (10 minutos); 1 ciclo 4°C (hold). A fração *Cot*-1 DNA (que compreende o *pool* de DNAs altamente e moderadamente repetitivos) foi obtida de um espécime de cada população segundo o protocolo descrito por Zwick *et al.* (1997). Todas as sondas foram marcadas por *nick translation* com digoxigenina-14-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) ou biotina-11-dATP (Invitrogen, San Diego, CA, USA).

2.4. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

FISH foi realizada segundo o protocolo descrito por Almeida *et al.* (2017). Lâminas preparadas citologicamente foram tratadas com pepsina 1%, e posteriormente fixadas em paraformaldeído 4%, por 10 minutos. Após isso, lâminas foram desidratadas em bateria de álcool 70%, 90% e 100%. A desnaturação do DNA cromossômico e das sondas se deu a 70°C e 100°C, respectivamente; posteriormente as lâminas foram incubadas a 37°C, *overnight*, para hibridização. Após lavagem de estringência, sondas foram detectadas com anticorpo anti-digoxigenina-FITC ou avidina-Cy3, e cromossomos contracolorados com DAPI (Vectashield; Vector, Burlingame, California, USA).

2.5. Isolamento de genes mitocondriais

Para análises filogenéticas foram utilizados 5 exemplares das populações de Parintins e Óbidos, citadas anteriormente. O isolamento de sequências parciais dos genes 16S rDNA e Citocromo Oxidase I (COI) foi realizado por PCR, utilizando os primers descritos por Ojanguren-Affilastro *et al.* (2017): F5'-CAACATTTATTTTGATTTTGG-3' e R5'-GATATTAATCCTAAAAAATGTTGAGG-3' para COI; F5'-CGATTTGAACTCAGATCA-3' e R5'-GTGCAAAGGTAGCATAATCA-3' para 16S rRNA. As reações de PCR foram constituídas de: 16,25 µL de água estéril, 2,5 µL de tampão da *Taq* Polimerase 10x, 2 µL de DNTP mix (2mM), 1 µL de DNA genômico(100ng), 1 µL de MgCl₂ (50mM), 1 µL de primer forward (10mM), 1 µL de primer reverse (10mM), 0,25 µL de *Taq* Polimerase 1U. As configurações termais de PCR foram: 1 ciclo de 94°C (5 minutos); 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 50°C-53°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto); 1 ciclo de 72°C (10 minutos); 1 ciclo 4°C (hold).

Sequenciamento foi realizado segundo o método de Sanger, utilizando Big Dye, com as sequências sendo obtidas em um sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems).

2.6. Análise filogenética

Cada sequência foi analisada na ferramenta BLASTN, disponível no website NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmar sua identidade e similaridade (acima de 95%). Sequências de *Tityus obscurus* (espécie relacionada a *T. metuendus*) foram obtidas no banco de dados Nucleotide do NCBI (ver tabela 2) e adicionadas para enraizar a árvore filogenética. Em seguida, elas foram alinhadas de forma automática usando Clustal W presente no software BioEdit (Hall, 1999). O alinhamento foi corrigido manualmente. A escolha do modelo evolutivo mais apropriado foi realizada no software JModeltest 2.1.10 (Posada, 2008). Topologias foram construídas pelo método de máxima verossimilhança (MV) no software PhyML 3.0 (Guidon *et al.*, 2010), utilizando os modelos de substituição nucleotídica TIM2+I para COI e TIM1+I+G para 16S rRNA, com *Bootstrap* baseado em 1000 pseudoréplicas (Felsenstein, 1985). Inferência bayesiana (IB) foi realizada no software MrBayes 3.2.7 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001) utilizando amostragem “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC) para cada gene separado, realizando 4 corridas simultâneas (1 fria e 3 quentes), cada uma com 10^7 gerações. O modelo HKY+I foi selecionado para IB de ambos os genes COI e 16S rRNA. Valores de suporte nodal foram avaliados com base nas probabilidades *a posteriori*. MEGA-X foi utilizado para cálculo de distâncias genéticas entre os grupos estudados, com base no modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros (Tamura *et al.*, 2013).

3. RESULTADOS

3.1. Morfometria

O estudo de caracteres merísticos demonstrou variação de 16 a 23 dentes nos dentes direitos dos espécimes de *T. metuendus* (tabela 2). O número de séries de grânulos no dedo móvel dos pedipalpos direitos mostrou variação de 16 a 20 na amostra investigada (tabela 2); em ambos os casos, sobreposição no valor médio e modal desses caracteres foi observada entre os grupos estudados (tabela 2).

Análise discriminante mostrou que, considerando todas as proporções morfométricas (Tabela 3), há uma separação clara entre as populações de *T. metuendus*. Três funções discriminantes foram construídas, entretanto, apenas as funções 1 e 2 apresentaram significância para distinguir os grupos estudados (lambida de Wilks $\lambda_1 = 0,001 / p < 0,001$; lambida de Wilks $\lambda_2 = 0,025 / p < 0,001$). Os coeficientes calculados para cada função estão descritos na Tabela 4. As funções discriminantes 1 e 2 explicam, respectivamente, 66,2% e 26,1% da variância total, e foram hábeis em classificar corretamente 100% dos indivíduos em seus grupos originais (Tabela 6). Os espécimes dos grupos Pará e Amazonas formaram dois *clusters* definidos e separados entre si no plano multivariado (Figura 1); estes também demonstraram ser distintos de Rondônia e Acre, os quais agrupam próximos em outro extremo do plano, sugerindo similaridade morfométrica entre essas duas amostras (Figura 1).

3.2.Citogenética

T. metuendus apresentou cromossomos com morfologia holocêntrica, evidenciada pela ausência de constrição primária (centrômero) em cromossomos metafásicos na mitose (Figura 2). O número diploide variou entre as duas populações analisadas. Os espécimes de Óbidos (citótipo A) demonstraram $2n = 18$, e cariótipo constituído apenas por cromossomos de tamanho médio (Figura 2a). Os indivíduos provenientes de Parintins (citótipo B) apresentaram $2n = 12$, com cariótipo constituído de 6 cromossomos grandes e 6 cromossomos médios, sendo os pares 1 e 5 heteromórficos (Figura 2b). O número diploide não variou entre os sexos. Em todos os indivíduos machos de ambas as populações se observou ocorrência de meiose regular, com formação de nove e seis bivalentes durante metáfase I nos citótipos A e B, respectivamente. Adicionalmente, a meiose foi considerada aquiasmática em *T. metuendus*, em virtude da ausência de quiasmas durante Prófase I.

O bandejamento C revelou dois padrões distintos de distribuição de heterocromatina constitutiva entre os citótipos estudados. No citótipo A ($2n = 18$) bandas C foram observadas somente na região terminal dos pares 1, 2, 4, 7 e 8 (Figura 2c). No citótipo B ($2n = 12$) os pares 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram bandas C terminais (Figura 2d), entretanto, no par 1 a heterocromatina foi visível apenas em um dos homólogos (Figura

2d); no par 5 e em um dos homólogos do par 4 bandas C intersticiais adicionais foram registradas (Figura 2d).

O mapeamento físico do 45S rDNA demonstrou diferentes distribuições entre os cariótipos analisados: o citótipo A demonstrou três clusters 45S rRNA de tamanhos desiguais, localizados terminalmente sobre o par 2 e em um homólogo do par 1 (Figura 3a); no citótipo B o maior cluster de rRNA foi registrado na região terminal dos pares 4 e 5 (Figura 3b). Sequências teloméricas foram observadas apenas nas extremidades dos cromossomos em ambos os citótipos A e B (Figura 3c,d).

A fração *Cot*-1 DNA apresentou padrão de hibridização disperso ao longo dos cromossomos de *T. metuendus*, entretanto, acúmulo de DNAs repetitivos foi observado nas extremidades de todos os elementos do complemento do citótipo A ($2n = 18$), e na região terminal dos pares 4 e 5 do citótipo B ($2n = 12$) (Figura 4a,b). Em relação a organização genômica do transposon *Mariner*, no citótipo A este elemento transponível foi encontrado compartimentalizado nas extremidades de todos os cromossomos (Figura 4c), enquanto no citótipo B *Mariner* foi registrado na heterocromatina terminal e intersticial (Figura 4d).

3.3. Análise filogenética

O alinhamento múltiplo resultou em 15 sequências de 370 pb para 16S rRNA e 11 sequências de 413 pb para o gene COI. Foram observados 61 e 84 sítios variáveis para 16S rRNA e COI, respectivamente. Em relação a composição nucleotídica 16S rRNA apresentou em média 39,8% de Timina, 14,0% de Citosina, 31,7% de Adenina e 14,6% de Guanina, enquanto sequências COI mostraram média de 41,0% de Timina, 12,7% de Citosina, 22,3% de Adenina e 24% de Guanina.

Reconstruções de árvores filogenéticas por MV ou IB para as duas sequências mitocondriais analisadas mostraram topologias similares, altamente estruturadas e com a maioria dos clados apresentando altos valores de suporte. Em ambos os casos, foi observado um clado basal formado pela união de espécimes de *Tityus obscurus* linhagem “Leste” e um espécime de Morona Santiago (Equador) (Figuras 5,6). O segundo clado divergente corresponde aos espécimes de *T. metuendus* citótipo A (Figuras 5,6). Em seguida, um terceiro grande clado se subdivide em um ramo que compreende os espécimes pertencentes ao citótipo B de *T. metuendus* e outro ramo que corresponde aos indivíduos de *Tityus obscurus* linhagem “Oeste” (Figuras 5,6).

O nível de distância genética estimado com base nas sequências do gene COI entre os citótipos de *T. metuendus* foi de aproximadamente 10,5%, enquanto a distância calculada a partir de sequências 16S rRNA entre estes dois grupos foi de 0,6% (Tabela 5). As distâncias genéticas entre *T. metuendus* e as linhagens de *T. obscurus* são mostradas na tabela 5.

4. DISCUSSÃO

Variação morfométrica em *T. metuendus*

A região Amazônica abriga a maior diversidade de escorpiões *Tityus* da América Latina. No entanto, a delimitação das espécies deste gênero é extremamente difícil, em virtude da ocorrência de polimorfismos morfológicos intraespecíficos, ou da alta conservação fenotípica entre elas (Lourenço, 2002). Lourenço (1983) revisou *T. metuendus* utilizando apenas 11 exemplares provenientes de diferentes localidades da Amazônia (incluindo o holótipo), sem efetuar uma análise robusta da variação geográfica desta espécie. Adicionalmente, como demonstrado por nossos resultados, alguns caracteres merísticos utilizados por Lourenço (1983), a exemplo do número de dentes dos pentes e o número de séries de grânulos do dedo móvel do pedipalpo, não permitem distinguir populações de *T. metuendus*. Esses fatores (descrição ou revisão de espécies com baixa amostragem e uso de caracteres morfológicos com pouco valor taxonômico) são problemas recorrentes na taxonomia da ordem Scorpiones, como observado nos gêneros *Vaejovis* (Hughes, 2011), *Mesobuthus* (Mirshamsi *et al.*, 2011) e no próprio *Tityus* (Moreno-Gonzalez *et al.*, 2019), e podem ter contribuído para considerar *T. metuendus* uma espécie monotípica.

Análise multivariada utilizando funções discriminantes, sugere que as populações de *T. metuendus* estudadas no presente artigo, são altamente divergentes em relação ao aspecto morfométrico. Resultados semelhantes foram descritos para *Tityus silvestris* e *Tityus gasci*, ambas com distribuição na Amazônia brasileira (Lourenço, 2016). Lourenço (1986) *apud* Lourenço (2018) explica que estes polimorfismos morfométricos são decorrentes do isolamento temporário sofrido por estas espécies ao final do Pleistoceno, quando subpopulações de animais e plantas permaneceram confinados em fragmentos da Floresta Amazônica (refúgios), devido a mudanças climáticas ocorridas neste período. Segundo Lourenço (1986) a ocorrência dos refúgios não possibilitou isolamento reprodutivo suficiente para estabelecimento de novas espécies entre as populações de

Scorpiones da Amazônia (ao contrário do proposto para outros táxons) (Rocha e Kaefer, 2019) e, desta forma, variações morfológicas foram consideradas apenas caracteres polimórficos. Até o presente momento, não há estudos filogeográficos que demonstrem a contribuição real dos refúgios para diversidade de escorpiões na Amazônia e, por essa razão, a hipótese de Lourenço (1986) *apud* Lourenço (2018) tem recebido diversas críticas, inclusive com revisão das “formas polimórficas” e elevação destas ao *status* de espécie (Kovářik *et al.*, 2015).

Diferenciação genética entre populações de *T. metuendus*

Para verificar o nível de diferenciação genética entre os grupos morfológicos estabelecidos pelas funções discriminantes, realizamos análise filogenética e citogenética em indivíduos provenientes de Óbidos (grupo Pará) e Parintins (grupo Amazonas). Estas populações revelaram grandes diferenças quanto a estrutura do cariótipo, constituindo os citótipos A e B respectivamente. Em um estudo anterior, Piza (1950) descreveu cariótipos com $2n = 15, 16$ em uma amostra de *T. metuendus* do Estado do Acre, Brasil, evidenciando a existência de um terceiro citótipo. A variação no $2n$ desta espécie pode estar relacionada a dinâmica de rearranjos cromossômicos do tipo fusão/fissão em sistemas holocinéticos. *Tityus metuendus*, assim como os demais integrantes de Buthidae, possui cromossomos caracterizados pela existência de um centrômero descentralizado (holocêntricos), com formação de uma grande placa cinetocórica ao longo das cromátides na mitose (Mattos *et al.*, 2018). Por essa razão, durante a divisão celular, fragmentos gerados por fissão ou cromossomos formados por fusão, unem-se aos microtúbulos do fuso, e migram normalmente para as células-filhas, resultando em alterações no $2n$ (Marques e Pedrosa-Harand, 2016).

Os citótipos de *T. metuendus* também mostraram diferenças em relação a distribuição do 45S rDNA. A presença de 4 *clusters* de 45S rDNA no citótipo B é similar ao registrado para a espécie *Tityus obscurus* (Almeida *et al.*, 2017) e parece ser um carácter comum a espécies amazônicas do subgênero *Atreus*. No citótipo A ($2n = 18$) a presença de genes ribossomais apenas em três cromossomos (com apenas um dos homólogos do par 1 portador do 45S rDNA), pode ser explicada pela ação de translocações ou deleções de tais sequenciais repetitivas, similar ao modelo proposto para *Tityus serrulatus* (Schneider e Cella, 2010; Lima *et al.*, 2020). Outros estudos citogenéticos em integrantes da família Buthidae corroboram essa hipótese, pois mostram

que a localização cromossômica do 45S rDNA é extremamente móvel em diversas linhagens dessa família (Ubinski *et al.*, 2018; Šťáhlavský *et al.*, 2020).

As árvores filogenéticas obtidas por ML e IB foram congruentes com os resultados das análises morfométricas e citogenéticas. Ambas as topologias apresentaram ramos com altos valores de apoio, sugerindo que os citótipos A e B de *T. metuendus* correspondem a duas unidades taxonômicas distintas. Essa hipótese é fortemente apoiada pela porcentagem de distância genética dos genes COI e 16S rDNA observada entre eles, que é similar à distância interespecífica registrada para gêneros de Buthidae, tais como *Odontobuthus* (Azghadi *et al.*, 2014), *Mesobuthus* (Zhang *et al.*, 2020), *Leiurus* (Alqahtani e Badry, 2020) e *Tityus* (Roman *et al.*, 2018). Estes citótipos (A e B) apresentam distribuição alopátrica, estando ambos separados pelo Rio Amazonas. Estudos anteriores têm sugerido que vicariância é um importante fator para especiação em Scorpiones, e em alguns casos, rios podem constituir barreiras geográficas e limitar o fluxo gênico entre populações destes artrópodes (Borges *et al.*, 2010; Ceccarelli *et al.*, 2016; Roman *et al.*, 2018). Em virtude de sua largura e fortes correntezas, o Rio Amazonas tem sido associado à promoção de especiação em diversas espécies de vertebrados, invertebrados e plantas (Gibbs *et al.*, 2018; Dambros *et al.*, 2020; Fordham *et al.*, 2020). Assim, a formação do Rio Amazonas pode ter sido fundamental para estabelecimento do processo de diferenciação genética entre os citótipos A e B de *T. metuendus*, bem como para sua manutenção, impedindo introgressão entre seus integrantes.

Evolução cromossômica em *T. metuendus*

Baseado na estruturação filogenética obtida no presente estudo, podemos inferir que durante a evolução cromossômica de *T. metuendus* houve tendência à redução do número diploide. Considerando essas informações, sugerimos que as bandas C intersticiais nos pares 4 e 5 do citótipo B podem ser pontos de fusões, como observado em outras espécies de *Tityus* (Almeida *et al.*, 2017; Adilardi *et al.*, 2020). A presença do transposon *Mariner* nas regiões heterocromáticas deste citótipo sugere que elementos transponíveis podem ter importante papel na reorganização genômica de *T. metuendus*, similar a outros organismos (Ahola *et al.*, 2014; Glugoski *et al.*, 2018). Espécimes de *T. metuendus* do Acre ($2n = 15, 16$) apresentam um anel meiótico composto de 8 cromossomos, resultante de translocações recíprocas em heterozigose, além de um trivalente originado por fusão/fissão, o que indica que este citótipo é altamente divergente

em relação aos citótipos A e B de *T. metuendus* (Piza, 1950). O papel dos rearranjos cromossômicos na especiação de organismos portadores de cromossomos holocêntricos tem sido bastante debatido e há evidências de que eles possam constituir barreiras pós-zigóticas por promover infertilidade em híbridos (Pérez *et al.*, 2005; Escudero *et al.*, 2016). Segundo a hipótese de especiação por homoploidia de híbridos, espécies holocêntricas portadores de duas ou mais fusões/fissões em heterozigose são capazes de formar novos cariótipos homozigotos durante hibridização; estes, posteriormente, podem ser fixados através de deriva genética, levando a extinção dos cariótipos intermediários (ver Lukhtanov *et al.*, 2020). É plausível que este processo tenha ocorrido entre as populações de *T. metuendus* durante dispersão dessa espécie ao longo de sua distribuição geográfica na Amazônia, estabelecendo os cariótipos homozigotos registrados no presente estudo. Ademais, a existência de meiose aquiasmática em *T. metuendus* pode ter sido um fator facilitador para fixação destes rearranjos (Schneider *et al.*, 2015).

Relações filogenéticas entre *T. metuendus* e *T. obscurus*

A maior parte dos acidentes por escorpiões na Amazônia envolvem espécies do subgênero *Tityus* (*Atreus*), especialmente *T. metuendus* e *T. obscurus* (Pardal *et al.*, 2014b; Gomes *et al.*, 2020). A reconstrução de árvores filogenéticas entre os citótipos de *T. metuendus* e *T. obscurus* mostrou que essas duas espécies são muito relacionadas. Do ponto de vista morfológico, ambas são diferenciadas apenas pelo dimorfismo sexual dos machos, enquanto fêmeas são extremamente semelhantes, sendo impossível distingui-las por métodos taxonômicos convencionais (Lourenço, 2002). A proximidade filogenética entre elas também pode ser vista em relação a composição química do veneno, uma vez que algumas de suas proteínas apresentam 100% de similaridade (Batista *et al.*, 2018). Nossa análise genética se mostrou eficiente para identificação molecular de linhagens distintas em *T. metuendus*, e para sua diferenciação em relação a *T. obscurus*, podendo ser uma ferramenta adicional na taxonomia destes escorpiões.

Diversidade genética em *T. metuendus* e implicações para o escorpionismo na Amazônia

Em conjunto, nossos dados mostram que *T. metuendus* corresponde a um complexo de espécies crípticas. Eventos de especiação (principalmente aqueles que envolvem isolamento geográfico) ou a ocorrência de extensa heterogeneidade ambiental, são fatores importantes para diversificação de toxinas de escorpiões, como demonstrado para *Tityus trivittatus* (Borges *et al.*, 2020), *Centruroides sculpturatus* (Carcamo-Noriega

et al., 2018) e *Scorpio maurus* (Abdel-Rahman *et al.*, 2009). Em alguns casos, os efeitos da variação do veneno são percebidos nos quadros clínicos dos acidentes; em *T. obscurus*, por exemplo, a diversidade genética observada entre as linhagens “Leste” e “Oeste”, foi congruente com variação geográfica nos sintomas de acidentes ocasionados por esta espécie no Estado do Pará, Brasil (Pardal *et al.*, 2014a; Roman *et al.*, 2018). Assim, estudos toxicológicos são recomendados para verificar se há diferença na composição bioquímica do veneno das espécies crípticas reveladas no presente estudo, em relação ao proteoma descrito para indivíduos de *T. metuendus* de Manaus, Amazonas, Brasil (Batista *et al.*, 2018).

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados evidenciam que *T. metuendus* não é um táxon monotípico, e que os citótipos A ($2n = 18$) e B ($2n = 12$) constituem duas espécies crípticas. Estes diferem em relação a características morfométricas, citogenéticas (número diploide, distribuição de heterocromatina constitutiva e 45S rDNA), e apresentam alta divergência genética entre si. A variação do $2n$ entre ambos os citótipos é resultado da ação de rearranjos do tipo fusão/fissão que, juntamente com formação de barreiras geográficas como o Rio Amazonas, pode ter contribuído para manutenção do processo de diferenciação entre estas linhagens.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN MA, OMRAN MA, ABDEL-NABI IM, UEDA H, MCVEAN A (2009) Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* venom collected from different biotopes. *Toxicon* 53:349-359.

ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MARTÍ DA, MOLA LM (2020) Chromosome puzzle in the southernmost populations of the medically important scorpion *Tityus bahiensis* (Perty 1833) (Buthidae), a polymorphic species with striking structural rearrangements. *Zoologischer Anzeiger* 288:139-150

AHOLA V, LEHTONEN R, SOMERVUO P, SALMELA L, KOSKINEN P, RASTAS P, *et al.* (2014). The Glanville fritillary genome retains an ancient karyotype and reveals selective chromosomal fusions in Lepidoptera. *Nat Commun* 5: 4737.

ALMEIDA BRR, MILHOMEM-PAIXÃO SSR, NORONHA RCR, NAGAMACHI CY, COSTA MJR, PARDAL PPO, COELHO JS, PIECZARKA JC (2017) Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). BMC Genetics 18:35.

ALQAHTANI AR, BADRY A (2020) Genetic diversity among different species of the genus *Leiurus* (Scorpiones: Buthidae) in Saudi Arabia and the Middle East. Saudi Journal of Biological Sciences 27:3348-3353

AZGHADI S, MIRSHAMSI O, NAVIDPOUR S, ALIABADIAN M (2014) Scorpions of the genus *Odontobuthus* Vachon, 1950 (Scorpiones: Buthidae) from Iran: Phylogenetic relationships inferred from mitochondrial DNA sequence data. Zoology in the Middle East, 60: 169–179

BATISTA CVF, MARTINS JG, RESTANO-CASSULINI R, CORONAS FIV, ZAMUDIO FZ, PROCÓPIO R, POSSANI LD. (2018). Venom characterization of the Amazonian scorpion *Tityus metuendus*. Toxicon 143: 51–58.

BORGES A, BERMINGHAM E, HERRERA N, ALFONZO MJ, SANJUR OI (2010) Molecular systematics of the neotropical scorpion genus *Tityus* (Buthidae): the historical biogeography and venom antigenic diversity of toxic Venezuelan species. Toxicon 55:436-54

BORGES A, ROJAS DE ARIAS A, DE ALMEIDA LIMA S, LOMONTE B, DÍAZ C, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, GRAHAM MR, KALAPOTHAKIS E, CORONEL C, ROODT AR (2020) Genetic and toxinological divergence among populations of *Tityus trivittatus* Kraepelin, 1898 (Scorpiones: Buthidae) inhabiting Paraguay and Argentina. PLoS Negl Trop Dis 14: e0008899

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>. Acesso em: 10 out 2019.

CARCAMO-NORIEGA EN, OLAMENDI-PORTUGAL T, RESTANO-CASSULINI R, ROWE A, URIBE-ROMERO SJ, BECERRIL B, POSSANI LD. (2018). Intraspecific

variation of *Centruroides sculpturatus* scorpion venom from two regions of Arizona. Arch. Biochem. Biophys. 638:52–57.

CECCARELLI FS, PIZARRO-ARAYA J, OJANGUREN-AFFILASTRO AA (2016) Phylogeography and population structure of two *Brachistosternus* species (Scorpiones: Bothriuridae) from the Chilean coastal desert - the perils of coastal living. Biol J Linn Soc Lond 120:75-89

DAMBROS C, ZUQUIM G, MOULATLET GM, *et al.* (2020) The role of environmental filtering, geographic distance and dispersal barriers in shaping the turnover of plant and animal species in Amazonia. Biodivers Conserv 29, 3609–3634.

DE SOUZA CAR, CANDIDO DM, LUCAS SM, BRESCOVIT AD (2009) On the *Tityus stigmurus* complex (Scorpiones, Buthidae). Zootaxa 1987:1-38

ESCUDERO M, HAHN M, BROWN BH, LUEDERS K, HIPPI AL. (2016) Chromosomal rearrangements in holocentric organisms lead to reproductive isolation by hybrid dysfunction: The correlation between karyotype rearrangements and germination rates in sedges. Am J Bot. 103:1529-1536.

FELSENSTEIN J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791

FORDHAM G, SHANEE S, PECK M (2020) Effect of river size on Amazonian primate community structure: A biogeographic analysis using updated taxonomic assessments. American Journal of Primatology. Am J Primatol. e23136

GIBBS HL, SOVIC M, AMAZONAS D, CHALKIDIS H, SALAZAR-VALENZUELA D, MOURA-DA-SILVA AM (2018) Recent lineage diversification in a venomous snake through dispersal across the Amazon River, Biol J Linn Soc Lond 123:651–665

GLUGOSKI L, GIULIANO-CAETANO L, MOREIRA-FILHO O, VICARI MR, NOGAROTO V (2018) Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. Gene 15:49-54

GOMES JV, FÉ NF, SANTOS HLR, JUNG B, BISNETO PF, SACHETT A, DE MOURA VM, MENDONÇA DA SILVA I, CARDOSO DE MELO G, PEREIRA DE OLIVEIRA PARDAL P, LACERDA M, SAMPAIO V, WEN FH, SACHETT JAG, MONTEIRO WM. (2020) Clinical profile of confirmed scorpion stings in a referral center in Manaus, Western Brazilian Amazon. *Toxicon* 187:245-254.

GUERRERO-VARGAS JA, MOURA CBF, QUINTERO-HERNÁNDEZ V, POSSANI LD, SCHWARTZ EF (2012) Identification and Phylogenetic Analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* Novel Putative Na⁺ Channel Scorpion Toxins. *PLoS ONE* 7:e30478.

GUIDON S, DUFAYARD JF, LEFORT V, ANISIMOVA M, HORDJIK W, GASCUEL O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307-321

HABEL JC, HUSEMANN M, SCHMITT T, ZACHOS FE, HONNEN AC, PETERSEN B, PARMAKELIS A, STATHI I (2012) Microallopatry caused strong diversification in *Buthus* scorpions (Scorpiones: Buthidae) in the Atlas Mountains (NW Africa). *PloS one* 7: e29403

HALL TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.

HUELSENBECK JP, RONQUIST F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755

HUGHES GB (2011) Morphological analysis of montane scorpions of the genus *Vaejovis* (Scorpiones: Vaejovidae) in Arizona with revised diagnoses and description of a new species. *J. Arachnol.* 39: 420-438

KIROV I, KHRUSTALEVA L, VAN LAERE K, SOLOVIEV A, MEEUS S, ROMANOV D, FESENKO I (2017) DRAWID: user-friendly java software for chromosome measurements and idiogram drawing. *Comp. Cytogenet.* 11: 747-757

KOVAŘÍK F, TERUEL R, LOWE G, FRIEDRICH S (2015) Four new scorpion species (Scorpiones: Buthidae) from Amazonian Peru. *Euscorpius*, 210: 1-40.

LAMPE DJ, WITHERSPOON DJ, SOTO-ADAMES FN, ROBERTSON HM (2003) Recent horizontal transfer of mellifera subfamily *Mariner* transposons into insect lineages representing four different orders shows that selection acts only during horizontal transfer. *Mol Biol Evol*, 20:554–562.

LIMA JF, CARVALHO LS, SCHNEIDER MC (2020) The first chromosomal analysis of bisexual populations of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* (Scorpiones: Buthidae). *The Journal of Arachnology* 48:77-83

LOURENÇO WR (1983). Contribution à la connaissance du scorpion amazonien *Tityus metuendus* Pocock, 1897 (Buthidae). *Stud Neotrop Fauna E* 18:185–193.

LOURENÇO WR (1986) Les modèles de distribution géographique de quelques groupes de scorpions néotropicaux. *C R Soc Biogéogr.* 62:61–83

LOURENÇO WR (2002) Scorpiones. In: ADIS, J. (org.). *Amazonian Arachnida and Miryapoda: identification keys to all classes, orders, families, some genera and list of known terrestrial species*. Pensoft Publishes, Moscow, 399-438p.

LOURENÇO WR (2015) What do we know about some of the most conspicuous scorpion species of the genus *Tityus*? A historical approach. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 21:1-20

LOURENÇO WR (2016) Scorpion incidents, misidentification cases and possible implications for the final interpretation of results. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* 22. <http://dx.doi.org/10.1186/s40409-016-0075-6>

LOURENÇO, WR (2018) The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* 24. <http://dx.doi.org/10.1186/s40409-017-0138-3>

LUKHTANOV VA, DINCĂ V, FRIBERG M, VILA R, WIKLUND C. (2020) Incomplete Sterility of Chromosomal Hybrids: Implications for Karyotype Evolution and Homoploid Hybrid Speciation. *Front. Genet.* 11:583827

MARQUES A, PEDROSA-HARAND (2016) Holocentromere identity: from the typical mitotic linear structure to the great plasticity of meiotic holocentromeres. *Chromosoma* 125:669-681

MATTOS VF, CARVALHO LS, CARVALHO MA, SCHNEIDER MC (2018) Insights into the origin of the high variability of multivalent-meiotic associations in holocentric chromosomes of *Tityus*(*Archaeotityus*) scorpions. PLoS ONE 13: e0192070.

MEIRMANS PG. The trouble with isolation by distance. Mol Ecol. 2012 Jun;21(12):2839-46. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05578.x. Epub 2012 May 11. PMID: 22574758.

MIRSHAMSI O, SARI A, ELAHI E, HOSSEINIE S (2011) *Mesobuthus eupeus* (Scorpiones: Buthidae) from Iran: A polytypic species complex. Zootaxa, 2929: 1–21

MONTEIRO WM, GOMES J, FÉ N, MENDONÇA DA SILVA I, LACERDA M, ALENCAR A, FARIAS AS, VAL F, SAMPAIO VS, MELO GS, PARDAL PPO, SILVA AM, BERNARDE PS, FERREIRA LCL, GUTIERREZ JM, SACHETT JAG, FAN HW (2019) Perspectives and recommendations towards evidence-based health care for scorpion sting envenoming in the Brazilian Amazon: A comprehensive review. Toxicon169:68-80

MORENO-GONZÁLEZ JA, GONZÁLEZ-O R, FLÓREZ E (2019) Taxonomic revision of the Colombian *Tityus* (*Archaeotityus*) (Scorpiones, Buthidae) species: a morphological and morphometric approach, with a description of a new species. Zootaxa 4660:1-94.

OJANGUREN-AFFILASTRO AA, ADILARDI RS, CAJADE R, RAMÍREZ MJ, CECCARELLI FS, MOLA LM (2017) Multiple approaches to understanding the taxonomic status of an enigmatic new scorpion species of the genus *Tityus* (Buthidae) from the biogeographic island of Paraje Tres Cerros (Argentina). PLoS One 12:e0181337.

OZKAN O, AHMET C, ZAFER K (2010) A study on the genetic diversity of *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807; Scorpiones: Buthidae) from Turkey. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis16:599-606.

PARDAL PPO, GADELHA MAC, MENEZES MMGO, MALHEIROS RS, ISHIKAWA EAY, GABRIEL MDG. (2014b). Envenenamento grave pelo escorpião *Tityus obscurus* Gervais, 1843. Ver. Pan-Amazon Saude 5:65-70.

PARDAL PPO, SANTOS PRSG, CARDOSO BS, LIMA RJS, GADELHA MAC (2017) Spatial distribution of envenomation by scorpions in Pará state, Brazil. *Journal of Tropical Pathology*, 46:94-104.

PARDAL, PEDRO PO, ISHIKAWA, EDNA AY, VIEIRA, JOSÉ LF, COELHO, JOHNE S, DÓREA, REGINA CC, ABATI, PAULO AM, QUIROGA, MARIANA MM, & CHALKIDIS, HIPÓCRATES M. (2014a). Clinical aspects of envenomation caused by *Tityus obscurus* (Gervais, 1843) in two distinct regions of Pará state, Brazilian Amazon basin: a prospective case series. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 20, 3.

PÉREZ R, HERNÁNDEZ M, QUINTERO O, SCVORTZOFF E, CANALE D, MÉNDEZ L, COHANOFF C, MARTINO M, PANZERA, F. (2005) Cytogenetic Analysis of Experimental Hybrids in Species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). *Genetica*, 125: 261–270.

PIZA ST (1950) Primeiras observações sobre os cromossômios do *Tityus metuendus* Pocock. *Sci Genet* 4:162-167

POSADA D (2008) jModelTest: phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256.

QUEIROZ AM, SAMPAIO VS, MENDONÇA I, FÉ NF, SACHETT J, FERREIRA LCL, FEITOSA E, WEN FH, LACERDA M, MONTEIRO W (2015) Severity of scorpion stings in the western brazilian Amazon: A case-control study. *PLoS ONE* 10: e0128819.

QUIJANO-RAVELL AF, DE ARMAS LF, FRANCKE OF, PONCE-SAAVEDRA J (2019) A new species of the genus *Centruroides* Marx (Scorpiones, Buthidae) from western Michoacán State, México using molecular and morphological evidence. *ZooKeys* 859: 31-48.

REIN JO (2021) The Scorpion Files. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology. Acessado em 23 de Janeiro de 2021. Disponível em <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>

ROCHA DG, KAEFER IL (2019) What has become of the refugia hypothesis to explain biological diversity in Amazonia? *Ecol Evol.*9:4302–430

ROMÁN JP, GARCÍA F, MEDINA D, VÁSQUEZ M, GARCÍA J, GRAHAM MR, ROMERO-ALVAREZ D, PARDAL PPO, ISHIKAWA EAY, BORGES A (2018) Scorpion envenoming in Morona Santiago, Amazonian Ecuador: Molecular phylogenetics confirms involvement of the *Tityus obscurus* group. *Acta Trop.*178:1-9.

SAHARA K, MAREC F, TRAUT W (1999) TTAGG Telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res* 7: 449–460

SCHNEIDER MC, CELLA DM (2010) Karyotype conservation in 2 populations of the parthenogenetic scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and Its associated heterochromatin are concentrated on only one chromosome. *J. Hered.* 101: 491-496.

SCHNEIDER MC, MATTOS VF, CARVALHO LS, CELLA DM. (2015) Organization and behavior of the synaptonemal complex during achiasmatic meiosis of four buthid scorpions. *Cytogenet Genome Res.* 144:341-347.

ŠTÁHLAVSKÝ F, NGUYEN P, SADÍLEK D, ŠTUNDLOVÁ J, JUST P, HADDAD CR, KOÇ H, RANAWANA KB, STOCKMANN M, YAĞMUR EA, KOVAŘÍK F. (2020) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of buthid scorpions (Chelicerata: Arachnida)., *Biological Journal of the Linnean Society*, blaa118, <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa118>

SUMNER AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304–306.

TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.

TORREZ PPQ; DOURADO FS; BERTANI R; CUPO P; FRANÇA FOS (2019). Scorpionism in Brazil: exponential growth of accidents and deaths from scorpion stings. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52, e20180350.

UBINSKI CV, CARVALHO LS, SCHNEIDER MC (2018) Mechanisms of karyotype evolution in the Brazilian scorpions of the subfamily Centruroidinae (Buthidae). *Genetica* 146: 475–486

WANG IJ, BRADBURD GS (2014) Isolation by environment. *Molecular Ecology* 23: 5649–5662.

ZHANG X, LIU G, FENG Y, ZHANG D, SHI C (2020) Genetic analysis and ecological niche modeling delimit species boundary of the Przewalski's scorpion (Scorpiones: Buthidae) in arid Asian inland. *Zoological Systematics* 45: 81–96.

ZWICK MS, HANSON RE, MCKNIGHT TD, NURUL-ISLAM-FARIDI M, STELLY DM (1997) A rapid procedure for the isolation of *Cot*-1 DNA from plants. *Genome* 40: 138–142

Tabelas

Tabela 1: Informações gerais sobre amostra de *T. metuendus* utilizada para análise morfométrica no presente estudo. N = tamanho amostral.

Tabela 2Tabela 1: Informações gerais sobre amostra de *T. metuendus* utilizada para análise morfométrica no presente estudo. N = tamanho amostral.

Grupo	Localidade	N	Coordenada Geográfica
Pará	Anapú	5	3°07'51"S/51°22'46"O
	Brasil Novo	1	3°02'35"S/52°38'36"O
	Altamira	2	3°13'53"S/52°14'35"O
	Óbidos	5	1°54'16"S/55°31'12"O
Amazonas	Manaus	1	3°06'10"S/59°58'42"O
	Parintins	7	2°38'15"S/56°43'46"O
	Presidente Figueiredo	2	2°02'56"S/60°02'24"O
Rondônia	Porto Velho	4	9°16'52"S/63°56'22"O
Acre	Cruzeiro do Sul	2	7°39'37"S/72°38'50"O

Tabela 2: Contagem do número de dentes dos pentes e séries de grânulos do pedipalpo em indivíduos machos de *T. metuendus*.

Tabela 3Tabela 2: Contagem do número de dentes dos pentes e séries de grânulos do pedipalpo em indivíduos machos de *T. metuendus*.

Número de dentes do pente direito											
	16	17	18	19	20	21	22	23	Média	Moda	Desvio Padrão
Pará					7	2	1	3	21	20	±1.29
Amazonas				4	2	3			19.88	19	±0.92
Rondônia	1			1	2				18.75	20	±1.89
Acre				2					19	19	±0.00
Número de séries de grânulos do dedo móvel do pedipalpo direito											
	16	17	18	19	20	21	22	23	Média	Moda	Desvio Padrão
Pará	2	6		4	1				17.69	17	±1.31
Amazonas	2	4	3						17.11	17	±0.78
Rondônia		4							17	17	±0.00
Acre	1	1							16.50	-	±0.70

Tabela 3: Médias de proporções morfométricas calculadas para os quatro grupos de *T. metuendus* analisados no presente estudo.

Tabela 4Tabela 3: Médias de proporções morfométricas calculadas para os quatro grupos de *T. metuendus* analisados no presente estudo.

Proporção Morfométrica	Pará (n = 13)	Amazonas (n = 9)	Rondônia (n = 4)	Acre (n =2)
FC/FL	0.528 ± 0.38	0.446 ±0.03	0.341 ±0.01	0.453 ±0.22
TC/TL	2.007 ± 0.10	1.758 ±0.22	1.274 ±0.02	1.423 ±0.00
QC/QL	1.923 ±0.15	1.833 ±0.18	1.430 ±0.13	1.511 ±0.08
QC/DMC	0.598 ±0.45	0.574 ±0.03	0.598 ±0.03	0.607 ±0.01
MET4C/MET4L	1.992 ±0.75	1.612 ±0.11	1.184 ±0.05	1.412 ±0.10
MET5C/MET5L	2.195 ±0.93	1.724 ±0.13	1.292 ±0.10	1.562 ±0.03
CARC/CARLP	1,071 ±0.75	1.050 ±0.12	1.035 ±0.74	1.070 ±0.00
CARC/QC	1.244 ±0.86	1.252 ±0.16	1.297 ±0.32	1.292 ±0.00
CARL/MET4L	1.637 ±1.62	1.487 ±0.26	1.184 ±0.10	1.289 ±0.01
DMC/MET5C	1.076 ±0.06	1.224 ±0.07	1.204 ±0.07	1.126 ±0.04
CARLP/ MET5L	1.641 ±0.17	1.452 ±0.23	1.169 ±0.12	1.291 ±0.05
TL/QL	0.920 ±0.96	0.913 ±0.66	0.765 ±0.06	0.847 ±0.02
FL/QL	0.713 ±0.00	0.675 ±0.00	0.527 ±0.00	0.640 ±0.00
FL/ MET5L	0.523 ±0.00	0.447 ±0.00	0.340 ±0.00	0.455 ±0.00
TC/ MET5L	2.007 ±0.01	1.757 ±0.04	1.275 ±0.00	1.420 ±0.00

Tabela 4: Coeficiente das funções discriminantes obtidas para as amostras de *T. metuendus*.

Tabela 5Tabela 4: Coeficiente das funções discriminantes obtidas para as amostras de *T. metuendus*.

Proporção Morfométrica	F1	F2	F3
FC/FL	-0,272	-0,650	0,781
TC/TL	5,370	17,946	-8,112
QC/QL	0,146	-3,786	-5,911
QC/DMC	2,106	0,468	7,180
MET4C/MET4L	0,182	-1,272	0,495
MET5C/MET5L	2,799	1,346	4,984
CARC/CARLP	-2,992	3,648	-3,010
CARC/QC	4,106	-2,800	3,564
CARL/MET4L	4,487	6,010	1,011
DMC/MET5C	1,854	0,931	4,976
CARLP/ MET5L	-8,820	-1,539	-4,277
TL/QL	4,799	18,182	-8,434
FL/QL	-4,660	-11,909	16,235
FL/ MET5L	3,119	7,493	-12,997
TC/ MET5L	-3,406	-13,296	8,345
Eigenvalue	24,162	9,515	2,799

Tabela 5: Estimativa de divergência genética entre citótipos de *T. metuendus* e linhagens de *T. obscurus*. As médias das distancias genéticas calculadas para 16S rDNA e COI são mostradas respectivamente, acima e abaixo da diagonal.

Tabela 6Tabela 5: Estimativa de divergência genética entre citótipos de *T. metuendus* e linhagens de *T. obscurus*. As médias das distancias genéticas calculadas para 16S rDNA e COI são mostradas respectivamente, acima e abaixo da diagonal.

	<i>T. metuendus</i> Citótipo A	<i>T. metuendus</i> Citótipo B	<i>T. obscurus</i> Leste	<i>T. obscurus</i> Oeste	<i>T. obscurus</i> Morona
<i>T. metuendus</i> Citótipo A	-	0.0641	0.0933	0.0705	-
<i>T. metuendus</i> Citótipo B	0.1052	-	0.1233	0.0796	-
<i>T. obscurus</i> Leste	0.1246	0.1006	-	0.1079	-
<i>T. obscurus</i> Oeste	0.1125	0.0743	0.1246	-	-
<i>T. obscurus</i> Morona	0.0917	0.0837	0.0682	0.1114	-

Tabela 6: Classificação morfológica dos espécimes machos de *T. metuendus* através de análise de funções discriminantes.

Tabela 7Tabela 6: Classificação morfológica dos espécimes machos de *T. metuendus* através de análise de funções discriminantes.

Grupo Originais	Grupos Preditos				Total
	Pará	Amazonas	Rondônia	Acre	
Pará	13	0	0	0	13(100%)
Amazonas	0	9	0	0	9 (100%)
Rondônia	0	0	4	0	4 (100%)
Acre	0	0	0	2	2 (100%)

Legenda das Figuras

Figura 1: Discriminação de populações de *T. metuendus* sobre plano multivariado baseada em 15 proporções morfométricas.

Figura 2: Cariótipos dos citótipos A ($2n = 18$) e B ($2n = 12$) de *T. metuendus* submetidos a coloração convencional (a,b) e bandeamento C (c,d).

Figura 3: Mapeamento cromossômico de 45S rDNA (a,b) e sequencias teloméricas (c,d) em citótipos A e B de *T. metuendus*.

Figura 4: Organização cromossômica da fração *C₀t*-1 DNA (a,b) e transposon *Mariner* (c,d) em citótipos A e B de *T. metuendus*.

Figura 5: Árvore filogenética de citótipos de *T. metuendus* e linhagens de *T. obscurus* obtida por Máxima Verossimilhança e Inferencia Bayesiana com gene 16S rDNA. Os valores de suporte de cada ramo são representados pelo *bootstrap*/probabilidade *a posteriori*. Nota: Tmet 1-5 (Citótipo A); Tmet 6-10 (Citótipo B); Tobs_E1-5 (linhagem leste de *T. obscurus*); Tobs_W1-5 (linhagem oeste de *T. obscurus*).

Figura 6: Árvore filogenética de citótipos de *T. metuendus* e linhagens de *T. obscurus* obtida por Máxima Verossimilhança e Inferencia Bayesiana com gene COI. Os valores de suporte de cada ramo são representados pelo *bootstrap*/probabilidade *a posteriori*. Nota: Tmet 1-5 (Citótipo A); Tmet 6-10 (Citótipo B); Tobs_E1-5 (linhagem leste de *T. obscurus*); Tobs_W1-5 (linhagem oeste de *T. obscurus*); Tobs_Moron (*T. obscurus* do Equador)

Figura 1

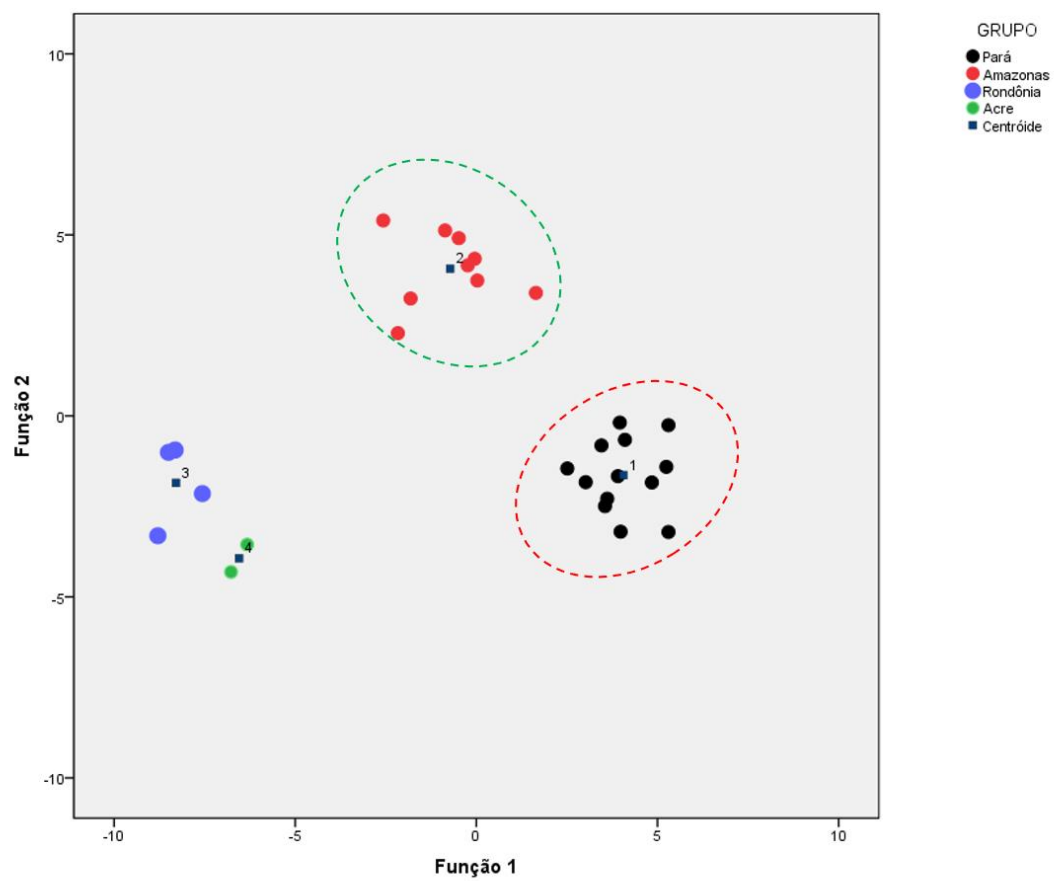


Figura 2

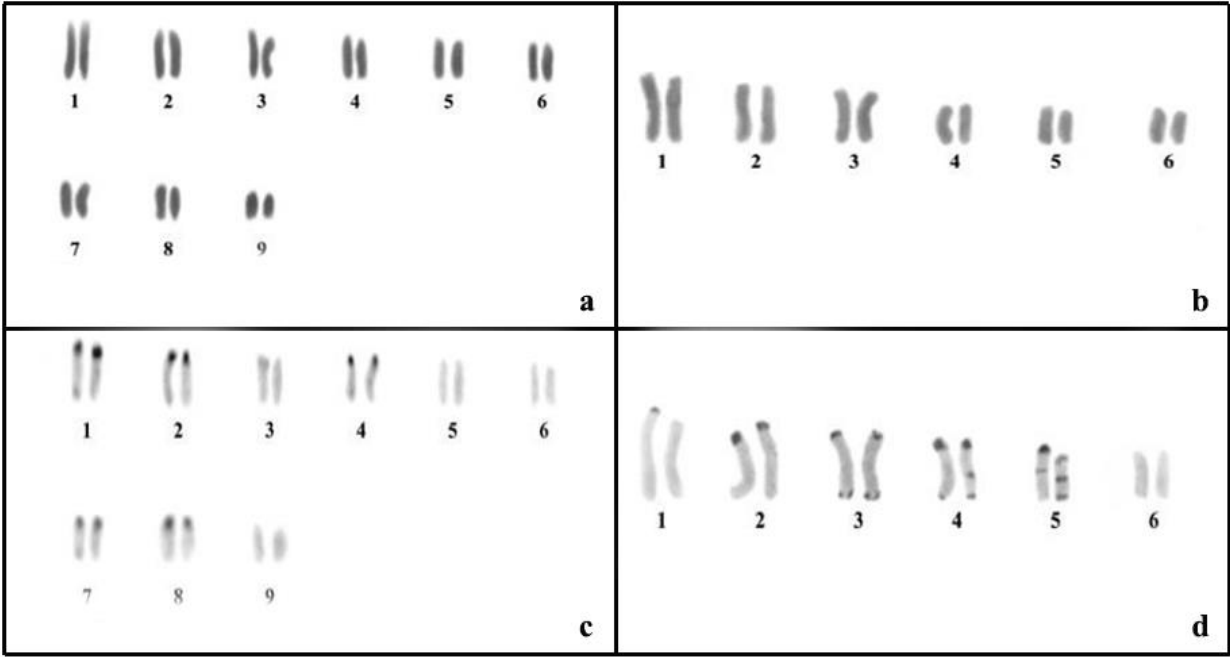


Figura 3

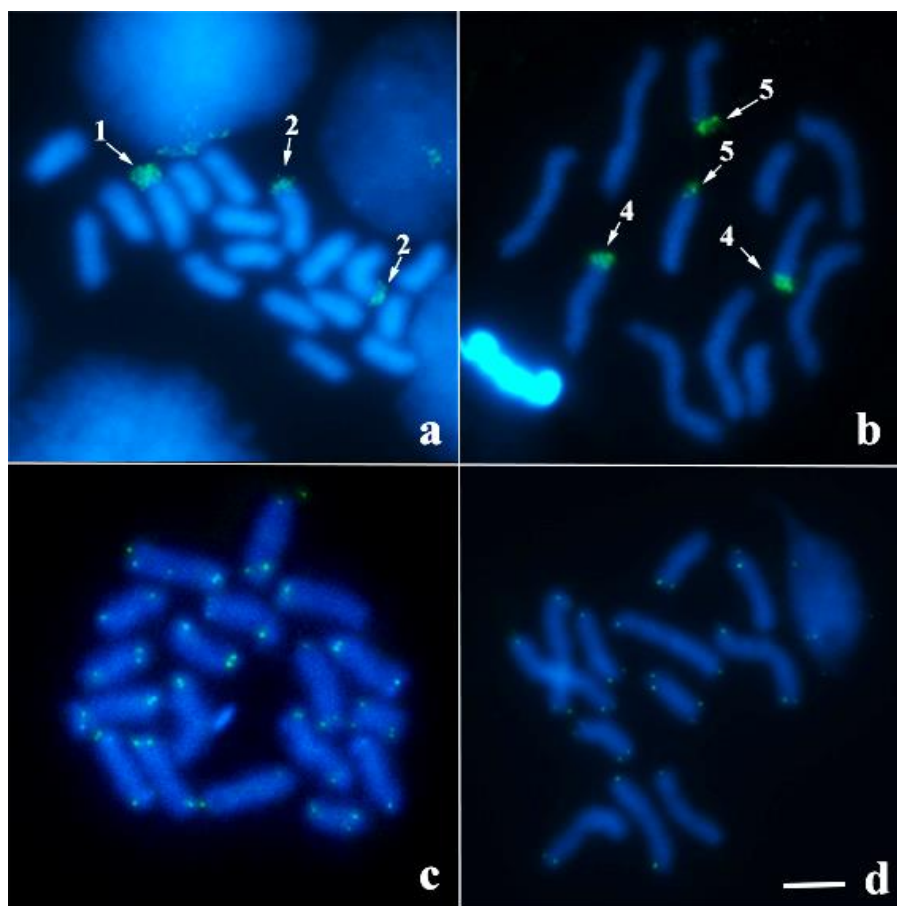


Figura 4

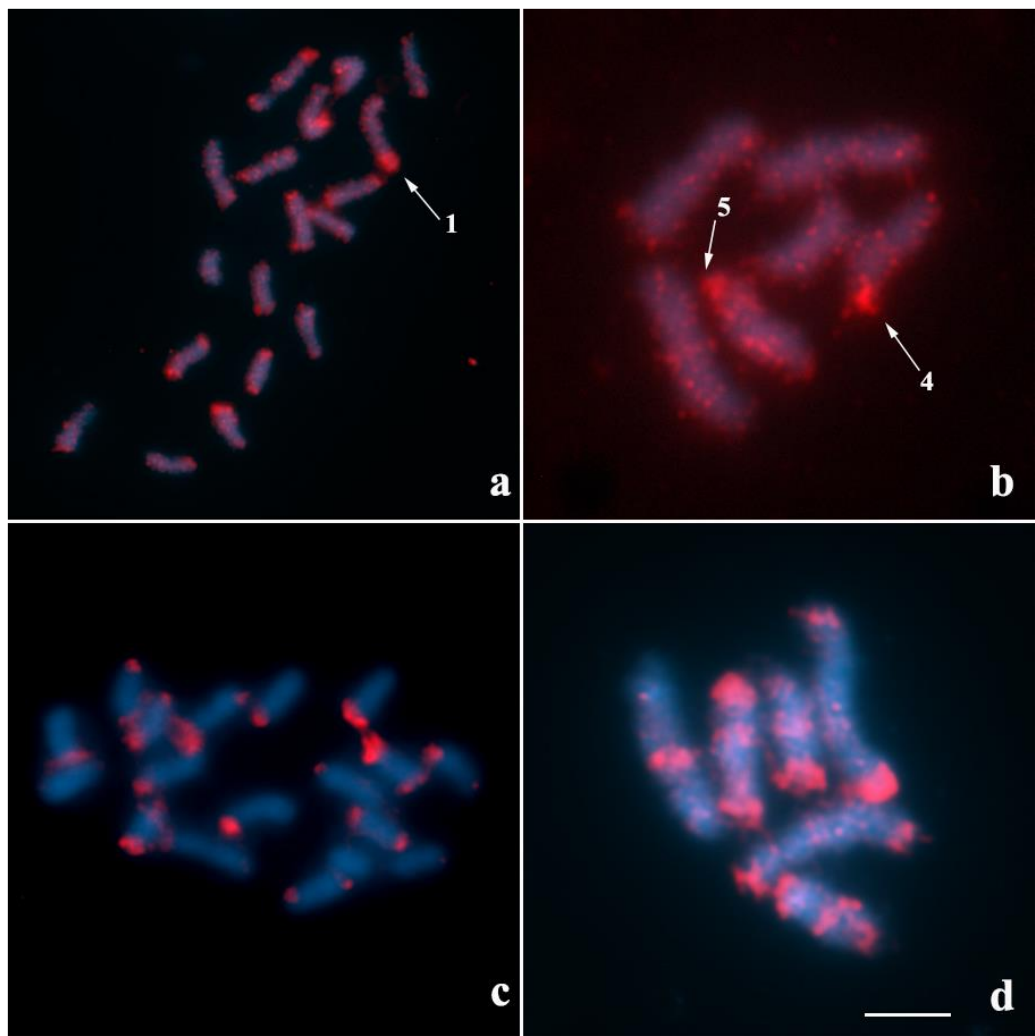


Figura 5

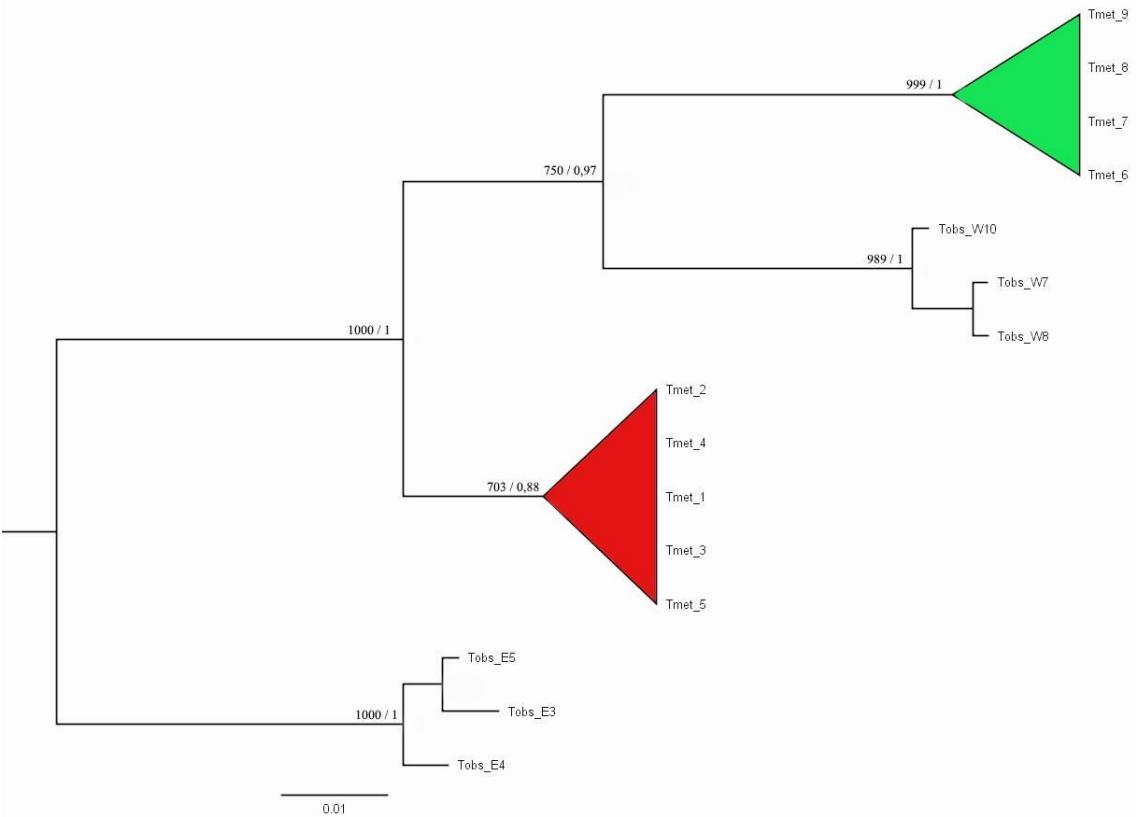
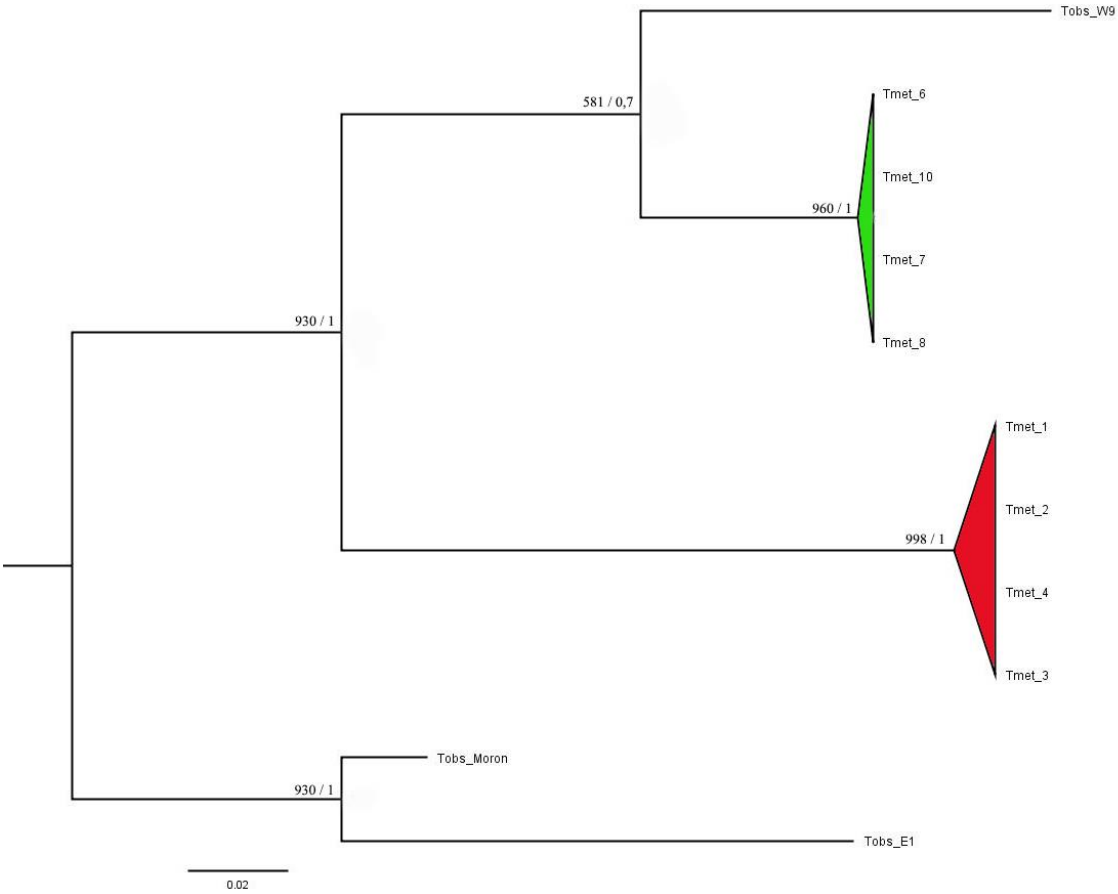


Figura 6



CAPÍTULO 2: Diversidade cariotípica e dinâmica genômica de sítios 45S rDNA em escorpiões *Brotheas* (Scorpiones, Chactidae) da Amazônia Brasileira

Bruno Rafael Ribeiro de Almeida¹; Jonas Gama Martins²; Renata Coelho Rodrigues Noronha¹; Stella Miranda Malcher¹; Marlyson Jeremias Rodrigues da Costa¹; Cleusa Yoshiko Nagamachi¹; Rudi Emerson de Lima Procópio²; Julio Cesar Pieczarka¹

¹Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Avenida Augusto Corrêa, nº01, 66075-900, Belém, Pará, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas, Brasil.

***Corresponding author:** Julio Cesar Pieczarka

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Campus do Guamá

Av. Perimetral, s/n. Guamá

66075-900 Belém – Pará, Brazil

E-mail: juliopieczarka@gmail.com

RESUMO

Rearranjos cromossômicos em heterozigose são amplamente registrados na ordem Scorpiones, promovendo alta diversidade cariotípica em diversas espécies. No presente estudo, realizamos análise citogenética em três espécies de *Brotheas* (Chactidae), com o objetivo de inferir os mecanismos responsáveis pela evolução cromossômica neste gênero. Nossos resultados demonstraram $2n = 40$ em *Brotheas silvestris* e $2n = 48$ em *Brotheas paraensis*; em *Brotheas amazonicus* observamos dois cariótipos distintos: $2n = 50$ (citótipo A-população Manaus), e $2n = 52$ (citótipo B-população Parintins). A distribuição do 45S rDNA também divergiu entre as espécies estudadas: terminal no par 16 em *B. silvestris*; na região pericentromérica do par 5 em *B. paraensis*; terminal nos pares 16 e 4 nos citótipos A e B de *B. amazonicus*, respectivamente. A quantidade, tamanho e distribuição de *clusters* deste rDNA foi altamente variável no citótipo B de *B. amazonicus*. Alguns indivíduos do citótipo B de *B. amazonicus* apresentaram associações multi-cromossômicas durante meiose I (quadrivalentes e hexavalentes), que envolvem o par portador do 45S rDNA. Sequências teloméricas foram registradas apenas nas extremidades cromossômicas. O multigene U2 snRNA foi mapeado na região intersticial em *B. paraensis* e citótipo A de *B. amazonicus*, enquanto no citótipo B foi registrado na região terminal do quadrivalente (associado a 45S rDNA). Nossos resultados mostraram que eventos de fusão/fissão, inversões e translocações estão envolvidos na evolução cariotípica de *Brotheas*, sendo estes últimos responsáveis pela formação de associações multi-cromossômicas no citótipo B de *B. amazonicus*. A ação de inversões, bem como amplificação e degeneração de *clusters* 45S rDNA, explicam as diferentes configurações deste rDNA no genoma das espécies estudadas. Por último, nossos resultados sugerem formação de espécies crípticas em *B. amazonicus* e indicam que rearranjos cromossômicos podem estar atuando como barreiras pós-zigóticas ao fluxo gênico entre as duas populações analisadas.

Palavras-chave: Translocação recíproca, Scorpiones, cromossomos monocêntricos, *Brotheas*

1. INTRODUÇÃO

Rearranjos cromossômicos, tais como translocações, inversões, fusões e fissões, desempenham importante papel na evolução dos genomas de organismos eucariotos, em

adição a processos em escala gênica (Crombach e Hogeweg, 2007). Eles podem ser desencadeados por fatores externos (radiação, por exemplo) ou celulares, como erros durante recombinação e reparo de DNA (Mieczkowski *et al.*, 2006; Mani e Chinnaiyan, 2010; Auvinet *et al.*, 2018). Neste último caso, diferentes classes de DNA repetitivo podem ser enriquecidos em regiões genômicas instáveis, constituindo sítios frágeis, suscetíveis a quebras (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006; Glugoski *et al.*, 2018). Ademais, recombinação ectópica envolvendo sequências repetitivas entre cromossomos não-homólogos ou transposição de elementos móveis podem ser grandes forças evolutivas para diferenciação cariotípica, por promoverem translocações ou inversões cromossômicas (Argueso *et al.*, 2008; Delprat *et al.*, 2009; Scelfo e Fachinetti, 2019). Dentre as consequências de rearranjos cromossômicos pode-se citar a modificação da expressão gênica (efeito de posição), supressão da recombinação entre regiões rearranjadas e formação de barreiras pós-zigóticas (por meio da infertilidade de híbridos) entre subgrupos de uma espécie, contribuindo para o processo de especiação (Harewood e Fraser, 2014; Martin *et al.*, 2020).

Scorpiones é uma das ordens mais antigas do filo Arthropoda e abrange aproximadamente 1900 espécies (Rein, 2021). Estes aracnídeos são excelentes modelos para o estudo de rearranjos cromossômicos, pois diversas famílias exibem alta incidência de quebras e fusões espontâneas (Schneider *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2017). Essa característica torna-se evidente quando comparamos a variação do número diploide nas famílias Buthidae ($2n = 5$ a 44), Euscorpiidae ($2n = 46$ a 112), Liochelidae ($2n = 48$ a 174), Scorpionidae ($2n = 50$ a 120) e Urodacidae ($2n = 29$ a 175) (Schneider *et al.*, 2021). Adicionalmente estudos anteriores demonstraram que, durante a Meiose I, alguns integrantes desta ordem exibem associações multivalentes resultantes de translocações recíprocas múltiplas (Plíšková *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017; Adilardi *et al.*, 2020). Embora em muitos organismos os rearranjos que originam associações meióticas multicromossômicas tenham tendência a ser estáveis e conservados dentro de uma mesma espécie, em Scorpiones essas cadeias ou anéis podem diferir aos níveis inter ou intrapopulacional e até mesmo entre células de um mesmo indivíduo (Mattos *et al.*, 2018). Os fatores que desencadeiam essa alta diversidade cariotípica ainda são pouco conhecidos. A maior parte dos estudos neste sentido foram realizados na família Buthidae, que possui cromossomos holocêntricos (com centrômero descentralizado, disperso ao longo das cromátides), para os quais sugere-se que pontos de quebras

localizados em regiões terminais são responsáveis por eventos de fusão/fissão (Almeida *et al.*, 2017; Adilardi *et al.*, 2016; 2020).

A fração repetitiva do genoma compreende sequências com centenas ou milhares de cópias, a exemplo de famílias multigênicas (rDNAs, U snRNAs, genes histônicos, etc), DNAs satélites e elementos transponíveis, que desempenham diversos papéis funcionais e estruturais nas células eucarióticas (Biscoti *et al.*, 2015). O 45S rDNA, também denominado região organizadora de nucléolo (NOR), é a maior sequência responsável pela transcrição de RNAs que constituirão os ribossomos citoplasmáticos. Em animais, ele compreende um conjunto de repetições *in tandem* composto dos genes 18S, 28S e 5.8S, separados por regiões espaçadoras intergênicas internas e externas (Ban *et al.*, 2015; Sochorová *et al.*, 2018). Estudos acerca do mapeamento cromossômico deste DNA repetitivo em Scorpiones, demonstrou que 45S rDNA é presente geralmente na região terminal de um par do cariótipo (Mattos *et al.*, 2014; Šťáhlavský *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2019; Štundlová *et al.*, 2019). Entretanto, em algumas espécies, extensa dispersão deste multigene foi registrada recentemente (Šťáhlavský *et al.*, 2020). Interessantemente, em muitos escorpiões o par portador do 45S rDNA é envolvido em associações multivalentes (Adilardi *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017; Šťáhlavský *et al.*, 2020).

Chactidae é uma das maiores famílias de Scorpiones reunindo cerca de 15 gêneros e 209 espécies. Até o presente momento poucos dados citogenéticos são conhecidos para membros desta família, com apenas duas espécies apresentando descrições cariotípicas: *Neochactas parvullus* ($2n = 56$) e *Brotheas amazonicus* ($2n = 50$) (Ferreira *et al.*, 1968; Almeida *et al.*, em redação). A primeira espécie apresenta um cariótipo altamente bimodal, enquanto a segunda mostrou cromossomos que decrescem gradualmente de tamanho. No presente estudo, realizamos análise citogenética em três espécies de *Brotheas*, com o objetivo de inferir os mecanismos responsáveis pela evolução cromossômica neste gênero e o papel do DNA repetitivo na sua reorganização genômica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Análise cariotípica

Dados sobre quantidade e o sexo dos indivíduos amostrados no presente estudo e suas respectivas localidades de coleta estão descritas na tabela 1. A identificação taxonômica foi realizada segundo Lourenço (2002). Os espécimes foram depositados na coleção do Laboratório de Entomologia Médica e Artrópodes Peçonhentos

(LEMAP/UFPA). Gônadas e embriões foram hipotonizadas em KCl 0,075M, e posteriormente fixados em solução de metanol:ácido acético (3:1). Suspensão celular gerada a partir da digestão de gônadas e embriões em ácido acético 60% foi espalhada em lâminas a 45°C. Cromossomos foram corados com Giemsa 5%. Medidas cromossômicas foram realizadas através do software DRAWID (Kirov *et al.*, 2017). A determinação da morfologia cromossômica seguiu a classificação de Levan *et al.* (1964).

2.2.Sondas

A Sonda 45S rDNA foi produzida a partir do plasmídeo pTa71, que contém a sequência completa deste rDNA de *Triticum aestivum* (Gerlach e Bedrok, 1945). Por sua vez, sonda de sequências teloméricas de artrópodes e do U2 snRNA foram obtidas por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores descritos por Sahara *et al.* (1999) e Colgan *et al.* (1998), respectivamente. As reações de PCR foram constituídas de: 16,25 µL de água estéril, 2,5 µL de tampão da Taq Polimerase 10x, 2 µL de DNTP mix (2mM), 1 µL de DNA genômico(100ng), 1 µL de MgCl₂ (50mM), 1 µL de primer forward (10mM), 1 µL de primer reverse (10mM), 0,25 µL de Taq Polimerase 1U. As configurações termais das PCR foram: 1 ciclo de 94°C (5 minutos); 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 53 a 55°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto); 1 ciclo de 72°C (10 minutos); 1 ciclo 4°C (hold). Todas as sondas foram marcadas por *nick translation* utilizando digoxigenina-14-dUTP (Roche, Mannheim, Germany).

2.3.Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

FISH foi realizada de acordo com Cabral-de-Mello *et al.* (2021). Inicialmente os cromossomos foram tratados com solução de Pepsina 1%, fixados em Paraformaldeído 4% e desidratados em bateria de álcool (70%, 90% e 100%). A desnaturação do DNA cromossômico e de sondas ocorreu a 70°C e 100°C, respectivamente. Lâminas foram mantidas a 37°C, *overnight*, para a hibridização. Posteriormente, lâminas foram lavadas com 2xSSC e 4xSSC-Tween para remoção de hibridizações inespecíficas. Sondas foram detectadas com Anti-digoxigenina-FITC. Cromossomos foram contracorados com 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) contendo antifading Vectashield (Vector).

3. RESULTADOS

No presente estudo, foram registrados cromossomos monocêntricos típicos, cariótipos unimodais e ausência de pares sexuais heteromórficos nos quatro táxons analisados (Figura 1). O número diploide e a fórmula cariotípica variaram segundo a espécie estudada: $2n = 40$ e cariótipo constituído de 28 metacêntricos, 6 submetacêntricos e 6 acrocêntricos em *Brotheas silvestris* (figura 1a); $2n = 48$, e cariótipo com 14 metacêntricos, 4 submetacêntricos e 30 acrocêntricos em *Brotheas paraensis* (figura 1b,c); em relação a *Brotheas amazonicus* dois cariótipos distintos foram registrados: $2n = 50$ (24 metacêntricos, 4 submetacêntricos e 22 acrocêntricos) na população de proveniente de Manaus - citótipo A (figura 1d); e $2n = 52$ (20 metacêntricos, 10 submetacêntricos e 22 acrocêntricos) na amostra de Parintins – citótipo B (figura 1e).

Células em metáfase I de indivíduos machos das três espécies não demonstraram quaisquer evidências de quiasma (meiose aquiasmática) (figura 1). Na maior parte dos espécimes estudados foram observadas as seguintes quantidades de pares de homólogos com comportamento meiótico regular: 20 bivalentes em *B. silvestris* (figura 1a); 24 bivalentes em *B. paraensis* (figura 1b, c); 25 bivalentes em citótipo A de *B. amazonicus* ($2n = 50$) (figura 1d). Em contraste, no citótipo B de *B. amazonicus* ($2n = 52$) diferentes configurações meióticas foram observadas: 26 bivalentes regulares em 5 indivíduos (figura 1e); 23 bivalentes e 1 hexavalente em 2 indivíduos (figura 1 f,i); 24 bivalentes e 1 quadrivalente em 1 indivíduo (figura 1 g, h).

Diferentes distribuições do 45S rDNA foram registrados entre os cariótipos analisados. Em *B. silvestris* esta sequência foi observada na região terminal do braço curto do par 16 (figura 2a). Em *B. paraensis* 45S rDNA localiza-se na região pericentromérica do par 5 (figura 2b). Em *B. amazonicus* dois padrões distintos foram evidenciados: no citótipo A ($2n = 50$) 45S rDNA foi mapeado na região terminal do braço longo do par 16 (figura 2c); por outro lado, no citótipo B de *B. amazonicus* ($2n = 52$), portadores de 26 bivalentes, este DNA repetitivo foi observado no par 4, com um dos cromossomos deste par portando apenas um sinal em uma extremidade, enquanto seu homólogo apresentou dois clusters 45S rDNA de tamanhos desiguais nas duas extremidades (figura 2d). FISH em células meióticas deste citótipo também revelou que exemplares portadores de multivalentes apresentam o maior rDNA em pares envolvidos na cadeia cromossômica: o indivíduo que possui um quadrivalente, mostrou que este rDNA está presente apenas em uma região terminal de dois elementos heteromórficos envolvidos nesta associação

(figura 2e); em espécimes portadores do hexavalente, dois *clusters* 45S rDNA, de tamanhos desiguais, foram observados em ambas as extremidades de um único cromossomo componente deste multivalente (figura 2f).

Sequências teloméricas de artrópodes (TTAGG) foram registradas nas extremidades dos cromossomos em todos os indivíduos estudados (figura 3).

Mapeamento do gene U2 snRNA foi obtido com êxito em apenas 3 citótipos. Em *B. paraensis* ele localiza-se na região intersticial do braço curto do par 17 (figura 4a). No citótipo A de *B. amazonicus* ($2n = 50$) este multigene foi observado no braço curto do par 3 (figura 4a). No indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* ($2n = 52$), portador do quadrivalente, U2 snRNA foi registrado na região terminal de um par envolvido nesta associação (figura 4c); análises cariométricas permitiram identificar que U2 snRNA localiza-se na mesma região terminal do 45S rDNA neste multivalente (figura 4c).

4. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram alta diversidade citogenética entre integrantes do gênero *Brotheas* da Amazônia Brasileira. Dentre as espécies estudadas, *B. paraensis* e *B. silvestris* são simpátricas e morfologicamente relacionadas, diferindo apenas em relação à coloração e granulação de alguns segmentos corporais (Lourenço, 2002). Nossos achados permitiram distingui-las citogeneticamente e sugerem que estas divergem por no mínimo 8 eventos de fusão/fissão. Porém, a taxa de rearranjos responsáveis pela reorganização genômica entre *B. paraensis* e *B. silvestris* pode ser muito superior; o uso de técnicas com maior potencial para detecção de alterações cariotípicas, como pintura cromossômica, pode revelar rearranjos crípticos em *Brotheas*, como evidenciado em peixes (Nagamachi *et al.*, 2013) e mamíferos (Di-Nizo *et al.*, 2015). De igual forma, análises do complexo sinaptonêmico devem ser realizadas em *Brotheas*, para investigar ocorrência de inversões em estado heterozigoto, que realizam heterosinapse durante o paquíteno, como registrado no escorpião *Urodacus* (Shanahan e Hayman, 1990). Sequências teloméricas intersticiais (ITS) não foram observadas em nenhuma destas duas espécies, sugerindo que fusão/fissão não envolveram telômeros dos cromossomos originais, ou que ITSs podem ter sido removidos após a ocorrência destes rearranjos (Mohan *et al.*, 2010; Adilardi *et al.*, 2016). Análise da fórmula cariotípica em *Brotheas* também permitiu inferir ocorrência de inversões durante diversificação cromossômica deste gênero. Este rearranjo tem sido recorrentemente documentado em outros escorpiões

que apresentam sistemas monocêntricos, como *Urodacus* (Shanahan, 1989), *Euscorpius* (Štundlová *et al.*, 2019) e *Hadogenes* (Šťáhlavský *et al.*, 2018). Inversões também podem explicar a divergência na morfologia do cromossomo portador do 45S rDNA e na localização física desta sequência repetitiva entre *B. paraensis* (NOR pericêntrica) e *B. silvestris* (NOR terminal) (figura 5).

Em relação a *B. amazonicus*, o número diploide $2n = 50$ (citótipo A) registrado no presente estudo concorda com os dados descritos por Ferreira *et al.* (1968). Entretanto, este citótipo mostrou profundas diferenças quanto a estrutura cariotípica (número diploide, morfologia cromossômica, localização de 45S rDNA e U2 snRNA) em relação ao citótipo B ($2n = 52$); este fato sugere possível existência de espécies crípticas. No caso específico do citótipo B, ocorrência de multivalentes meióticos mostrou que translocações múltiplas são importantes mecanismos envolvidos na sua diferenciação cromossômica (ver figura 6). Cadeias e anéis meióticos foram registrados em várias famílias de Scorpiones, e em geral promovem heteromorfismos em diversos pares do cariótipo (Schneider *et al.*, 2009; Plíšková *et al.*, 2016; Mattos *et al.*, 2018; Adilardi *et al.*, 2020). Dados ecológicos sobre *B. amazonicus* revelaram que esta espécie apresenta baixa motilidade e alta abundância em certas regiões da Floresta Amazônica, onde indivíduos buscam abrigos contra a predação, e podem formar agrupamentos com baixa densidade populacional (Höffer *et al.*, 1996). Esses atributos populacionais podem promover alta incidência de cruzamento entre indivíduos heterozigotos para diferentes translocações, e aumentar a taxa de ocorrência de multivalentes no citótipo B de *B. amazonicus*. Estudos anteriores têm demonstrado que indivíduos resultantes de hibridização, portadores de translocações múltiplas, apresentam baixa fertilidade, alterações meióticas no comportamento sináptico, diminuição da taxa de recombinação e erros de segregação cromossômica (Matveevsky *et al.*, 2020). Entretanto, diversas adaptações em processos celulares e cromossômicos podem ser desenvolvidas para diminuir os efeitos deletérios destes rearranjos, favorecendo sua fixação na população (Gross *et al.*, 2009; McClure *et al.*, 2018; Noronha *et al.*, 2020). No citótipo B de *B. amazonicus*, assim como nos demais integrantes da ordem Scorpiones, a ausência de quiasmas e orientação *zig-zag* dos cromossomos durante Meiose I podem ser fatores indispensáveis para formação de gametas balanceados e segregação correta dos elementos envolvidos em associações multivalentes (Shanahan e Hayman, 1990; Schneider *et al.*, 2015).

Na maior parte dos indivíduos do citótipo B *B. amazonicus*, análise FISH mostrou a presença de dois grandes *clusters* 45S rDNA em cada elemento do par 4, sendo ambos altamente divergentes em relação ao tamanho; adicionalmente, no maior homólogo deste par, um sítio extra na extremidade oposta foi registrada. Esse padrão é incomum para a ordem Scorpiones, na qual casos semelhantes de heteromorfismos de NOR apenas foram observados pontualmente em alguns integrantes das famílias Buthidae (Adilardi *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2020; Šťáhlavský *et al.*, 2020) e Hormuridae (Šťáhlavský *et al.*, 2018). No citótipo B de *B. amazonicus*, esse resultado pode ser explicado pela ocorrência de amplificação de motivos 45S rDNA, com posterior *crossing-over* desigual entre os mesmos, similar ao observado em peixes (Frade *et al.*, 2019), anfíbios (Suárez *et al.*, 2020), plantas (Su *et al.*, 2020) e outros artrópodes (Neto *et al.*, 2013; Šťáhlavský *et al.*, 2018). Amplificação de 45S rDNA é um fenômeno controlado epigeneticamente pela célula, e pode constituir resposta a fatores ambientais (Jack *et al.*, 2015). Em alguns organismos, tais como plantas (Huang *et al.*, 2008), mamíferos (Cazaux *et al.*, 2011) e peixes (Frade *et al.*, 2019) foi demonstrado que constrições 45S rDNA constituem sítios frágeis, e podem promover instabilidade genômica. Durante o *bouquet* meiótico, extremidades cromossômicas unem-se a membrana nuclear, e telômeros permanecem agrupados a um único polo da célula. Segundo Hirai (2020) diversas associações entre *clusters* 45S rDNA terminais e regiões heterocromáticas podem ocorrer nesta fase do ciclo meiótico, promovendo dispersão de parte de cópias deste multigene para outros *loci* genômicos. Assim, é plausível sugerir que o sítio extra observado neste citótipo provavelmente foi originado por meio de recombinação ectópica ou translocação de parte das repetições dos *clusters* principais, durante organização da configuração *bouquet* em meiose I.

Considerando a distribuição do 45S rDNA observada no presente estudo, propomos que as associações multi-cromossômicas registradas no citótipo B de *B. amazonicus* podem ter origens independentes (ver figura 5). Baseado nos dados cariotípicos do citótipo A de *B. amazonicus* e nas características citogenéticas da maioria dos escorpiões (Mattos *et al.*, 2014; Šťáhlavský *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2019; Štundlová *et al.*, 2019; Šťáhlavský *et al.*, 2020), sugerimos que o cromossomo ancestral no gênero *Brotheas*, portador do 45S rDNA, possuía um *cluster* terminal deste DNA repetitivo e morfologia metacêntrica. No caso específico do espécime portador do quadrivalente (citótipo B), a origem desta configuração meiótica pode estar relacionada

a ocorrência de uma translocação recíproca entre o par da NOR ancestral e um par metacêntrico pequeno não identificado; essa hipótese é apoiada pela existência de *clusters* 45S rDNA terminais e de tamanhos iguais entre os homólogos, localizados somente em uma das extremidades de um dos pares envolvidos nesta associação. Em contrapartida, hipotetizamos que nos espécimes que possuem hexavalente, o par que apresenta a NOR pode ter sido derivado do par 4 (portador do rDNA) típico da maior parte dos indivíduos do citótipo B de *B. amazonicus*, descrito no parágrafo anterior. Como parte da evolução em concerto deste DNA repetitivo, algumas repetições 45S rDNA podem ser degeneradas em pseudogenes ou perdidas via recombinação, a fim de promover homogeneização de tais sequências (Ganley e Kobayashi, 2007; Garcia *et al.*, 2017; Ferretti *et al.*, 2019). Dessa forma, em indivíduos que apresentaram o hexavalente, esse mecanismo pode ser evocado para explicar a presença de apenas um cromossomo portador do 45S rDNA. Posteriormente, translocações recíprocas envolvendo este homólogo com outros pares do cariótipo resultaram na formação do hexavalente.

No citótipo B de *B. amazonicus*, apesar de *clusters* 45S rDNA possuírem tamanhos distintos, nossos resultados demonstraram pareamento regular entre os mesmos durante meiose I (figura 6). Nos indivíduos que possuem o hexavalente, o pareamento ocorreu entre um *cluster* 45S rDNA e regiões eucromáticas (que não portam esse DNA repetitivo), caracterizando um caso de heterosinapse (figura 6). Este mecanismo meiótico tem sido amplamente documentado em espécies heterozigotas para translocações recíprocas múltiplas, como anfíbios (Noronha *et al.*, 2020), mamíferos (Villagómez *et al.*, 2008) e escorpiões (Mattos *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2017). Neste caso, complexo sinaptonêmico pode ser formado em regiões repetitivas sem necessidade de homologia (Garcia-Cruz *et al.*, 2009). Em *Nauphoeta cinerea* (Blatodea), por exemplo, diversas formas deste ajuste sináptico foram demonstradas em *loci* heterocromáticos e 45S rDNA divergentes em tamanho, a fim de favorecer o pareamento correto dos mesmos (Kornienko, *et al.*, 2009), com ajuste no tamanho dos cromossomos mediante equalização dos elementos axiais sinapsados (Zickler e Kleckner, 1999).

A distribuição do multigene U2 snRNA mostrou que essa sequência pode ser móvel no genoma de escorpiões *Brotheas*. Entre os integrantes da ordem Scorpiones, até o presente momento, esse DNA repetitivo foi mapeado apenas em cromossomos do butídeo *Tityus obscurus* (Almeida *et al.*, 2017) e no cactídeo *Neochactas parvulus* (Almeida *et al.*, em redação). Juntamente a *B. silvestris* e citótipo A de *B. amazonicus* 2n

= 50 (presente estudo), essas espécies apresentaram *clusters* U2 snRNA localizado na região intersticial de um par do cariótipo; essa análise revela alta conservação na quantidade de *loci* deste multigene em Scorpiones, sugerindo ser esta a condição ancestral para estes aracnídeos. Por outro lado, o indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus*, portador do quadrivalente, demonstrou U2 snRNA na região terminal deste multivalente, associado ao 45S rDNA. Ocorrência sintênica de U snRNA e rDNAs foi observada em outros organismos como Orthoptera (Palacios-Gimenez *et al.*, 2015), Testudines (Cavalcante *et al.*, 2020), peixes (Manchado *et al.*, 2006) e moluscos (Cross *et al.*, 2005). O significado evolutivo e funcional desta associação ainda não é conhecido. A mudança registrada na localização física do U2 snRNA entre as espécies de *Brotheas* (da região intersticial para terminal) pode ter sido mediada através de um evento de inversão (Silva *et al.*, 2015) ou por movimento de elementos transponíveis, como registrado anteriormente para outros organismos (Yano *et al.*, 2017; Pucci *et al.*, 2018).

5. CONCLUSÃO

O presente estudo registrou baixa variação do número diploide em escorpiões *Brotheas* ($2n = 40$ a 52), em comparação a outros gêneros portadores de cromossomos monocêntricos. Apesar disso, cariótipos distintos foram evidenciados em *B. amazonicus*, sugerindo ocorrência de especiação críptica nesta espécie. Os principais rearranjos responsáveis pela evolução cromossômica em escorpiões *Brotheas* são fusão/fissão, inversões e translocações recíprocas. Este último fator promove formação de associações multi-cromossômicas durante metáfase I em *B. amazonicus* $2n = 52$. Extensa variação na posição e tamanho de *clusters* 45S rDNA foi registrada em *Brotheas*, indicando ação de inversões, duplicações e deleções na organização genômica deste DNA repetitivo. Finalmente, análise meiótica neste gênero demonstrou que ajuste sináptico em *clusters* 45S rDNA e meiose aquiasmática durante meiose I, são importantes para assegurar a segregação correta de componentes dos multivalentes no citótipo B de *B. amazonicus*.

6. REFERENCIAS

ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MARTÍ DA, MOLA LM (2020) Chromosome puzzle in the southernmost populations of the medically important scorpion *Tityus bahiensis* (Perty 1833) (Buthidae), a polymorphic species with striking structural rearrangements. Zoologischer Anzeiger 288:139-150

Adilardi RS, Ojanguren-Affilastro AA, Mola LM (2016) Sex-Linked chromosome heterozygosity in males of *Tityus confluens* (Buthidae): A clue about the presence of sex chromosomes in scorpions. *Plos one* 11: e0164427

ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MOLA LM (2016) Sex-linked chromosome heterozygosity in males of *Tityus confluens* (Buthidae): a clue about the presence of sex chromosomes in scorpions. *Plos one* 11:10.

ALMEIDA BRR, MILHOMEM-PAIXÃO SSR, NORONHA RCR, NAGAMACHI CY, COSTA MJR, PARDAL PPO, COELHO JS, PIECZARKA JC (2017) Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). *BMC Genetics* 18:35.

ALMEIDA BRR, NORONHA RCR, COSTA MJR, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC (2018) Meiosis in the scorpion *Tityus silvestris*: new insights into achiasmatic chromosomes. *Biology Open* 8:bio04352.

ARGUESO JL, WESTMORELAND J, MIECZKOWSKI PA, GAWEL M, PETES TD, RESNICK MA (2008) Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. *Proc Natl Acad Sci*, 105:11845-11850

AUVINET J, GRAÇA P, BELKADI L, PETIT L, BONNIVARD E, DETTAI A, DETRICH III WH, OZOUF-COSTAZ C, HIGUET D (2018) Mobilization of retrotransposons as a cause of chromosomal diversification and rapid speciation: the case for the Antarctic teleost genus *Trematomus*. *BMC Genomics* **19**: 339.

BAN N, BECKMANN R, CATE JH, DINMAN JD, DRAGON F, ELLIS SR, LAFONTAINE DL, LINDAHL L, LILJAS A, LIPTON JM, MCALEAR MA, MOORE PB, NOLLER HF, ORTEGA J, PANSE VG, RAMAKRISHNAN V, SPAHN CM, STEITZ TA, TCHORZEWSKI M, TOLLERVEY D, WARREN AJ, WILLIAMSON JR, WILSON D, YONATH A, YUSUPOV M (2014) A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 24:165-169

BISCOTTI MA, OLMO E, HESLOP-HARRISON JS (2015) Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Res*, 23:415-420.

- CABRAL-DE-MELLO DC, MAREC F. (2021) Universal fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. *Mol Genet Genomics*. doi: 10.1007/s00438-021-01765-2.
- CAVALCANTE MG, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, NORONHA RCR (2020) Evolutionary insights in Amazonian turtles (Testudines, Podocnemididae): co-location of 5S rDNA and U2 snRNA and wide distribution of Tc1/Mariner. *Biol Open*, 9:bio049817.
- CAZAUX B, CATALAN J, VEYRUNES F, DOUZERY EJ, BRITTON-DAVIDIAN J. (2011) Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots?: a case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol Biol*, 11:124.
- COLGAN DJ, MCLAUCHLAN A, WILSON GDF, LIVINGSTON SP, EDGECOMBE GD, MACARANAS J, CASSIS G, GRAY MR (1998) Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Austral J Zool* 46: 419–437.
- CROMBACH A, HOGEWEG P (2007) Chromosome Rearrangements and the Evolution of Genome Structuring and Adaptability. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1130–1139
- CROSS I, REBORDINOS L. (2005) 5S rDNA and U2 snRNA are linked in the genome of *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas* oysters: does the (CT)_n.(GA)_n microsatellite stabilize this novel linkage of large tandem arrays? *Genome*, 48:1116-1119
- DELPRAT A, NEGRE B, PUIG M, RUIZ A (2009) The transposon Galileo generates natural chromosomal inversions in *Drosophila* by ectopic recombination. *PLoS One*, 4:e7883.
- DI-NIZO CB, VENTURA K, FERGUSON-SMITH MA, O'BRIEN PCM, YONENAGA-YASSUDA Y, SILVA MJDJ (2015) Comparative chromosome painting in six species of *Oligoryzomys* (rodentia, sigmodontinae) and the karyotype evolution of the genus. *Plos one* 10: e0117579
- FERREIRA A (1968) Contribution to the knowledge of cytology of two species of Brazilian scorpions: *Opisthacantus manauarensis*, Ferreira, 1967 (Scorpiones, Scorpionidae) and *Bothriurus asper araguaie* (Scorpiones, Bothriuridae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 40:97-99

FERRETTI ABSM, RUIZ-RUANO FJ, MILANI D, LORETO V, MARTÍ DA, RAMOS E, MARTINS C, CABRAL-DE-MELLO DC (2019) How dynamic could be the 45S rDNA cistron? An intriguing variability in a grasshopper species revealed by integration of chromosomal and genomic data. *Chromosoma*,128:165-175.

FRADE LFDS, ALMEIDA BRR, MILHOMEM-PAIXÃO SSR, READY JS, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, NORONHA RCR (2019) Karyoevolution of *Crenicichla heckel* 1840 (Cichlidae, Perciformes): a process mediated by inversions. *Biol Open*, 8:bio041699.

GANLEY AR, KOBAYASHI T (2007) Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome research*, 17: 184–191.

GARCIA S, KOVAŘÍK A, LEITCH AR, GARNATJE T (2017) Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database. *Plant J*,89:1020-1030.

GARCIA-CRUZ R, ROBLES P, STEINBERG ER, CAMATS N, BRIEÑO MA, GARCIA-CALDÉS M, MUDRY MD (2009) Pairing and recombination features during meiosis in *Cebus paraguayanus* (Primates: Platyrrhini). *BMC Genet.*, 10:25.

GERLACH WL, BEDBROOK JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* 7:1869–1885.

GLUGOSKI L, GIULIANO-CAETANO L, MOREIRA-FILHO O, VICARI MR, NOGAROTO V. (2018) Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. *Gene*, 650:49-54.

GROSS MC, FELDBERG E, CELLA DM, SCHNEIDER MC, SCHNEIDER CH, PORTO JI, MARTINS C.(2009) Intriguing evidence of translocations in *Discus* fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. *Heredity*, 102:435-441

HAREWOOD L, FRASER P (2014) The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression, *Human Molecular Genetics*, 23: R76–R82

HIRAI H (2020) Chromosome dynamics regulating genomic dispersion and alteration of Nucleolus Organizer Regions (*NORs*). *Cells*, 9: 971.

HÖFFER H, WOLLSCHEID E, GASNIER T (1996) The relative abundance of *Brotheas amazonicus* (Chactidae, Scorpiones) in different habitat types of a central amazon rainforest. *Journal of Arachnology* 24: 34-38.

HUANG J, MA L, YANG F, FEI S-Z, LI L (2008) 45S rDNA Regions Are Chromosome Fragile Sites Expressed as Gaps *In Vitro* on Metaphase Chromosomes of Root-Tip Meristematic Cells in *Lolium* spp. *Plos one* 3(5): e2167

JACK CV, CRUZ C, HULL RM, KELLER MA, RALSER M, HOUSELEY J (2015) Regulation of ribosomal DNA amplification by the TOR pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112:9674-9679.

KIROV I, KHRUSTALEVA L, VAN LAERE K, SOLOVIEV A, MEEUS S, ROMANOV D, FESENKO I (2017) DRAWID: user-friendly java software for chromosome measurements and idiogram drawing. *Comparative Cytogenetics* 11(4): 747-757

KORNIENKO OS, GUSACHENKO AM, VYSOTSKAYA LV (2009) C-heterochromatin during synapsis and recombination in grey cockroach *Nauphoeta cinerea* spermatogenesis. *Cell Tiss. Biol.*, 3: 289–296.

LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.

LIMA JF, CARVALHO LS, SCHNEIDER MC (2020) The first chromosomal analysis of bisexual populations of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* (Scorpiones: Buthidae). *The Journal of Arachnology* 48:77-83.

LOURENÇO WR (2002) Scorpiones. In: ADIS, J. (org.). *Amazonian Arachnida and Miryapoda: identification keys to all classes, orders, families, some genera and list of know terrestrial species*. Pensoft Publishes, Moscow, 399-438p.

MANCHADO M, ZUASTI E, CROSS I, MERLO A, INFANTE C, REBORDINOS L. (2006) Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in

Solea senegalensis: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. *Genome*, 49:79-86

MANI RS, CHINNAIYAN A (2010) Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nat Rev Genet* **11**: 819–829

MARTIN G, BAURENS F, HERVOUET C, SALMON F, DELOS J, LABADIE K, PERDEREAU A, MOURNET P, BLOIS L, DUPOUY M, CARREEL F, RICCI S, LEMAINQUE A, YAHIAOUI N, D'HONT A (2020) Chromosome reciprocal translocations have accompanied subspecies evolution in bananas. *The Plant Journal*. 104:1698-1711

MATTOS VF, CARVALHO LS, CARVALHO MA, SCHNEIDER MC (2018) Insights into the origin of the high variability of multivalent-meiotic associations in holocentric chromosomes of *Tityus* (*Archaeotityus*) scorpions. *Plos One* 13: e0192070.

MATTOS VF, CARVALHO LS, CELLA DM, SCHNEIDER MC (2014) Location of 45S ribosomal genes in mitotic and meiotic chromosomes of Buthid scorpions. *Zoolog Sci*. 31:603-607.

MATVEEVSKY S, TRETIKOV A, KASHINTSOVA A, BAKLOUSHINSKAYA I, KOLOMIETS O (2020) meiotic nuclear architecture in distinct mole vole hybrids with robertsonian translocations: chromosome chains, stretched centromeres, and distorted recombination. *Int J Mol Sci.*, 21:7630

MCCLURE M, DUTRILLAUX B, DUTRILLAUX AM, LUKHTANOV V, ELIAS M (2017) Heterozygosity and chain multivalents during meiosis illustrate ongoing evolution as a result of multiple holokinetic chromosome fusions in the genus *Melinaea* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Cytogenet Genome Res.*, 153:213-222

MIECZKOWSKI PA, LEMOINE FJ, PETES TD (2006) Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*. 8:1010-1020.

MOHAN NK, RANI S, KULASHRESHTA PS, KADANDALE JS (2010) Characterization of TTAGG telomeric repeats, their interstitial occurrence and constitutively active telomerase in the mealybug *Planococcus lilacinus*. *Chromosoma*, 120:165–175.

- NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, MILHOMEM SS, BATISTA JA, O'BRIEN PC, FERGUSON-SMITH MA (2013) Chromosome painting reveals multiple rearrangements between *Gymnotus capanema* and *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes). *Cytogenet Genome Res*, 141:163-168.
- NETO MS, DE SOUZA MJ, LORETO V (2013) Chromosomal evolution of rDNA and H3 histone genes in representative Romaleidae grasshoppers from northeast Brazil. *Molecular cytogenetics*, 6: 41.
- NORONHA RCR, DE ALMEIDA BRR, DA COSTA MJR, NAGAMACHI CY, MARTINS C, PIECZARKA JC (2020) Meiotic analyses show adaptations to maintenance of fertility in X1Y1X2Y2X3Y3X4Y4X5Y5 system of amazon frog *Leptodactylus pentadactylus* (Laurenti, 1768). *Sci Rep.*, 10:16327
- PALACIOS-GIMENEZ OM, CARVALHO CR, FERRARI SOARES FA, CABRAL-DE-MELLO DC (2015) Contrasting the chromosomal organization of Repetitive DNAs in two gryllidae crickets with highly divergent karyotypes. *Plos one*, 10: e0143540.
- PLÍŠKOVÁ J, KOVAŘÍK F, KOŠULIČ O, ŠT'ÁHLAVSKÝ F (2016) Description of a New species of *Heterometrus* Ehrenberg, 1828 (Scorpiones: Scorpionidae) from Thailand with remarks about the utilization of cytogenetic data in taxonomy of the genus. *Annales Zoologici*, 66: 467–476.
- PUCCI MB, NOGAROTO V, MOREIRA-FILHO O, VICARI MR (2018) Dispersion of transposable elements and multigene families: Microstructural variation in *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae) genomes. *Genet Mol Biol.*, 41:585-592.
- REIN JO (2021) The Scorpion Files. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology. [Accessed 2017.01.23]. Available from <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>
- RUIZ-HERRERA A, CASTRESANA J, ROBINSON TJ (2006) Is mammalian chromosomal evolution driven by regions of genome fragility? *Genome Biol.* 7:R115
- SAHARA K, MAREC F, TRAUT W (1999) TTAGG Telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res* 7: 449–460
- SCELFO A, FACHINETTI D (2019) Keeping the centromere under control: A promising role for DNA methylation. *Cells* , 8: 912

SCHNEIDER MC, MATTOS VF, CELLA DM (2021) The scorpion cytogenetic database. Available in www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpiondatabase

SCHNEIDER MC, ZACARO AA, PINTO-DA-ROCHA R, CANDIDO DM, CELLA DM (2009b) Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. Chromosome Res. 17: 883-898

SCHNEIDER MC, MATTOS VF, CARVALHO LS, CELLA DM (2015) Organization and behavior of the synaptonemal complex during achiasmatic meiosis of four buthid scorpions. Cytogenet Genome Res. 144:341-347.

SHANAHAN CM (1989) Cytogenetics of Australian scorpions. II. Chromosome polymorphism in species of *Urodacus* (family Scorpionidae). **Genome**, 32:890-900

SHANAHAN CM, HAYMAN DL (1990). Synaptonemal complex formation in male scorpions exhibiting achiasmate meiosis and structural heterozygosity. *Genome*, 33(6),: 914–926.

SILVA DM, UTSUNOMIA R, PANSONATO-ALVES JC, OLIVEIRA C, FORESTI F. (2015) Chromosomal mapping of Repetitive DNA sequences in five species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) reveals independent location of U1 and U2 snRNA sites and association of U1 snRNA and 5S rDNA. Cytogenet Genome Res.,146:144-52.

SOCHOROVÁ J, GARCIA S, GÁLVEZ F, SYMONOVÁ R, KOVAŘÍK A (2018) Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma*, 127:141-150.

ŠTÁHLAVSKÝ F, KOVAŘÍK F, STOCKMANN M, OPATOVA V (2020) Karyotype evolution and preliminary molecular assessment of genera in the family Scorpionidae (Arachnida: Scorpiones). *Zoology*, 144:125882

ŠTÁHLAVSKÝ F, NGUYEN P, SADÍLEK D, ŠTUNDLOVÁ J, JUST P, HADDAD CR, KOÇ H, RANAWANA KB, STOCKMANN M, YAĞMUR EA, KOVAŘÍK F. (2020) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of buthid scorpions (Chelicerata: Arachnida)., *Biological Journal of the Linnean Society*, blaa118, <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa118>

ŠTÁHLAVSKÝ F, OPATOVA V, JUST P, LOTZ LN, HADDAD CR (2018) Molecular technique reveals high variability of 18S rDNA distribution in harvestmen (Opiliones, Phalangidae) from South Africa. *Comparative cytogenetics*, 12 41–59.

ŠTÁHLAVSKÝ F, ŠTUNDLOVÁ J, LOWE G, STOCKMANN, M.; KOVAŘÍK, F. (2018) Application of cytogenetic markers in the taxonomy of flat rock scorpions (Scorpiones: Hormuridae), with the description of *Hadogenes weygoldti* sp. n. *Zoologischer Anzeiger*, 273:173-182

ŠTUNDLOVÁ J, ŠMÍD J, NGUYEN P, ŠTÁHLAVSKÝ F (2019) Cryptic diversity and dynamic chromosome evolution in Alpine scorpions (Euscorpiidae: Euscorpius). *Mol Phylogenet Evol*, 134:152-163.

SU D, CHEN L, SUN J, ZHANG L, GAO R, LI Q, HAN Y, LI Z. (2020) Comparative chromosomal localization of 45S and 5S rDNA sites in 76 purple-fleshed sweet potato cultivars. *Plants (Basel)*, 9:865.

SUÁREZ P, FERRO JM, NAGAMACHI CY, CARDOZO DE, BLASCO-ZÚÑIGA A, SILVA JB, MARCIANO-JR E, COSTA MA, ORRICO VGD, SOLÉ M, ROBERTO IJ, RIVERA M, WILEY JE, FAIVOVICH J, BALDO D, PIECZARKA JC. Chromosome evolution in *Lophyohylini* (Amphibia, Anura, Hylinae). *Plos One*, 15:e0234331

VILLAGÓMEZ DA, AYALA-VALDOVINOS MA, GALINDO-GARCÍA J, SÁNCHEZ-CHIPRES DR, MORA-GALINDO J, TAYLOR-PRECIADO JJ (2008) Extensive nonhomologous meiotic synapsis between normal chromosome axes of an rcp(3;6)(p14;q21) translocation in a hairless mexican boar. *Cytogenet Genome Res.*, 120:112-116.

YANO CF, BERTOLLO LA, REBORDINOS L, MERLO MA, LIEHR T, PORTELA-BENS S, CIOFFI MB (2017) Evolutionary dynamics of rDNAs and U2 Small Nuclear DNAs in *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae): High variability and particular syntenic organization. *Zebrafish*, 14:146-154.

ZICKLER D, KLECKNER N (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet.*, 33:603-754

Tabela 1: Dados gerais sobre a amostra utilizada no presente estudo.

Espécie	N	Localidade	Coordenada Geográfica
<i>Brotheas amazonicus</i>	1♂, 1♀, 16 embriões	Manaus/AM	3° 06' 10"S/59°58'42"O
	7♂, 5♀, 9 embriões	Parintins/AM	2°38'15"S/56°43'46"O
<i>Brotheas silvestris</i>	3♂, 1♀, 19 embriões	Óbidos/PA	3° 06' 10"S/59°58'42"O
<i>Brotheas paraensis</i>	2♂, 1♀, 12 embriões	Óbidos/PA	3° 06' 10"S/59°58'42"O

Legenda das figuras:

Figura 1: Células meióticas em diferentes espécies de *Brotheas*. **(a)** *B. silvestris*, 2n =40. **(b)** *B. paraensis*, 2n =48. **(c)** *B. amazonicus* citótipo A, 2n =50. **(d)** *B. amazonicus* citótipo B, 2n =52. **(e)** Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador de uma associação meiótica hexavalente. **(f)** Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador de uma associação meiótica quadrivalente. As setas em **(e)** e **(f)** sinalizam associações multivalentes.

Figura 2: FISH com sonda 45S rDNA em *Brotheas*. **(a)** *B. silvestris*. **(b)** *B. paraensis*. **(c)** *B. amazonicus* citótipo A. **(d)** *B. amazonicus* citótipo B; o inserto mostra o par 4 de uma célula mitótica evidenciando a diferença de tamanho entre os *clusters* 45S rDNA. **(e)** Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador do quadrivalente. **(f)** Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador do hexavalente.

Figura 3: FISH com sonda telomérica TTAGG em *Brotheas*. **(a)** *B. silvestris*. **(b)** *B. paraensis*. **(c)** *B. amazonicus* citótipo A. **(d)** *B. amazonicus* citótipo B; o inserto mostra o par 4 de uma célula mitótica evidenciando a diferença de tamanho entre os *clusters* 45S

rDNA. **(e)** Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador do quadrivalente. **(f)** Célula em início de Anáfase I do Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador do hexavalente; o inserto em **(g)** mostra o hexavalente em metáfase I.

Figura 4: Distribuição de U2 snRNA em escorpiões *Brotheas*. **(a)** *B. paraensis*. **(b)** citótipo A de *B. amazonicus*. **(c)** Indivíduo do citótipo B de *B. amazonicus* portador do quadrivalente.

Figura 5: Hipótese para dinâmica do 45S rDNA nas três espécies de *Brotheas* analisadas citogeneticamente no presente estudo.

Figura 6: Interpretação esquemática para translocações observadas no citótipo B de *B. amazonicus*. **(a)** origem e **(b)** pareamento em metáfase I da associação quadrivalente; **(c)** origem e **(d)** pareamento em metáfase I da associação hexavalente. Regiões em amarelo nos esquemas corresponde sítios 45S rDNA.

Figura 1

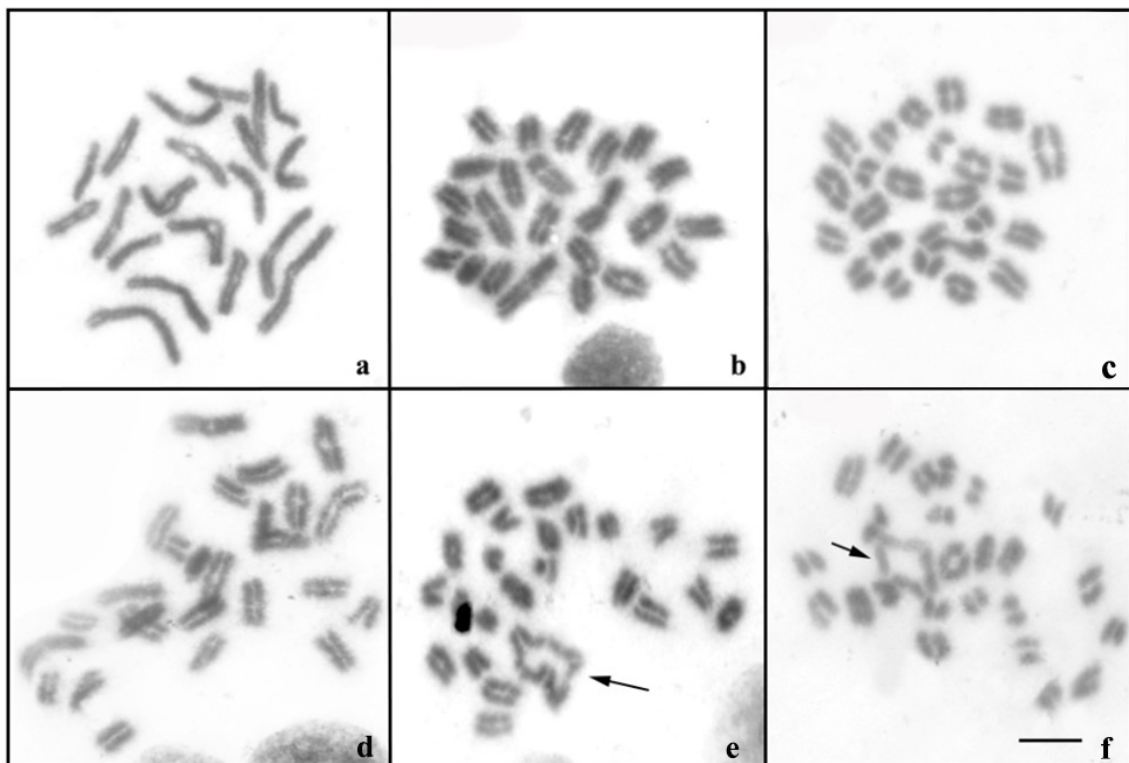


Figura 2

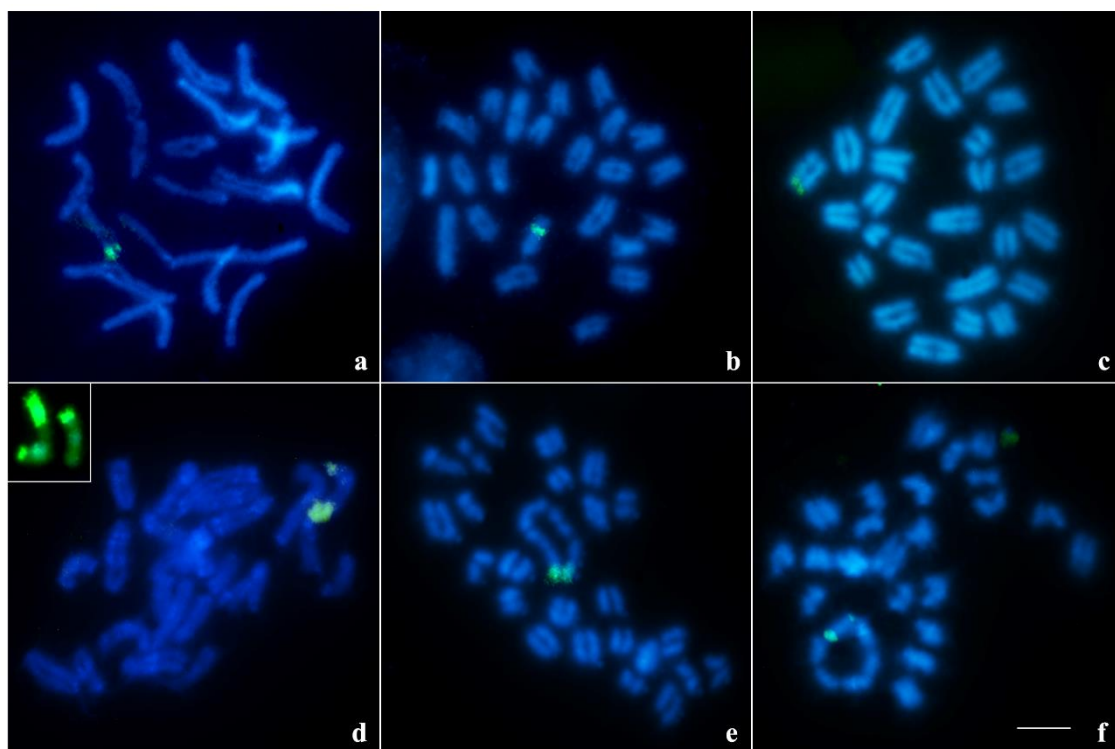


Figura 3

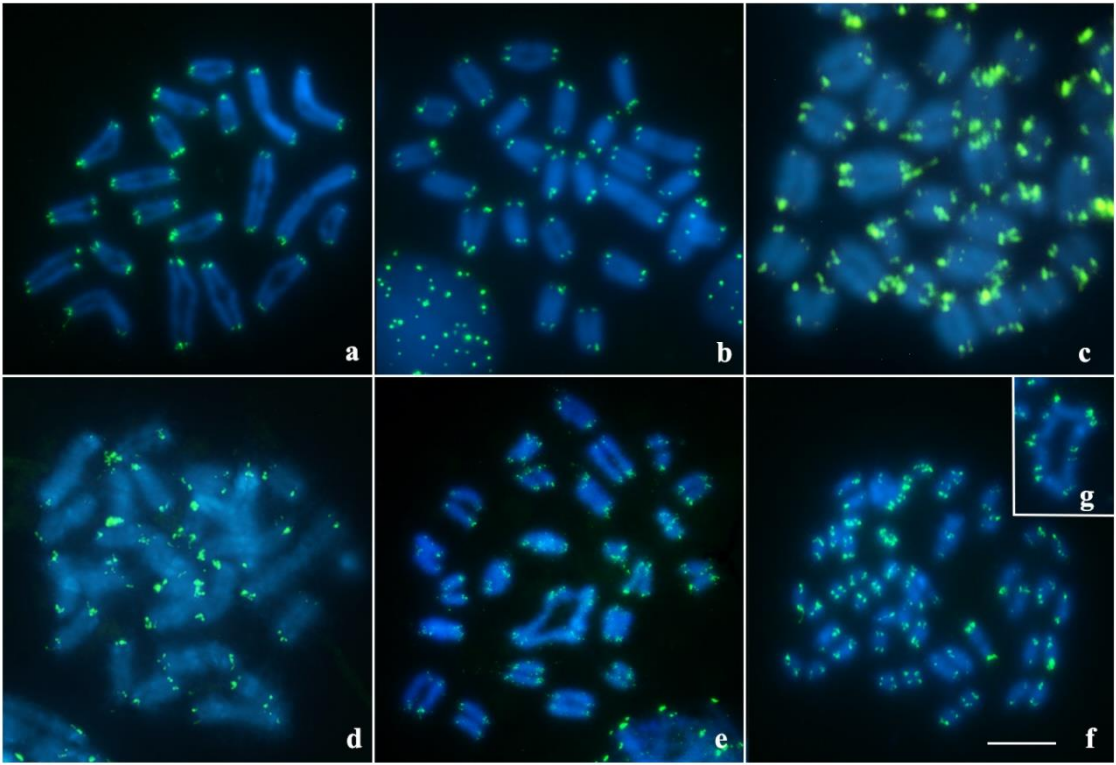


Figura 4

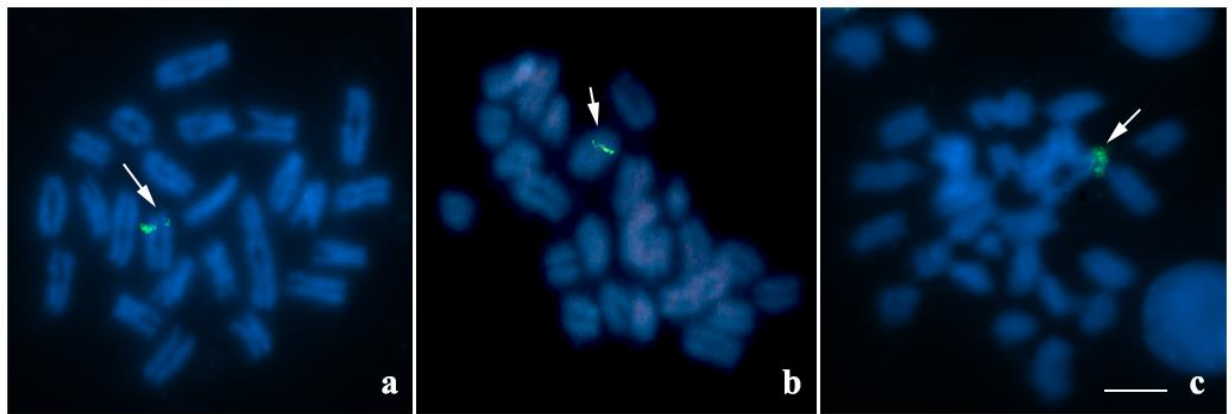
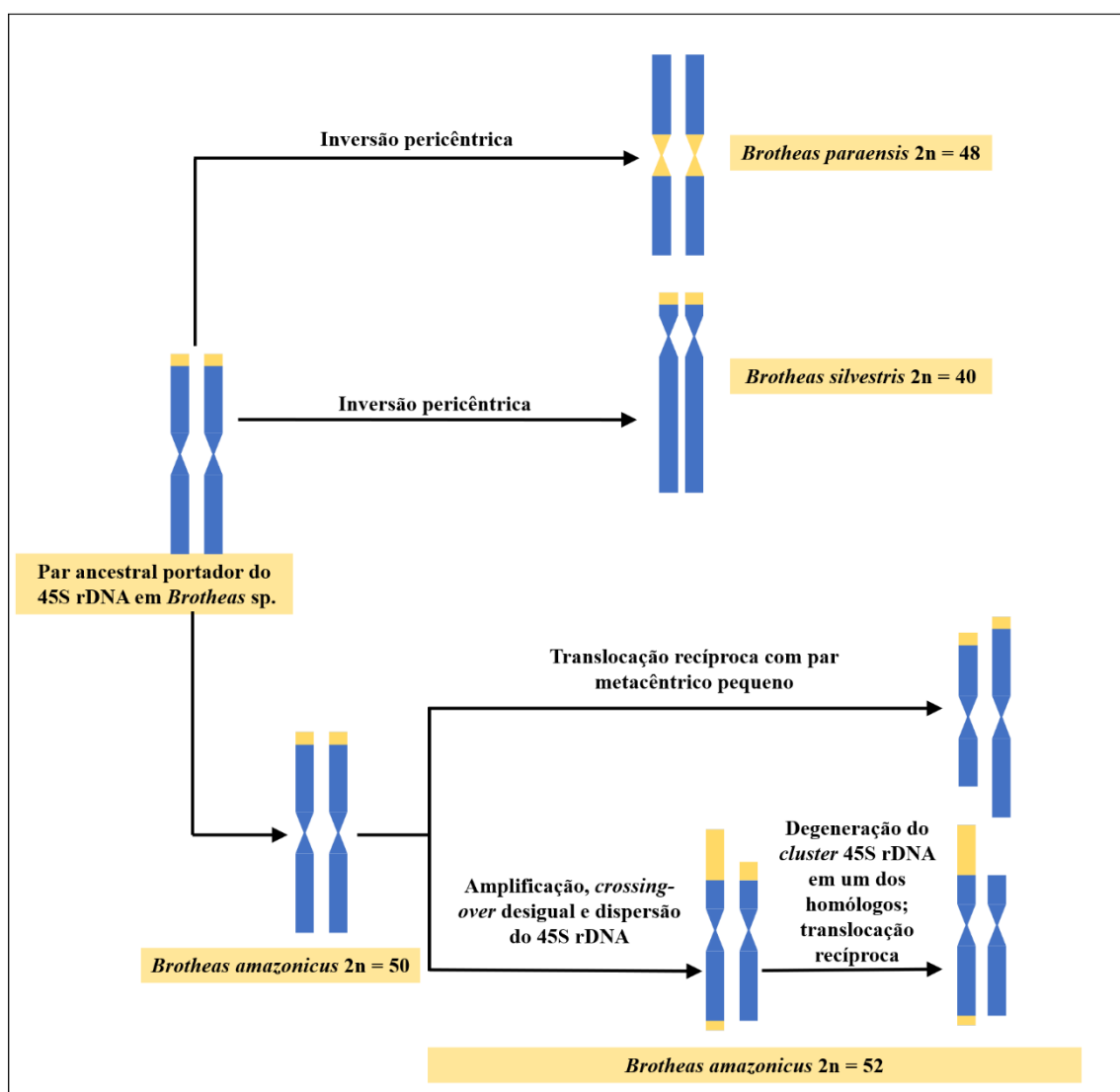
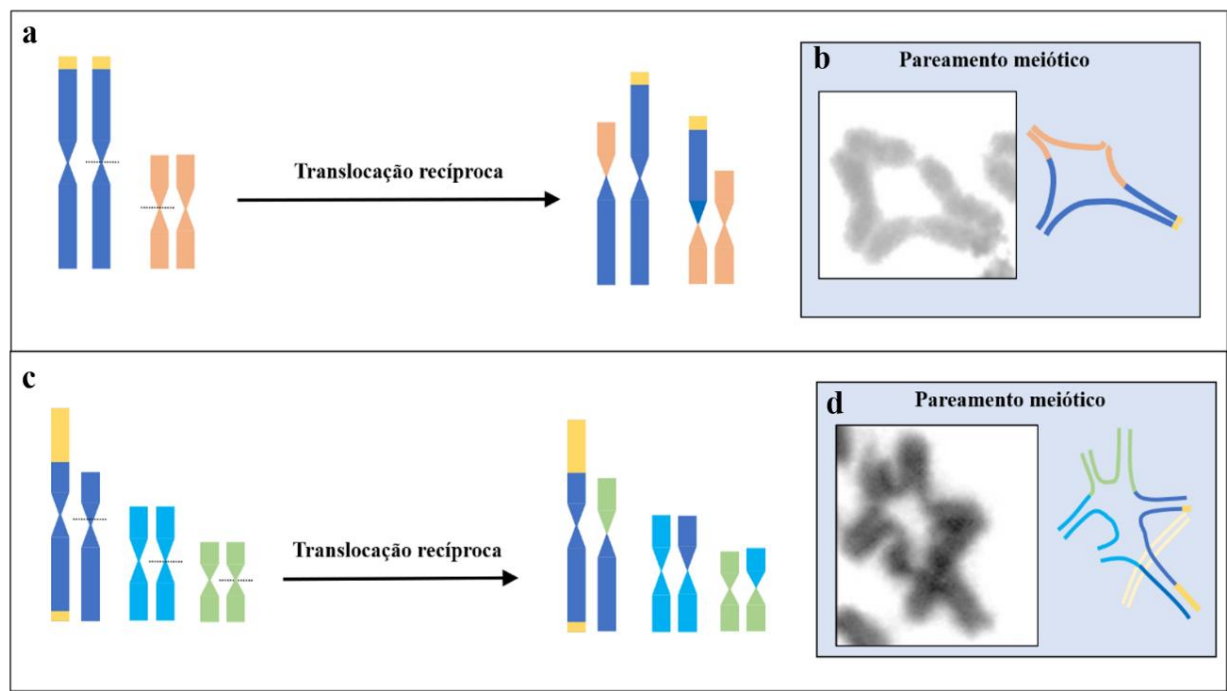


Figura 5



F

Figura 6



CAPÍTULO 3: Microcromossomos em Scorpiones? O caso do cariótipo bimodal de *Neochactas parvulus* (Chactidae)

Bruno Rafael Ribeiro de Almeida¹; Renata Coelho Rodrigues Noronha¹; Stella Miranda Malcher¹; Cleusa Yoshiko Nagamachi¹; Julio Cesar Pieczarka¹

¹Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Avenida Augusto Corrêa, nº01, 66075-900, Belém, Pará, Brasil.

***Corresponding author:** Julio Cesar Pieczarka

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Campus do Guamá

Av. Perimetral, s/n. Guamá

66075-900 Belém – Pará, Brazil

E-mail: juliopieczarka@gmail.com

RESUMO

Microcromossomos são amplamente encontrados principalmente em cariótipos bimodais de vertebrados e caracterizam-se pelo tamanho extremamente pequeno, cromatina rica em GC e replicação inicial na fase S em relação a cromossomos de tamanho regular. Neste estudo, descrevemos pela primeira vez ocorrência de microcromossomos em *Scorpiones* ao investigar a organização genômica e o comportamento meiótico em *Neochactas parvulus*. Esta espécie demonstrou $2n = 54$, com fórmula cariotípica $4M+26SM+6A+18$ microcromossomos. Grandes blocos de heterocromatina rica em pares de bases AT foi observada na região pericentromérica da maior parte dos pares de macro e microcromossomos. Durante o paquíteno, 18 bivalentes aquiasmáticos são formados, que segregam regularmente na anáfase I. Os multigenes 45S rDNA e U2snRNA foram localizados na região intersticial dos pares 2 e 6 (macrocromossomos), respectivamente, e ocupam regiões periféricas no núcleo interfásico. Sequências teloméricas foram observadas apenas nas extremidades cromossômicas. A ausência de quiasmas não compromete a estabilidade dos microcromossomos de *N. parvulus* na meiose, possivelmente devido a preservação do complexo sinaptonêmico até fases tardias da prófase I, típico de *Scorpiones*. Mapeamento de multigenes evidencia a existência de arranjo centro-periférico dos conjuntos cromossômicos de *N. parvulus* durante interfase. Finalmente, nossos resultados sugerem que os microcromossomos deste escorpião são produtos de rearranjos Robertsonianos e que eventos de amplificação de heterocromatina contribuem para a manutenção do estado bimodal do cariótipo desta espécie.

Palavras-chave: microcromossomos, aquiasmia, cariótipo bimodal, heterocromatina, *Scorpiones*

1. INTRODUÇÃO

Microcromossomos são definidos pelo seu tamanho extremamente pequeno, similar a pontos, cuja morfologia não é possível determinar (O'Connor *et al.*, 2018). Eles são característicos de cariótipos bimodais, em que bivalentes não diminuem gradualmente de tamanho como observado na maioria dos seres vivos (Palomino *et al.* 2008). São encontrados em plantas monocotiledôneas (McKain *et al.*, 2012) e em vários grupos de vertebrados, como Aves (O'Connor *et al.*, 2018), Squamata (Deakin and Ezaz, 2019),

Testudines (Cavalcante *et al.*, 2020), Gymnophiona (Seto and Nussbaum, 1976) e alguns peixes primitivos (Fontana *et al.*, 2004).

Durante a divisão celular, microcromossomos são estáveis (pois possuem centrômeros e telômeros típicos) e comportam-se como cromossomos regulares (macrocromossomos), sendo mantidos a cada ciclo (Ezaz e Young, 2013; Menezes *et al.*, 2019). Em plantas e animais, geralmente os microcromossomos apresentam alto conteúdo de genes, e replicam mais cedo na fase S em relação aos macrocromossomos (McQueen *et al.*, 1998; Domaschitz *et al.*, 2015; Báez *et al.*, 2019; Deakin and Ezaz, 2019). Quanto a disposição no interior do núcleo interfásico, os microcromossomos são constantemente observados na região central, enquanto macrocromossomos são localizados na periferia destes (Skinner *et al.* 2009; Báez *et al.*, 2019).

A organização bimodal do cariótipo pode ser originada através de diferentes mecanismos, dentre os quais destacam-se: (i) hibridização com posterior poliploidia (McKain *et al.*, 2012); (ii) acúmulo diferencial de sequências repetitivas em alguns cromossomos (Báez *et al.*, 2019); (iii) e rearranjos cromossômicos, especialmente do tipo fusão/fissão (Medeiros-Neto *et al.*, 2017). Este último fator, parece ser o mais implicado na origem da bimodalidade em táxons animais (Burt, 2002; Cavalcante *et al.*, 2018; Deakin and Ezaz, 2019). Em aves, por exemplo, diversos estudos tem demonstrado que rearranjos Robertsonianos, especialmente fissões de cromossomos de tamanho regular, ocorreram durante a história evolutiva deste grupo, originando microcromossomos (Voss *et al.*, 2011; O’connor *et al.*, 2018).

A ordem Scorpiones compreende cerca de 1900 espécies, com ampla ocorrência em todos os continentes, a exceção da Antártida (Rein, 2021). Análise citogenética em escorpiões mostrou apenas cariótipos unimodais nestes artrópodes. Apesar disso, apresentam dois tipos cromossômicos que se distinguem quanto a estrutura do centrômero: holo e monocêntricos (Mattos *et al.*, 2013). Os primeiros são observados apenas em Buthidae e possuem o centrômero disperso ao longo das cromátides (Adilardi *et al.*, 2016). As demais famílias de Scorpiones apresentam cromossomos com centrômeros restritos a uma única região, números diploides altos ($2n = 48-175$) e 45S rDNA localizado em regiões intersticiais de um par do cariótipo (Schneider *et al.*, 2009; Štundlová *et al.*, 2019). Dados citogenéticos de escorpiões portadores de sistemas monocêntricos são escassos, e em algumas famílias apenas poucas espécies foram investigadas. Em Chactidae, por exemplo, que abrange 15 gêneros e 208 espécies, apenas *Brotheas amazonicus* teve seu cariótipo brevemente descrito (Ferreira *et al.*, 1950).

O gênero *Neochactas* (Chactidae) é encontrado na região amazônica, reunindo cerca de 40 espécies (Lourenço, 2017; Rein, 2021). Dentre estas, *Neochactas parvulus* possui distribuição geográfica na região oeste do estado do Pará, Brasil (Lourenço, 2002). No presente estudo, realizamos análise citogenética nesta espécie, e constatamos a existência de um cariótipo bimodal, o primeiro descrito na ordem Scorpiones. Adicionalmente, caracterizamos o comportamento meiótico, distribuição de heterocromatina e a organização cromossômica de famílias multigênicas neste escorpião, a fim de inferir a origem da bimodalidade nesta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostra e Análise cariotípica

A amostra utilizada para este estudo foi constituída de dois machos e uma fêmea de *N. parvulus*, coletados no município de Óbidos, Pará, Brasil. A identificação taxonômica foi realizada segundo Lourenço (2002). Os espécimes foram depositados na coleção do Laboratório de Entomologia Médica e Artrópodes Peçonhentos (LEMAP/UFPA). Gônadas foram hipotonizadas em KCl 0,075M, e posteriormente fixadas em solução de metanol:ácido acético (3:1). Suspensão celular gerada a partir da digestão de gônadas em ácido acético 60% foi espalhada em lâminas a 45°C. Cromossomos foram corados com Giemsa 5%. Medidas cromossômicas foram realizadas através do software DRAWID (Kirov *et al.*, 2017). A determinação da morfologia cromossômica seguiu a classificação de Levan *et al.* (1964). Bandeamento C foi realizado de acordo com Sumner (1972).

2.2. Sondas

A Sonda 45S rDNA foi produzida a partir do plasmídeo pTa71, que contém a sequência completa deste rDNA de *Triticum aestivum* (Gerlach e Bedrok, 1945). Por sua vez, sonda de sequências teloméricas de artrópodes e do U2 snRNA foram obtidas por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores descritos por Sahara *et al.* (1999) e Colgan *et al.* (1998), respectivamente. Para a reação de PCR foi utilizado: 100ng de DNA genômico de *N. parvulus*, 2,5µL de tampão de reação 10x, 2 µL de DNTP 2mM, 1 µL de MgCl 50 mM, 1 µL de cada iniciador a 10 mM, 0,25 µL de Taq DNA polimerase, e 16,75 µL de água estéril. Todas as sondas foram marcadas por *nick translation* utilizando digoxigenina-14-dUTP (Roche, Mannheim, Germany).

2.3. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

FISH foi realizada de acordo com Cabral-de-Mello *et al.* (2010). Anteriormente, cromossomos foram tratados com solução de Pepsina 1%, fixados em Paraformaldeído 4% e desidratados em bateria de álcool (70%, 90% e 100%). A desnaturação do DNA cromossômico e de sondas ocorreu a 70°C e 100°C, respectivamente. Lâminas foram mantidas a 37°C, *overnight*, para a hibridização. Posteriormente, lâminas foram lavadas com 2xSSC e 4xSSC-Tween para remoção de hibridizações inespecíficas. Sondas foram detectadas com Anti-digoxigenina-FITC. Cromossomos foram contracorados com 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) contendo antifading Vectashield (Vector).

3. RESULTADOS

Nossos resultados demonstraram que *N. parvulus* apresenta número diploide $2n = 54$ (Figura 1). Os cromossomos foram classificados como monocêntricos, baseado na presença de constrição primária. O cariótipo desta espécie é altamente bimodal e constituído por 4 cromossomos metacêntricos, 26 submetacêntricos, 6 acrocêntricos e 18 microcromossomos (Figura 1). Na amostra de machos analisada, não foram observados cromossomos com comportamento meiótico diferencial que sugerisse ocorrência de alossomos heteromórficos.

Bandeamento C com posterior coloração por DAPI evidenciou fortes bandas de heterocromatina rica em pares de bases AT na região pericentromérica da maior parte dos macro e microcromossomos, com exceção dos pares 3, 11, 13, 15, 16, 17, 23, 25 e 27 (Figura 2). Uma banda C adicional foi registrada na região intersticial do braço curto do par 2 (Figura 2).

Análise meiótica revelou comportamento sináptico regular para todos os pares cromossômicos de *N. parvulus*. Durante o zigóteno, cromossomos organizam-se em configuração *bouquet*, com telômeros agrupados a um polo do núcleo celular (Figura 3 a, b); em paquíteno, todos os bivalentes (macro e microcromossomos) são visualizados na forma de filamentos duplos, com sinapse completa (Figura 3c). O grau de extensão das fibras cromossômicas durante o paquíteno permitiu observar a presença de dois domínios heterocromáticos na região pericentromérica de um bivalente submetacêntrico submetido

ao bandejamento C (Figura 3d). Células pós-paquítenu apresentaram 27 bivalentes altamente condensados e pareados, sem quaisquer indícios de quiasmas (Figura 3e). A partir desta fase até Metáfase I a região pericentromérica apresentou-se assináptica (Figura 3e). Na transição metáfase I/anáfase I os componentes dos bivalentes iniciam a disjunção e permanecem em disposição paralela entre si (Figura 3f).

FISH com sonda de famílias multigênicas demonstrou que o 45S rDNA encontra-se na região intersticial do braço curto do par 2, e é co-localizado com a banda C observada na mesma região (Figura 4a). Repetições teloméricas TTAGG foram presentes nas quatro extremidades de todos os micro e macrobivalentes (Figura 4b). O gene U2 snRNA foi registrado na região intersticial do braço longo do par 6 (Figura 4c). Em núcleos interfásicos, sinais de hibridização dos multigenes 45S rDNA e U2 snRNA foram observados na periferia desta organela durante a interfase (Figura 4d, e). Na mesma lâmina, após desnaturação em formamida para experimento FISH com sonda 45S rDNA, foi possível observar a presença de blocos heterocromáticos DAPI+ em macrocromossomos (Figura 4a), e distribuição destas regiões na periferia do núcleo celular (Figura 4d).

4. DISCUSSÃO

Cariótipos bimodais são raros em invertebrados, sendo esporadicamente registrados em integrantes do filo Arthropoda (Kuznetsova *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2006; Mesa *et al.*, 2010; Kuznetsova *et al.*, 2017; Menezes *et al.*, 2019; Lukhtanov, 2019). Em algumas ordens de Insecta, a bimodalidade é caracterizada apenas pela presença de um par de cromossomos sexuais gigantes (Almeida *et al.*, 2006; Brito *et al.*, 2010; Mesa *et al.*, 2010) ou pela formação de um único par de microcromossomos (Kuznetsova *et al.*, 2011; Kuznetsova *et al.*, 2017). O cariótipo de *N. parvulus* é o primeiro com padrão bimodal descrito para ordem Scorpiones e não está relacionado ao processo de diferenciação de cromossomos sexuais. Resultados semelhantes foram encontrados por Shanahan (1989) que observou cromossomos telocêntricos extremamente pequenos no escorpião *Urodacus manicatus* (Urodacidae). No entanto, diferentemente de nossos achados, a bimodalidade do cariótipo não foi demonstrada nesta espécie e os cromossomos pequenos de *U. manicatus* apresentaram variação intrapopulacional, descaracterizando a estabilidade típica de microcromossomos (Ezaz e Young, 2013). Adicionalmente, o motivo telomérico TTAGG nas quatro extremidades dos

microcromossomos de *B. parvulus*, contribui para impedir a eliminação destes ao longo do ciclo celular, mantendo-os constantes na população.

A ausência de dados citogenéticos de outras espécies do gênero *Neochactas* inviabiliza a reconstrução da evolução cariotípica de *N. parvulus*. O único integrante da família Chactidae com descrição citogenética conhecida além de *N. parvulus*, é *Brotheas amazonicus*, que apresentou $2n = 50$ (Ferreira *et al.*, 1995). De qualquer forma, o mapeamento das famílias multigênicas 45SrDNA e U2snRNA em *N. parvulus* nos permite descartar a hipótese da origem deste cariótipo por aloploidia, uma vez que apenas um sítio de cada uma destas sequências foi observado no complemento desta espécie. Por outro lado, a unimodalidade dos cariótipos de *B. amazonicus* e dos demais escorpiões, nos permite sugerir que eventos de fusão/fissão tenham sido os principais responsáveis pela origem da bimodalidade em *N. parvulus*. Neste caso, cromossomos de tamanho regular seriam resultantes de fusões, enquanto microcromossomos seriam originados por meio de fissões destes (McKain *et al.* 2012); este fenômeno é amplamente documentado em outros grupos animais que apresentam cariótipo bimodal, como testudines (Cavalcante *et al.*, 2018), aves (Ribas *et al.*, 2018) e squamata (Srikulnath *et al.*, 2013). Alta taxa de fusão/fissão tem sido revelada em escorpiões com cromossomos holo e monocêntricos (Adilardi *et al.*, 2013; Almeida *et al.* 2017). Nestes últimos, estas alterações Robertsonianas têm sido documentadas principalmente nos gêneros *Urodacus* (Shanahan, 1989), *Euscorpius* (Štundlová *et al.*, 2019), *Hadogenes* (Šťáhlavský *et al.*, 2018) e *Heterometrus* (Plíšková *et al.*, 2016). Em *N. parvulus* a presença de dois domínios heterocromáticos na região pericentromérica de um bivalente submetacêntrico (ver figura 3d) constitui evidência adicional da ocorrência de fusão cêntrica nesta espécie, pois podem ser remanescentes da união de dois centrômeros de cromossomos acrocêntricos, como registrado em outros organismos. Em Scorpiones, quando no estado heterozigoto, fusão/fissão promovem diversas falhas na sinapse meiótica, com alta incidência de *gaps*, *interlocks*, assinapses e associações multivalentes (Shanahan and Hayman, 1990; Schneider *et al.*, 2015). Segundo Imai (1986) fissões podem ser selecionadas positivamente, para resolver *interlocks* e *crossing-overs* ectópicos, formados no interior do núcleo celular, prevenindo formação de translocações e inversões. Considerando estas informações, é possível que microcromossomos de *N. parvulus* tenham sido originados a partir de fissões de cromossomos grandes (e vice-versa), a fim de evitar os efeitos deletérios de rearranjos em heterozigose.

O comportamento meiótico de microcromossomos em Arthropoda é relativamente mais variável do que em vertebrados. Na maior parte dos animais, microcromossomos são mantidos sinapsados durante o paquíteno, e realizam *crossing-over* nesta fase da meiose I (Kuznetsova *et al.*, 2017; Pigozzi, 2016; Lisachov *et al.*, 2017), pois, a formação de quiasmas é necessária para estabilidade destes durante a divisão celular (Ezaz and Young, 2013). Por outro lado, em diversas linhagens aquiasmáticas de Heteroptera, microcromossomos realizam sinapse tardiamente no paquíteno, são univalentes no diplóteno (devido a ausência de quiasmas), e posteriormente formam um pseudo-bivalente na diacinese (Toscani *et al.*, 2007; Kuznetsova *et al.*, 2011). De modo semelhante, machos de *N. parvulus* analisados no presente estudo são aquiasmáticos. Essa característica é compartilhada com os demais escorpiões atuais (Mattos *et al.*, 2013; Adilardi *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017). Apesar disso, em *N. parvulus*, microcromossomos apresentaram comportamento regular durante a prófase I, similar aos macrocromossomos, e permaneceram na forma de bivalentes até o início da anáfase I (ver figura 3f). Esse resultado é explicado pela presença de um complexo sinaptonêmico (CS) modificado que se mantém até fases tardias da prófase I, como observado em outros integrantes da ordem Scorpiones (Shanahan and Hayman, 1990; Schneider *et al.* 2009; Schneider *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2018). A persistência do CS nestes aracnídeos pode estar associado a formação de cromatina rica em H3K27me3, como registrado para o escorpião *Tityus silvestris* (Almeida *et al.*, 2018). Assim, em *N. parvulus* esta adaptação meiótica pode substituir a função dos quiasmas e permitir a disjunção normal dos microbivalentes durante anáfase I.

Nossos resultados mostraram 45S rDNA localizado na região intersticial de um macrocromossomo em *N. parvulus*. O mapeamento físico desta sequência em outros sistemas monocêntricos de escorpiões mostrou resultados semelhantes (Plíšková *et al.*, 2016; Šťáhlavský *et al.*, 2018; Štundlová *et al.*, 2019). Esse padrão diverge dos cariótipos bimodais de grande parte dos vertebrados que apresentam esta sequência em microcromossomos (Fontana *et al.*, 2003; Degrandi *et al.*, 2020; Cavalcante *et al.*, 2020). Em alguns casos, microcromossomos podem ser originados a partir de duplicações e fissões de clusters do maior DNA ribossomal (Menezes *et al.*, 2019), o que não é o caso de *N. parvulus*. Outro multigene mapeado em macrocromossomos desta espécie foi U2 snRNA, cuja distribuição genômica é similar aos resultados encontrados no escorpião *Tityus obscurus* (Almeida *et al.*, 2017). Em células interfásicas sinais de hibridização destes dois DNAs repetitivos foram registrados na periferia do núcleo. Esse achado sugere

a existência de organização diferencial dos conjuntos cromossômicos de *N. parvulus* durante esta fase, em que microcromossomos seriam mantidos no centro enquanto macrocromossomos ocupariam a periferia desta organela. Em aves, esse padrão de distribuição é mantido mesmo após fusão de micro a macrocromossomos (O'Connor *et al.*, 2018). Uma explicação para este fato em aves, propõe que sequências ricas em pares de base AT dos macrocromossomos os mantém ligados a membrana nuclear; em contrapartida, microcromossomos que são pobres em pares de bases AT (e ricos em GC), manteriam sua posição central (O'Connor *et al.*, 2018). Entretanto, essa hipótese não é válida para todos os organismos com cariótipos bimodais, pois esse padrão na composição de bases, típico dos microcromossomos de aves e alguns répteis, não é compartilhado por outros grupos taxonômicos (Bressa *et al.*, 2005; Alföldi *et al.*, 2011). Em *N. parvulus*, por exemplo, foram observadas bandas C DAPI+ em quase todos os pares de microcromossomos, indicando que sua heterocromatina é rica em pares de bases AT (ver figura 2). Outra possibilidade sugere que a posição central de microcromossomos de *N. parvulus* no núcleo interfásico possa estar relacionada a atividade gênica e um maior acesso a maquinaria proteica responsável pela duplicação do DNA na fase S. Essa hipótese tem sido bem aceita para aves (Habermann *et al.*, 2001) e plantas (Báez *et al.*, 2019), e explica a replicação inicial destes em relação aos macrocromossomos.

Diversos estudos têm mostrado que a taxa de recombinação tende a diferir entre os conjuntos cromossômicos de um cariótipo bimodal ao longo do tempo (Burt, 2002; Báez *et al.*, 2019). Em *Gallus*, por exemplo, a taxa de recombinação é duas a quatro vezes maior em microcromossomos quando comparados aos macrocromossomos (Smith *et al.*, 2000). Essa característica é necessária para manter a assimetria de um cariótipo bimodal após sua formação (Vosa *et al.* 2005). Em *N. parvulus* essa hipótese não pode ser totalmente aplicada, pois a meiose é aquiasmática nesta espécie, sugerindo baixa taxa de *crossing-over* ou sua ausência total em todos os pares de cromossomos na prófase I. Assim, a persistência da assimetria no cariótipo bimodal deste escorpião deve estar relacionada a outros mecanismos. Em plantas De la Herrán *et al.* (2001) e Báez *et al.* (2019) sugeriram que a amplificação de DNAs repetitivos heterocromáticos cromossomo-específicos contribui para aumentar a diferença de tamanho entre as classes do cariótipo bimodal. Interessantemente, em *N. parvulus* observamos grande variabilidade na quantidade de heterocromatina constitutiva (HC) entre os pares de tamanho regular, com alguns deles, a exemplo dos pares 2, 6 e 14 apresentado grande quantidade desta forma de cromatina. Esse padrão é incomum para cromossomos

monocêntricos de Scorpiones, que apresentam baixo conteúdo heterocromático, geralmente restrito a diminutos blocos pericentroméricos (Shanahan, 1989; Schneider *et al.*, 2009; Adilardi *et al.*, 2013; Plíšková *et al.*, 2016). Assim, o padrão de bandas C obtido no presente estudo sugere amplificação de HC em alguns pares do cariótipo de *N. parvulus*. Esse fenômeno pode ocorrer para inibir o aumento de cópias de elementos transponíveis e outras sequências repetitivas, bem como sua atividade transcricional em domínios centroméricos (Nishibuchi and Déjardin, 2017). Além disso, a presença de famílias multigênicas nos macrocromossomos (45S rDNA e U2 snRNA), corrobora a hipótese da ocorrência de acúmulo diferencial de DNAs repetitivos entre macro e microcromossomos de *N. parvulus*, contribuindo para manter a assimetria do cariótipo neste escorpião.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo evidencia a bimodalidade do cariótipo como uma tendência na evolução cromossômica do gênero *Neochactas*. Nossos dados sugerem que os microcromossomos registrados em *N. parvulus* são originados por eventos de fusões/fissões, e podem apresentar distribuição mais central no interior de núcleos interfásicos, em relação a macrocromossomos. Análises posteriores envolvendo sequenciamento e imunodeteção de modificações epigenéticas de microcromossomos deste escorpião nos permitirão entender a composição genômica dos mesmos, e se eles conferem alguma vantagem funcional/evolutiva para esta espécie.

6. REFERÊNCIAS

ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MOLA LM (2016) Sex-linked chromosome heterozygosity in males of *Tityus confluens* (Buthidae): a clue about the presence of sex chromosomes in scorpions. *PLoS ONE* 11:10.

ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, RODRÍGUEZ GIL SG, SCIOSCIA CL, AND MOLA LM. (2013) Meiotic studies in *Brachistosternus alienus* (Scorpiones; Bothriuridae). *The Journal of Arachnology* 41:222-226.

ALFÖLDI J, DI PALMA F, GRABHERR M, WILLIAMS C, KONG L, MAUCELI E, RUSSEL P, LOWE CB, GLOR RE, JAFFE JD, *et al.* (2011) The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature* 477:587–591.

ALMEIDA BRR, MILHOMEM-PAIXÃO SSR, NORONHA RCR, NAGAMACHI CY, COSTA MJR, PARDAL PPO, COELHO JS, PIECZARKA JC (2017) Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). *BMC Genetics* 18:35.

ALMEIDA BRR, NORONHA RCR, COSTA MJR, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC (2018) Meiosis in the scorpion *Tityus silvestris*: new insights into achiasmatic chromosomes. *Biology Open* 8:bio04352.

ALMEIDA, MC, CAMPANER C, CELLA DM (2006) Karyotype characterization, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Paranaita opima* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). *Genet. Mol. Biol.* 29:475-481.

BÁEZ M, VAIO M, DREISSIG S, SCHUBERT V, HOUBEN A, PEDROSA-HARAND A (2019) Together but different: the subgenomes of the bimodal *Eleutherine* karyotypes are differentially organized. *Front Plant Sci.* 7:1170.

BRESSA MJ, LARRAMENDY ML, PAPESCHI AG (2005) Heterochromatin characterization in five species of Heteroptera. *Genetica* 124:307–317.

BRITO RO, AFFONSO PRAM, SILVA JR. JC (2010) Chromosomal diversity and phylogenetic inferences concerning thrips (Insecta, Thysanoptera) in a semi-arid region of Brazil. *Genet. Mol. Res.* 9: 2230-2238.

BURT DW (2002) Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 96: 97–112.

CABRAL-DE-MELO DC, MOURA RC, MARTINS C (2010) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provide the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity* 104:393-400.

CAVALCANTE MG, BASTOS CEMC, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, VICARI MR, NORONHA RCR (2018) Physical mapping of repetitive DNA suggests 2n reduction

in Amazon turtles *Podocnemis* (Testudines: Podocnemididae). PLOS ONE, 13:e0197536.

CAVALCANTE MG, SOUZA LF, VICARI MR, DE BASTOS CEM, DE SOUSA JV, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, MARTINS C, NORONHA RCR (2020) Molecular cytogenetics characterization of *Rhinoclemmys punctularia* (Testudines, Geoemydidae) and description of a Gypsy-H3 association in its genome. Gene 738:144477.

COLGAN DJ, MCLAUCHLAN A, WILSON GDF, LIVINGSTON SP, EDGECOMBE GD, MACARANAS J, CASSIS G, GRAY MR (1998) Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. Austral J Zool 46: 419–437.

DE LA HERRÁN R, ROBLES F, CUÑADO N, SANTOS JL, RUIZ REJÓN M, GARRIDO-RAMOS MA, RUIZ REJÓN C (2001). A heterochromatic satellite DNA is highly amplified in a single chromosome of *Muscari* (Hyacinthaceae). Chromosoma, 110(3), 197–202.

DEAKIN JE, EZAZ T (2019) Understanding the Evolution of Reptile Chromosomes through Applications of Combined Cytogenetics and Genomics Approaches. Cytogenetic and Genome Research 157:7-20

DEGRANDI TM, GUNSKI RJ, GARNERO AV, OLIVEIRA EHC, KRETSCHMER R, SOUZA MS, BARCELLOS AS, HASS I (2020). The distribution of 45S rDNA sites in bird chromosomes suggests multiple evolutionary histories. Genetics and Molecular Biology 43: e20180331.

DOMASCHENZ R, LIVERNOIS AM, RAO S, EZAZ T, DEAKIN JE (2015) Immunofluorescent staining reveals hypermethylation of microchromosomes in the central bearded dragon, *Pogona vitticeps*. Molecular cytogenetics, 8, 104.

EZAZ T, YOUNG M (2013) Microchromosomes. Brenner's Encyclopedia of Genetics, 405–407.

FERREIRA A (1968) Contribution to the knowledge of cytology of two species of Brazilian scorpions: *Opisthacanthus manauarensis*, Ferreira, 1967 (Scorpiones,

Scorpionidae) and *Bothriurus asper araguaie* (Scorpiones, Bothriuridae). Anais da Academia Brasileira de Ciências 40:97-99.

FONTANA F, BRUCH RM, BINKOWSKI FP, LANFREDI M, CHICCA M, BELTRAMI N, CONGIU L (2004) Karyotype characterization of the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens* (Rafinesque 1817) by chromosome banding and fluorescent *in situ* hybridization. Genome 47:742-746.

FONTANA F, LANFREDI M, CONGIU L, LEIS M, CHICCA M, ROSSI R (2003) Chromosomal mapping of 18S-28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent *in situ* hybridization in six sturgeon species. Genome 46:473-477

GERLACH WL, BEDBROOK JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucleic Acids Res. 7:1869–1885.

HABERMANN FA, CREMER M, WALTER J, KRETH G, VON HASE J, BAUER K, WEINBERG J, CREMER C, CREMER T, SOLOVEI I (2001) Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells. Chromosome Research 9: 569–584.

Hemmer, W. (1990). Karyotype differentiation and chromosomal variability in springtails (Collembola, Insecta). Biology and Fertility of Soils, 9(2), 119–125. doi:10.1007/bf00335793

Imai HT, Maruyama T, Gojobori T, Inoue Y, Crozier RH (1986) Theoretical bases for karyotype evolution. I. The Minimum –Interaction Hypothesis. The American Naturalist 128 (6): 900-920.

KIROV I, KHRUSTALEVA L, VAN LAERE K, SOLOVIEV A, MEEUS S, ROMANOV D, FESENKO I (2017) DRAWID: user-friendly java software for chromosome measurements and idiogram drawing. Comparative Cytogenetics 11(4): 747-757

KUZNETSOVA VG, GROZEVA SM, NOKKALA S, NOKKALA C (2011) Cytogenetics of the true bug infraorder Cimicomorpha (Hemiptera, Heteroptera): a review. ZooKeys 154:31–70.

KUZNETSOVA VG, MARYAŃSKA-NADACHOWSKA A, SHAPOVAL NA, ANOKHIN BA, SHAPOVAL AP (2017) Cytogenetic characterization of eight Odonata

species originating from the curonian spit (the Baltic Sea, Russia) using C-banding and FISH with 18S rDNA and Telomeric (TTAGG) Probes. *Cytogenet Genome Res* 153:147-157.

LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.

LISACHOV AP, TRIFONOV VA, GIOVANNOTTI M, FERGUSON-SMITH MA, BORODIN PM (2017) Immunocytological analysis of meiotic recombination in two anole lizards (Squamata, Dactyloidae). *Comparative Cytogenetics* 11: 129-141.

LOURENÇO W (2017) Scorpions from Brazilian Amazonia, with a description of two new species from 'Serra da Mocidade' National Park in the State of Roraima (Scorpiones: Buthidae, Chactidae). *Arachnida - Rivista Aracnologica Italiana* 12: 2-17.

LOURENÇO WR (2002) Scorpiones. In: ADIS, J. (org.). *Amazonian Arachnida and Miryapoda: identification keys to all classes, orders, families, some genera and a list of known terrestrial species*. Pensoft Publishers, Moscow, 399-438p.

LUKHTANOV VA (2019) Two types of highly ordered micro- and macrochromosome arrangement in metaphase plates of butterflies (Lepidoptera). *Comp Cytogenet.* 13:19-25

MATTOS VF, CELLA DM, CARVALHO LS, CANDIDO DM, SCHNEIDER MC (2013) High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. *Chromosome Res.* 21:121-136

MCKAIN MR, WICKETT N, ZHANG Y, AYYAMPALAYAM S, MCCOMBIE WR, CHASE MW, PIRES JC, DE PAMPHILIS CW, LEEBENS-MACK J. (2012) Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in Agavoideae (Asparagaceae). *American Journal of Botany* 99:397–406.

MCQUEEN HA, SIRIACO G, BIRD AP (1998). Chicken Microchromosomes Are Hyperacetylated, Early Replicating, and Gene Rich. *Genome Research* 8:621–630.

MEDEIROS-NETO E, NOLLET F, MORAES AP, FELIX LP (2017) Intrachromosomal karyotype asymmetry in Orchidaceae. *Genetics and Molecular Biology*, 40:610–619.

MENEZES RST, GAZONI T, COSTA MA (2019) Cytogenetics of warrior wasps (Vespidae: *Synoeca*) reveals intense evolutionary dynamics of ribosomal DNA clusters and an unprecedented number of microchromosomes in Hymenoptera. *Biological Journal of the Linnean Society* 126:925–935

MESA A, FONTANETTI CS, FERREIRA A (2010) The Chromosomes and the sex determining mechanism of *Scaphura nigra* (Orthoptera, Ensifera, Tettigoniidae, Phaneropterinae). *Journal of Orthoptera Research*, 19: 239–242.

NISHIBUCHI G, DÉJARDIN J (2017) The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals. *Chromosome Res.* 25: 77-87.

O’CONNOR RE, KIAZIM L, SKINNER B, FONSEKA G, JOSEPH S, JENNINGS R, LARKIN DM, GRIFFIN DK (2018) Patterns of microchromosome organization remain highly conserved throughout avian evolution. *Chromosoma* 128:21-29

PALOMINO G, MARTÍNEZ J, MÉNDEZ I (2008) Karyotype studies in cultivars of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia*, 61:144-153.

PIGOZZI MI (2016) The Chromosomes of Birds during Meiosis. *Cytogenetic and Genome Research* 150:128–138.

PLÍŠKOVÁ J, KOVAŘÍK F, KOŠULIČ O, ŠT’ÁHLAVSKÝ F (2016). Description of a New species of *Heterometrus* Ehrenberg, 1828 (Scorpiones: Scorpionidae) from Thailand with remarks about the utilization of cytogenetic data in taxonomy of the genus. *Annales Zoologici*, 66: 467–476.

REIN JO (2021) The Scorpion Files. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology. [Acessado em 23 de Janeiro de 2021]. Disponível em <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>

RIBAS TFA, NAGAMACHI CY, ALEIXO A, PINHEIRO MLS, O’BRIEN PCM, FERGUSON-SMITH MA, YANG F, SUAREZ P, PIECZARKA JC (2018) Chromosome painting in *Glyphorynchus spirurus* (Vieillot, 1819) detects a new fission in Passeriformes. *PLoS ONE* 13: e0202040.

COLMAGRO R, MINELLI A, PALUDETTI G, RASOTTO MB (1986) Chromosome Studies in Centipedes (Chilopoda), *Caryologia*, 39: 309-323.

SAHARA K, MAREC F, TRAUT W (1999) TTAGG Telomeric Repeats in Chromosomes of Some Insects and Other Arthropods. *Chromosome Res* 7: 449–460

SCHNEIDER MC, MATTOS VF, CARVALHO LS, CELLA DM (2015) Organization and behavior of the synaptonemal complex during achiasmatic meiosis of four Buthid scorpions. *Cytogenet Genome Res* 144:341-347.

SCHNEIDER MC, ZACARO AA, PINTO-DA-ROCHA R, CANDIDO DM, CELLA DM (2009a) A comparative cytogenetic analysis of 2 Bothriuridae species and overview of the chromosome data of Scorpion. *Journal of Heredity*, 100: 545-555.

SETO T, NUSSBAUM RA (1976) Mitotic and Meiotic Chromosomes of *Ichthyophis Orthoplicatus* Taylor (Amphibia: Gymnophiona). *Caryologia* 29:317–331.

SHANAHAN CM (1989) Cytogenetics of Australian scorpions. II. Chromosome polymorphism in species of *Urodacus* (family Scorpionidae). *Genome* 32:890–900.

SHANAHAN CM, HAYMAN DL (1990) Synaptonemal complex formation in male scorpions exhibiting achiasmatic meiosis and structural heterozygosity. *Genome* 33:914–926.

SKINNER BM, ROBERTSON LBW, TEMPEST HG, LANGLEY EJ, IOANNOU D, FOWLER KE, CROOIJMANS RPMA, HALL AD, GRIFFIN DK, VÖLKER M (2009) Comparative genomics in chicken and Pekin duck using FISH mapping and microarray analysis. *BMC Genomics* 10:357.

SMITH J, BRULEY CK, PATON IR, DUNN I, JONES CT, WINDSOR D, MORRICE DR, LAW AS, MASABANDA J, SAZANOV A, WADDINGTON D, FRIES R, BURT DW (2000) Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes. *Animal Genetics* 31: 96–103.

SRIKULNATH K, UNO Y, NISHIDA C, MATSUDA Y (2013) Karyotype evolution in monitor lizards: cross-species chromosome mapping of cDNA reveals highly conserved synteny and gene order in the Toxicofera clade. *Chromosome Res* 21:805–819.

ŠTÁHLAVSKÝ F, ŠTUNDLOVÁ J, LOWE G, STOCKMANN M, KOVAŘÍK F (2018) Application of cytogenetic markers in the taxonomy of flat rock scorpions (Scorpiones: Hormuridae), with the description of *Hadogenes weygoldti* sp. n. Zoologischer Anzeiger, 273:, 173–182.

ŠTUNDLOVÁ J, ŠMÍD J, NGUYEN P, ŠTÁHLAVSKÝ F (2019) Cryptic diversity and dynamic chromosome evolution in Alpine scorpions (Euscorpiidae: Euscorpius). Molecular Phylogenetics and Evolution 134:152-163.

SUMNER AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Research 75: 304–306.

TOSCANI MA, PIGOZZI MI, BRESSA MJ, PAPESCHI AG (2007) Synapsis with and without recombination in the male meiosis of the leaf-footed bug *Holhymenia rubiginosa* (Coreidae, Heteroptera). Genetica, 132(2), 173–178.

VOSA CG (2005) On chromosome uniformity, bimodality and evolution in the tribe Aloineae (Asphodelaceae). Caryologia 58:83–85.

VOSS SR, KUMP DK, PUTTA S, PAULY N, REYNOLDS A, HENRY RJ, BASA S, WALKER JA, SMITH J (2011) Origin of amphibian and avian chromosomes by fission, fusion, and retention of ancestral chromosomes. Genome Research 21:1306–1312.

Legenda das figuras

Figura 1: Cariótipo de *N. parvulus*. Notar a diferença de tamanho entre os microcromossomos e os macrocromossomos.

Figura 2: Bandeamento C em cromossomos de *N. parvulus*. A seta no par 2 indica a banda C adicional no braço curto. No inserto, alguns exemplares de microcromossomos submetidos a coloração por DAPI após o bandeamento C.

Figura 3: Comportamento meiótico em *N. parvulus*. (a) Zigóteno. (b) o mesmo núcleo zigotênico em “a” submetido a FISH com sonda telomérica; notar a disposição polarizada dos telômeros. (c) Paquíteno. Setas indicam microbivalentes. (d) Bivalentes paquitênicos isolados; a seta indica os múltiplos dominos heterocromáticos na região pericentromérica. O inserto mostra uma representação esquemática do bivalente indicado pela seta. (e) Pós-paquíteno. (f) Anáfase I.

Figura 4: Mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos em *N. parvulus*. (a) 45S rDNA (seta); blocos heterocromáticos DAPI+ são indicados pelas cabeças-de-setas. (b) Repetições TTAGG. (c) U2 snRNA. (d) 45S rDNA em interfase; a seta indica 45S rDNA, e as cabeças-de-seta indicam heterocromatina de macrocromossomos na periferia do núcleo. (e) U2 snRNA em núcleo interfásico (seta).

Figura 1

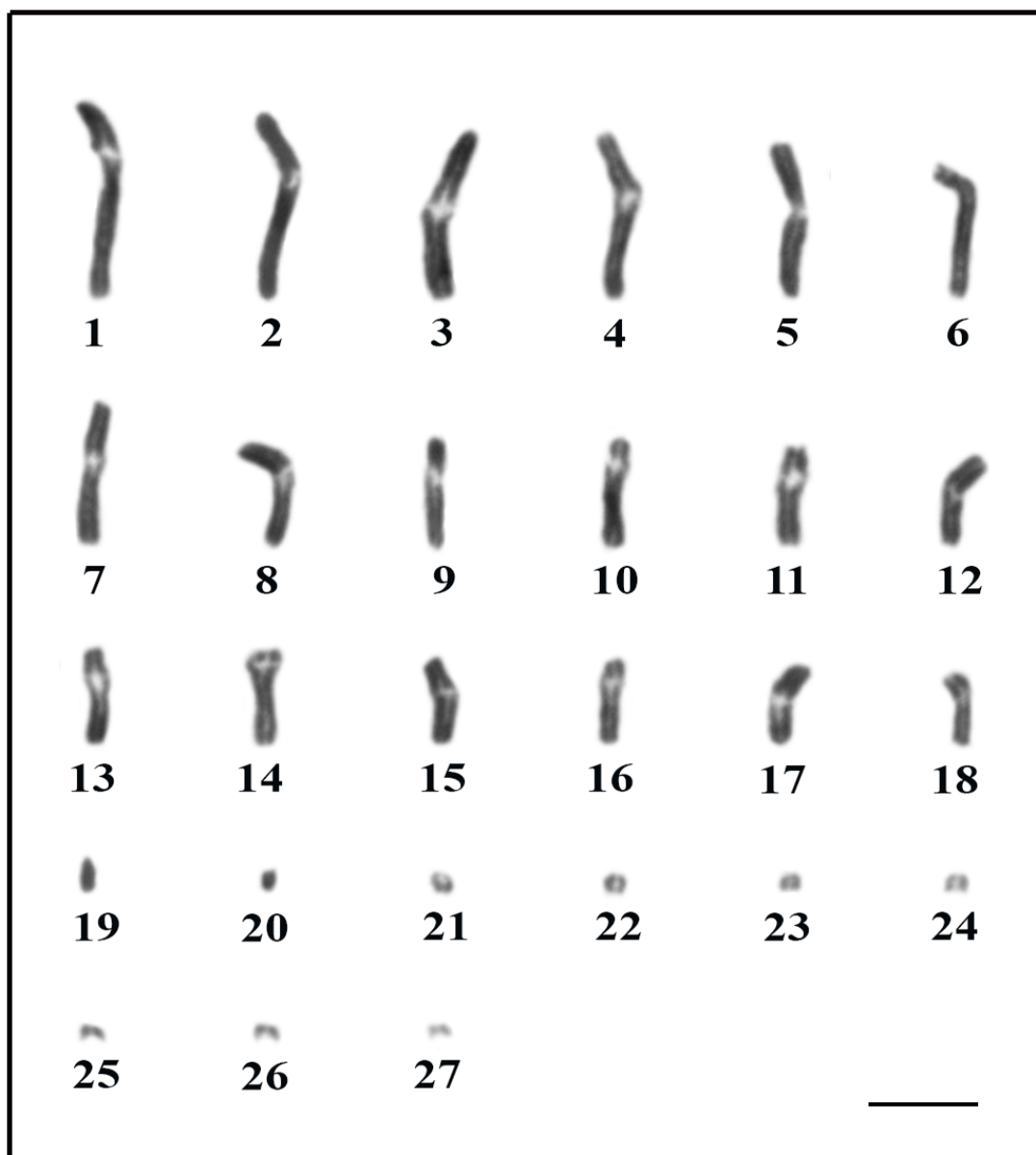


Figura 2

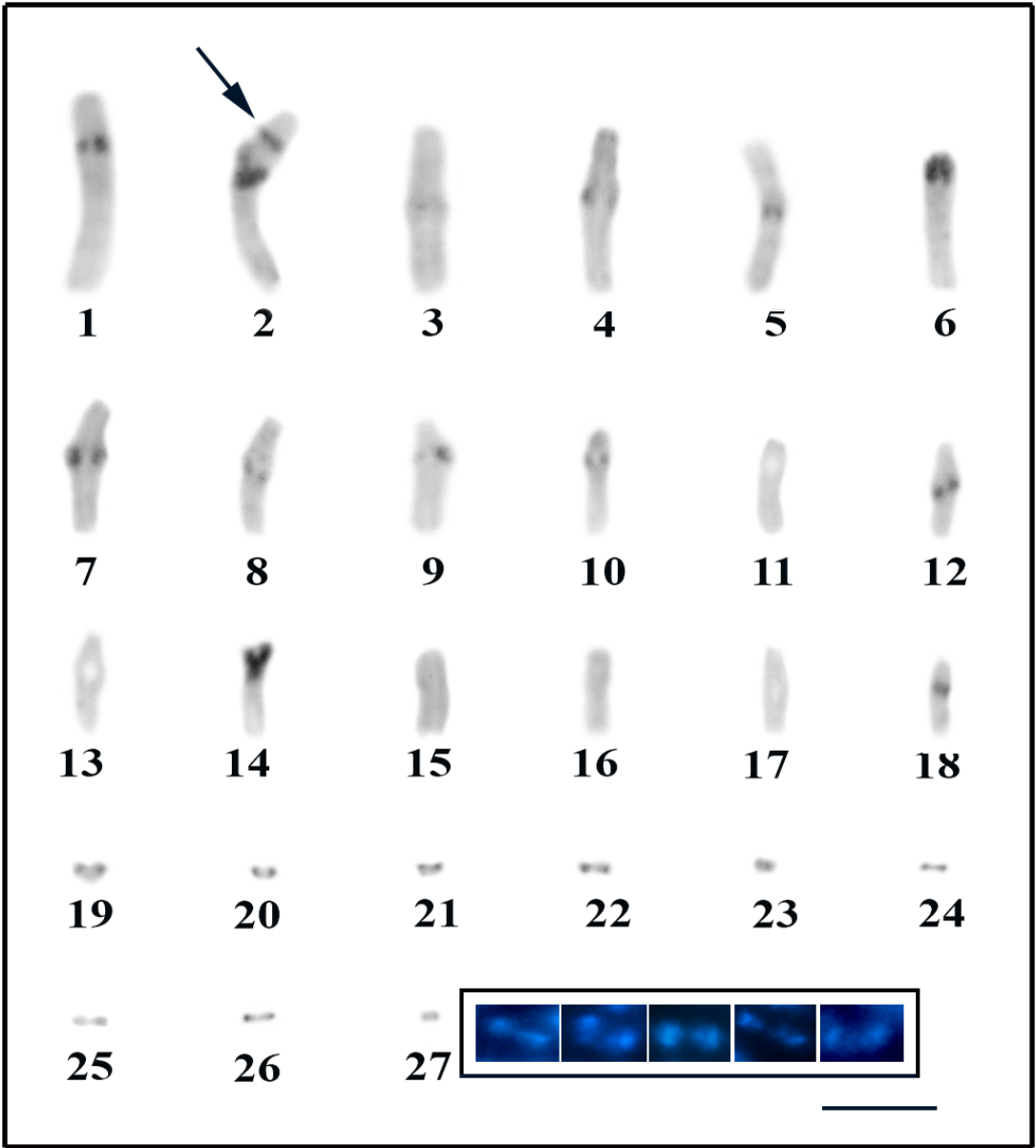


Figura 3

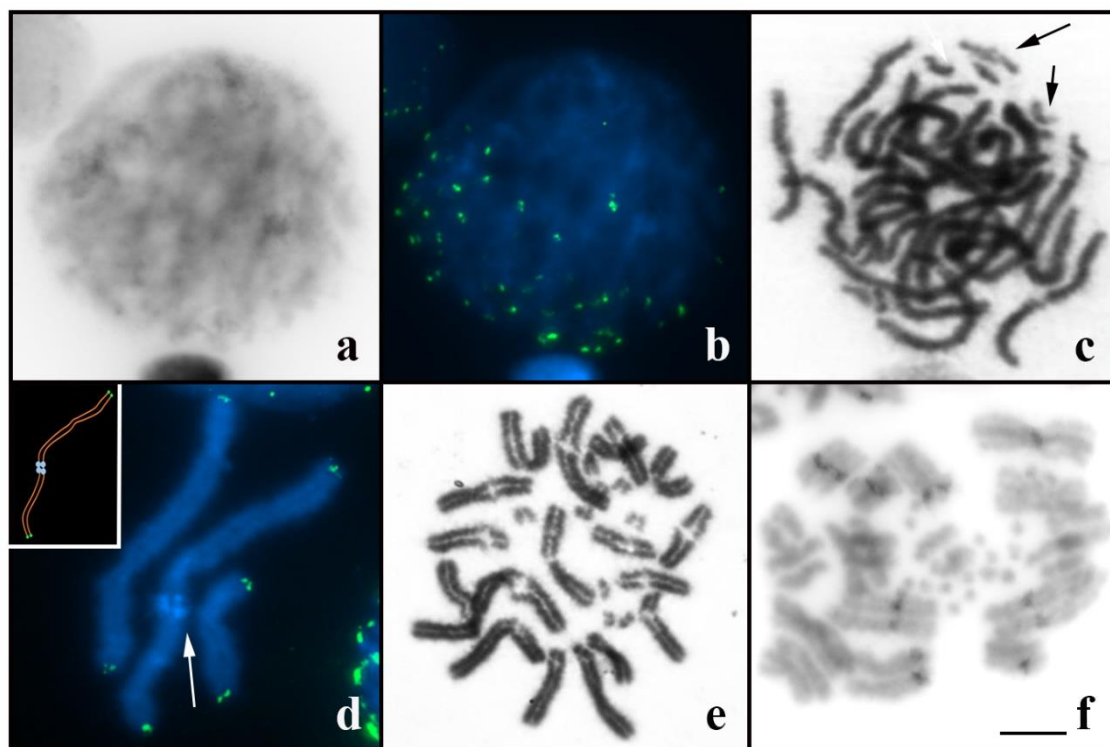
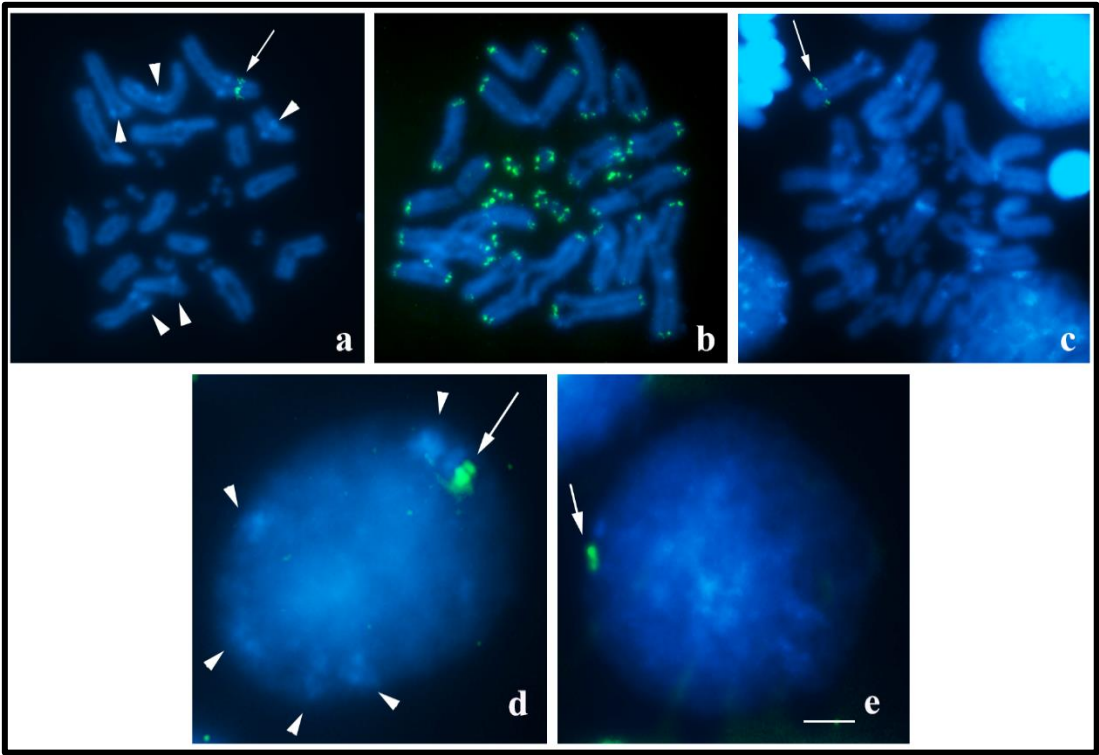


Figura 4



CAPÍTULO 4: Meiosis in the scorpion *Tityus silvestris*: new insights into achiasmatic chromosome

Bruno Rafael Ribeiro de Almeida¹; Renata Coelho Rodrigues Noronha¹; Marlyson Jeremias Rodrigues da Costa¹; Cleusa Yoshiko Nagamachi¹; Julio Cesar Pieczarka¹

¹Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Avenida Augusto Corrêa, nº01, 66075-900, Belém, Pará, Brasil.

***Corresponding author:** Julio Cesar Pieczarka

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Campus do Guamá

Av. Perimetral, s/n. Guamá

66075-900 Belém – Pará, Brazil

E-mail: juliopieczarka@gmail.com

RESEARCH ARTICLE

Meiosis in the scorpion *Tityus silvestris*: new insights into achiasmatic chromosomes

Bruno Rafael Ribeiro de Almeida, Renata Coelho Rodrigues Noronha, Marlyson Jeremias Rodrigues da Costa, Cleusa Yoshiko Nagamachi and Julio Cesar Pieczarka*

ABSTRACT

Achiasmatic male meiosis in scorpions is characterized by a high frequency of gaps, asynaptic regions and multivalent associations. Here, we performed an immunocytochemical analysis to investigate recombination, and synapsis and chromatin-remodeling events during meiosis of the scorpion *Tityus silvestris*. Our results demonstrate that the synaptonemal complex (SC) begins its organization in the zygotene stage and persists until metaphase I. The advancement of the synaptic process is related to the epigenetic modification histone H3 lysine 27 trimethylation (H3K27m3). The distribution and dynamics patterns of variant γ H2AX and recombinase Rad51 during achiasmatic meiosis suggests formation and repair of DNA double-strand breaks (DSBs) during early stages of prophase I. The epigenetic modifications, histone H3 lysine 4 trimethylation (H3K4m3) and histone H3 lysine 9 acetylation (H3K9ac), showed a dispersed distribution along the bivalents, suggesting that transcriptional activity is maintained constitutively during prophase I. However, H3K9ac modifications are absent in constitutive heterochromatin carrying the 45S rDNA in pachytene and post-pachytene stages. Collectively, our data demonstrate that *T. silvestris* exhibits adaptations to the achiasmatic mode, and suggest that epigenetic modifications may act in the regulation of these mechanisms to favor the normal continuation of meiosis in this scorpion.

KEY WORDS: Holocentric chromosome, Achiasmatic meiosis, Scorpiones, Epigenetics, Synaptonemal complex

INTRODUCTION

Tityus is the largest genus of the Buthidae family in the Neotropical region, comprising about 200 described species, some of which are of great medical importance (Kovářik et al., 2013; Lourenço, 2002, 2015). In recent years, these scorpions have been the subject of several meiotic studies, reflecting the fact that they exhibit extensive multivalent associations during metaphase I. These meiotic chains may involve all chromosomes of the karyotype and are the result of the occurrence of structural rearrangements of the fusion/fission type or reciprocal translocations in the heterozygous state (Piza,

1950a,b; Cunha and Pavan, 1954; Adilardi et al., 2016; Ojanguren-Affilastro et al., 2017). The presence of holocentric chromosomes favors fixation of these rearrangements in several natural populations (Mattos et al., 2013). Direct consequences of such changes are detected during prophase I events, as evidenced by synaptic anomalies, such as gaps, asynapsed regions, loop-like structures and a high frequency of heterosynapsis, in several members of this genus (Schneider et al., 2009b).

Another interesting aspect of *Tityus* meiosis is the absence of chiasma in males (Schneider et al., 2009a). Achiasmatic meiosis is not unique to this genus, occurring in all Scorpiones families, as well as in other organisms, such as plants, flatworms and insects (Schneider et al., 2009a; Loidl, 2016). Chiasma formation is related to the occurrence of DNA double-strand breaks (DSBs), created by the enzyme Spo11 (Moens et al., 2007). The recombinases, Rad51 (radiation sensitive 51) and DMC1 (disrupted meiotic cDNA1), perform reciprocal repair by subsequently associating with regions of DSBs and connecting them to the homologous DNA strand, forming a heteroduplex (Gray and Cohen, 2016). The chiasma is the cytological visualization of this process during the diplotene stage, after dissociation of the synaptonemal complex (SC). To date, no detailed studies of meiotic recombination in scorpions have been reported, with the exception of an ultrastructural analysis of the SC of some Buthidae species that showed no recombination nodules (Shanahan and Hayman, 1990; Schneider et al., 2015).

Histones are protein components of nucleosomes that can undergo post-translational modifications through methylation, acetylation, ubiquitination, sumoylation or phosphorylation of different amino acids present in the amino terminal tail (Venkatesh and Workman, 2015). Such changes reshape the chromatin, promoting the activation or inactivation of genes, or recruiting specific proteins to perform certain functions (Bannister and Kouzarides, 2011). During meiosis I in several organisms, insertions of histone variants in the chromatin are observed; these include the phosphorylated serine 136 histone variant H2AX (γ H2AX) (Cabrero et al., 2007) and methylation or acetylation of histone H3 at different amino acids (Hayashi et al., 2005). Such changes may be related to the regulation of several meiotic processes, including recombination, condensation, segregation and transcriptional silencing of homologues (Moens et al., 2007; Naumova et al., 2013; Rahn et al., 2016).

Thus, *Tityus* scorpions may be excellent models for epigenetic studies on achiasmatic meiotic chromosomes. In this study, we performed a detailed analysis of the meiotic cycle of *Tityus silvestris* Pocock, 1988, with the objective of analyzing the synaptic behavior, verifying the occurrence and repair of DSBs and investigating the relationship of these events to epigenetic modifications of bivalents throughout prophase I of this species. In addition, information about *Tityus* chromatin epigenetic dynamics may contribute to understanding the molecular organization of DNA in holocentric systems (Heckmann et al., 2013).

Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados em Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Avenida Augusto Corrêa, s/n, 66075-900, Guamá, Belém, Pará, Brazil.

*Author for correspondence (juliopeczarka@gmail.com)

B.R.R.d.A., 0000-0002-6080-5826; R.C.R.N., 0000-0001-9150-8544; M.J.R.d.C., 0000-0003-4415-2420; C.Y.N., 0000-0003-1516-2734; J.C.P., 0000-0003-2951-8877

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 17 November 2018; Accepted 15 April 2019

RESULTS

Tityus silvestris has $2n=24$ holocentric chromosomes, with one large-size pair and 11 medium-size pairs (Fig. 1A). C-banding revealed only one heterochromatic block in the terminal region of pair 1 (Fig. 1B). During meiosis, post-pachytene cells exhibited bivalents, with homologues arranged parallel to each other, without a configuration that evidences the presence of chiasma (Fig. 1C). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using 45S rDNA showed that this sequence is co-localized with the heterochromatin of pair 1 (Fig. 1D). Telomeric sequences were observed only at chromosomal ends (Fig. 1D).

Immunodetection of SMC3 (Structural Maintenance of Chromosomes 3) protein and FISH with a telomeric probe showed that, in the leptotene stage, cohesin SMC3 was present in the form of single filaments, dispersed along nuclei, or initiating the bouquet formation (Fig. 2A–D). During the zygotene stage, SMC3 filaments and telomeres were polarized in the bouquet configuration, with synapsis initiation of homologs through terminal regions (Fig. 2E–H). In early pachytene stage, the bouquet configuration became disorganized, exhibiting longer double filaments, owing to advancement of the synapsis, that were continuous with single filaments (Fig. 2I–L). During the intermediate pachytene stage, bivalents were almost totally synapsed, but with interstitial regions that had not yet completed the synapsis process (Fig. 2M–P); the synapsis of bivalents was completed in the late pachytene stage (Fig. 2Q–T). Post-pachytene cells exhibited the presence of 12 completely synapsed bivalents, in which the SMC3 axis remained centrally located along each bivalent to the metaphase I stage (Fig. 2U–Z).

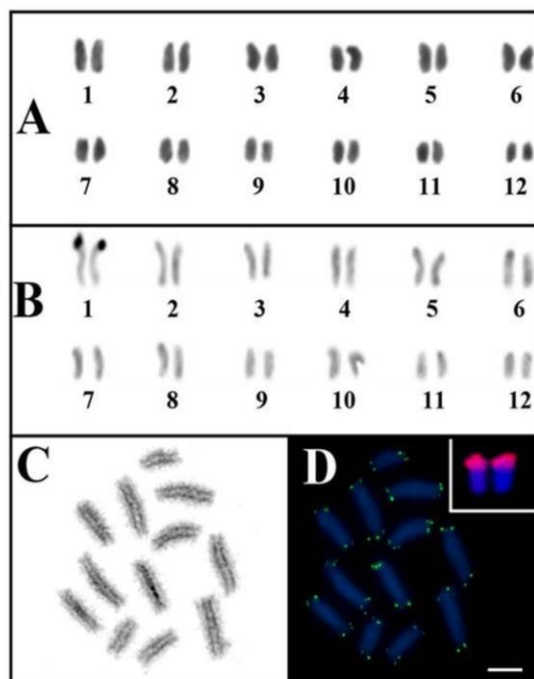


Fig. 1. Cytogenetic characterization of *T. silvestris*. (A) Karyotype, $2n=24$. (B) C-banding; note the heterochromatic block in pair 1. (C) Post-pachytene stage meiotic cell demonstrating 12 achiasmatic bivalents. (D) The same post-pachytene stage cell from C submitted to FISH with a telomeric probe; inset shows the rDNA 45S carrier (pair 1). Scale bar: 10 μ m.

Immunodetection of γ H2AX demonstrated that the formation of DSBs starts in pre-leptotene cells (Fig. 3A–D). In leptotene cells, γ H2AX signals were randomly distributed along the nucleus (Fig. 3E–H). During the zygotene stage, γ H2AX signals were co-located with SMC3 axes, polarized according to the bouquet configuration (Fig. 3I–L). In the early pachytene stage, γ H2AX signals increased in intensity, expanding along the synapsed SMC3 axes (Fig. 3M–P). In the intermediate pachytene stage, the number of γ H2AX signals decreased drastically, with only a few visible domains, most of which were restricted to the bivalent terminal region (Fig. 3Q–T). No γ H2AX signals were observed at the late pachytene stage (Fig. 3U–Z).

An analysis of the distribution of Rad51 revealed that foci of this recombinase were first detected in the leptotene stage, located on scattered SMC3 axes along the nucleus (Fig. 4A–D). In the zygotene stage, Rad51 was observed only in the synapsed chromosome axes of the bouquet (Fig. 4E–H). During early and intermediate phases of the pachytene stage, Rad51 foci were distributed along the SC, detectable on different regions of the synapsed axes or lateral to them (Fig. 4I–L). No Rad51 signals were observed in the late pachytene stage (Fig. 4M–P).

An analysis of the anti-H3K27m3 antibody-labeling pattern demonstrated that the proportion of histones bearing this modification increased in association with advancement of the synapsis. In the leptotene stage, H3K27m3 was located only at one pole of the cellular nucleus (Fig. 5A,B). During the early zygotene stage, the number of H3K27m3 signals increased slightly but were still polarized in the bouquet over thick chromatin, which comprises regions containing initiated synapsis (Fig. 5C,D). In late zygotene stage, the number and intensity of anti-H3K27m3 signals did not change, and were observed mainly on the terminal region of bivalents (Fig. 5E,F). In early pachytene stage, there was a large increase in the amount of H3K27m3 that remained localized only in the synapsed parts of homologs (Fig. 5G,H). In the intermediate pachytene stage, H3K27m3 signals were observed along all bivalents (Fig. 5I,J). In late pachytene cells, on the other hand, the amount of H3K27m3 decreased, and the signals appeared to be compartmentalized, exhibiting a binding-like pattern in some bivalents (Fig. 5K,L). With progression of chromosomal condensation to post-pachytene and metaphase I stages, H3K27m3 signals were observed with a distribution that covered most bivalent extensions, with the exception of the terminal region of some bivalents, including pair 1 carrying the C band (Fig. 5M–P).

Immunodetection of H3K4m3 revealed a uniform distribution of this epigenetic mark along the nucleus of leptotene stage cells (Fig. 6A,B). During the zygotene stage, the pattern was the same as that observed in leptotene cells; however, it was possible to identify some terminal regions that contained few H3K4m3 signals (Fig. 6C–F). In early and late pachytene cells, H3K4m3 signals were detected along almost all extensions of the homologues, where they were present in both synapsed and non-synapsed regions; exceptions included some interstitial and terminal regions that exhibited a low intensity of H3K4m3 signals (Fig. 6G–J). In metaphase II cells, chromosomes exhibited an apparently homogeneous distribution of H3K4m3, and it was not possible to clearly distinguish regions that lacked these modified histones (Fig. 6K,L).

An antibody specific for lysine 9-acetylated histones (H3K9ac) revealed an apparently uniform distribution of this epigenetic mark in interphase chromosomes, with a small accumulation in the heterochromatic region (Fig. 7A–C). In the early stages of prophase I (leptotene and zygotene stages), the distribution of H3K9ac remained uniform throughout the bivalents (Fig. 7D–I). On the other hand, the

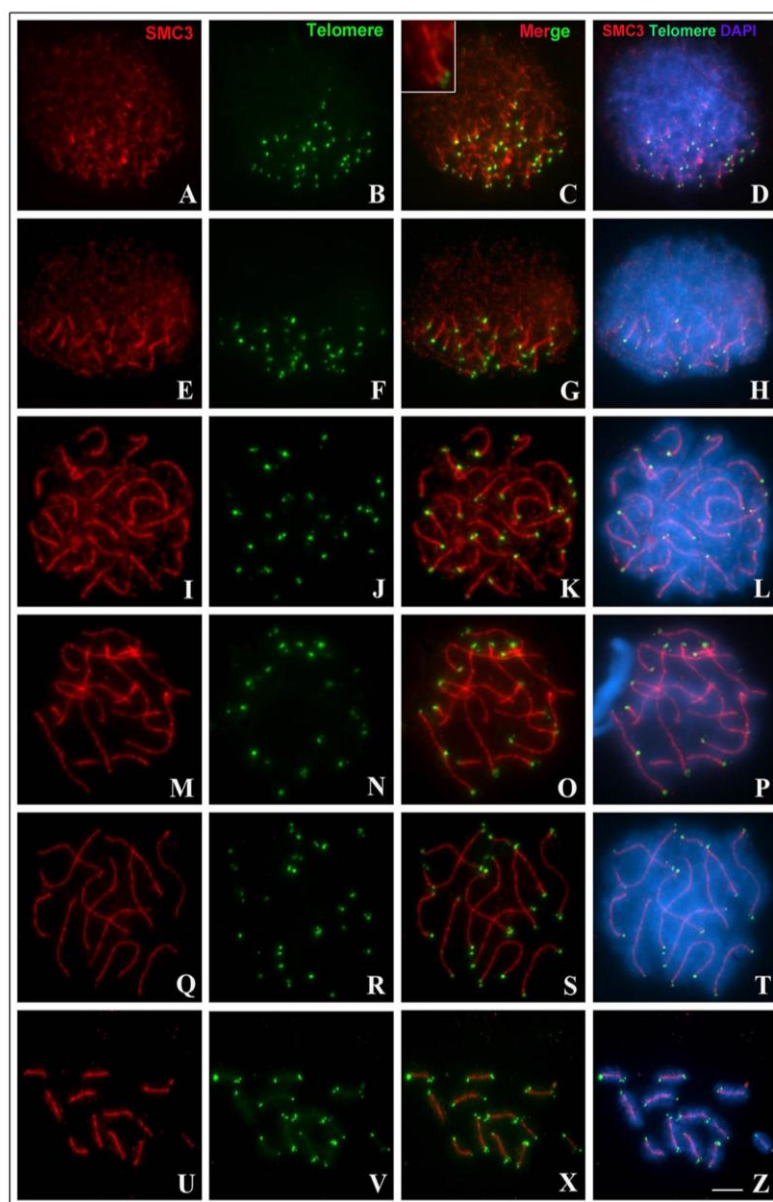


Fig. 2. Synaptic behavior in *T. silvestris* inferred by immunodetection of SMC3 (red) and FISH with telomeric probe (green). Chromatin was counterstained with DAPI (blue). (A–D) A cell in the late leptotene stage; inset in C demonstrates the pairing of a bivalent. (E–H) A cell in the zygotene stage, with telomeres polarized in a bouquet formation. (I–L) A cell in the early pachytene stage. (M–P) A cell in the intermediate pachytene stage. (Q–T) A cell in the late pachytene stage. (U–Z) A cell in metaphase I; note the maintenance of the SMC3 axial shaft. Scale bar: 10 μ m.

heterochromatic region of pair 1, identified by the presence of 45S rDNA, did not show H3K9ac signals during pachytene subphases (Fig. 7J–L). This pattern was also observed in post-pachytene and metaphase I cells (Fig. 7M–R). An antibody specific for lysine 27-acetylated histones (H3K27ac) showed no signals for this epigenetic mark in meiotic cells; these signals were only detected in interphase cells, where they were homogeneously distributed (data not shown).

DISCUSSION

Synaptic dynamics in *T. silvestris*

In the present study, we demonstrated that synapsis in *T. silvestris* is initiated at terminal regions, arranged in a bouquet configuration,

during the leptotene–zygotene transition (Fig. 2). This feature seems to be common for Buthidae members, and suggests that pairing centers are present at chromosome ends in scorpions of this family (Shanahan and Hayman, 1990; Adilardi et al., 2015). This result agrees with findings from other holocentric organisms, such as *Caenorhabditis elegans*, for example, in which each bivalent has a pairing center close to telomeres (Rog and Dernburg, 2013). In Buthidae, terminal regions are composed of several repetitive DNAs present in euchromatin or heterochromatin (Adilardi et al., 2015; Almeida et al., 2017); such sequences may facilitate pairing and synapsis processes, as proposed by Almeida et al. (2017), for histone H3 clusters in *Tityus obscurus*.

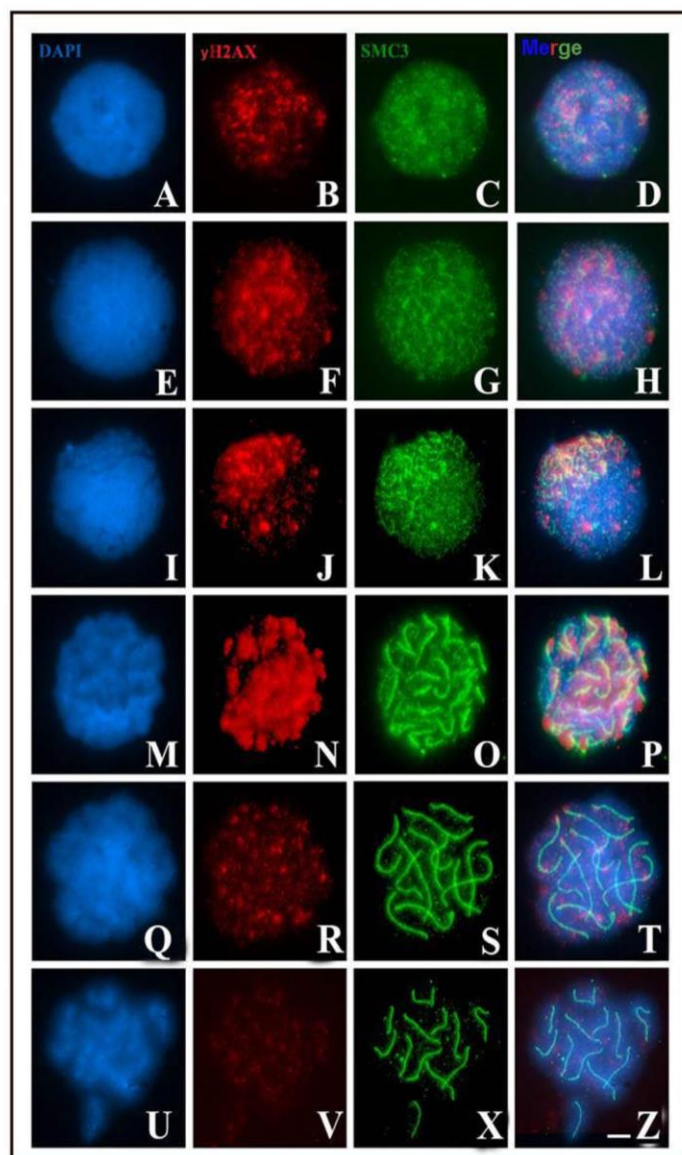


Fig. 3. Signaling of DSBs by γ H2AX (red) and SMC3 (green) during prophase I of *T. silvestris*. Chromatin was counterstained with DAPI (blue). (A–D) A cell in the pre-leptotene stage demonstrating the presence of many γ H2AX domains. (E–H) A cell in the leptotene stage. (I–L) A cell in the zygotene stage with γ H2AX signals located in the bouquet formation. (M–P) A cell in the early pachytene stage, with γ H2AX signals along synapsed axes. (Q–T) A cell in the intermediate pachytene stage with few γ H2AX tags. (U–Z) A cell in the late pachytene stage. Scale bar: 10 μ m.

The composition and various types of epigenetic modifications of chromatin play important roles in the synapsis (Spangenberg et al., 2010). Immunodetection of H3K27m3 in *T. silvestris* revealed a correlation of this epigenetic mark with synapsis during prophase I (Fig. 5). In mice, meiotic studies have revealed that the enrichment of H3K27m3 occurs in repetitive sequences, which associate with the lateral elements of the SC and act as anchor points for them during the pachytene stage (Hernández-Hernández et al., 2008; Hernández-Hernández et al., 2010). Thus, we believe that, in *T. silvestris*, H3K27m3 signals indicate inactivated sequences associated with the organization of SC, similar to the proposal of Hernández-Hernández et al. (2010) for *Mus musculus*.

In the case of achiasmatic meiosis, pairing and synapsis adaptations accomplish the objective of ensuring correct segregation of homologues in anaphase I. Our results demonstrated that, in *T. silvestris*, SC persist until metaphase I, a finding observed in other species of Buthidae and in some orders of insects (Marec, 1996; Schneider et al., 2009b). In insects, this characteristic is an adaptation related to the achiasmatic mode, and is only possible thanks to the existence of a modified SC (Bogdanov, 2003). Our study demonstrated that the cohesin SMC3 also remains preserved along the SC during metaphase I in *T. silvestris*, diverging from other arthropods in which SMC3 is observed only in the space between chromatids

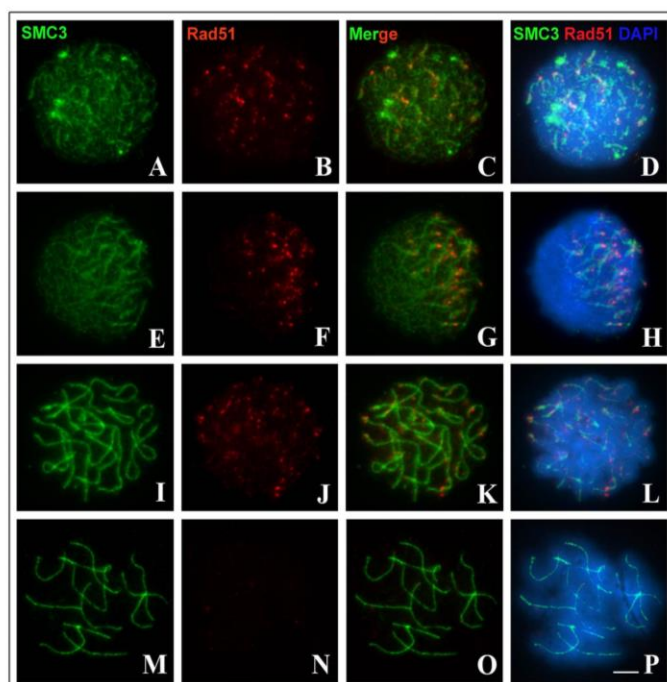


Fig. 4. Repair of DSBs during prophase I of *T. silvestris* inferred by immunodetection of SMC3 (green) and Rad51 (red). Chromatin was counterstained with DAPI (blue). (A–D) A cell in the leptotene stage demonstrating few foci Rad51. (E–H) A cell in the zygotene stage, with Rad51 on synapsed axes in the bouquet formation. (I–L) A cell in the intermediate pachytene stage with foci Rad51 along the bivalents. (M–P) A cell in the late pachytene stage. Scale bar: 10 μ m.

(Calvente et al., 2013) or at centromeres (McKee et al., 2012) during this phase of the meiotic cycle.

DSB repair and its significance in achiasmatic meiosis in *T. silvestris*

Achiasmy is a phenomenon that has arisen in several independent eukaryotic lines, usually associated with heterogametic sex (Loidl, 2016). Although meiosis is achiasmatic in *T. silvestris*, DSBs form and are repaired, as evidenced by the detection of γ H2AX and Rad51 proteins (Figs 3 and 4). Similar results have been found only in *Rhynchospora tenuis* and *Bombyx mori* females, in which initial recombination nodules are observed during achiasmatic meiosis (Holm and Rasmussen, 1980; Cabral et al., 2014). In the specific case of *T. silvestris*, we suggest that DSBs are not repaired in the form of crossing-over. The absence of late recombination nodes in ultrastructural analyses of the SC of four Buthidae species supports our hypothesis that DSBs are processed by non-crossing-over mechanisms in *T. silvestris* (Schneider et al., 2015). The absence of chiasma in *T. silvestris* is considered an advantageous characteristic that was maintained during the chromosomal evolution of Buthidae, possibly because it allows normal segregation of the chromosomes involved in multivalent meiosis (Mattos et al., 2013; Adilardi et al., 2016; Almeida et al., 2017).

Considering this information, what purpose might DSBs serve during prophase I in *T. silvestris*? According to Zickler (2006), homologous pairing occurs in three distinct and consecutive steps in most eukaryotes: homologous recognition, juxtaposition of chromosomal axes mediated by DSBs and SC formation. Considering the results of the present study, we believe that the maintenance of DSBs in *T. silvestris* is attributable to the role played

by these events in the synaptic mechanism. In this scorpion, this relationship between DSB dependence and synapsis is corroborated by the chronology of these mechanisms during prophase I. This is indicated by our immunocytochemical experiments (Figs 2, 3 and 4), which demonstrated that the synapsis starts in the zygotene stage, after the appearance of DSBs, which occurs during the leptotene stage, following the general model of eukaryotes (Zickler, 2006). Accordingly, the maintenance of DSB formation and repair mechanisms may be essential for the synaptic process in this species.

Regulation of transcription in heterochromatin during prophase I in *T. silvestris*

Recent studies in mice and yeast have provided evidence for the enrichment of both H3K4m3 and H3K9ac epigenetic marks, typical of transcriptionally active chromatin, at DSBs sites (Lichten and De Massy, 2011; Yamada et al., 2013). In this case, it is thought that these histone modifications serve to decompact the chromatin, making it accessible to Spo11 and other components of the recombination machinery, or to recruit chromatin remodelers (Borde et al., 2009; Getun et al., 2017). In the present study, we found that H3K4m3 and H3K9ac marks were equally distributed throughout the initial phases of prophase I in *T. silvestris* (Figs 6 and 7), a pattern that exhibits no relationship between them and the formation of DSBs. In *Saccharomyces cerevisiae*, the absence of H3K4m3 modifications does not prevent formation of DSBs (Borde et al., 2009). The observed patterns of the distribution of H3K4m3 and H3K9ac marks in *T. silvestris* (Figs 6 and 7) may represent the axial axis loops of chromosomes that are actively engaged in the process of transcription (Prakash et al., 2015), a suggestion that aligns well with results of recent studies on transcriptional

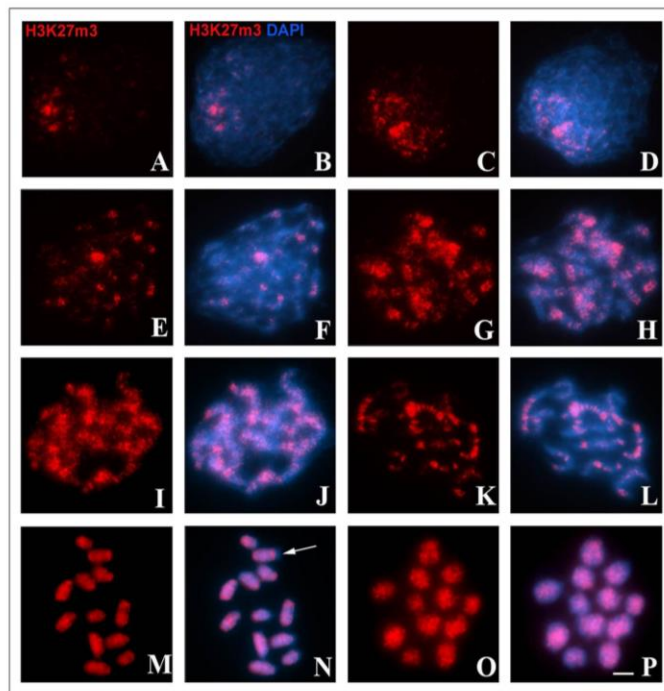


Fig. 5. Dynamics of chromatin rich in H3K27m3 (red) in prophase I of *T. silvestris*. Chromatin was counterstained with DAPI (blue). (A,B) A cell in the leptotene stage, with few H3K27m3. (C,D) A cell in the early zygotene stage with increase of H3K27m3 in the bouquet formation. (E,F) A cell in the late zygotene stage with decoupling of the bouquet configuration. (G,H) A cell in the early pachytene stage; note the propagation of H3K27m3 along the synapsed axes. (I,J) A cell in intermediate the pachytene stage. (K,L) A cell in the late pachytene stage, with H3K27m3 band-like markings. (M,N) A cell in early metaphase I; the arrow indicates the heterochromatic block with absence of final H3K27m3. (O,P) A cell in metaphase I. Scale bar: 10 μ m.

activity during Arthropoda meiosis. In *Drosophila*, for example, transcription is maintained constant throughout meiosis I (Hennig and Weyrich, 2013). In Hemiptera, Viera et al. (2017) reported that transcription is reactivated during the zygotene stage and proceeds until the end of prophase I in autosomes.

In *T. silvestris*, H3K27m3 modifications are reported to be absent in the heterochromatin region located in pair 1 during metaphase I (Fig. 5). This result can be explained by the presence of other histone marks in the positive C-block of this species. In eukaryotes, several studies have shown that the formation of constitutive heterochromatin

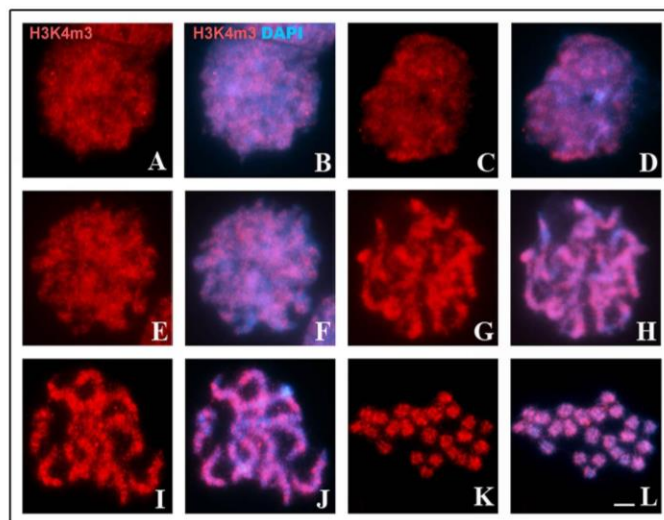


Fig. 6. Distribution of H3K4m3 (red)-rich chromatin during meiosis I of *T. silvestris*. Chromatin was counterstained with DAPI (blue). (A,B) A cell in the leptotene stage, with the nucleus uniformly labeled with H3K4m3. (C,D) A cell in the early zygotene stage. (E,F) A cell in the late zygotene stage. (G,H) A cell in the early pachytene stage, note the presence of some terminal and interstitial regions without H3K4m3 markings. (I,J) A cell in the late pachytene stage. (K,L) A cell in metaphase II. Scale bar: 10 μ m.

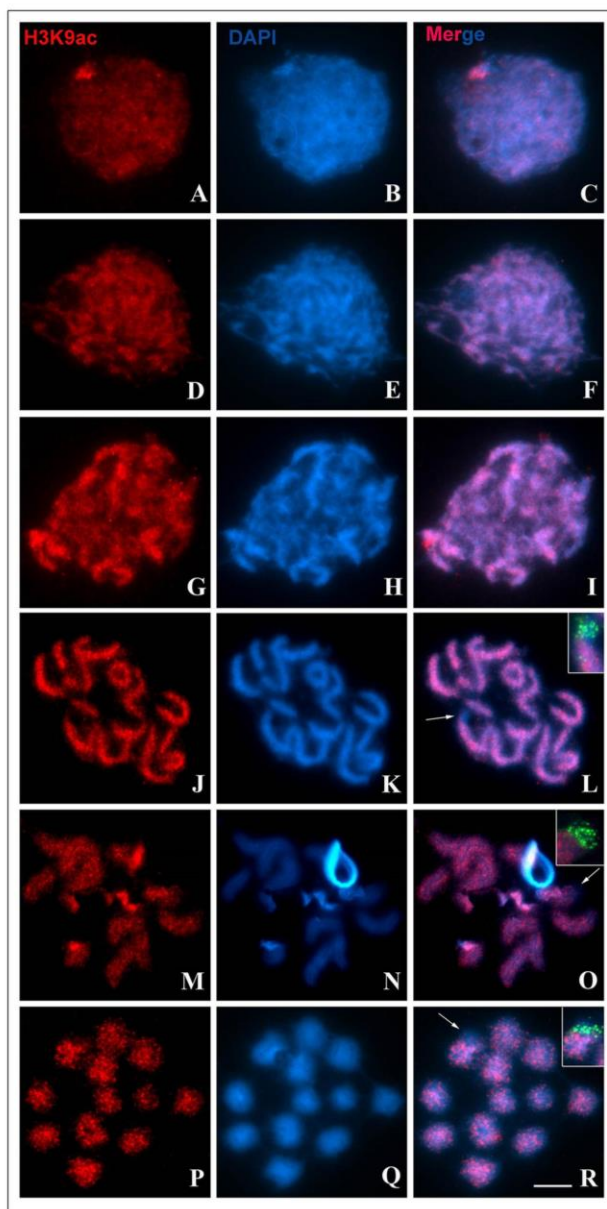


Fig. 7. Distribution of H3K9ac (red)-rich chromatin during meiosis I of *T. silvestris*. Chromatin was counterstained with DAPI (blue). (A–C) A cell in interphase with heterochromatin rich in H3K9ac. (D–F) A cell in the leptotene stage. (G–I) A cell in the zygotene stage. (J–L) A cell in the intermediary pachytene stage. (M–O) A cell in the post-pachytene stage. (P–R) A cell in metaphase I; arrows (L,O,R) show heterochromatic region with absence of H3K9ac; insets (L,O,R) demonstrate 45S rDNA (green) co-localized with this heterochromatin. Scale bar: 10 μ m.

(pericentromeric or terminal) is related to the tri-methylation of histone H3 in lysine 9 (H3K9m3) (Nishibuchi and Déjardin, 2017). This epigenetic modification is recognized by the protein HP1 (Heterochromatin Protein 1), which performs the process of heterochromatinization (Saksouk et al., 2015). Meiotic analyses in

grasshoppers (Viera et al., 2009), crustaceans (Gómez et al., 2016) and Hemiptera (Viera et al., 2009) have revealed an H3K9m3 distribution pattern in which this modification is co-localized with constitutive heterochromatin. Thus, we believe that the C-positive heterochromatin in *T. silvestris* is enriched for H3K9m3.

In our study, we observed that H3K9ac was absent in the constitutive heterochromatin of pair I in *T. silvestris* after the pachytene stage (Fig. 7). These results suggest that this epigenetic mark participates in the regulation of 45S rDNA and is active during leptotene and zygotene stages, before being silenced later in the pachytene stage. These data are in agreement with literature reports on the transcriptional activity of this sequence during prophase I (see Hernandez-Verdun, 2011) and demonstrate that H3K9ac is a good marker for 45S rDNA expression studies in Arthropoda.

Our study demonstrated that the synapsis in *T. silvestris* begins at chromosomal ends and its progression is directly related to the trimethylation of histone H3 lysine 27. In *T. silvestris*, DSB formation and repair are not related to sites rich in H3K4m3 or H3K9ac, and their simultaneous occurrence with achiasmatic meiosis demonstrates that programmed DNA breaks are not processed through homologous recombination, but may be important for the synaptic mechanism of this species. The presence of the epigenetic marks, H3K4m3 and H3K9ac, demonstrates constitutive gene activity throughout prophase I; in turn, the absence of H3K9ac in constitutive heterochromatin carrying the 45S rDNA from the pachytene stage indicates silencing of this gene in this phase of meiosis I.

MATERIALS AND METHODS

Six individuals (four male and two female) of *T. silvestris*, collected in the municipality of Belém, Pará, Brazil (1°24'16.29"S/48°27'12.29"W), were used as samples in this study. For karyotype analysis, testes and ovaries were processed according to the protocol described by Schneider et al. (2009a,b). Chromosomal preparations were stained with 5% Giemsa. C-banding was performed according to Sumner (1972).

Meiotic preparations for obtaining SC were generated according to the method of Viera et al. (2009), with some modifications. Testes were removed and held in Hanks's solution for 10 min, and then hypotonized in 0.075 M KCl for 30 min. Thereafter, gonads were transferred to a 100-mM sucrose solution (pH 8.5), in which they were disrupted with the aid of needles. Approximately 40 µl of the generated cell suspension was spread on slides, precoated with 2% paraformaldehyde (pH 8.5) containing 0.15% Triton-X. The slides were dried in a humid chamber at room temperature for 2 h, then washed in 0.08% Photo-Flo (Kodak), and stored at -80°C.

For immunodetection of meiotic proteins, slides were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS), followed by blocking with a 5% bovine serum albumin solution at room temperature for 30 min. Primary antibodies used and their respective dilutions in PBS were as follows: rabbit anti-SMC3 (Abcam, ab9263) at 1:200; rabbit anti-γH2AX (Abcam, ab2893) at 1:50; rabbit anti-Rad51 (Santa Cruz Biotechnology, H92 sc-8349) at 1:50; rabbit anti-H3K27m3 (Cell Signaling, 9733S) at 1:50; rabbit anti-H3K27ac (Millipore, 07-360) at 1:50; rabbit anti-H3K4m3 (Millipore, 07-473) at 1:50; and rabbit anti-H3K9ac (Millipore, 07-352) at 1:50. Slides were incubated with antibodies for 2 h at 37°C in a humidified chamber. After washing in PBS, slides were incubated for 2 h at 37°C with the appropriate secondary antibodies, diluted in 1:100 PBS-Tween. Chromatin was counterstained by incubating with Vectashield Antifade Mounting Medium containing DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

FISH technique and the production of telomeric and 45S rDNA probes were performed according to Almeida et al. (2017), with few modifications. Slides used for immunodetection were washed three times in 4×SSC-Tween, and then dehydrated using an ethanol series (70%, 90% and 100%). The probes and chromosomal DNA were denatured at 100°C and 70°C, respectively. Hybridization was performed by incubating overnight at 37°C. Probe was detected by incubating with a fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-digoxigenin antibody at 37°C for 1 h. Chromatin was counterstained by incubating with Vectashield Antifade Mounting Medium containing DAPI.

Ethical approval

All applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. J.C.P. has a permanent field permit,

number 13248, from Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. The Cytogenetics Laboratory from Federal University of Pará has permit number 19/2003 from the Ministry of Environment for sample transport and permit 52/2003 for using the samples for research. The Ethics Committee (Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Pará) approved this research (Permit 68/2015).

Acknowledgements

The authors are especially grateful to PhD. MSc. Roberta B. Sciarano and MSc. Irene M. Rahn (Universidad de Buenos Aires, Argentina) for training in meiotic techniques and donation of the anti-Rad51 and anti-γH2AX antibodies used for immunofluorescence assays of the present article. We are also grateful to the research group of the PhD. Cesar Martins (State University of São Paulo) for having generously assigned the antibodies of epigenetic modifications used in this study. Thanks also to the MSc. Jorge Rissino, MSc. Shirley Nascimento and Maria da Conceição for assistance in laboratory work. The collection of the specimens was authorized by the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO), the Chico Mendes Conservation Institute (ICMbio) and the State Secretariat of Environment of the State of Pará (SEMA-PA).

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: B.R.R.d.A., J.C.P.; Methodology: B.R.R.d.A., R.C.R.N., C.Y.N.; Validation: J.C.P.; Formal analysis: B.R.R.d.A., R.C.R.N., M.J.R.d.C., C.Y.N.; Investigation: B.R.R.d.A., R.C.R.N., M.J.R.d.C., C.Y.N.; Resources: C.Y.N., J.C.P.; Data curation: B.R.R.d.A., R.C.R.N.; Writing - original draft: B.R.R.d.A.; Writing - review & editing: R.C.R.N., M.J.R.d.C., C.Y.N., J.C.P.; Visualization: M.J.R.d.C., C.Y.N.; Supervision: J.C.P.; Project administration: J.C.P.; Funding acquisition: J.C.P.

Funding

This research was funded by the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) to C.Y.N. (047/2012) and National Bank for Economic and Social Development to J.C.P. (2.318.697.0001). This study is part of the doctoral thesis of B.R.R.d.A., who has a National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Scholarship in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Pará (UFPA). C.Y.N. (305880/2017-9) and J.C.P. (305876/2017-1) are grateful to CNPq for productivity grants.

References

- Adilardi, R. S., Ojanguren-Afflastro, A. A., Mattoni, C. I. and Mola, L. M. (2015). Male and female meiosis in the mountain scorpion *Zabius fuscus* (Scorpiones, Buthidae): heterochromatin, rDNA and TTAGG telomeric repeats. *Genetica* **143**, 393-401. doi:10.1007/s10709-015-9838-1
- Adilardi, R. S., Ojanguren-Afflastro, A. A. and Mola, L. M. (2016). Sex-Linked chromosome heterozygosity in males of *Tityus confluens* (Buthidae): A clue about the presence of sex chromosomes in scorpions. *PLoS One* **11**, e0164427. doi:10.1371/journal.pone.0164427
- Almeida, B. R. R., Milhomem-Paixão, S. S. R., Noronha, R. C. R., Nagamachi, C. Y., Costa, M. J. R. D., Pardal, P. O., Coelho, J. S. and Pieczarka, J. C. (2017). Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). *BMC Genet.* **18**, 35. doi:10.1186/s12863-017-0494-6
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381-395. doi:10.1038/cr.2011.22
- Bogdanov, Y. F. (2003). Variation and evolution of meiosis. *Genetica* **39**, 453-473.
- Borde, V., Robine, N., Lin, W., Bonfils, S., Géli, V. and Nicolas, A. (2009). Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J.* **28**, 99-111. doi:10.1038/emboj.2008.257
- Cabral, G., Marques, A., Schubert, V., Pedrosa-Harand, A. and Schlöglhofer, P. (2014). Chiasmatic and achiasmatic inverted meiosis of plants with holocentric chromosomes. *Nat. Commun.* **5**, 1-11. doi:10.1038/ncomms6070
- Cabrero, J., Teruel, M., Carmona, F. D. and Camacho, J. P. M. (2007). Histone H2AX phosphorylation is associated with most meiotic events in grasshopper. *Cytogenet Genome Res.* **116**, 311-315. doi:10.1159/000100416
- Calvente, A., Viera, A., Parra, M. T., De La Fuente, R., Suja, J. A., Page, J., Santos, J. L., De La Veja, C. G., BARBERO, J. L. and Rufas, J. S. (2013). Dynamics of cohesin subunits in grasshopper meiotic divisions. *Chromosoma* **122**, 77-91. doi:10.1007/s00412-012-0393-6
- Cunha, A. B. and Pavan, C. (1954). Duas novas configurações cromossômicas em *Tityus bahiensis* (Scorpiones-Buthidae). *Ciência e Cultura*. **6**, 18-20.
- Getun, I. V., Wu, Z., Fallahi, M., Quizem, S., Liu, Q., Li, W., Costi, R., Roush, W. R., Cleveland, J. L. and Bois, P. R. J. (2017). Functional roles of acetylated

- histone marks at mouse meiotic recombination hot spots. *Mol. Cell. Biol.* **37**, 1-24. doi:10.1128/MCB.00942-15
- Gómez, R., Van Damme, K., Gosálvez, J., Morán, E. S. and Colbourne, J. K. (2016). Male meiosis in Crustacea: synapsis, recombination, epigenetics and fertility in *Daphnia magna*. *Chromosoma* **125**, 769-787. doi:10.1007/s00412-015-0558-1
- Gray, S. and Cohen, P. E. (2016). Control of meiotic crossovers: from double-strand break formation to designation. *Annu. Rev. Genet.* **23**, 175-210. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035111
- Hayashi, K., Yoshida, K. and Matsui, Y. (2005). A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* **438**, 374-378. doi:10.1038/nature04112
- Heckmann, S., Macas, J., Kumke, K., Fuchs, J., Schubert, V., Ma, L., Novák, P., Neumann, P., Taudien, S., Platzer, M. et al. (2013). The holocentric species *Luzula elegans* shows interplay between centromere and large-scale genome organization. *Plant J.* **73**, 555-565. doi:10.1111/tpj.12054
- Hennig, W. and Weyrich, A. (2013). Histone modifications in the male germ line of *Drosophila*. *BMC Dev. Biol.* **13**, 1-14. doi:10.1186/1471-213X-13-7
- Hernández-Hernández, A., Rincón-Arango, H., Recillas-Targa, F., Ortiz, R., Valdes-Quezada, C., Echeverría, O. M., Benavente, R. and Vázquez-Nin, G. H. (2008). Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. *Chromosoma* **117**, 77-87. doi:10.1007/s00412-007-0128-2
- Hernández-Hernández, A., Ortiz, R., Ubaldo, E., Martínez, O. M., Vázquez-Nin, G. H. and Recillas-Targa, F. (2010). Synaptonemal complex stability depends on repressive histone marks of the lateral element-associated repeat sequences. *Chromosoma* **119**, 41-58. doi:10.1007/s00412-009-0243-3
- Hernandez-Verdun, D. (2011). Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus* **2**, 189-194. doi:10.4161/nucl.2.3.16246
- Holm, P. B. and Rasmussen, S. W. (1980). Chromosome pairing, recombination nodules and chiasma formation in diploid *Bombyx* males. *Carlsberg Res. Commun.* **45**, 483-548. doi:10.1007/BF02932921
- Kovářík, F., Teruel, R., Cozijn, M. A. C. and Seiter, M. (2013). *Tityus carolinense* sp. n. from Suriname and Guyana (Scorpiones: Buthidae). *Euscorpius* **178**, 1-9.
- Lichten, M. and De Massy, B. (2011). The impressionistic landscape of meiotic recombination. *Cell* **147**, 267-270. doi:10.1016/j.cell.2011.09.038
- Loidl, J. (2016). Conservation and variability of meiosis across the eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **23**, 293-316. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035100
- Laurenço, W. R. (2002). *Scorpions of Brazil*. Paris: Les Editions de l'IF. 320p.
- Laurenço, W. R. (2015). What do we know about some of the most conspicuous scorpion species of the genus *Tityus*? A historical approach. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **21**, 1-20. doi:10.1186/s40409-015-0016-9
- Marec, F. (1996). Synaptonemal complexes in insects. *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* **25**, 205-233. doi:10.1016/0020-7322(96)00009-8
- Mattos, V. F., Cella, D. M., Carvalho, L. S., Candido, D. M. and Schneider, M. C. (2013). High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. *Chromosome Res.* **21**, 121-136. doi:10.1007/s10577-013-9342-3
- McKee, B. D., Yan, R. and Tsai, J. H. (2012). Meiosis in male *Drosophila*. *Spermatogenesis* **2**, 167-184. doi:10.4161/spmg.21800
- Moens, P. B., Marcon, E., Shore, J. S., Kochakpour, N. and Spyropoulos, B. (2007). Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J. Cell Sci.* **120**, 1017-1027. doi:10.1242/jcs.03394
- Naumova, A. K., Fayer, S., Leung, J., Boateng, K. A., Camerini-Otero, R. D. and Taketo, T. (2013). Dynamics of response to asynapsis and meiotic silencing in spermatocytes from Robertsonian translocation carriers. *PLoS One* **8**, e75970. doi:10.1371/journal.pone.0075970
- Nishibuchi, G. and Déjardin, J. (2017). The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals. *Chromosome Res.* **25**, 77-87. doi:10.1007/s10577-016-9547-3
- Ojanguren-Affilastro, A. A., Adilardi, R. S., Cajade, R., Ramirez, M. J., Ceccarelli, F. S. and Mola, L. M. (2017). Multiple approaches to understanding the taxonomic status of an enigmatic new scorpion species of the genus *Tityus* (Buthidae) from the biogeographic island of Paraje Tres Cerros (Argentina). *PLoS ONE* **12**, e0181337. doi:10.1371/journal.pone.0181337
- Piza, S. T. (1950a). Variações cromossômicas do *Tityus bahiensis* de Ribeirão Preto. *Ciência e Cultura* **2**, 57-59.
- Piza, S. T. (1950b). Observações cromossômicas em escorpiões brasileiros. *Ciência e Cultura* **2**, 202-206.
- Prakash, K., Fournier, D., Redl, S., Best, G., Borsos, M., Tiwari, V. K., Tachibana-Konwalski, K., Ketting, R. F., Parekh, S. H., Cremer, C. et al. (2015). Superresolution imaging reveals structurally distinct periodic patterns of chromatin along pachytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 14635-14640. doi:10.1073/pnas.1516928112
- Rahn, M. I., Noronha, R. C., Nagamachi, C. Y., Pieczarka, J. C., Solari, A. J. and Sciarano, R. B. (2016). Protein markers of synaptic behavior and chromatin remodeling of the neo-XY body in phyllostomid bats. *Chromosoma* **125**, 701-708. doi:10.1007/s00412-015-0566-1
- Rog, O. and Dernburg, A. F. (2013). Chromosome pairing and synapsis during *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 349-356. doi:10.1016/j.cob.2013.03.003
- Saksouk, N., Simboeck, E. and Déjardin, J. (2015). Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* **8**, 1-17. doi:10.1186/1756-8935-8-3
- Schneider, M. C., Zacaro, A. A., Pinto-Da-Rocha, R., Candido, D. M. and Cella, D. M. (2009a). A comparative cytogenetic analysis of 2 Bothriuridae species and overview of the chromosome data of Scorpiones. *J. Hered.* **100**, 545-555. doi:10.1093/jhered/esp023
- Schneider, M. C., Zacaro, A. A., Pinto-Da-Rocha, R., Candido, D. M. and Cella, D. M. (2009b). Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. *Chromosome Res.* **17**, 883-898. doi:10.1007/s10577-009-9076-4
- Schneider, M. C., Mattos, V. F., Carvalho, L. S. and Cella, D. M. (2015). Organization and behavior of the synaptonemal complex during achiatic meiosis of four buthid scorpions. *Cytogenet. Genome Res.* **144**, 341-347. doi:10.1159/000375388
- Shanahan, C. M. and Hayman, D. L. (1990). Synaptonemal complex formation in male scorpions exhibiting achiatic meiosis and structural heterozygosity. *Genome* **33**, 914-926. doi:10.1139/g90-138
- Spangenberg, V. E., Dadashev, S. I. A., Matveevski, S. N., Kolomiets, O. L. and Bogdanov, Y. F. (2010). How do chromosomes attach to synaptonemal complexes? *Genetika* **46**, 1363-1366. doi:10.1134/s1022795410100157
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell Res.* **75**, 304-306. doi:10.1016/0014-4827(72)90558-7
- Venkatesh, S. and Workman, J. L. (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 178-189. doi:10.1038/nrm3941
- Viera, A., Santos, J. L., Parra, M. T., Calvente, A., Gómez, R., De La Fuente, R., Suja, J. A., Page, J. and And Rufas, J. S. (2009). Cohesin axis maturation and presence of RAD51 during first meiotic prophase in a true bug. *Chromosoma* **118**, 575-589. doi:10.1007/s00412-009-0218-4
- Viera, A., Parra, M. T., Rufas, J. S. and Page, J. (2017). Transcription reactivation during the first meiotic prophase in bugs is not dependent on synapsis. *Chromosoma* **126**, 179-194. doi:10.1007/s00412-016-0577-6
- Yamada, S., Ohta, K. and Yamada, T. (2013). Acetylated Histone H3K9 is associated with meiotic recombination hotspots, and plays a role in recombination redundantly with other factors including the H3K4 methylase Set1 in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3504-3517. doi:10.1093/nar/gkt049
- Zickler, D. (2006). From early homologue recognition to synaptonemal complex formation. *Chromosoma* **115**, 158-174. doi:10.1007/s00412-006-0048-6

CAPÍTULO 5: Meiose aquiasmática em *Tityus* (Scorpiones, Buthidae): comportamento meiótico de multivalentes e expressão de genes de reparo *mismatch*

Bruno Rafael Ribeiro de Almeida¹; Renata Coelho Rodrigues Noronha¹; Jonas Gama Martins²; Rudi Emerson de Lima Procópio²; Marlyson Jeremias Rodrigues da Costa¹; Luiz Reginaldo Ribeiro Rodrigues³; Cesar Martins⁴; Adauto Cardoso⁴; Cleusa Yoshiko Nagamachi¹; Julio Cesar Pieczarka¹

¹Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Avenida Augusto Corrêa, nº01, 66075-900, Belém, Pará, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas, Brasil.

³ Laboratório de Genética e Biodiversidade, ICED, Universidade Federal do Oeste do Pará, Belém, Brasil

⁴Integrative Genomics Laboratory, Department of Morphology, Institute of Biosciences, São Paulo State University – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil

***Corresponding author:** Julio Cesar Pieczarka

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Campus do Guamá

Av. Perimetral, s/n. Guamá

66075-900 Belém – Pará, Brazil

E-mail: juliopieczarka@gmail.com

RESUMO

Escorpiões *Tityus* (Buthidae) apresentam cromossomos holocêntricos e meiose aquiasmática em indivíduos machos. Grande parte das espécies deste gênero apresenta multivalentes meióticos, originados a partir de translocações recíprocas. No presente estudo, realizamos imunolocalização de proteínas meióticas em *Tityus maranhensis* e *Tityus silvestris*, a fim de verificar quais os papéis funcionais destas enzimas na manutenção deste sistema genético. Os cariótipos apresentaram os seguintes números diploides: *T. maranhensis* $2n = 20$; *T. silvestris* $2n = 24$ (citótipo A) ou $2n = 16$ (citótipo B). Associações quadrivalentes foram registradas em *T. maranhensis* e no citótipo B de *T. silvestris*. Em ambos os casos, o quadrivalente apresenta atraso no processo sináptico durante o paquíteno em relação aos bivalentes. Em *T. maranhensis*, a variante histônica γ H2AX foi registrada apenas nas extremidades cromossômicas nas etapas iniciais da prófase I; nesta espécie, em metáfase I, bivalentes e quadrivalentes exibem ligação à microtúbulos ao longo de toda sua extensão, enquanto, em metáfase II, fibras do fuso interagem apenas com regiões teloméricas. Em *T. silvestris* (citótipo A) observamos que genes envolvidos no processo de recombinação são expressos em ovários, testículos e embriões. A quinase ATR em *T. silvestris* (citótipo B) foi registrada durante zigóteno (com maior concentração em regiões de iniciação da sinapse) e paquíteno. Nossos resultados indicam ocorrência de diversidade críptica em *T. silvestris*; a atividade dos genes de reparo *mismatch* em meiose aquiasmática de *Tityus* são discutidos no presente artigo. Em conjunto, os resultados sugerem que ajuste sináptico, ausência de inativação meiótica por γ H2AX e comportamento holo/telocinético são fatores importantes para manutenção de multivalentes e prosseguimento normal do ciclo meiótico *Tityus*.

Palavras-chave: Scorpiones, meiose aquiasmática, recombinação, comportamento telocinético.

1. INTRODUÇÃO

O centrômero é a região do genoma no qual está inserido o cinetócoro, a estrutura proteica que permite a união dos microtúbulos do fuso mitótico aos cromossomos, possibilitando sua segregação durante a divisão celular (Bloom and Costanzo, 2017). Em diversas linhagens de artrópodes, nematódeos, plantas e protistas, são observados cromossomos holocêntricos, nos quais o centrômero é descentralizado e ocupa grande

parte de sua extensão (Melters *et al.* 2012). Na mitose, esta forma cromossômica é identificada pela ausência de constrição primária (Mola e Papeschi, 2006). Outra característica atribuída a cromossomos holocêntricos mitóticos é o comportamento holocinético das cromátides-irmãs, que migram em disposição paralela umas às outras aos polos celulares durante anáfase (Melters *et al.*, 2012). A união de microtúbulos ao longo dos cromossomos também auxilia na conservação de fragmentos gerados por fissão, que desta forma são transmitidos às células-filhas, gerando extensa variabilidade no cariótipo das espécies (Zedek and Bureš, 2017).

Em grande parte das espécies portadoras de sistemas holocêntricos, foram observadas modificações na estrutura ou na fisiologia dos cromossomos durante a meiose I. Essas alterações são adaptações necessárias para a correta segregação anafásica de bivalentes cruciformes, que apresentam quiasmas intersticiais (Marques e Pedrosa-Harand, 2016). Assim, em diversas plantas e artrópodes tem sido registrada ocorrência de meiose invertida, em que cromátides irmãs segregam durante meiose I, e cromátides homólogas separam-se na meiose II (Heckmann *et al.*, 2014). Em *C. elegans*, há redistribuição das proteínas CENH3 (Wignall e Villeneuve, 2009). Outra adaptação é a restrição da atividade cinética, observada em insetos, nos quais apenas as extremidades cromossômicas unem-se aos microtúbulos do fuso (Pérez *et al.*, 2000).

Escorpiões *Tityus* (Buthidae) apresentam cromossomos holocêntricos e extensa reorganização cariotípica gerada, principalmente, por translocações recíprocas e fusões/fissões (Schneider *et al.*, 2009; Mattos *et al.*, 2018; Adilardi *et al.*, 2020). A alta frequência destes rearranjos em estado heterozigoto nas populações naturais de *Tityus*, promove formação de associações multivalentes durante a meiose I (Almeida *et al.*, 2017; Adilardi *et al.*, 2020). Assim, comumente se observa a presença de trivalentes, quadrivalentes, e outras formas de pareamento complexas em diversas espécies (Mattos *et al.*, 2013; Adilardi *et al.*, 2016). Essas cadeias podem estar relacionadas à determinação cromossômica do sexo, como registrado em *Tityus confluens* (Adilardi *et al.*, 2016), ou serem altamente polimórficas entre populações (Adilardi *et al.*, 2020), entre espécimes de uma mesma localidade (Almeida *et al.*, 2017), ou entre células de um mesmo indivíduo (Mattos *et al.*, 2013; 2018).

Meiose aquiasmática em machos de *Tityus* simultânea à persistência do complexo sinaptonêmico em fases tardias da prófase I, foi relatada para todas as espécies deste gênero (Schneider *et al.*, 2015). A ausência de quiasmas em *Tityus*, como em outros escorpiões, é considerada uma adaptação a elevada taxa de rearranjos, permitindo a

segregação correta dos homólogos (Schneider *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2019). Em *Tityus silvestris* reparo de DSBs através de Rad51 ocorre durante o zigóteno e paquíteno, indicando que eventos iniciais do processo de recombinação são mantidos (Almeida *et al.*, 2019). Apesar disso, até o presente momento, nenhum estudo avaliou a atividade das enzimas de reparo *mismatch* (MLH1, MLH3, MSH4, MSH5 e Mus81) em Scorpiones, que são recrutadas para estabilizar e resolver a *junção Holliday*, criada a partir da ação de Rad51 e Dmc1, originando cromossomos recombinantes (Moens *et al.*, 2007).

No presente estudo, investigamos a expressão de proteínas meióticas por imunocitogenética ou RT-PCR, com objetivo de investigar o papel destas enzimas na manutenção e regulação da sinapse, recombinação e segregação durante a meiose I em duas espécies de *Tityus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostra

A amostra do presente estudo foi composta de: 3 espécimes de *T. maranhensis* (1 macho de Marapanin; 1 macho e 1 fêmea de Curuçá, Estado do Pará, Brasil) e 54 espécimes de *T. silvestris* (8 machos de Rurópolis, Pará, Brasil; 4 machos, 6 fêmeas e 20 embriões de Santarém, Pará, Brasil; 1 macho, 1 fêmea, e 14 embriões de Manaus, Amazonas, Brasil). A identificação taxonômica foi realizada segundo Lourenço (2002). Os espécimes foram depositados na coleção do Laboratório de Entomologia Médica e Artrópodes Peçonhentos (LEMAP/UFPA).

2.2. Análise cariotípica

Gônadas e embriões foram hipotonizadas em KCl 0,075M, e posteriormente fixados em solução de metanol:ácido acético (3:1). Suspensão celular gerada a partir da digestão de gônadas e embriões em ácido acético 60% foi espalhada em lâminas, a 45°C. Cromossomos foram corados com Giemsa 5%. Medidas cromossômicas foram realizadas através do software DRAWID (Kirov *et al.*, 2017).

2.3. Sondas

A sonda 45S rDNA foi produzida a partir do plasmídeo pTa71, que contém a sequência completa deste rDNA de *Triticum aestivum* (Gerlach e Bedrok, 1945). Por sua vez, sonda de sequências teloméricas de artrópodes foi obtida por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores descritos por Sahara *et al.* (1999). As reações de

PCR foram constituídas de: 16,25 µL de água estéril, 2,5 µL de tampão da Taq Polimerase 10x, 2 µL de DNTP mix (2mM), 1 µL de DNA genômico(100ng), 1 µL de MgCl₂ (50mM), 1 µL de primer forward (10mM), 1 µL de primer reverse (10mM), 0,25 µL de Taq Polimerase 1U. As configurações termais das PCR foram: 1 ciclo de 94°C (5 minutos); 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 53 a 55°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto); 1 ciclo de 72°C (10 minutos); 1 ciclo 4°C (hold). Todas as sondas foram marcadas por *nick translation* utilizando digoxigenina-14-dUTP (Roche, Mannheim, Germany).

2.4.Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

FISH foi realizada de acordo com Cabral-de-Mello *et al.* (2021). Anteriormente, cromossomos foram tratados com solução de Pepsina 1%, fixados em Paraformaldeído 4% e desidratados em bateria de álcool (70%, 90% e 100%). A desnaturação do DNA cromossômico e de sondas ocorreu a 70°C e 100°C, respectivamente. Lâminas foram mantidas a 37°C, *overnight*, para a hibridização. Posteriormente as lâminas foram lavadas com 2xSSC e 4xSSC-Tween para remoção de hibridizações inespecíficas. Sondas foram detectadas com Anti-digoxigenina-FITC. Cromossomos foram contracorados com 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) em solução de antifading Vectashield (Vector).

2.5.Imunodeteção de proteínas meióticas e Imuno-FISH

A obtenção de complexos sinaptonêmicos foi realizada de acordo com Almeida *et al.* (2019). Gônadas foram hipotonizadas com KCl 0,075M e maceradas em 200 µL de Sacarose 100 mM com auxílio de agulhas, até formarem uma suspensão de células, a qual foi espalhada sobre lâminas previamente revestidas com paraformaldeído 2% (pH 8,2). Lâminas foram incubadas por 2 horas em câmara úmida, posteriormente lavadas em Photo-Flo (pH 8.2) e armazenadas à -80°C.

Os anticorpos primários utilizados e suas respectivas diluições em PBS foram: coelho anti-SMC3 (Abcam, ab9263) em 1:200; camundongo anti- α -tubulina (Santa Cruz, sc-23948) em 1:50; camundongo anti-ATR (Santa Cruz, SC-515173) em 1:50; Coelho anti- γ H2AX (Abcam, ab2893) em 1:50. Para imunodeteção de proteínas meióticas, o bloqueio com BSA 5% (contendo Triton-20 0,01%, e PBS1x) foi realizado por 30 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas com anticorpos primários por 2h (37°C). Após lavagem em PBS1X, elas foram incubadas com anticorpos secundários apropriados, diluídos em 1:100, a 37°C, durante 2 horas. Finalmente, cromossomos foram

contracolorados com DAPI, contido em antifading Vectashield. Para imuno-FISH com sonda telomérica seguimos o protocolo descrito por Araya-Jaime *et al.* (2015).

2.6.RT-PCR

Análise RT-PCR foi realizada para investigar a expressão de enzimas MLH1, MLH3, MSH5 e MUS81. RNA total foi isolado de embriões (n=4), testículos (n = 4) e ovários (n=4) utilizando o reagente Trizol, segundo normas do fabricante. Após quantificação e análise da qualidade das amostras de RNA, elas foram tratadas com DNase I. Transcrição reversa foi realizada através do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription da Applied Biosystems. PCR quantitativa foi realizada através do kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega), utilizando os seguintes conjuntos de primers: F:5'-GATAGCGAGGAGAGTGGATGG-3' e R: 5'-CCGCCTTTGT CTGTAGGAAATC-3' para MLH1; F:5'-CCTCTGCCTTCCGAAGTTGTT-3' e R: 5'-CGCAAACATTCGTAGCAAAAGC-3' para MLH3; F:5'-GCGGGACCT AACGAACATTC-3' e R: 5'-GATGTCA ACGGGCAACTCG-3' para MSH5; e F:5'-CGTACCTGGATCGGGAAGC-3' e F:5'-GGTATAGTGACAAATTGGGATG-3' para MUS81. As reações foram compostas de: 7,5 µL de Mix SYBR Green, 0,6 µL de *primers forward* e *reverse* (400 nM), 5,8 µL de água estéril e 0,5 µL de cDNA. As condições termais foram: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Primers do gene β -Actina desenhados por Guo *et al.* (2018) foram utilizados com endógeno, para normalizar a expressão relativa dos demais. A mensuração dos níveis de expressão foi realizada no sistema Step One Plus (Life). Os dados foram normalizados usando-se o programa Q-Gene (SIMON, 2003).

3. RESULTADOS

3.1.Cariótipo e formação do complexo sinaptonêmico em *T. maranhensis*

Os cromossomos de *T. maranhensis* não apresentaram constrição primária, evidenciando morfologia holocêntrica (Figura 1). O cariótipo dessa espécie mostrou número diploide $2n = 20$ (Figura 1a). Durante metáfase I, os dois machos de *T. maranhensis* apresentaram 1 quadrialente e 8 bivalentes (Figura 1a), enquanto em metáfase II, apenas 8 cromossomos foram observados (Figura 1b). Sequências teloméricas foram observadas apenas nas extremidades cromossômicas (Figura 1a, b).

Análise meiótica em *T. maranhensis*, revelou que na transição leptóteno/zigóteno a região terminal de eixos SMC3 (evidenciada pelos telômeros) são polarizadas no núcleo celular (Figura 2a). Em zigóteno tardio observa-se avanço da sinapse ao longo dos cromossomos (Figura 2b). Em paquítenos iniciais, observa-se que bivalentes completam a sinapse, enquanto os componentes do quadrivalente ainda apresentam longas regiões assinápticas (Figura 2c, d). Essa condição assináptica é observada até o final de estágios pós-paquítenos (Figura 2e-g). Durante metáfase I, o complexo sinaptonêmico permanece preservado ao longo dos bivalentes e do quadrivalente (Figura 2h); na região central do quadrivalente há ausência de sinapse (Figura 2h). No início da anáfase I, o complexo sinaptonêmico foi registrado em todos os pares (Figura 2i). Nesta fase, também foi registrada dissociação precoce do quadrivalente em relação aos bivalentes, e disposição *zig-zag* dos cromossomos envolvidos nesta associação (Figura 2i).

3.2. Distribuição de γ H2AX ao longo da prófase I de *T. maranhensis*

Célula em leptóteno evidenciaram conspícuos sinais γ H2AX ao longo do núcleo (Figura 3a-c). Durante a transição leptóteno/zigóteno, marcações γ H2AX foram observadas organizadas próximo a periferia do núcleo celular (Figura 3d-f). Ao final do zigóteno, sinais γ H2AX foram evidenciados sobre cromatina mais densamente coradas com DAPI, indicando regiões de pareamento/sinapse (Figura 3g-i). Células em fases iniciais do paquíteno, mostraram marcações γ H2AX localizadas em diferentes regiões terminais e intersticiais dos cromossomos (Figura 3j-l). Em paquítenos tardios e estágios pós-paquítenos não foram observados sinais γ H2AX (Figura 3m-o).

3.3. União de microtúbulos ao longo dos cromossomos de *T. maranhensis*

A dinâmica de ligação de microtúbulos ao cinetócoro, foi avaliada em bivalentes e quadrivalentes de *T. maranhensis*. Durante o zigóteno, foi observado que as fibras de tubulina interagem exclusivamente com regiões teloméricas (Figura 4a-d). Em paquíteno, esse padrão ainda ocorre, apesar de serem visualizados alguns microtúbulos associados a regiões não terminais (Figura 4e-h). Por outro lado, em metáfase I, as fibras do fuso foram visualizadas ao longo dos bivalentes, bem como, nos quatro cromossomos do quadrivalente (Figura 4i-l; a'-b''). Nesta fase não foi observada distribuição diferencial dos microtúbulos entre regiões terminais e intersticiais (Figura 4i-l; a'-b''). Esse padrão

também foi registrado em Anáfase I (Figura 4m-p). Em metáfase II, nossos resultados mostraram que microtúbulos se unem tanto ao longo dos cromossomos, quanto nas extremidades (Figura 4q-t). Porém em Anáfase II as fibras do fuso foram visualizadas somente interagindo com telômeros (Figura 4u-z; c'-c").

3.4. Expressão de enzimas de reparo *mismatch* em *T. silvestris*, citótipo A

Espécimes de *T. silvestris* procedentes dos municípios de Manaus-AM e Belém-PA revelaram cariótipo constituído por $2n = 24$ (citótipo A) (Figura 5a). Em meiose I, 12 bivalentes regulares aquiasmáticos foram observados em indivíduos machos (Figura 5a). Um bloco heterocromático conspícuo foi registrado no par 1 (Figura 5a), co-localizado com 45S rDNA (Figura 5b). Sequências teloméricas foram registradas somente nas extremidades cromossômicas (Figura 5c).

Para avaliar expressão diferencial de enzimas de reparo *mismatch* (MLH1, MLH3, MSH4, MSH5 e Mus81) entre os sexos e etapas diferentes do desenvolvimento, realizamos RT-PCR em embriões e entre ambas as gônadas adultas (testículo e ovário) de indivíduos do citótipo A de *T. silvestris*. Nossos dados mostraram expressão de todos os genes estudados nos três tipos de tecidos analisados, embora não tenha sido detectada diferença estatisticamente significativa em nenhum destes casos (Figura 6). Apesar disso, em relação ao gene MLH3, observamos uma menor expressão em gônadas em relação aos tecidos embrionários, sugerindo tendência de diminuição da transcrição deste gene ao longo do desenvolvimento de *T. silvestris* (Figura 6).

3.5. Dinâmica de ATR durante meiose I do citótipo B de *T. silvestris*

Indivíduos de *T. silvestris* provenientes de Santarém (Alter do Chão) e Rurópolis, Estado do Pará, Brasil, mostraram cariótipos com número diploide $2n = 16$ (citótipo B) (Figura 7). Em metáfase I, dois tipos de configurações meióticas foram registradas entre os indivíduos deste citótipo: 7 machos de Rurópolis foram portadores de 8 bivalentes regulares (Figura 7a); por outro lado, 1 macho de Rurópolis e 4 machos de Santarém apresentaram 1 quadrivalente e seis bivalentes (Figura 7b). Nos primeiros, o 45S rDNA foi mapeado no bivalente 1 (Figura 7a); em contrapartida, em indivíduos portadores do quadrivalente, este rDNA foi registrado na região terminal de um dos pares envolvidos nesta associação (Figura 7b). Sequências teloméricas foram registradas apenas nas

extremidades cromossômicas (Figura 7c). Quiasmas não foram registrados em indivíduos machos (meiose aquiasmática) (Figura 7).

Nos indivíduos portadores do quadrivalente do citótipo B de *T. silvestris*, realizamos imunodeteção da proteína ATR para verificar sua distribuição na prófase I desta espécie. Durante a transição leptóteno/zigóteno, *foci* desta quinase foram registrados em maior concentração próximo à zona de início da sinapse no *bouquet* (Figura 8a-c). Em zigóteno tardio, há aumento na quantidade de *foci* ATR, e com a desorganização do *bouquet* telomérico, esta proteína foi observada uniformemente dispersa ao longo da cromatina (Figura 8d-f). Em paquítenos iniciais e intermediários, padrões semelhantes àquele observado em zigóteno tardio foi registrado (Figura 8g-i). Entretanto, em paquíteno tardio, observa-se diminuição progressiva de *foci* ATR (Figura 8j-l). Em metáfase I, não se evidenciou ocorrência desta quinase.

4. DISCUSSÃO

Os números diploides registrados no presente estudo para *T. maranhensis* e *T. silvestris* concordam com os resultados obtidos em estudos prévios (Mattos *et al.* 2013; 2018; Almeida *et al.*, 2019). Em relação ao citótipo B de *T. silvestris*, o número diploide $2n = 16$ foi descrito anteriormente para uma população procedente do Estado do Mato Grosso, Brasil, (Mattos *et al.*, 2018); entretanto os achados de Mattos *et al.* (2018) divergem dos dados registrados no presente estudo para este citótipo, pois os primeiros evidenciaram presença de uma cadeia meiótica composta por 12 cromossomos em espécimes de Mato Grosso, enquanto, nossos resultados mostraram apenas a ocorrência de quadrivalentes em indivíduos do Estado do Pará. Em diversos gêneros de Buthidae associações multivalentes, como observado em *T. maranhensis* e *T. silvestris*, são frequentemente documentadas (Adilardi *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017; Ubinski *et al.*, 2018; Mattos *et al.*, 2018). Elas são originadas por meio de translocações recíprocas e sua constituição pode apresentar variação geográfica (Mattos *et al.*, 2013; Adilardi *et al.*, 2020). A natureza aquiasmática dos cromossomos em machos de Buthidae pode contribuir para fixação de translocações em estado heterozigoto nas populações naturais, uma vez que permite a segregação correta dos elementos envolvidos na associação, resultando na formação de gametas balanceados (Schneider *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2019). Entretanto o acúmulo gradual de rearranjos cromossômicos em sistemas

holocêntricos pode promover formação de barreiras pós-zigóticas entre populações, contribuindo para rápidos eventos de especiação (Pérez *et al.*, 2005; Escudero *et al.*, 2016). Considerando as informações acima, e o fato de que diferentes populações de *T. silvestris* divergem em relação às características morfológicas (Lourenço, 2018), é plausível propor que este escorpião configure um complexo de espécies crípticas.

Análise do complexo sinaptonêmico em espécimes de *T. maranhensis* e *T. silvestris* portadores de quadrivalentes mostrou atraso no processo sináptico desta associação em relação aos bivalentes. Essa característica foi anteriormente reportada em outros escorpiões (Schneider *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2017), bem como em insetos (Arana *et al.*, 1987), mamíferos (Oliver-Bonet *et al.*, 2005; Ribagorda *et al.*, 2019) e anfíbios (Noronha *et al.*, 2020). Em cromossomos monocêntricos esse fenômeno pode ser explicado pela tensão mecânica, gerada pelos movimentos de centrômeros de cromossomos metacêntricos e acrocêntricos envolvidos em multivalentes, que são presentes em regiões distintas do núcleo celular (ver Berríos *et al.*, 2017). No entanto, essa hipótese não se aplica totalmente aos resultados encontrados no presente estudo, uma vez que os multivalentes em *T. silvestris* e *T. maranhensis* são formados por cromossomos holocêntricos. Desta forma, sugerimos que dois eventos podem estar contribuindo, em etapas distintas da prófase I, para o atraso na sinapse do quadrivalente nessas espécies: (1) resolução de *interlocks* e de outras falhas no processo de pareamento durante o zigóteno; (2) ausência de homologia entre segmentos translocados durante o paquíteno, como registrado por Mattos *et al.* (2013). *Interlocks* ocorrem durante a transição zigóteno/paquíteno, sendo frequentes em casos de translocação recíproca (Zickler e Kleckner, 1999); um estudo prévio demonstrou ocorrência de *interlocks* em *Tityus bahiensis* e *Tityus fasciolatus*, ambos portadores de interações meióticas heterozigotas (Schneider *et al.*, 2015). Muitos mecanismos são propostos para resolução de *interlocks*, como cortes em cromátides-irmãs por meio da ação de Topoisomerase II (Martinez-Garcia *et al.*, 2018), desinapse temporária para separação dos cromossomos entrelaçados (Blokchina *et al.*, 2019) ou movimentos coordenados por telômeros seguidos de quebra do complexo sinaptonêmico (Koszul e Kleckner, 2009; Wang *et al.*, 2009). Células em paquítenos iniciais de *T. maranhensis*, revelaram longos eixos de elementos laterais assinápticos e de tamanhos variados entre integrantes do quadrivalente, sugerindo que o provável mecanismo de resolução de *interlocks* nesta espécie seja mediado por quebras na estrutura cromossômica. Esse processo pode resultar na parada do ciclo meiótico, em virtude da ativação de proteínas de *checkpoint* do paquíteno (Subramanian

e Hochwagen, 2014). Porém, a observação do quadrivalente em todas as células em metáfase I analisadas sugere que estas quebras são reparadas de forma recíproca, originando o quadrivalente, fato que inibiria a ação do *checkpoint* do paquíteno, evitando apoptose; de igual forma, tais quebras poderiam eventualmente ser reparadas através de fusão (Imai, 1986); isso pode explicar a presença de indivíduos de *T. maranhensis*, estudados por Mattos *et al.* (2013), que apresentaram diferentes configurações meióticas durante meiose I (10 ou 9 bivalentes).

Em diversos táxons animais, regiões assinápticas de cromossomos sexuais ou autossomos, resultantes de translocações recíprocas, são transcricionalmente inativadas durante prófase I (Mahadevaiah *et al.*, 2008; Checchi *et al.*, 2011; Viera *et al.*, 2017; Noronha *et al.*, 2020). Em mamíferos, este processo envolve a proteína de reparo BRCA1, que posteriormente, recruta a quinase ATR (Garcia-Cruz *et al.*, 2009); sequencialmente, ATR fosforila a histona H2A, gerando γ H2AX, principal responsável pelo silenciamento meiótico de cromatina (Subramanian e Hochwagen, 2014). Nossos resultados mostraram que sinais γ H2AX são presentes durante zigóteno e paquíteno, mas não co-localizam com regiões assinápticas do quadrivalente. Assim, propomos que, diferentemente de muitos vertebrados, esta variante histônica não atua na inativação transcricional de genes meióticos em segmentos translocados em *Tityus*. Entretanto, não descartamos a possibilidade de outras modificações epigenéticas realizarem esta função durante meiose I em *Scorpiones* (Checchi *et al.*, 2011; Viera *et al.*, 2017). Por outro lado, sugerimos que marcações γ H2AX em *T. maranhensis*, estão relacionadas a sítios de DSBs induzidas por SPO11, que correspondem ao evento inicial dos processos de pareamento e recombinação meiótica, similar à *T. silvestris* (Almeida *et al.*, 2019).

A quinase ATR atua em diferentes etapas dos ciclos mitótico e meiótico, ativando diversas proteínas necessárias em determinadas fases da divisão celular. Durante leptóteno e zigóteno, por exemplo, ATR é necessária para o estabelecimento das recombinases Rad51 e Dmc1 sobre eixos cromossômicos portadores de DSBs (Pacheco *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2020). Assim, atribuímos a concentração de *foci* ATR próximo a região do *bouquet* durante zigóteno de *T. silvestris*, à sua ação sobre proteínas envolvidas no reparo de quebras programadas na prófase I. Durante zigóteno de *Mus musculus*, ATR é inicialmente observada sobre regiões não sinapsadas de bivalentes ou multivalentes e, em fases posteriores da prófase I, esta quinase é evidenciada somente sobre eixos dos cromossomos sexuais X e Y (Gil-Fernández *et al.*, 2020). Esse padrão é decorrente da participação desta proteína no processo de inativação transcricional

meiótica, bem como, na formação de sinapse independente de DSBs (Manterola *et al.*, 2009; Widger *et al.*, 2018). Nossos resultados divergem da distribuição de ATR em *Mus musculus*, e indicam que em *T. silvestris* esta quinase não é relacionada a inativação transcricional. Considerando o padrão de distribuição de *foci* ATR neste escorpião (uniformemente em núcleos paquitênicos, sem predominância em regiões específicas) e o fato de ser ausente em paquítenos tardios (quando sinapse e reparo de DSBs estão finalizados) é razoável propor que ATR pode ser responsável pela sinalização positiva ao *checkpoint* do paquíteno, como registrado anteriormente na oogênese de *Drosophila* (Hughes *et al.*, 2018).

Nossos resultados revelaram expressão de enzimas de reparo *mismatch* em gônadas e embriões de *T. silvestris*. Durante meiose I estas proteínas realizam o processamento de DSBs por recombinação homóloga, gerando quiasmas em bivalentes durante prófase I (Moens *et al.*, 2007). Em *Drosophila*, a aquiasmia masculina pode ser explicada pela expressão diferencial de diversos genes de recombinação entre os sexos (John *et al.*, 2016). Neste díptero, por exemplo, Rad51 é ausente em testículos, enquanto BLM helicase (que inibe *crossing-over*) é altamente expressa nesta gonada (Yoo *et al.*, 2005; John *et al.*, 2016). Em *T. silvestris* não observamos diferença significativa nos níveis de expressão destes genes entre os sexos (ver figura 6). Adicionalmente, Rad51 é observada em meiose masculina deste escorpião (Almeida *et al.*, 2019). Isso sugere que a aquiasmia em *T. silvestris* e *Drosophila* pode ser originada e mantida por processos distintos. Em Scorpiones, todos os machos investigados citogeneticamente mostraram meiose aquiasmática (Schneider *et al.*, 2015; Adilardi *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2019). Em relação a fêmeas, a presença de quiasmas é questionada, sendo a maioria considerada aquiasmática, com apenas um caso de estruturas similares a quiasmas em *Zabius* (Buthidae) (Shanahan, 1989; Adilardi *et al.*, 2015; Ubinski *et al.*, 2018). Adicionalmente, nódulos de recombinação tardios compostos pelas proteínas MLH1, MLH3, MSH4 e MSH5 não foram observados em paquítenos de *Tityus*, sugerindo ausência de *crossing-over* neste gênero (Schneider *et al.*, 2015). Mapas de ligação em outros artrópodes, como espécies aquiasmáticas de crustáceos (Burton, 1981) e insetos (Traut, 1977; Sloane *et al.*, 2001), comprovaram ausência total de recombinação. Assim, sugerimos que a expressão dos genes de reparo *mismatch* em *T. silvestris* observada no presente estudo, pode estar relacionada a outras funções celulares, como reparo de DNA em espermatogônias e espermatozoides (Gunes *et al.*, 2015). Interessantemente, detectamos expressão de MUS81 no testículo de *T. silvestris*. MUS81 é uma endonuclease que repara DSBs

meióticas através de recombinação homóloga sem formação da *junção Holliday* (Heyer, 2004). Assim, não excluimos totalmente a possibilidade de ocorrência de *crossing-over* sem formação de quiasma neste escorpião.

Em *T. maranhensis* observamos distintas formas de união dos microtúbulos aos cromossomos meióticos. Em zigóteno e paquíteno a associação de fibras do fuso a telômeros, denota a ação destes polímeros na mobilidade destas regiões genômicas durante organização/desorganização do *bouquet* telomérico e pareamento homólogo (Lee *et al.*, 2015). Em metáfase I o padrão de união da tubulina aos bivalentes de *T. maranhensis*, corresponde ao esperado para sistemas holocinéticos (Claycomb *et al.*, 2009; Heckmann *et al.*, 2014). Em relação ao quadrivalente observado neste escorpião, inicialmente hipotetizamos que esta associação poderia requerer adaptações meióticas, similares àquelas observadas para bivalentes holocêntricos com configuração cruciforme (Pérez *et al.*, 2000; Bongiorno *et al.*, 2004). Em *Luzula elegans*, por exemplo, bivalentes cruciformes exibem comportamento holocinético e meiose invertida (Heckmann *et al.*, 2014). No entanto, visualizamos fibras de tubulina aderidas ao longo de toda extensão dos cromossomos envolvidos no quadrivalente meiótico de *T. maranhensis*. Neste caso, a ausência de quiasmas durante meiose masculina neste escorpião, pode ser um fator importante para manutenção do comportamento holocinético deste quadrivalente. Nossos resultados divergem de Piza (1941), que registrou presença de fibras do fuso ligadas apenas às extremidades cromossômicas em bivalentes e trivalentes meióticos do escorpião *Tityus bahiensis*. Assim, modos de distribuição de microtúbulos durante metáfase I podem ter evoluído independentemente em *Tityus*.

Em contrapartida, ambos *T. bahiensis* (Piza, 1941) e *T. maranhensis* (presente estudo) apresentam comportamento telocinético em metáfase II. Restrição da atividade cinética é observada em ambas as metáfases I e II em nematódeos e insetos das ordens Hemiptera e Odonata (Mandrioli e Manicardi, 2020). Os mecanismos moleculares responsáveis por este fenômeno são pouco compreendidos. Na maioria dos organismos com restrição da atividade cinética, nota-se ausência de CENH3 e de cinetócoro durante meiose e, deste modo, os microtúbulos são inseridos diretamente na cromatina, interagindo especialmente com regiões heterocromáticas terminais (Goday e Pimpinelli, 1989; Comings e Okada, 1972; Drinnenberg *et al.*, 2014). Estes estudos sugerem que o cinetócoro pode ser dispensável para segregação meiótica de organismos holocêntricos com atividade telocinética. Em *T. bahiensis* o cinetócoro está presente em ambas as

metáfases I e II, mas não recobre totalmente os cromossomos (Benavente, 1982). Pequenos domínios CENH3 cineticamente ativos, presentes em regiões não associadas a placa cinetocórica principal, podem ocorrer em *Tityus*, como proposto para plantas do gênero *Cuscuta* (Oliveira *et al.*, 2020). O significado funcional da atividade telocinética na meiose II neste gênero ainda não é compreendido, porém pode estar relacionada a um processo intrínseco de degradação do complexo de coesinas presentes entre as cromátides-irmãs de *T. maranhensis*, que permitem sua correta disposição na placa metafásica e segregação para células filhas, similares ao descrito anteriormente para *C. elegans* (Schwarzstein *et al.*, 2010) e *Triatoma infestans* (Pérez *et al.*, 2000).

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados confirmaram as características cariotípicas descritas anteriormente para *T. maranhensis* e *T. silvestris*, com presença de associações multivalentes em ambas, resultantes de translocações em heterozigose. Nossos dados permitem concluir que a meiose aquiasmática em *Tityus* é caracterizada por: (1) atraso no processo sináptico de quadrivalentes durante paquíteno e pós-paquíteno; (2) inativação de cromatina não-sinapsada de multivalentes não envolve participação de γ H2AX; (3) ATR e γ H2AX atuam no processo de formação e reparo de DSBs meióticas; (4) expressão de genes de reparo *mismatch* é observada em ambos os sexos, apesar da ausência de quiasmas; (5) comportamento holo e telocinético, respectivamente, em metáfases I e II. Coletivamente, nossos dados evidenciam que *Tityus* pode ser um táxon modelo para estudos de meiose aquiasmática em organismos holocêntricos.

6. REFERÊNCIAS

- ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MARTÍ DA, MOLA LM (2020) Chromosome puzzle in the southernmost populations of the medically important scorpion *Tityus bahiensis* (Perty 1833) (Buthidae), a polymorphic species with striking structural rearrangements. *Zoologischer Anzeiger* 288:139-150
- ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MATTONI CI, MOLA LM (2015) Male and female meiosis in the mountain scorpion *Zabius fuscus* (Scorpiones,

Buthidae): heterochromatin, rDNA and TTAGG telomeric repeats. *Genetica*, 143(4), 393–401. doi:10.1007/s10709-015-9838-1

ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MOLA LM (2016) Sex-linked chromosome heterozygosity in males of *Tityus confluens* (Buthidae): a clue about the presence of sex chromosomes in scorpions. *PLoS ONE* 11:10.

ALMEIDA BRR, MILHOMEM-PAIXÃO SSR, NORONHA RCR, NAGAMACHI CY, COSTA MJR, PARDAL PPO, COELHO JS, PIECZARKA JC (2017) Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). *BMC Genetics* 18:35.

ALMEIDA BRR, NORONHA RCR, COSTA MJR, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC (2018) Meiosis in the scorpion *Tityus silvestris*: new insights into achiasmatic chromosomes. *Biology Open* 8:bio04352.

ARANA P, SANTOS JL, HENRIQUES-GIL N (1987) Interference relationships in grasshopper reciprocal translocation heterozygotes. *Heredity*, 59:85–93.

ARAYA-JAIME C, SERRANO ÉA, DE ANDRADE SILVA DM, YAMASHITA M, IWAI T, OLIVEIRA C, FORESTI F (2015) Surface-spreading technique of meiotic cells and immunodetection of synaptonemal complex proteins in teleostean fishes. *Mol Cytogenet* 8:4

BENAVENTE R (1982) Holocentric chromosomes of arachnids: presence of kinetochore plates during meiotic divisions. *Genetica* 59:23–27

BERRÍOS S, FERNÁNDEZ-DONOSO R, AYARZA E (2017) Synaptic configuration of quadrivalents and their association with the XY bivalent in spermatocytes of Robertsonian heterozygotes of *Mus domesticus*. *Biol Res*, 50:38

BLOKHINA YP, NGUYEN AD, DRAPER BW, BURGESS SM (2019) The telomere bouquet is a hub where meiotic double-strand breaks, synapsis, and stable homolog juxtaposition are coordinated in the zebrafish, *Danio rerio*. *Plos Genet* 15: e1007730.

BLOOM K, COSTANZO V (2017) Centromere Structure and Function. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 56:515–539.

BONGIORNI S, FIORENZO P, PIPPOLETTI D, PRANTERA G (2004) Inverted meiosis and meiotic drive in mealybugs. *Chromosoma*, 112:331-341

BURTON RS, FELDMAN MW, SWISHER SG (1981) Linkage relationships among five enzyme-coding gene loci in the copepod *Tigriopus californicus*: a genetic confirmation of achiasmatic meiosis. *Biochem Genet.*, 19:1237-1245.

CABRAL-DE-MELLO DC, MAREC F (2021) Universal fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. *Mol Genet Genomics*. doi: 10.1007/s00438-021-01765-2.

CHECCHI PM, ENGEBRECHT J (2011) *Caenorhabditis elegans* histone methyltransferase MET-2 shields the male X chromosome from checkpoint machinery and mediates meiotic sex chromosome inactivation. *PLoS Genet* 7: e1002267.

CLAYCOMB JM, BATISTA PJ, PANG KM, GU W, VASALE JJ, VAN WOLFSWINKEL JC, CHAVES DA, SHIRAYAMA M, MITANI S, KETTING RF, CONTE D JR, MELLO CC. (2009) The Argonaute CSR-1 and its 22G-RNA cofactors are required for holocentric chromosome segregation. *Cell*. 139:123-134

COMINGS DE, OKADA TA (1972) Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis but absent in meiosis. *Chromosoma* 37:177–192

DRINNENBERG IA, YOUNG D, HENIKOFF S, MALIK HS (2014) Recurrent loss of cenH3 is associated with independent transitions to holocentricity in insects. *Elife* 3: e03676.

ESCUDERO M, HAHN M, BROWN BH, LUEDERS K, HIPPEL AL (2016) Chromosomal rearrangements in holocentric organisms lead to reproductive isolation by hybrid dysfunction: The correlation between karyotype rearrangements and germination rates in sedges. *Am J Bot*. 103:1529-1536

GARCIA-CRUZ R, ROIG I, ROBLES P, SCHERTHAN H, GARCIA CALDÉS M (2009) ATR, BRCA1 and gammaH2AX localize to unsynapsed chromosomes at the pachytene stage in human oocytes. *Reprod Biomed Online*,18:37-44.

GERLACH WL, BEDBROOK JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res*. 7:1869–1885.

- GIL-FERNÁNDEZ A, SAUNDERS PA, MARTÍNRUIZ M, RIBAGORDA M, LO´PEZ-JIME´NEZ P, JEFFRIES DL, PARRA MT, VIERA A, RUFAS JS, PERRIN N, VEYRUNES F, PAGE J (2020) Meiosis reveals the early steps in the evolution of a neo-XY sex chromosome pair in the African pygmy mouse *Mus minutoides*. PLoS Genet 16(11): e1008959
- GODAY C, PIMPINELLI S (1989) Centromere organization in meiotic chromosomes of *Parascaris univalens*. Chromosoma 98:160–166
- GUNES S, AL-SADAAN M, AGARWAL A (2015) Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. Reprod Biomed Online, 31:309-319.
- GUO J, WANG L, WU H, CAO Y, XIAO R, LAI X, XUESHUANG L, JIANBO L, JIEQUN YI, ZHANG, G (2018) Molecular characterization and expression of vitellogenin genes from the wolf spider *Pardosa pseudoannulata* (Araneae: Lycosidae). Physiological Entomology. doi:10.1111/phen.12259
- HECKMANN S, JANKOWSKA M, SCHUBERT V, KUMKE K, MA W, HOUBEN A (2014) Alternative meiotic chromatid segregation in the holocentric plant *Luzula elegans*. Nature Communications 5:4979.
- HEYER WD (2004) Recombination: holliday junction resolution and crossover formation. Current Biology, 14: R56–R58.
- HUGHES SE, MILLER DE, MILLER AL, HAWLEY RS (2018) Female Meiosis: synapsis, recombination, and segregation in *Drosophila melanogaster*. Genetics 208(3):875-908
- IMAI HT, MARUYAMA T, GOJOBORI T, INOUE Y, CROZIER RH (1986) Theoretical bases for karayotype evolution. I. The Minimum –Interaction Hypothesis. The Americam Naturalist 128: 900-920.
- JOHN A, VINAYAN K, VARGHESE J (2016) Achiasmy: male fruit flies are not ready to mix. Frontiers in cell and developmental biology, 4:75.
- KIROV I, KHRUSTALEVA L, VAN LAERE K, SOLOVIEV A, MEEUS S, ROMANOV D, FESENKO I (2017) DRAWID: user-friendly java software for

chromosome measurements and idiogram drawing. *Comparative Cytogenetics* 11: 747-757

KOSZUL R, KLECKNER N (2009) Dynamic chromosome movements during meiosis: a way to eliminate unwanted connections? *Trends Cell Biol.* 19:716-724.

LEE CY, HORN HF, STEWART CL, BURKE B, BOLCUN-FILAS E, SCHIMENTI JC, DRESSER ME, PEZZA RJ (2015) Mechanism and regulation of rapid telomere prophase movements in mouse meiotic chromosomes. *Cell Rep.* 11:551-563.

LOURENÇO WR (2002) Scorpiones. In: ADIS, J. (org.). *Amazonian Arachnida and Miryapoda: identification keys to all classes, orders, families, some genera and a list of known terrestrial species.* Pensoft Publishes, Moscow, 399-438p.

LOURENÇO WR (2018) The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 24:1.

MAHADEVAIAH SK, BOURCHIS D, DE ROOIJ DG, BESTOR TH, TURNER JM, BURGOYNE PS (2008) Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *J Cell Biol.*, 182:263-76.

MANDRIOLI M, MANICARDI GC (2020) Holocentric chromosomes. *PLoS Genet* 16: e1008918

MANTEROLA M, PAGE J, VASCO C, BERRÍOS S, PARRA MT, VIERA A, RUFAS JS, ZUCCOTTI M, GARAGNA S, FERNÁNDEZ-DONOSO R (2009) A high incidence of meiotic silencing of unsynapsed chromatin is not associated with substantial pachytene loss in heterozygous male mice carrying multiple simple robertsonian translocations. *PLoS Genet* 5: e1000625.

MARQUES A, PEDROSA-HARAND (2016) Holocentromere identity: from the typical mitotic linear structure to the great plasticity of meiotic holocentromeres. *Chromosoma* 125:669-681

MARTINEZ-GARCIA M, SCHUBERT V, OSMAN K, DARBYSHIRE A, SANCHEZ-MORAN E, FRANKLIN FCH (2018) TOP2 and chromosome movement help remove interlocks between entangled chromosomes during meiosis. *J Cell Biol.*, 217:4070-4079.

MATTOS VF, CARVALHO LS, CARVALHO MA, SCHNEIDER MC (2018) Insights into the origin of the high variability of multivalent-meiotic associations in holocentric chromosomes of *Tityus (Archaeotityus)* scorpions. PLoS ONE 13(2): e0192070.

MATTOS VF, CELLA DM, CARVALHO LS, CANDIDO DM, SCHNEIDER MC (2013) High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. Chromosome Res. 21:121-136

MELTERS DP, PALIULIS LV, KORF IF, CHAN SWF (2012) Holocentric chromosome: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. Chromosome Research, 20: 579-593.

MOENS PB, MARCON E, SHORE JS, KOCHAKPOUR N, SPYROPOULOS B (2007) Initiation and resolution of interhomolog connections: *crossover* and non-*crossover* sites along mouse synaptonemal complexes. J. Cell Sci. 120:1017-1027

MOLA LA, PAPESCHI AG (2006) Holokinetic chromosome an glance. Journal of Basic & Applied Genetics 17: 17-33.

NORONHA RCR, DE ALMEIDA BRR, DA COSTA MJR, NAGAMACHI CY, MARTINS C, PIECZARKA JC (2020) Meiotic analyses show adaptations to maintenance of fertility in X1Y1X2Y2X3Y3X4Y4X5Y5 system of amazon frog *Leptodactylus pentadactylus* (Laurenti, 1768). Sci Rep. 10:16327.

OLIVEIRA L, NEUMANN P, JANG TS, KLEMM S, SCHUBERT V, KOBLÍŽKOVÁ A, HOUBEN A, MACAS J (2020) Mitotic Spindle Attachment to the Holocentric Chromosomes of *Cuscuta europaea* Does Not Correlate With the Distribution of CENH3 Chromatin. Frontiers in plant science, 10:1799.

OLIVER-BONET M, BENET J, SUN F, NAVARRO J, ABAD C, LIEHR T, STARKES H, GREENE C, KO E, MARTIN RH (2005) Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. Hum Reprod. 20:683-688.

PACHECO S, MALDONADO-LINARES A, MARCET-ORTEGA M, ROJAS C, MARTÍNEZ-MARCHAL A, FUENTES-LAZARO J, LANGE J, JASIN M, KEENEY S, FERNÁNDEZ-CAPETILLO O, GARCIA-CALDÉS M, ROIG I (2018) ATR is required to complete meiotic recombination in mice. Nature communications, 9: 2622.

- PEREIRA C, SMOLKA MB, WEISS RS, BRIÑO-ENRÍQUEZ MA (2020) ATR signaling in mammalian meiosis: from upstream scaffolds to downstream signaling. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 61: 752-766
- PÉREZ R, HERNÁNDEZ M, QUINTERO O, SCVORTZOFF E, CANALE D, MÉNDEZ L, COHANOFF C, MARTINO M, PANZERA, F (2005) Cytogenetic Analysis of Experimental Hybrids in Species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). *Genetica*, 125: 261–270.
- PÉREZ R, RUFAS JS, SUJA JA, PAGE J, PANZERA F (2000) Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Res* 8:17-25
- PIZA, ST (1941) Chromosomes with two spindle attachments: in the brazilian scorpion. *Journal of Heredity*, 32:423-426.
- RIBAGORDA M, BERRÍOS S, SOLANO E, AYARZA E, MARTÍN-RUIZ M, GIL-FERNÁNDEZ A, PARRA MT, VIERA A, RUFAS JS, CAPANNA E, CASTIGLIA R, FERNÁNDEZ-DONOSO R, PAGE J. (2019) Meiotic behavior of a complex hexavalent in heterozygous mice for Robertsonian translocations: insights for synapsis dynamics. *Chromosoma*, 128:149-163.
- SCHNEIDER MC, ZACARO AA, PINTO-DA-ROCHA R, CANDIDO DM, CELLA DM (2009b) Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. *Chromosome Res*. 17: 883-898
- SCHNEIDER MC, MATTOS VF, CARVALHO LS, CELLA DM (2015) Organization and behavior of the synaptonemal complex during achiasmatic meiosis of four buthid scorpions. *Cytogenet Genome Res*. 144:341-347.
- SCHVARZSTEIN M, WIGNALL SM, VILLENEUVE AM (2010) Coordinating cohesion, co-orientation, and congression during meiosis: lessons from holocentric chromosomes. *Genes Dev.*, 24:219-228.
- SHANAHAN CM (1989a). Cytogenetics of Australian scorpions I. Interchange polymorphism in the family Buthidae. *Genome*, 32: 882-889. 1989A.

- SLOANE MA, SUNNUCKS P, WILSON ACC, HALES DF (2001) Microsatellite isolation, linkage group identification and determination of recombination frequency in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Genetics Research*, 77:251-260
- SUBRAMANIAN VV, HOCHWAGEN A (2014) The meiotic checkpoint network: step-by-step through meiotic prophase. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 6:a016675
- TRAUT W (1977) A study of recombination, formation of chiasmata and synaptonemal complexes in female and male meiosis of *Ephesia kuehniella* (Lepidoptera). *Genetica* 47: 135–142.
- UBINSKI CV, CARVALHO LS, SCHNEIDER MC (2018) Mechanisms of karyotype evolution in the Brazilian scorpions of the subfamily Centruroidinae (Buthidae). *Genetica* 146: 475–486
- VIERA A, PARRA MT, RUFAS JS, PAGE J (2017) Transcription reactivation during the first meiotic prophase in bugs is not dependent on synapsis. *Chromosoma*, 126:179-194.
- WANG CJR, CARLTON PM, GOLUBOVSKAYA IN, CANDE WZ (2009) Interlock formation and coiling of meiotic chromosome axes during synapsis. *Genetics*, 183: 905–915
- WIDGER A, MAHADEVIAIAH SK, LANGE J, ELINATI E, ZOHREN J, HIROTA T, PACHECO S, MALDONADO-LINARES A, STANZIONE M, OJARIKRE O, MACIULYTE V, DE ROOIJ DG, TÓTH A, ROIG I, KEENEY S, TURNER JMA (2018) ATR is a multifunctional regulator of male mouse meiosis. *Nat Commun.* 9:2621.
- WIGNALL S, VILLENEUVE A (2009) Lateral microtubule bundles promote chromosome alignment during acentrosomal oocyte meiosis. *Nat Cell Biol* 11, 839–844.
- YOO S, MCKEE BD (2005) Functional analysis of the *Drosophila* Rad51 gene (spn-A) in repair of DNA damage and meiotic chromosome segregation. *DNA Repair (Amst)*, 4:231-242
- ZEDEK F, BUREŠ P (2017) Holocentric chromosomes: from tolerance to fragmentation to colonization of the land. *Annals of Botany*, 121: 9–16.

ZICKLER D, KLECKNER N (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet.*, 33:603-754

Legenda das figuras

Figura 1: Cromossomos meióticos em *T. maranhensis*. (a) Metáfase I; (b) Metáfase II.

Figura 2: Organização do complexo sinaptonêmico em *T. maranhensis*. Em vermelho SMC3, e em verde, telômeros. (a) Transição leptóteno/zigóteno; eixos SMC3 e telômeros arranjados em configuração *bouquet*. (b) Zigóteno tardio. (c) Paquíteno inicial; setas indicam regiões do quadrivalente asinápticas. (d) Representação esquemática dos eixos SMC3 apontados pelas setas em “c”. (e) Paquíteno intermediário; setas indicam regiões do quadrivalente em processo de sinapse. (f) Representação esquemática dos eixos SMC3 apontados pelas setas em “e”. (g) Paquíteno tardio; setas indicam regiões do quadrivalente em processo de sinapse. (h) Metáfase I; seta indica o quadrivalente. (i) Anáfase I; setas indicam componentes do quadrivalente iniciando segregação.

Figura 3: Imunodeteção de γ H2AX ao longo da prófase I de *T. maranhensis*. (a-c) Leptóteno. (d-f) Zigóteno inicial. (g-i) Zigóteno tardio. (j-l) Paquíteno inicial/intermediário. (m-o) Paquíteno tardio.

Figura 4: Imunodeteção de tubulina ao longo da prófase I em *T. maranhensis*. Em vermelho tubulina, e verde telômeros. (a-d) Zigóteno; setas indicam união de telômeros e fibras de tubulina. (e-h) Paquíteno; setas indicam união de telômeros e fibras de tubulina. (i-l) Metáfase I. (m-p) Anáfase I; seta indica o quadrivalente. (q-t) metáfase II. (u-z) anáfase II; setas indicam união de telômeros e fibras de tubulina. (a',a'') Bivalente metafásico ampliado. (b',b'') Quadrivalente ampliado. (c',c'') cromátides irmãs ampliadas em início de Anáfase II.

Figura 5: Cromossomos meióticos em citótipo A ($2n = 24$) de *T. silvestris*. (a) Bandeamento C. (b) FISH com sonda 45S rDNA. (c) FISH com sonda telomérica.

Figura 6: Expressão de genes de reparo *mismatch* em gônadas e embriões de *T. silvestris* citótipo A ($2n = 24$).

Figura 7: Cromossomos meióticos em citótipo B ($2n = 16$) de *T. silvestris*. (a) FISH com sonda 45S rDNA em indivíduo portador apenas de bivalentes. (b) 45S rDNA em indivíduo portador do quadrivalente. (c) FISH com sonda telomérica. Setas em a e b indicam *cluster* ribossomal.

Figura 8: Distribuição de ATR durante prófase I de *T. silvestris* citótipo B ($2n = 16$). (a-c) Transição Leptóteno/Zigóteno. (d-f) Zigóteno tardio. (g-i) Paquíteno inicial. (j-l) Paquíteno tardio.

Figura 1

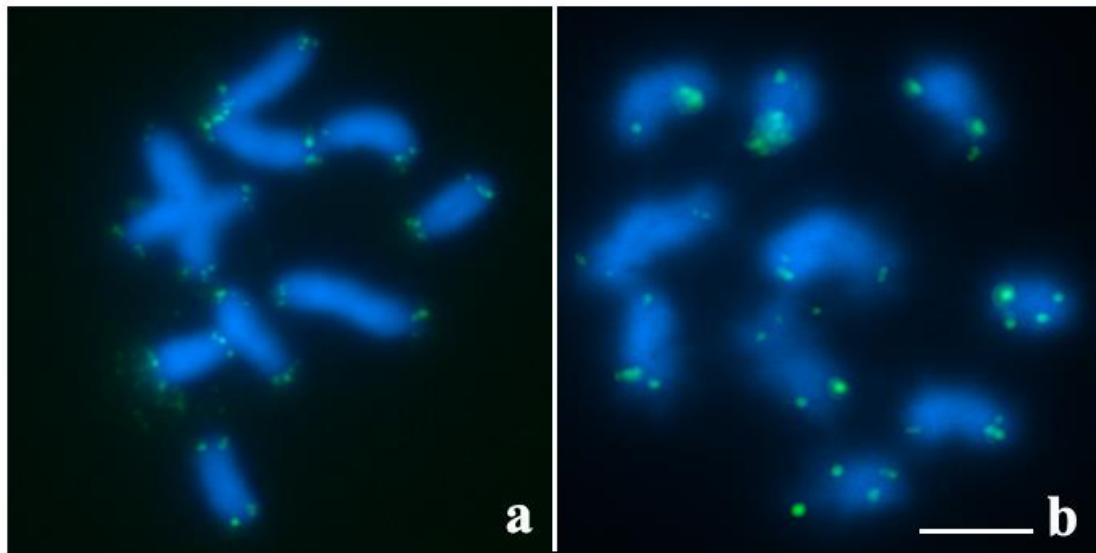


Figura 2

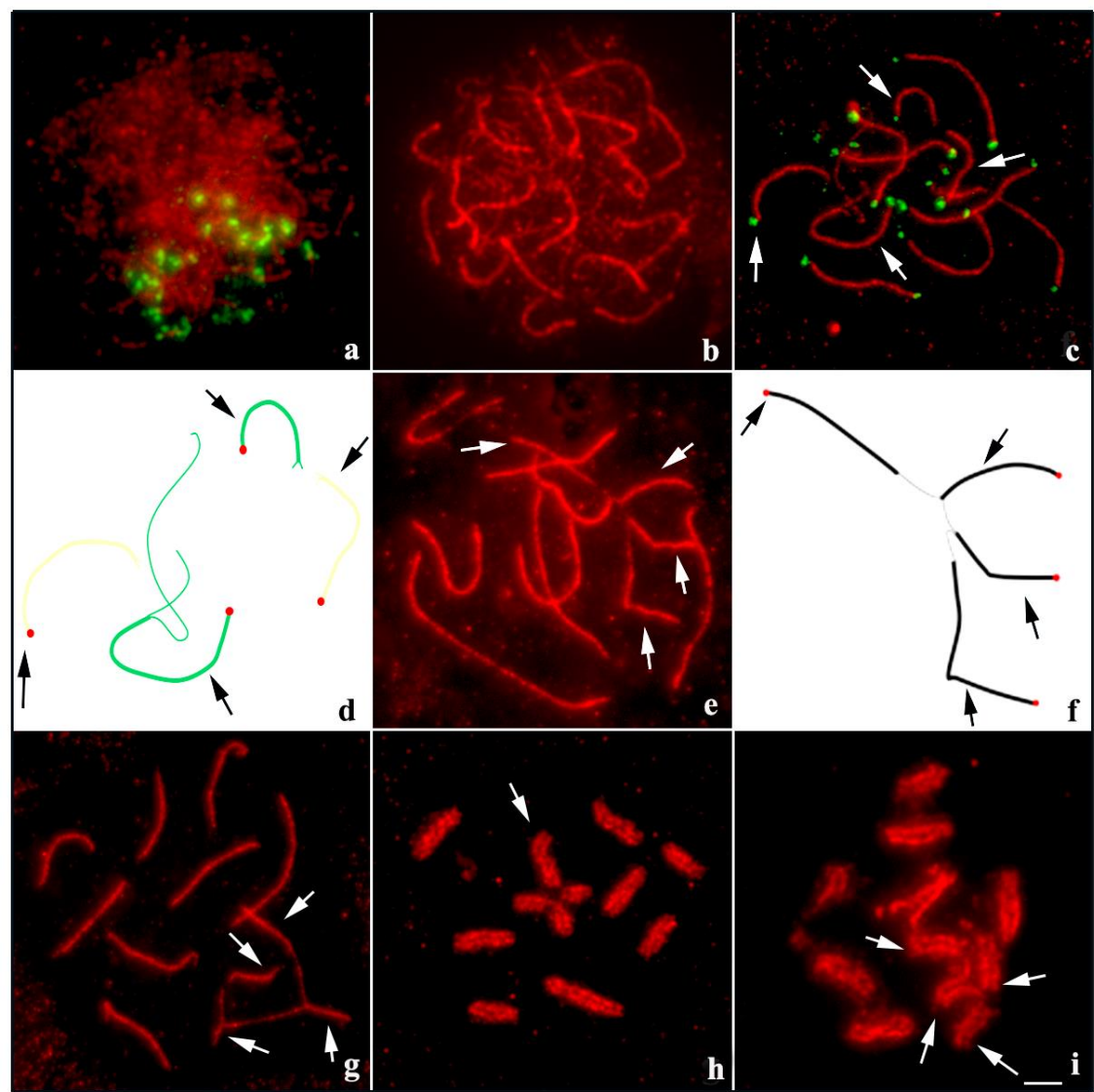


Figura 3

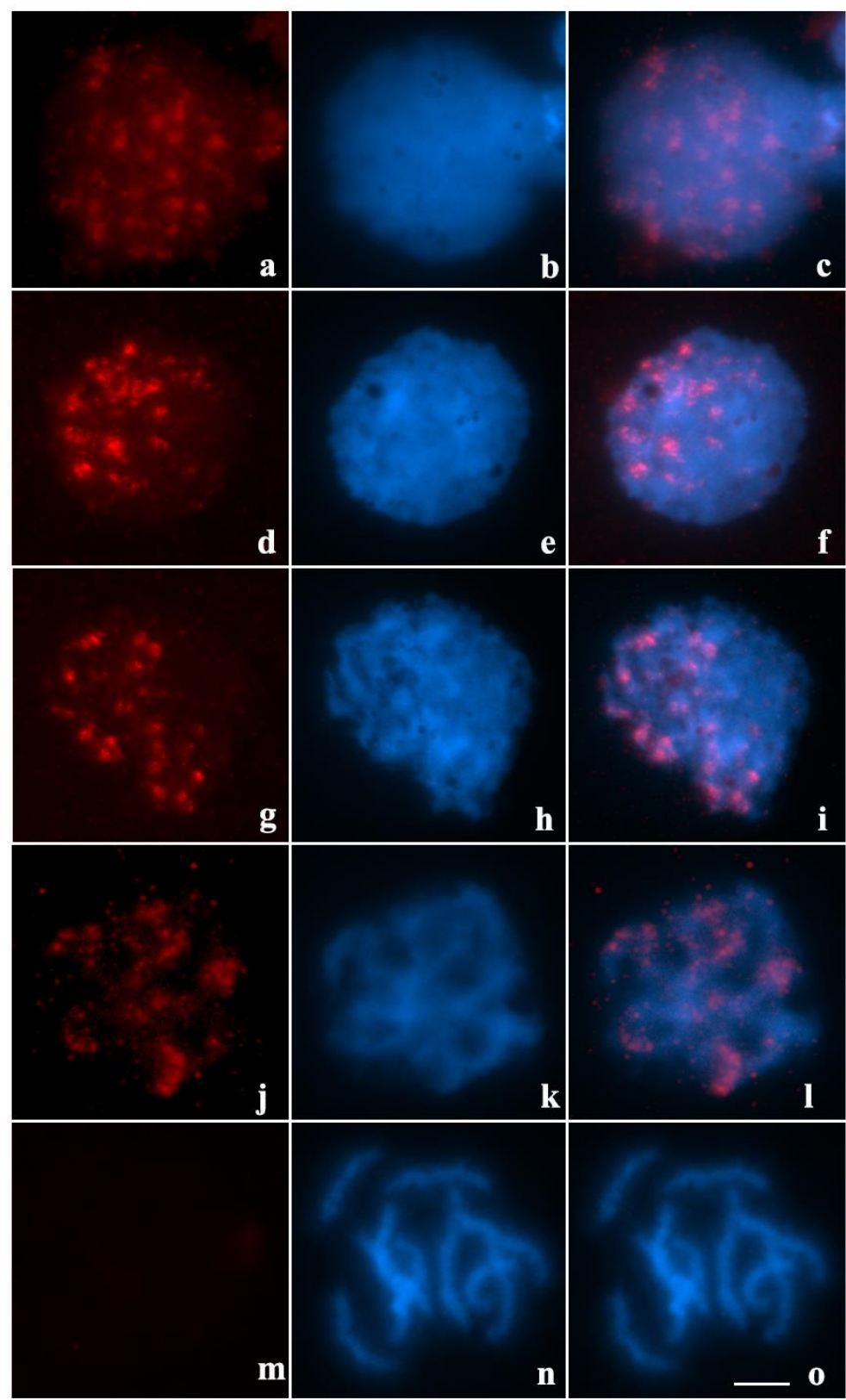


Figura 4

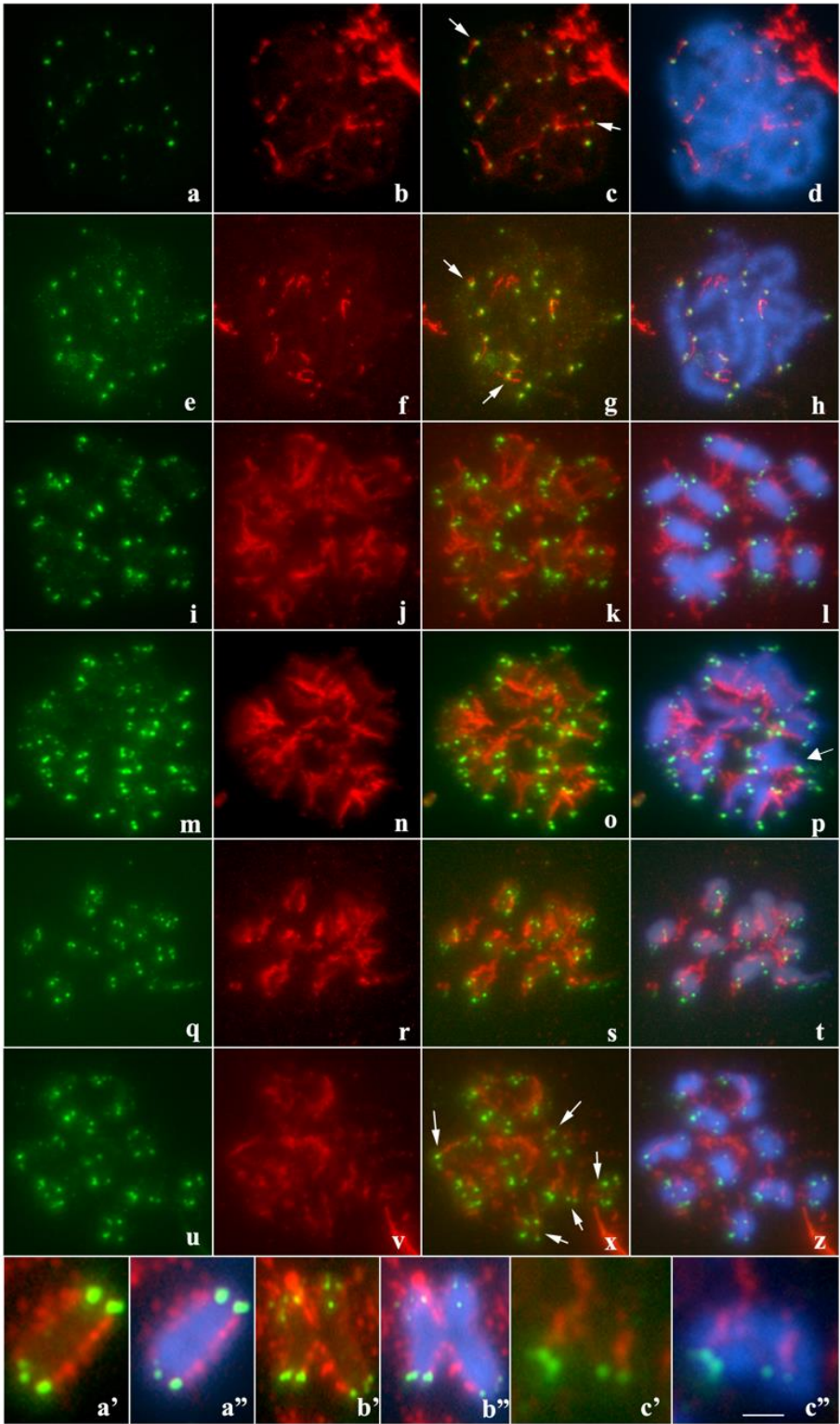


Figura 5

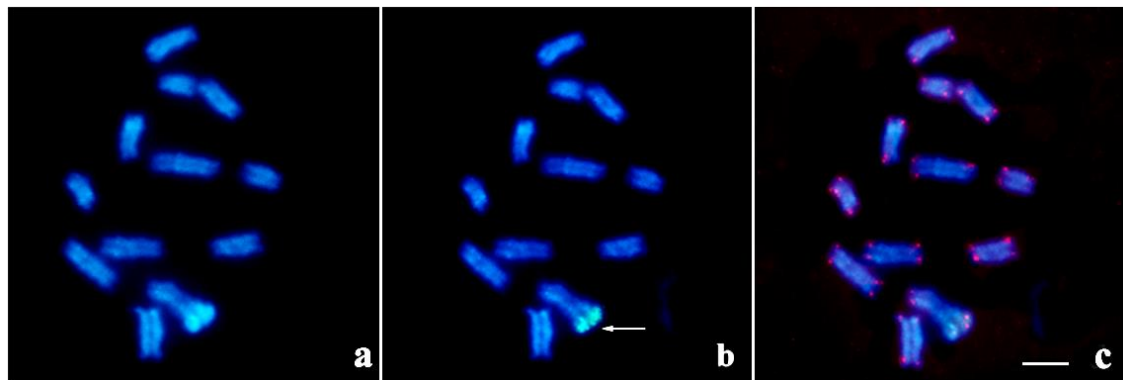


Figura 6

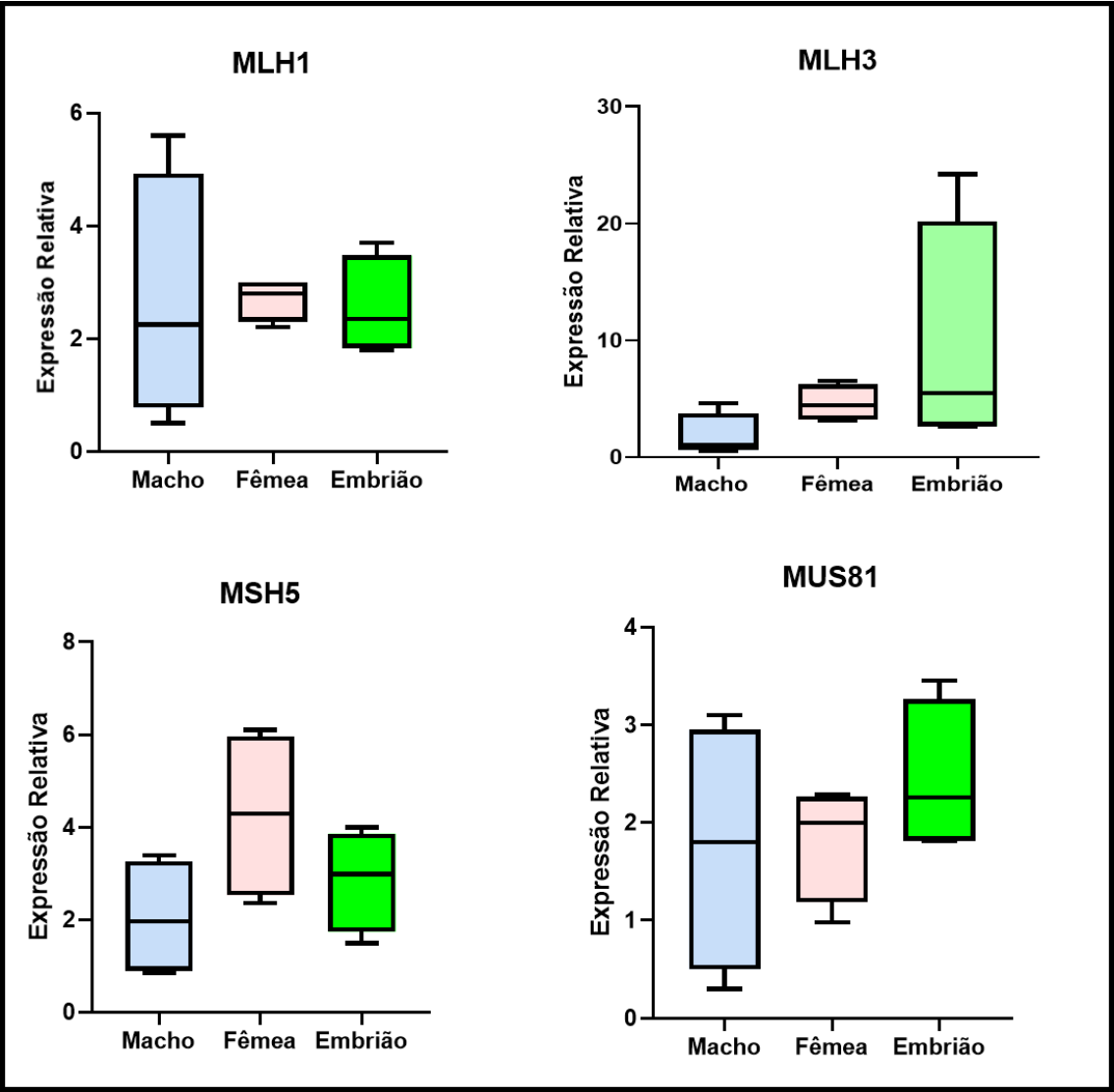


Figura 7

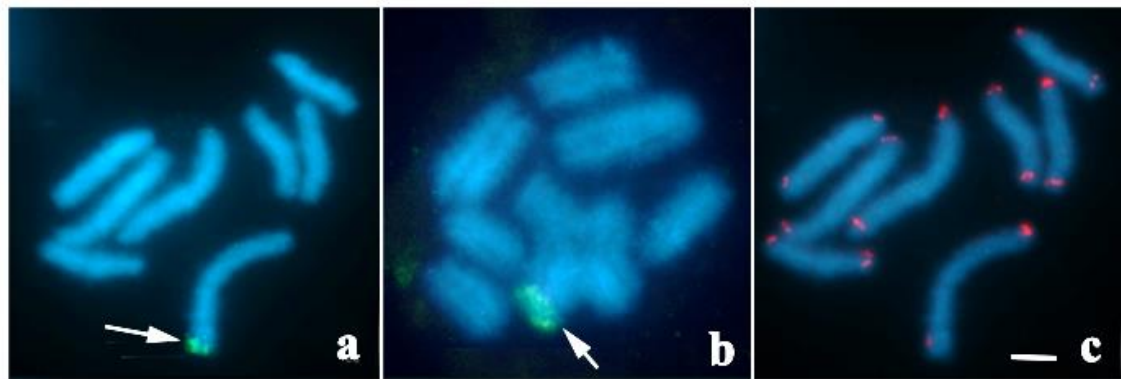
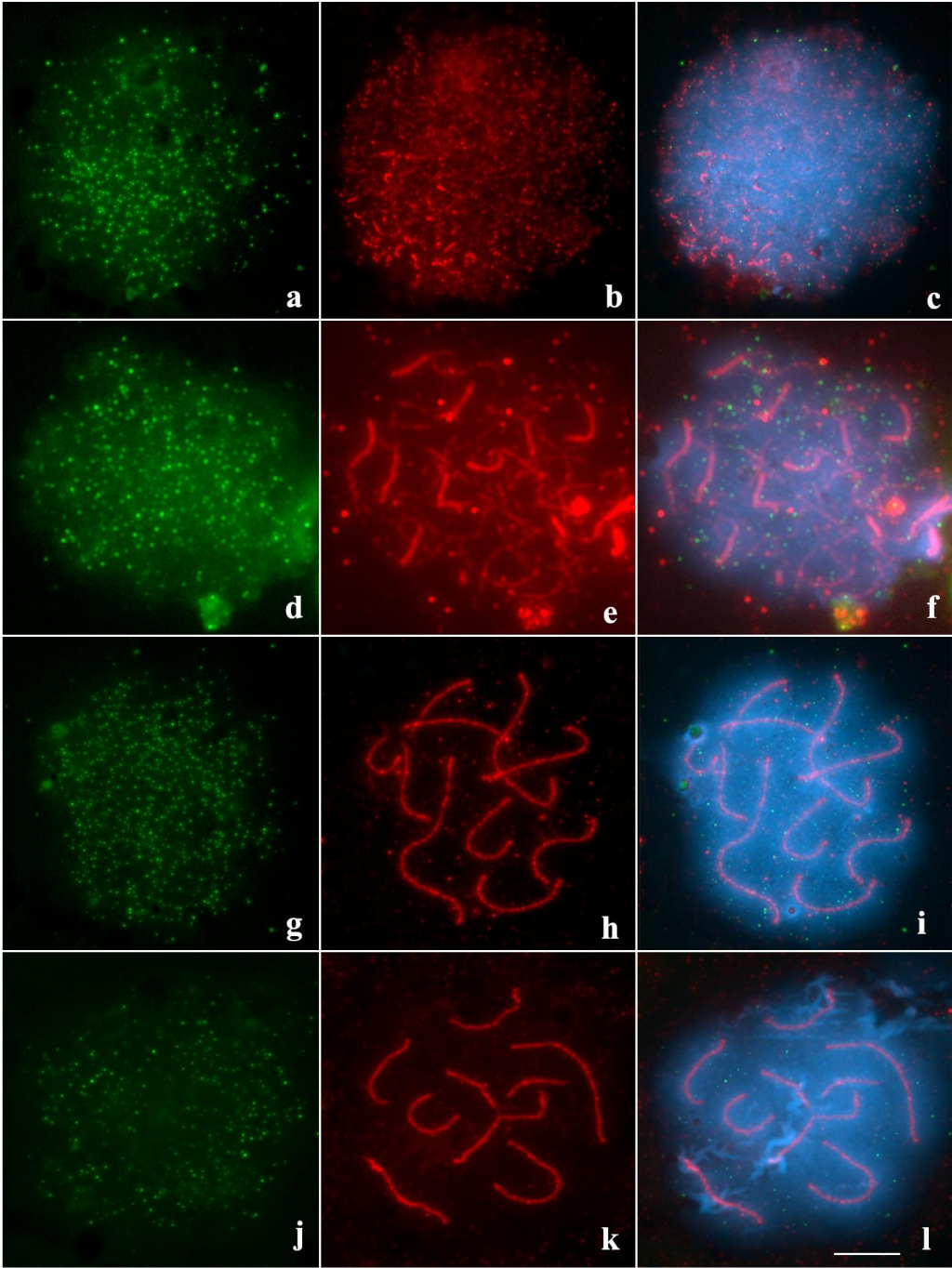


Figura 8



CAPÍTULO 6: Sequências teloméricas intersticiais em *Opisthachantus cayaporum* (Scorpiones, Hormuridae) são importantes para o pareamento meiótico

Bruno Rafael Ribeiro de Almeida¹; Renata Coelho Rodrigues Noronha¹; Marlyson Jeremias Rodrigues da Costa¹; Cleusa Yoshiko Nagamachi¹; Julio Cesar Pieczarka¹

¹Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Avenida Augusto Corrêa, nº01, 66075-900, Belém, Pará, Brasil.

***Corresponding author:** Julio Cesar Pieczarka

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Campus do Guamá

Av. Perimetral, s/n. Guamá

66075-900 Belém – Pará, Brazil

E-mail: juliopieczarka@gmail.com

RESUMO

Telômeros compreendem estruturas genômicas especializadas que protegem o DNA contra degradação e fusões. Sequências teloméricas podem estar presentes em regiões intracromossômicas (ITS), devido a fusões, reparo de DNA ou por constituírem DNAs satélites. Na ordem Scorpiones observa-se elevada taxa de fusão/fissão e translocações, porém apenas dois gêneros demonstraram ITSs. No presente estudo, analisamos citogeneticamente o escorpião *Opisthacanthus cayaporum*. O cariótipo desta espécie possui $2n = 50$ (FC: 6 SM + 44 A). Dez pares de cromossomos acrocêntricos e o par 2 (submetacêntrico) apresentaram ITSs associados a região pericentromérica. Mapeamento do transposon *Mariner* revelou acúmulo deste elemento transponível em pericentrômeros de diversos pares em *O. cayaporum*. O 45S rDNA foi registrado no braço longo do par 8. Análise meiótica mostrou que agrupamento telomérico similar a *bouquet* e sinapse ocorrem em etapas distintas do ciclo meiótico. Em paquíteno, pontes de DNA telomérico (especialmente entre ITSs terminais) foram observadas associando pares não homólogos. A presença de Rad51 foi constatada entre final do leptóteno e paquíteno intermediário, principalmente em sítios intersticiais dos homólogos. Nossos dados permitem inferir que: (1) fusões/fissões podem ter ocorrido ao longo da evolução de *Opisthacanthus*; (2) em *O. cayaporum*, ITSs são heterocromáticos ou resultantes de fusão, e estão sob ação de mecanismos de homogeneização; (3) associações heterólogas entre ITSs podem auxiliar no alinhamento dos homólogos durante metáfase I, contribuindo para segregação normal dos cromossomos aquiasmáticos de *O. cayaporum*.

Palavras-chave: Scorpiones, sequências teloméricas intersticiais, *Opisthacanthus*, fusão, associações heterocromáticas, configuração *bouquet*

1. INTRODUÇÃO

Telômeros compreendem estruturas genômicas especializadas, localizadas nas extremidades dos cromossomos eucarióticos. Sua função primordial é promover a estabilidade cromossômica por proteger o DNA contra degradação e impedir ocorrência de rearranjos cromossômicos prejudiciais (Smith *et al.*, 2020). São regiões de natureza nucleoprotéica, sendo associados a proteínas que formam o complexo *shelterinas*, a

exemplo de TRF1, TRF2 e POT1 (Srinivas *et al.*, 2020). O DNA telomérico é composto por curtas sequências microssatélites repetidas *in tandem*, de tamanho variável e geralmente conservadas para alguns grupos de organismos: TTAGGG (vertebrados), TTAGG (presente na maioria dos artrópodes), TTAGGG ou TTTAGGG (plantas), TTGGGG (*Tetrahymena* sp.), G₁₋₃T (*Saccharomyces cerevisiae*), entre outros (Sahara *et al.*, 1999; Aksenova e Mirkin, 2019; Fajkus *et al.*, 2019). A enzima telomerase, uma DNA polimerase dependente de RNA, é essencial para manutenção desta região genômica, pois é responsável pela adição de novas repetições teloméricas a cada ciclo celular (Schumpfová *et al.*, 2020). A expressão da telomerase em humanos diminui após o desenvolvimento embrionário, permanecendo restrita a alguns tecidos específicos, como a linhagem germinativa ou em tumores malignos (Roake e Artandi, 2020); por outro lado, indivíduos adultos de alguns grupos de artrópodes apresentam atividade desta enzima em diversos tecidos corporais (Mohan *et al.*, 2011; Schumpert *et al.*, 2015).

Estudos acerca de mapeamento físico do DNA telomérico evidenciaram que sequências teloméricas podem estar presentes em regiões intersticiais (ITS) dos cromossomos de vários organismos, ocupando *loci* em subtelômeros, centrômeros, pericentrômeros, Regiões Organizadoras de Nucléolo, entre outros (Gaspin *et al.*, 2010; Aksenova *et al.*, 2015; Cavalcante *et al.*, 2018; Frade *et al.*, 2019). Diferentes hipóteses tem sido propostas para explicar a origem de ITSs, dentre as quais destacam-se: (1) ITS como remanescentes de rearranjos cromossômicos, especialmente fusão *in tandem*; (2) deposição de sequências teloméricas via telomerase em heterocromatina constitutiva (Bolzán *et al.*, 2017). Adicionalmente, estudos prévios apontam que amplificação de ITSs pode ocorrer durante a replicação do DNA, gerando instabilidade genômica (Nagamachi *et al.*, 2013; Bolzán *et al.*, 2017; Aksenova *et al.*, 2019; Stivison *et al.*, 2020).

Scorpiones é uma das ordens mais antigas do filo Arthropoda e abrange aproximadamente 1900 espécies (Rein, 2021). Seus integrantes podem apresentar cromossomos holocêntricos (centrômero difuso, com proteínas do cinetócoro distribuídas ao longo das cromátides) ou monocêntricos, sendo os primeiros observados apenas na família Buthidae (Adilardi *et al.*, 2016; Mattos *et al.*, 2018). Elevada taxa de rearranjos cromossômicos, especialmente fusão/fissão, translocações e inversões foi relatada para diversas espécies destes aracnídeos, com ocorrência destas alterações em estado heterozigoto em populações naturais (Schneider *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2017; Mattos *et al.*, 2018). Em consequência disso, alterações no número diploide e formação de associações meióticas multivalentes complexas têm sido descritas em Scorpiones (Mattos

et al., 2013; Plíšková *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017; Adilardi *et al.*, 2020). Em relação a organização telomérica, todos os escorpiões estudados apresentaram a sequência canônica TTAGG, compartilhada por vários artrópodes (Sahara *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2017; Mattos *et al.*, 2018; Štundlová *et al.*, 2019; Adilardi *et al.*, 2020). Registros de ITSs são raros em Scorpiones, e até o presente momento, apenas foram observados em *Alloscorpiops* sp. e *Vietscorpiops* sp., ambos pertencentes a família Scorpipidae (Šťáhlavský *et al.*, 2020).

Opisthacanthus cayaporum, pertencente à família Hormuridae, é endêmico do Brasil, ocorrendo nos estados Pará, Goiás e Tocantins (Lourenço, 2002). Habita o interior de cupinzeiros nos campos do cerrado brasileiro, estando isolado geograficamente das demais espécies de *Opisthacanthus*, que são amplamente encontradas no norte da América do Sul, América Central, norte da África e Madagascar (Lourenço *et al.*, 2018). Essa distribuição disjunta reflete processos vicariantes e de dispersão ocorridos durante deriva continental (Monod e Prendini, 2014; Lourenço *et al.*, 2018). Na literatura vigente, dados citogenéticos de Hormuridae são conhecidos para os gêneros *Liocheles* (Yamazaki *et al.*, 2000) e *Hadogenes* (Šťáhlavský *et al.*, 2018), e *Opisthacanthus elatus* que apresenta $2n = 60$ ou $2n = 62$ (Wilson, 1931). No presente estudo, descrevemos pela primeira vez ocorrência de ITSs no cariótipo de *O. cayaporum*, e discutimos o papel destas sequências durante eventos da meiose I. Adicionalmente, nossos dados buscam compreender a evolução e organização do DNA repetitivo em *Opisthacanthus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostra

A amostra analisada no presente estudo foi composta de 6 machos, 1 fêmea e 12 embriões de *O. cayaporum*, provenientes de Conceição do Araguaia, Pará, Brasil (8°11'17,01"S/49°27'10,59"O). A identificação taxonômica foi realizada segundo Lourenço (2002). Os espécimes foram depositados na coleção do Laboratório de Entomologia Médica e Artrópodes Peçonhentos (LEMAP/UFPA).

2.2. Análise cariotípica

Gônadas e embriões foram hipotonizadas em KCl 0,075M, e posteriormente fixados em solução de metanol:ácido acético (3:1). Suspensão celular gerada a partir da digestão de gônadas e embriões em ácido acético 60% foi espalhada em lâminas a 45°C.

Cromossomos foram corados com Giemsa 5%. Medidas cromossômicas foram realizadas através do software DRAWID (Kirov *et al.*, 2017). A determinação da morfologia cromossômica seguiu a classificação de Levan *et al.* (1964). Bandeamento C foi realizado segundo Sumner (1972).

2.3.Sondas

A Sonda 45S rDNA foi produzida a partir do plasmídeo pTa71, que contém a sequência completa deste rDNA de *Triticum aestivum* (Gerlach e Bedrok, 1945). Por sua vez, sonda de sequências teloméricas de artrópodes e transposon *Mariner* foram obtidas por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores descritos por Sahara *et al.* (1999) e Lampe *et al.* (2003), respectivamente. As reações de PCR foram constituídas de: 16,25 µL de água estéril, 2,5 µL de tampão da Taq Polimerase 10x, 2 µL de DNTP mix (2mM), 1 µL de DNA genômico(100ng), 1 µL de MgCl₂ (50mM), 1 µL de primer forward (10mM), 1 µL de primer reverse (10mM), 0,25 µL de Taq Polimerase 1U. As configurações termais das PCR foram: 1 ciclo de 94°C (5 minutos); 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 53 a 55°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto); 1 ciclo de 72°C (10 minutos); 1 ciclo 4°C (hold). Todas as sondas foram marcadas por *nick translation* utilizando digoxigenina-14-dUTP (Roche, Mannheim, Germany).

2.4.Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

FISH foi realizada de acordo com Cabral-de-Mello *et al.* (2021). Inicialmente os cromossomos foram tratados com solução de Pepsina 1%, fixados em Paraformaldeído 4% e desidratados em bateria de álcool (70%, 90% e 100%). A desnaturação do DNA cromossômico e de sondas ocorreu a 70°C e 100°C, respectivamente. Lâminas foram mantidas a 37°C, *overnight*, para a hibridização. Posteriormente, lâminas foram lavadas com 2xSSC e 4xSSC-Tween para remoção de hibridizações inespecíficas. Sondas foram detectadas com Anti-digoxigenina-FITC. Cromossomos foram contracorados com 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) em solução antifading Vectashield (Vector).

2.5.Imunodeteção de proteínas meióticas e Imuno-FISH

A obtenção de complexos sinaptonêmicos foi realizada de acordo com Almeida *et al.* (2019). Gônadas foram hipotonizadas com KCl 0,075M e maceradas em 200 µL de

Sacarose 100 mM com auxílio de agulhas, até formarem uma suspensão de células, a qual foi espalhada sobre lâminas previamente revestidas com paraformaldeído 2% (pH 8,2). Lâminas foram incubadas por 2 horas em câmara úmida, posteriormente lavadas em Photo-Flo (pH 8.2) e armazenadas à -80°C.

Os anticorpos primários utilizados e suas respectivas diluições em PBS foram: coelho anti-SMC3 (Abcam, ab9263) em 1:200; coelho anti-Rad51 (Santa Cruz Biotechnology, H92 sc-8349) em 1:50. Para imunodeteção de proteínas meióticas, o bloqueio com BSA 5% (contendo Triton-20 0,01%, e PBS1x) foi realizado por 30 minutos. Em seguida, lâminas foram incubadas com anticorpos primários por 2h (37°C). Após lavagem em PBS1X, elas foram incubadas com anticorpos secundários apropriados, diluídos em 1:100, a 37°C, durante 2 horas. Finalmente, cromossomos foram contracolorados com DAPI em solução antifading Vectashield.

Para imuno-FISH com sonda telomérica seguimos o protocolo descrito por Araya-Jaime *et al.* (2015). Células em paquíteno (n = 67) foram utilizadas para contagem de associações entre ITSs, e destes com sinais teloméricos típicos durante esta fase da meiose I. Contagem de foci Rad51 foi efetuada em 16 células em leptóteno, 19 células em zigóteno e 24 células em paquíteno. Visto que os resultados desta análise não apresentam distribuição normal (averiguado pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk), médias foram comparadas através de teste t com correção de Weish, considerando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Nossos resultados mostraram que o cariótipo *O. cayaporum* apresenta cromossomos monocêntricos, que decrescem gradualmente de tamanho; o complemento consta de número diploide $2n = 50$ e fórmula cariotípica constituída de 6 cromossomos submetacêntricos e 44 acrocêntricos (Figura 1). Em todos os indivíduos machos, 25 bivalentes aquiasmáticos regulares foram registrados durante paquíteno e metáfase I (Figura 1). Apenas células mitóticas foram detectadas em fêmeas. Em *O. cayaporum* não foi constatada existência de pares heteromórficos ou bivalentes com comportamento diferencial na meiose, sugerindo ausência de cromossomos sexuais diferenciados entre os sexos desta espécie.

Bandeamento C evidenciou pequenos blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica dos pares 1, 3, 4, 9, 11, 12, 15, 17, 22 e 25 (Figura 2a). Sequências teloméricas foram observadas na região distal de alguns pares do cariótipo, com exceção dos bivalentes 1, 3, 6, 7, 9, 11, 14, 16, 22 e 25, cuja região pericentromérica demonstrou ser portadora de grandes blocos de sequências teloméricas intersticiais (ITSs) (Figura 2b). O transposon *Mariner* mostrou alta compartimentalização na região pericentromérica de vários pares do cariótipo de *O. cayaporum* (Figura 2c). Mapeamento físico do 45S rDNA demonstrou que esta sequência é localizada no braço longo do par 8 (Figura 2d).

Imuno-FISH com sonda telomérica e coesina SMC3 revelou que em células pré-leptóteno telômeros permanecem agrupados a um polo do núcleo celular; eixos SMC3 não foram visualizados nesta fase (Figura 3a-d). Por outro lado, no leptóteno, telômeros mostraram-se dispersos, enquanto, curtos eixos SMC3 iniciam o processo de organização dos elementos axiais (Figura 3e-h). No zigóteno inicial, a configuração *bouquet* dos telômeros não foi registrada (Figura 3i-l); apesar disso, foi observada tendência de agrupamento dos telômeros e ITSs em diversas regiões da periferia do núcleo (Figura 3i-l); nesta etapa, a maior parte dos eixos SMC3 são visualizados em processo de pareamento (evidenciados pela proximidade de telômeros), porém regiões sinapsadas não foram observadas (Figura 3i-l). No zigóteno tardio ainda é possível observar a presença de longas regiões não sinapsadas (Figura 3m-p). Em paquíteno, 25 filamentos completamente pareados foram registrados (Figura 3q-t). Nesta fase, a individualização dos bivalentes possibilitou verificar a existência de um ITS na região pericentromérica do par 2, não observado pela FISH convencional (Figura 3q-t). Além disso, foram visualizadas associações entre pares não-homólogos portadores de ITSs, nos quais DNA telomérico promove ligações entre dois, três ou quatro bivalentes distintos. Dois tipos de associação foram demonstradas nesta fase: (1) entre um par com ITS e extremidade de outro par não-homólogo, que porta região telomérica típica (média $0,91 \pm 0,88$) (Figura 5a); (2) entre pares não-homólogos que portam blocos conspícuos de ITSs ligados terminalmente (média $2,53 \pm 1,51$) (Figura 5a). Essa diferença na quantidade das duas formas de associação telomérica é estatisticamente significativa ($p=0,000$). Em metáfase I, ligações teloméricas não foram observadas (Figura 3u-z).

A dinâmica temporal de Rad51 inicia-se no leptóteno tardio, no qual foi possível identificar em média $16,14 \pm 4,59$ *foci* associados a curtos eixos SMC3 (Figura 4a). Em zigóteno, há aumento do número de *foci* Rad51 (média $87,62 \pm 44,32$), sendo a maior

parte destes observados sobre eixos não-sinapsados intersticiais do complexo sinaptonêmico (Figura 4b). Esse padrão é registrado até zigóteno tardio (Figura 4c). Durante o paquíteno inicial e intermediário, a expressão desta recombinase diminui drasticamente, sendo em média observados 6.21 ± 2.04 *foci* por célula (Figura 4d,e), dentre os quais a maior parte das marcações Rad51 foi evidenciada em regiões intersticiais (média de 4.95 ± 1.66) (Figura 5b). Em paquíteno tardio não foram observados sinais Rad51 positivos (Figura 4f).

4. DISCUSSÃO

Estudos citogenéticos em 17 espécies de Hormuridae demonstraram ampla variação do número diploide nesta família, desde $2n = 48$ em *Hadogenes trichiurus* até 168 em *Hadogenes tityrus* (Schneider *et al.*, 2021). Apesar disso, informações cromossômicas de *Opisthacanthus* são escassas pois, além de *O. cayaporum* (investigado no presente estudo), apenas *O. elatus* apresenta uma breve citação do número diploide $2n = 60$ ou 62 (Wilson, 1931). A diferença observada no número de cromossomos entre estas duas espécies indica que eventos de fusão/fissão foram importantes para o processo de evolução cariotípica deste gênero, como registrado para outros escorpiões (Plíšková *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017; Štundlová *et al.*, 2019).

Fusões *in tandem* ou Robertsonianas podem envolver união de regiões teloméricas, e neste caso ITSs podem ser formados e mantidos no provável ponto de união dos cromossomos rearranjados (Lin e Yan, 2008; Aksenova *et al.*, 2019). Estudos prévios tem demonstrado ITSs remanescentes de fusões em diversos táxons animais, especialmente em mamíferos (Letsolo *et al.*, 2010), lagartos (Srikulnath *et al.*, 2019), quelônios (Cavalcante *et al.*, 2018), peixes (Rosa *et al.*, 2011; Deon *et al.*, 2020) e insetos (Rego e Marec, 2003; Chirino *et al.*, 2017). Em Scorpiones, apesar da alta taxa de fusão, ITSs originados por este rearranjo não foram observados na maior parte das espécies estudadas citogeneticamente (Almeida *et al.*, 2017; Adilardi *et al.*, 2016, 2020). A única exceção são integrantes dos gêneros *Alloscorpiops* sp. e *Vietscorpiops* sp. (Scorpiopidae), que são portadores de associações meióticas trivalentes, com presença de ITSs no ponto de fusão em alguns casos (Šťáhlavský *et al.*, 2020). Em *O. cayaporum*, nenhum rearranjo heterozigoto similar aos descritos em Scorpiopidae foi registrado. Entretanto, a existência de alguns ITSs originados por fusão em *O. cayaporum* não pode ser completamente descartada. No par 2, por exemplo, que constitui um submetacêntrico, Imuno-FISH mostrou a presença de um ITS na região pericentromérica, sugerindo que este bivalente

pode ser derivado da união de dois acrocêntricos. Segundo modelo proposto por Ruiz-Herrera *et al.* (2008), ITS podem ser originados a partir da fusão de telômeros não funcionais de dois cromossomos acrocêntricos, que posteriormente aumentam em número de cópias gerando sítios instáveis; subsequentemente, essa região pericentromérica pode sofrer fissão, promovendo formação de cromossomos acrocêntricos estáveis. Assim, em *O. cayaporum* o ITS observado no par 2 pode corresponder a uma região genômica instável; esse resultado indica que em algumas espécies de Scorpiones, ITSs remanescentes de fusão podem ser mantidos e posteriormente amplificados, ao invés de sempre serem encurtados e deletados, como sugerido para outros integrantes desta ordem (Adilardi *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017; Mattos *et al.*, 2018; Štáhlavský *et al.*, 2020).

Nossos resultados mostraram ITSs na região pericentromérica de 10 pares acrocêntricos do cariótipo de *O. cayaporum*, indicando associação destas sequências teloméricas ectópicas com heterocromatina constitutiva (ITSs-Het). Achados semelhantes foram anteriormente descritos em outros animais, tais como, roedores (Swier *et al.*, 2012), marsupiais (Silva *et al.*, 2020), aves (Lianguzov *et al.*, 2002), serpentes (Viana *et al.*, 2016), peixes (Schneider *et al.*, 2012) e escorpiões (Štáhlavský *et al.*, 2020). Neste caso, ITSs-Het podem ser componentes de DNAs satélites presentes em pericentrômeros, ou localizar-se adjacentes a estes (Lianguzov *et al.*, 2002; Rovatsos *et al.*, 2011), bem como, apresentar *shelterinas*, como TRF1, TRF2 e RAP1, que conferem maior estabilidade (Bolzán *et al.*, 2017). Em *O. cayaporum*, a presença de *clusters* ITS-Het de tamanhos distintos entre os 10 pares acrocêntricos, denota ocorrência de processos de intensa amplificação, homogeneização e dispersão destes sítios repetitivos (Charlesworth *et al.*, 1994). Associação de ambas as extremidades de cromossomos acrocêntricos ao envelope nuclear durante interfase pode ser importante para promover rápida dispersão destas repetições entre diferentes pares do cariótipo (Rovatsos *et al.*, 2011), pois favorece transferência de ITSs-Het por meio de transposição ou recombinação de elementos transponíveis ou ação de DNAs circulares (He *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2016; Aksenova *et al.*, 2019). Assim, consideramos que agrupamento de telômeros em células pré-leptóteno e acúmulo de transposon *Mariner* em regiões pericentroméricas de *O. cayaporum* podem explicar parcialmente a presença de ITS-Het em vários pares do cariótipo dessa espécie.

Na maior parte dos organismos eucariotos o *bouquet* facilita o reconhecimento e pareamento dos homólogos e a correção de interações heterólogas (Niwa *et al.*, 2000).

No entanto, esta configuração não é presente em todos os organismos; em *C. elegans* e *Drosophila*, por exemplo, a justaposição dos homólogos é mediada por centros de pareamento (Tsai e McKee, 2011). Em *O. cayaporum* foi demonstrado que a realização da sinapse meiótica independe da configuração *bouquet*, uma vez que, nessa espécie, o *bouquet* não está presente no zigóteno, fase em que se registrou formação de eixos duplos sinapsados do complexo sinaptonêmico. O padrão registrado em *O. cayaporum* contrasta com aquele observado em escorpiões Buthidae, nos quais a sinapse inicia no zigóteno, com os cromossomos ainda arranjados em *bouquet* (Adilardi *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2017; 2019; Ojanguren-Affilastro *et al.*, 2017). Esse achado pode corresponder a uma divergência relativa aos eventos da meiose I entre cromossomos holo e monocêntricos de Scorpiones; entretanto, mais espécies devem ser investigadas para confirmar essa hipótese. Em *O. cayaporum*, o agrupamento pré-meiótico de telômeros e ITS-Het pode ser importante para aproximar *clusters* de mesmo tamanho, auxiliando no pareamento meiótico posterior, como sugerido para *Mus musculus* (Scherthan *et al.*, 2014). Adicionalmente, a ausência do *bouquet* durante a transição leptóteno/zigóteno em *O. cayaporum*, pode favorecer a iniciação da sinapse em extremidades portadoras de telômeros típicos e não em telômeros associados ao centrômero, evitando busca de homologia entre regiões pericentroméricas ricas em DNAs repetitivo (Kazemi *et al.*, 2021).

Em cromossomos paquitênicos de *O. cayaporum* foi possível observar que ITSs terminais e do par 2 formam pontes de DNA telomérico (DNA-tel) que unem temporariamente pares homólogos distintos. Considerando que nessa espécie associações heterólogas ocorreram entre ITSs inclusos em regiões pericentroméricas, propomos que elas são de natureza heterocromática (Heckmann *et al.*, 2014) e não proteica, como observado em humanos (Scherthan *et al.*, 2000). Além disso, visto que machos de *O. cayaporum* não possuem quiasmas, é plausível que essas associações contribuam para assegurar o correto alinhamento dos bivalentes durante metáfase I, como sugerido para fêmeas aquiasmáticas de Lepidoptera (Rego e Marec, 2003). Essa hipótese concorda com achados de Eyster *et al.*, (2019), que demonstraram importante papel de ligações heterocromáticas no pareamento e segregação de pares cromossômicos que falham ao realizar recombinação em *Mus musculus*. Nossos resultados mostraram exclusão do complexo sinaptonêmico em pontes de DNA-tel, divergindo de parte das associações teloméricas heterólogas observadas em *Danio rerio*, intermediadas por extensão de eixos

SYCP3 (Blokhina *et al.*, 2019). Em contrapartida, desde o final do leptóteno até o paquíteno de *O. cayaporum*, Rad51 foi evidenciada na região terminal de alguns pares cromossômicos. Essa enzima é relacionada ao processo de recombinação meiótica, durante o qual une-se às extremidades portadoras de DSBs e, posteriormente, invade o cromossomo homólogo, buscando sequências de alta similaridade, a fim de permitir o reparo da quebra de DNA por *crossing-over* (Lan *et al.*, 2020). Estudos anteriores mostraram que esta enzima pode apresentar funções específicas em telômeros, tais como: (1) amplificação de repetições teloméricas, compreendendo um mecanismo independente de telomerase (Grandin e Charbonneau, 2003; Badie *et al.*, 2010); (2) reparo de DSBs da região telomérica e no capeamento da mesma (Tarsounas *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2016). Assim, sugerimos que as associações entre ITSs-Het, registradas durante o paquíteno de *O. cayaporum*, podem ser formadas em parte pela ação de parálogos de Rad51, durante o reparo de DSBs no DNA-tel.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o cariótipo de *O. cayaporum* possui $2n = 50$ cromossomos, e que fusões/fissões podem ter ocorrido ao longo da evolução de espécies neotropicais de *Opisthacanthus*. Os dados apresentados neste artigo evidenciaram ITSs em regiões pericentroméricas de cromossomos de *O. cayaporum*, que podem estar sujeitas aos processos de amplificação e dispersão entre os bivalentes. Análise meiótica revelou que o início da sinapse meiótica neste escorpião independe de organização *bouquet* dos telômeros. Além disso, demonstramos ocorrência de associações heterólogas entre ITSs (e destes com regiões teloméricas típicas), e sugerimos que as mesmas podem auxiliar no alinhamento dos homólogos durante metáfase I.

6. REFERÊNCIAS

ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MARTÍ DA, MOLA LM (2020) Chromosome puzzle in the southernmost populations of the medically important scorpion *Tityus bahiensis* (Perty 1833) (Buthidae), a polymorphic species with striking structural rearrangements. *Zoologischer Anzeiger* 288:139-150

ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MATTONI CI, MOLA LM (2015) Male and female meiosis in the mountain scorpion *Zabius fuscus* (Scorpiones, Buthidae): heterochromatin, rDNA and TTAGG telomeric repeats. *Genetica* 143:393-401

ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MOLA LM (2016) Sex-Linked chromosome heterozygosity in males of *Tityus confluens* (Buthidae): A clue about the presence of sex chromosomes in scorpions. Plos one 11: e0164427

AKSENOVA AY, HAN G, SHISHKIN AA, VOLKOV KV, MIRKIN SM (2015) Expansion of interstitial telomeric sequences in yeast. Cell Rep 13:1545-1551

AKSENOVA AY, MIRKIN SM (2019) At the beginning of the end and in the middle of the beginning: structure and maintenance of telomeric DNA repeats and interstitial telomeric sequences. Genes (Basel) 10:118

ALMEIDA BRR, MILHOMEM-PAIXÃO SSR, NORONHA RCR, NAGAMACHI CY, COSTA MJR, PARDAL PPO, COELHO JS, PIECZARKA JC (2017) Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). BMC Genetics 18:35.

ALMEIDA BRR, NORONHA RCR, DA COSTA MJR, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC (2019) Meiosis in the scorpion *Tityus silvestris*: new insights into achiasmatic chromosomes. Biol Open 8: bio040352.

ARAYA-JAIME C, SERRANO ÉA, DE ANDRADE SILVA DM, YAMASHITA M, IWAI T, OLIVEIRA C, FORESTI F (2015) Surface-spreading technique of meiotic cells and immunodetection of synaptonemal complex proteins in teleostean fishes. Mol Cytogenet 8:4

BADIE S, ESCANDELL JM, BOUWMAN P, CARLOS AR, THANASOULA M, GALLARDO MM, SURAM A, JACO I, BENITEZ J, HERBIG U, BLASCO MA, JONKERS J, TAROUNAS M (2010) BRCA2 acts as a RAD51 loader to facilitate telomere replication and capping. Nat Struct Mol Biol. 17:1461-1469.

BLOKHINA YP, NGUYEN AD, DRAPER BW, BURGESS SM (2019) The telomere bouquet is a hub where meiotic double-strand breaks, synapsis, and stable homolog juxtaposition are coordinated in the zebrafish, *Danio rerio*. Plos Genet 15: e1007730.

BOLZÁN AD (2017) Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function, instability and evolution. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 773: 51–65.

CABRAL-DE-MELLO DC, MAREC F (2021) Universal fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. *Mol Genet Genomics*. doi: 10.1007/s00438-021-01765-2.

CAVALCANTE MG, BASTOS CEMC, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, VICARI MR, NORONHA RCR (2018) Physical mapping of repetitive DNA suggests 2n reduction in Amazon turtles *Podocnemis* (Testudines: Podocnemididae). *plos one*13: e0197536

CHARLESWORTH B, SNIEGOWSKI P, STEPHAN W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.

CHIRINO MG, DALÍKOVÁ M, MAREC FR, BRESSA MJ (2017) Chromosomal distribution of interstitial telomeric sequences as signs of evolution through chromosome fusion in six species of the giant water bugs (Hemiptera, Belostoma). *Ecol Evol.* 7:5227-5235

DEON GA, GLUGOSKI L, VICARI MR, NOGAROTO V, SASSI FMC, CIOFFI MB, LIEHR T, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O. (2020) Highly rearranged karyotypes and multiple sex chromosome systems in armored catfishes from the genus *Harttia* (Teleostei, Siluriformes). *Genes (Basel)* 11:1366.

EYSTER C, CHUONG HH, LEE CY, PEZZA RJ, DAWSON D (2019) The pericentromeric heterochromatin of homologous chromosomes remains associated after centromere pairing dissolves in mouse spermatocyte meiosis. *Chromosoma* 128(3):355-367

FAJKUS P, PEŠKA V, ZÁVODNÍK M, FOJTOVÁ M, FULNEČKOVÁ J, DOBIAS Š, KILAR A, DVOŘÁČKOVÁ M, ZACHOVÁ D, NEČASOVÁ I, SIMS J, SÝKOROVÁ E, FAJKUS J (2019) Telomerase RNAs in land plants. *Nucleic Acids Res* 47:9842-9856

FRADE LFDS, ALMEIDA BRR, MILHOMEM-PAIXÃO SSR, READY JS, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, NORONHA RCR (2019) Karyoevolution of *Crenicichla heckel* 1840 (Cichlidae, Perciformes): a process mediated by inversions. *Biol Open*, 8: bio041699.

GASPIN C, RAMI JF, LESCURE B (2010) Distribution of short interstitial telomere motifs in two plant genomes: putative origin and function. *BMC Plant Biol* 10:283

GERLACH WL, BEDBROOK JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* 7:1869–1885.

GRANDIN N, CHARBONNEAU M. (2003) The Rad51 pathway of telomerase-independent maintenance of telomeres can amplify TG1-3 sequences in yku and cdc13 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23:3721-3734.

HE L, LIU J, TORRES GA, ZHANG H, JIANG J, XIE C (2013) Interstitial telomeric repeats are enriched in the centromeres of chromosomes in *Solanum* species. *Chromosome Res* 21:5-13.

HECKMANN S, JANKOWSKA M, SCHUBERT V, KUMKE K, MA W, HOUBEN A (2014) Alternative meiotic chromatid segregation in the holocentric plant *Luzula elegans*. *Nature Communications* 5:4979.

KAZEMI P, TAKETO T (2021) Two telomeric ends of acrocentric chromosome play distinct roles in homologous chromosome synapsis in the fetal mouse oocyte. *Chromosoma* 130:41-52.

KIROV I, KHRUSTALEVA L, VAN LAERE K, SOLOVIEV A, MEEUS S, ROMANOV D, FESENKO I (2017) DRAWID: user-friendly java software for chromosome measurements and idiogram drawing. *Comparative Cytogenetics* 11: 747-757

LAMPE DJ, WITHERSPOON DJ, SOTO-ADAMES FN, ROBERTSON HM (2003) Recent horizontal transfer of mellifera subfamily *Mariner* transposons into insect lineages representing four different orders shows that selection acts only during horizontal transfer. *Mol Biol Evol*, 20:554–562.

LAN WH, LIN SY, KAO CY, CHANG WH, YEH HY, CHANG HY, CHI P, LI HW. (2020) Rad51 facilitates filament assembly of meiosis-specific Dmc1 recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:11257-11264.

LETSOLO BT, DUNCAN JR, BAIRD M (2010) Fusion of short telomeres in human cells is characterized by extensive deletion and microhomology, and can result in complex rearrangements, *Nucleic Acids Research* 38: 1841–1852.

LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.

LIANGUZOV IA, DERIUSHEVA SE, SAĬFITDINOVA AF, MALYKH AG, GAGINSKAIA ER (2002) Monomers of a satellite sequence of chaffinch (*Fringilla coelebs* L., Aves: Passeriformes) genome contains short clusters of the TTTAGGG repeat. *Genetika* 38:1607-1613.

LIN KW, YAN J (2008) Endings in the middle: Current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658: 95–110.

LOURENÇO WR (2002) Scorpiones. In: ADIS, J. (org.). *Amazonian Arachnida and Miryapoda: identification keys to all classes, orders, families, some genera and a list of known terrestrial species*. Pensoft Publishers, Moscow, 399-438p.

LOURENÇO WR, WILMÉ L, WAEBER PO (2018) The genus *Opisthacanthus* Peters, 1861 (Scorpiones: Hormuridae), a remarkable Gondwanian group of scorpions. *C R Biol* 341:131-143.

MAO P, LIU J, ZHANG Z, ZHANG H, LIU H, GAO S, RONG YS, ZHAO Y (2016) Homologous recombination-dependent repair of telomeric DSBs in proliferating human cells. *Nat Commun* 7:12154

MATTOS VF, CARVALHO LS, CARVALHO MA, SCHNEIDER MC (2018) Insights into the origin of the high variability of multivalent-meiotic associations in holocentric chromosomes of *Tityus* (*Archaeotityus*) scorpions. *Plos One* 13: e0192070.

MATTOS VF, CELLA DM, CARVALHO LS, CANDIDO DM, SCHNEIDER MC (2013) High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. *Chromosome Research* 21:121-136

MOHAN KN, RANI BS, KULASHRESHTA PS, KADANDALE JS (2011) Characterization of TTAGG telomeric repeats, their interstitial occurrence and constitutively active telomerase in the mealybug *Planococcus lilacinus* (Homoptera; Coccoidea). *Chromosoma* 120:165-175.

MONOD L, PRENDINI L (2014). Evidence for Eurogondwana: the roles of dispersal, extinction and vicariance in the evolution and biogeography of Indo-Pacific Hormuridae (Scorpiones: Scorpionoidea). *Cladistics* 31:71–111.

NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, O'BRIEN PC, PINTO JA, MALCHER SM, PEREIRA AL, RISSINO JD, MENDES-OLIVEIRA AC, ROSSI RV, FERGUSON-SMITH MA (2013) FISH with whole chromosome and telomeric probes demonstrates huge karyotypic reorganization with ITS between two species of *Oryzomyini* (Sigmodontinae, Rodentia): *Hylaeamys megacephalus* probes on *Cerradomys langguthi* karyotype. *Chromosome Res* 21:107-119

NIWA O, SHIMANUKI M, MIKI F (2000) Telomere-led bouquet formation facilitates homologous chromosome pairing and restricts ectopic interaction in fission yeast meiosis. *EMBO J* 19:3831-3840.

OJANGUREN-AFFILASTRO AA, ADILARDI RS, CAJADE R, RAMÍREZ MJ, CECCARELLI FS, MOLA LM (2017) Multiple approaches to understanding the taxonomic status of an enigmatic new scorpion species of the genus *Tityus* (Buthidae) from the biogeographic island of Paraje Tres Cerros (Argentina). *PLoS One*. 12:e0181337.

PLÍŠKOVÁ J, KOVAŘÍK F, KOŠULIČ O, ŠT'ÁHLAVSKÝ F (2016) Description of a New species of *Heterometrus* Ehrenberg, 1828 (Scorpiones: Scorpionidae) from Thailand with remarks about the utilization of cytogenetic data in taxonomy of the genus. *Annales Zoologici*, 66: 467–476.

REGO A, MAREC F (2003) Telomeric and interstitial telomeric sequences in holokinetic chromosomes of Lepidoptera: telomeric DNA mediates association between postpachytene bivalents in achiasmatic meiosis of females. *Chromosome Res* 11:681-94.

REIN JO (2021) The Scorpion Files. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology. [Accessed 2021.01.23]. Available from <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>

ROAKE CM, ARTANDI SE (2020) Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:384–397

- ROSA KO, ZIEMNICZAK K, DE BARROS AV, NOGAROTO V, ALMEIDA MC, CESTARI MM, ARTONI RF, VICARI MR (2011) Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22:739–749.
- ROVATSOS MT, MARCHAL JA, ROMERO-FERNÁNDEZ I, FERNÁNDEZ FJ, GIAGIAATHANOSOPOULOU EB, SÁNCHEZ A (2011) Rapid, independent, and extensive amplification of telomeric repeats in pericentromeric regions in karyotypes of arvicoline rodents. *Chromosome Res.* 19:869-882.
- RUIZ-HERRERA A, NERGADZE SG, SANTAGOSTINO M, GIULOTTO E (2008) Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res* 122:219-228
- SAHARA K, MAREC F, TRAUT W (1999) TTAGG Telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res* 7: 449–460
- SCHERTHAN H, JERRATSCH M, LI B, SMITH S, HULTEN M, LOCK T, LANGE T (2000) Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores. *Molecular biology of the cell* 11:4189–4203
- SCHERTHAN H, SCHÖFISCH K, DELL T, ILLNER D (2014) Contrasting behavior of heterochromatic and euchromatic chromosome portions and pericentric genome separation in pre-bouquet spermatocytes of hybrid mice. *Chromosoma* 123:609-624.
- SCHNEIDER CH, GROSS MC, TERCENCIO 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. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 23: 201–214
- SCHNEIDER MC, MATTOS VF, CELLA DM (2021) The scorpion cytogenetic database. Available in www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpiondatabase
- SCHNEIDER MC, ZACARO AA, PINTO-DA-ROCHA R, CANDIDO DM, CELLA DM (2009) A comparative cytogenetic analysis of 2 Bothriuridae species and overview of the chromosome data of Scorpion. *Journal of Heredity*, 100: 545-555.

SCHRUMPFOVÁ PP, FAJKUS J (2020) Composition and function of telomerase-A polymerase associated with the origin of eukaryotes. *Biomolecules* 10:1425

SCHUMPERT C, NELSON J, KIM E, DUDYCHA JL, PATEL RC (2015) Telomerase activity and telomere length in *Daphnia*. *Plos one* 10: e0127196

SILVA CEFÉ, SOUZA EMS, ELER ES, SILVA MNF, FELDBERG E (2020) Comparison of the heterochromatin and telomeric sequences distribution in chromosomes of 11 species of Amazonian marsupials (Didelphimorphia; Didelphidae). *Genetics and Molecular Biology* 43: e20190357

SMITH EM, PENDLEBURY DF, NANDAKUMAR J (2020) Structural biology of telomeres and telomerase. *Cell. Mol. Life Sci.*, 77: 61–79

SOUZA G, VANZELA AL, CROSA O, GUERRA M (2016) Interstitial telomeric sites and robertsonian translocations in species of *Ipheion* and *Nothoscordum* (Amaryllidaceae). *Genetica* 144:157-166.

SRIKULNATH K, AZAD B, SINGCHAT W, EZAZ T (2019) Distribution and amplification of interstitial telomeric sequences (ITSs) in Australian dragon lizards support frequent chromosome fusions in Iguania. *Plos one* 14: e0212683.

SRINIVAS N, RACHAKONDA S, KUMAR R (2020) Telomeres and telomere length: A General Overview. *Cancers (Basel)*,12:558.

ŠTÁHLAVSKÝ F, KOVAŘÍK F, STOCKMANN M, OPATOVA V (2020) Karyotype evolution and preliminary molecular assessment of genera in the family Scorpipidae (Arachnida: Scorpiones). *Zoology*, 144:125882

ŠTÁHLAVSKÝ F, ŠTUNDLOVÁ J, LOWE G, STOCKMANN, M.; KOVAŘÍK, F. (2018) Application of cytogenetic markers in the taxonomy of flat rock scorpions (Scorpiones: Hormuridae), with the description of *Hadogenes weygoldti* sp. n. *Zoologischer Anzeiger*, 273:173-182

STIVISON EA, YOUNG KJ, SYMINGTON LS (2020) Interstitial telomere sequences disrupt break-induced replication and drive formation of ectopic telomeres. *Nucleic Acids Res* 48:12697-12710

- ŠTUNDLOVÁ J, ŠMÍD J, NGUYEN P, ŠTÁHLAVSKÝ F (2019) Cryptic diversity and dynamic chromosome evolution in Alpine scorpions (Euscorpiidae: Euscorpius). *Mol Phylogenet Evol*,134:152-163.
- SUMNER AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304–306.
- SWIER VJ, ANWARALI KHAN FA, BAKER RJ (2012) Do time, heterochromatin, NORs, or chromosomal rearrangements correlate with distribution of interstitial telomeric repeats in *Sigmodon* (cotton rats)? *J Hered* 103:493-502
- TARSOUNAS M, MUÑOZ P, CLAAS A, SMIRALDO PG, PITTMAN DL, BLASCO MA, WEST SC (2004) Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein. *Cell* 117:337-347.
- TSAI JH, MCKEE BD (2011) Homologous pairing and the role of pairing centers in meiosis. *Journal of cell science* 124:1955–1963.
- VIANA PF, RIBEIRO LB, SOUZA GM, CHALKIDIS HDM, GROSS MC, FELDBERG E (2016) Is the karyotype of neotropical boid snakes really conserved? Cytotaxonomy, chromosomal rearrangements and karyotype organization in the Boidae family. *Plos one* 11: e0160274
- WILSON EB (1931) The distribution of sperm-forming materials in scorpions. *Journal of Morphology and Physiology* 52:429-483
- YAMAZAKI K, YAHATA H, KOBAYASHI N, MAKIOKA T (2001) Egg maturation and parthenogenetic recovery of diploidy in the scorpion *Liocheles australasiae* (Fabricius) (Scorpions, Ischnuridae). *Journal of Morphology* 247: 39-50

Legenda das Figuras

Figura 1: Cariótipo meiótico de *O. cayaporum* $2n = 50$.

Figura 2: Distribuição de heterocromatina e DNAs repetitivos no genoma de *O. cayaporum*. (a) Bandeamento C; setas indicam blocos C positivos. (b) Telômeros; setas demonstram ITS. (c) Localização cromossômica de cópias do transposon *Mariner*. (d) 45S rDNA.

Figura 3: Dinâmica da coesina SMC3 e telômeros durante meiose I de *O. cayaporum*. (a-d) Célula pré-meiótica. (e-h) Leptóteno. (i-l) Zigóteno inicial. (m-p) Zigóteno tardio. (q-t) Paquíteno inicial/intermediário; a seta indica o ITS na região pericentromérica do par 2. (u-z) Metáfase I.

Figura 4: Distribuição espacial de *foci* Rad51 durante Prófase I de *O. cayaporum*. (a) Leptóteno tardio. (b) Zigóteno inicial. (c) Zigóteno tardio. (d) Paquíteno inicial. (e) Paquíteno intermediário. (f) Paquíteno tardio.

Figura 5: Análise quantitativa de (a) associações teloméricas meióticas e (b) quantidade de *foci* Rad51 distribuídos em regiões terminais e intersticiais durante paquíteno inicial/intermediário.

Figura 1

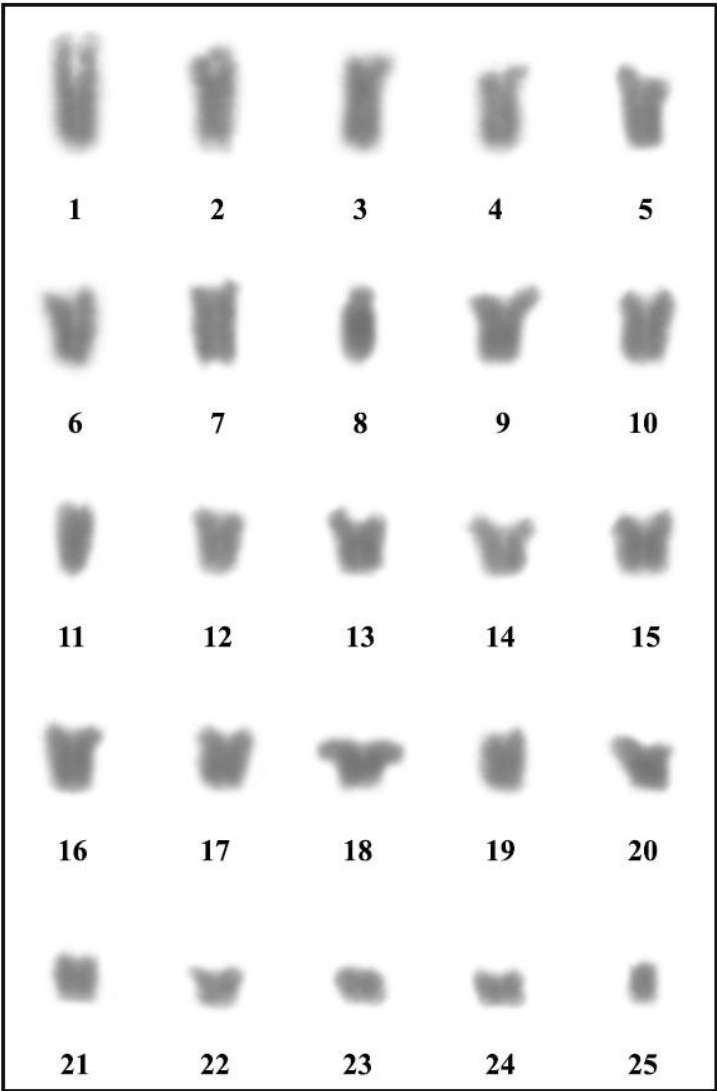


Figura 2

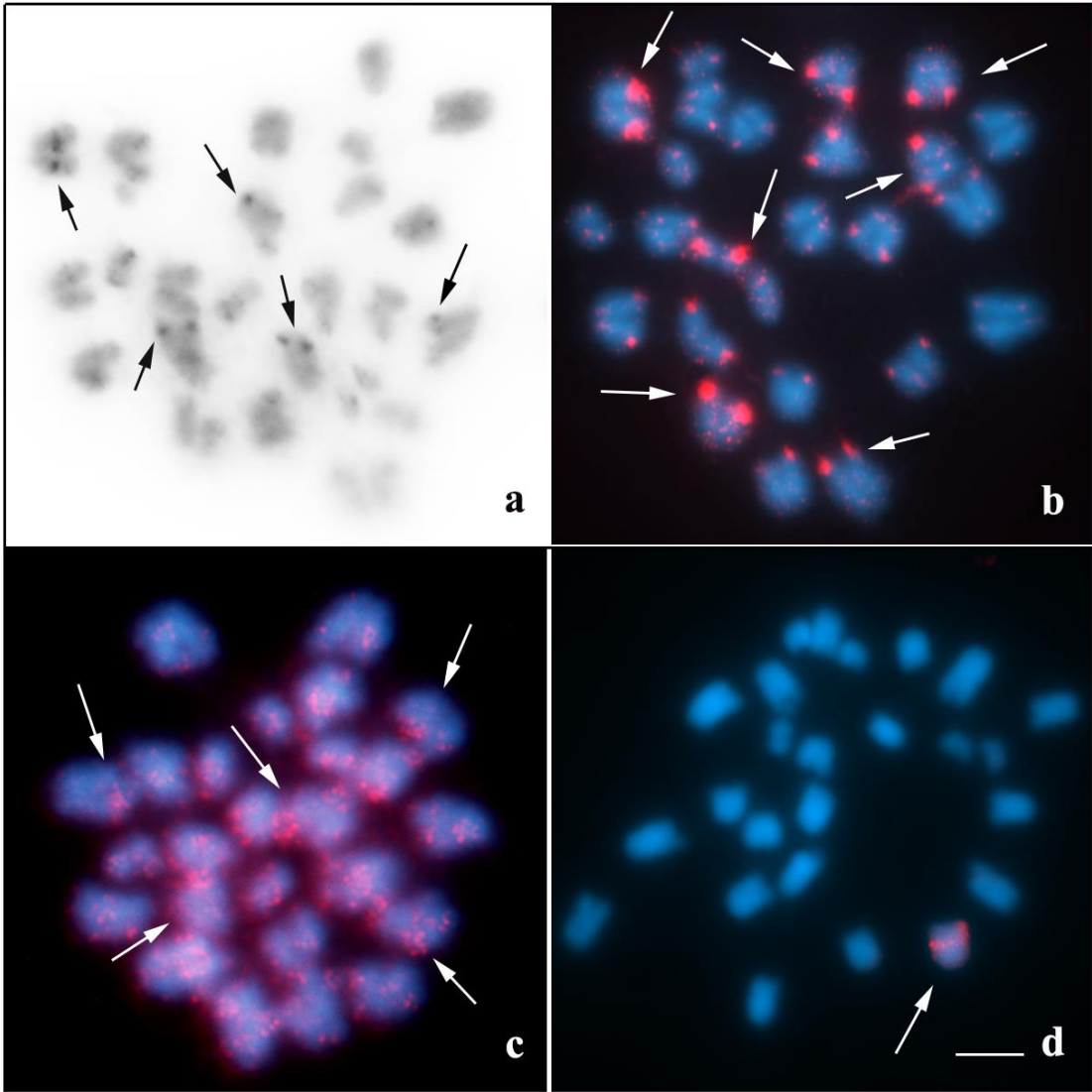


Figura 3

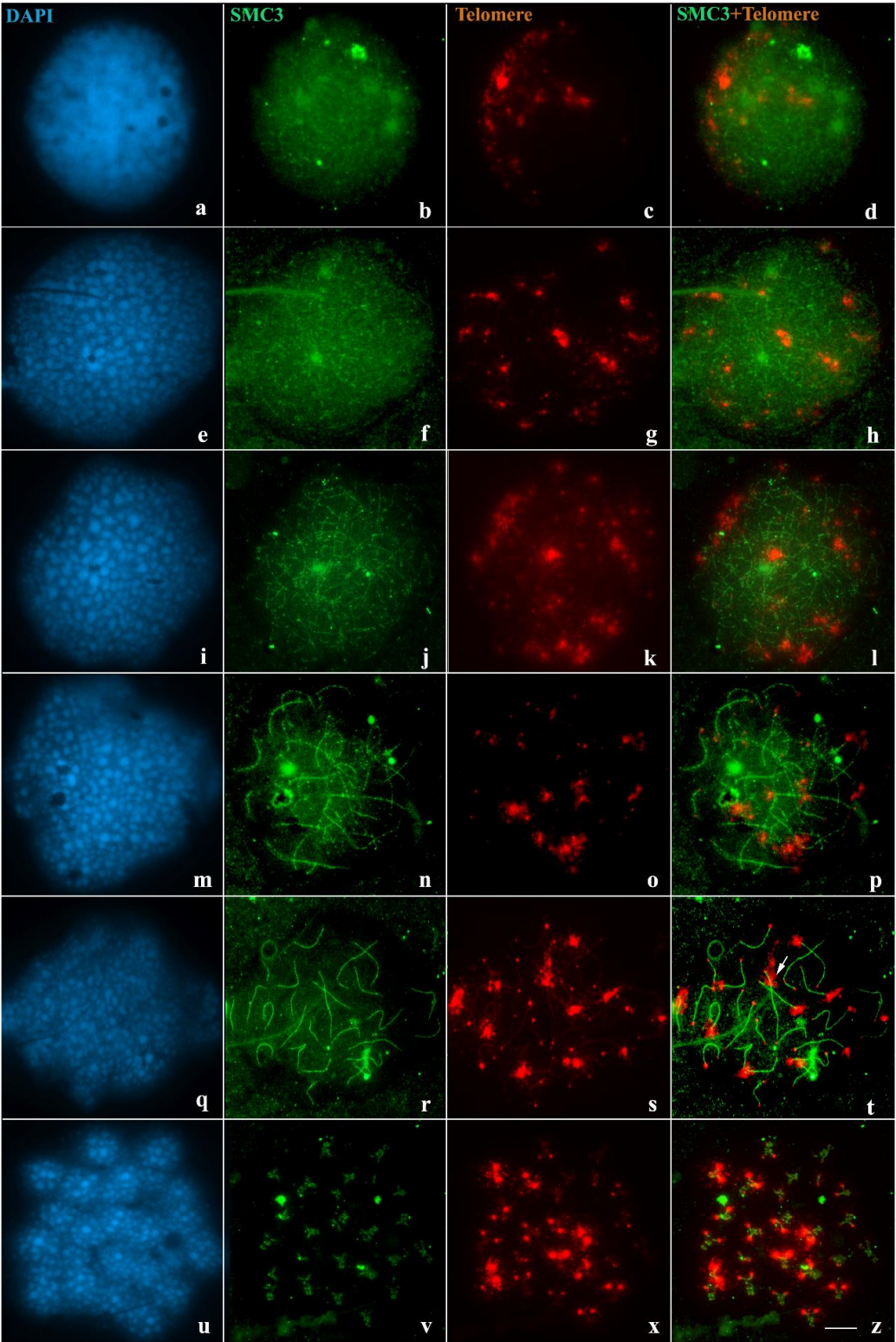


Figura 4

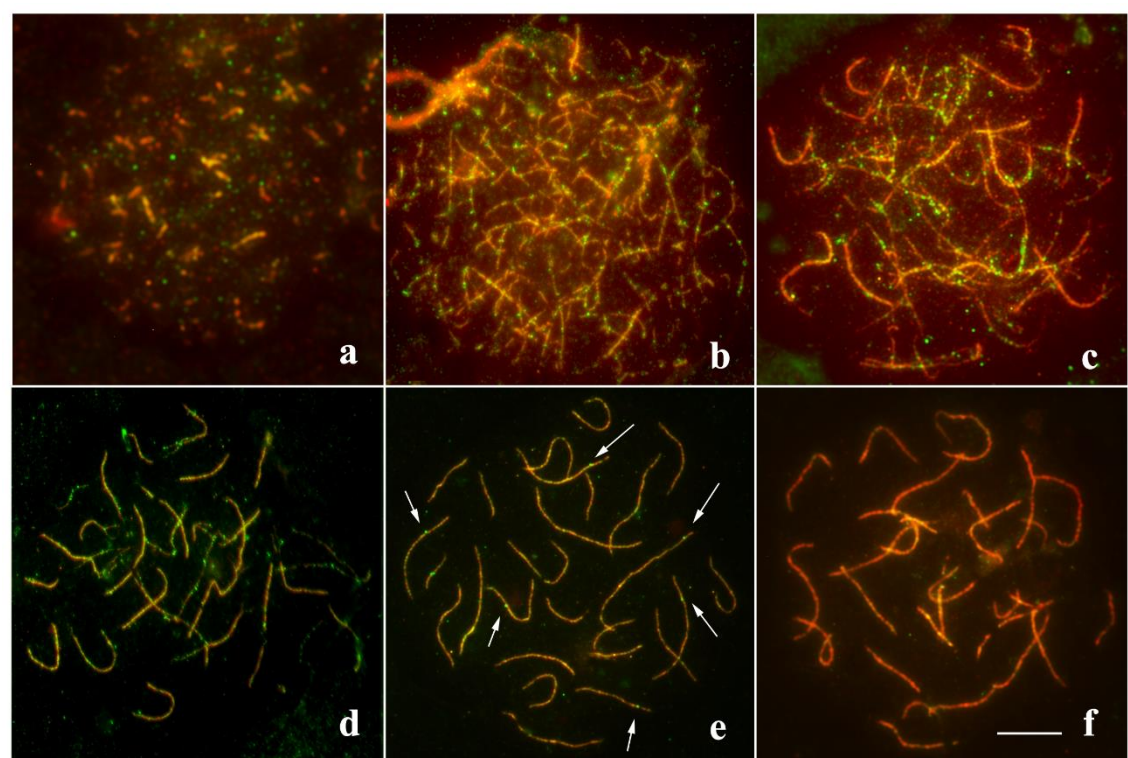
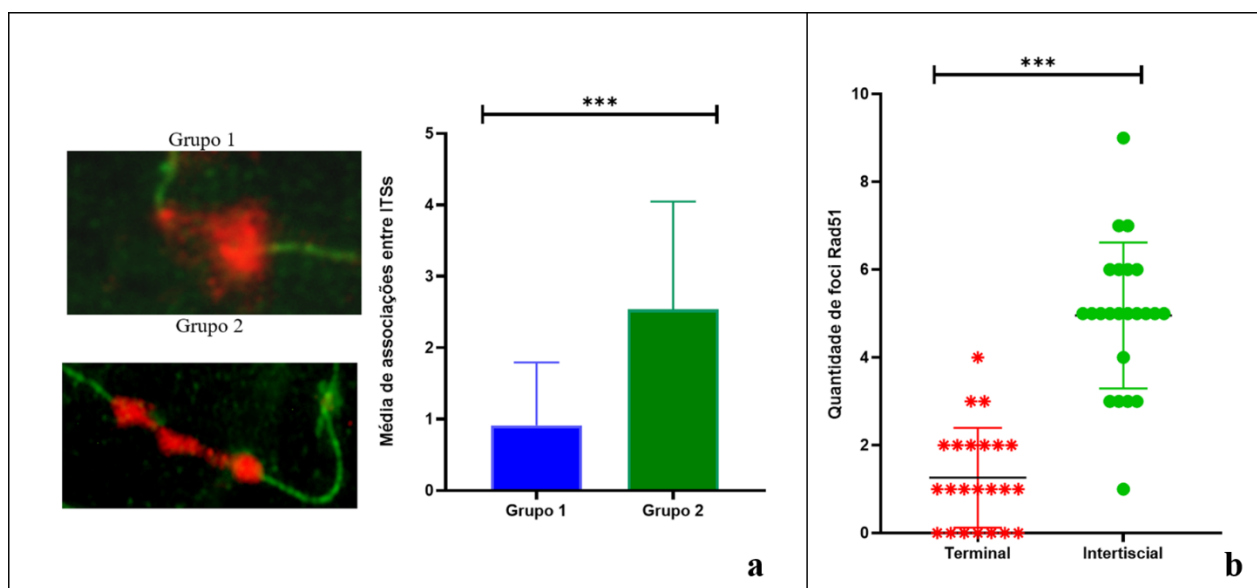


Figura 5



5. CONCLUSÕES

As principais conclusões do presente estudo são:

- a) *Tityus metuendus*, *Brotheas amazonicus* e *Tityus silvestris* apresentam variações geográficas em seus cariótipos e podem constituir complexos de espécies crípticas.
- b) Durante meiose I em *Tityus maranhensis* associações quadrivalentes apresentam atraso no processo sináptico em relação à bivalentes.
- c) Há formação e reparo de DSBs e expressão de enzimas de reparo *mismatch* durante meiose aquiasmática em *T. silvestris*.
- d) Em *Tityus maranhensis*, cromossomos apresentam atividade holocinética em metáfase I e telocinética em metáfase II.
- e) A trimetilação da Histona H3 na lisina 27 é importante para progressão da sinapse em *Tityus silvestris*.
- f) Rearranjos do tipo fusão/fissão foram responsáveis pela formação do cariótipo bimodal de *Neochactas parvulus*.
- g) Diferentes formas de heteromorfismos do 45S rDNA e multivalentes meióticos em *B. amazonicus* são explicados, principalmente, pela ação de translocações recíprocas.
- h) Sequências teloméricas intersticiais em *O. cayaporum* são de natureza heterocromática e associações heterólogas entre estes ITSs durante o paquíteno podem contribuir para segregação correta dos cromossomos homólogos.

6. REFERÊNCIAS

- ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MARTÍ DA, MOLA LM (2020) Chromosome puzzle in the southernmost populations of the medically important scorpion *Tityus bahiensis* (Perty 1833) (Buthidae), a polymorphic species with striking structural rearrangements. *Zoologischer Anzeiger* 288:139-150
- ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MATTONI CI, MOLA LM (2015) Male and female meiosis in the mountain scorpion *Zabius fuscus* (Scorpiones, Buthidae): heterochromatin, rDNA and TTAGG telomeric repeats. *Genetica*, 143(4), 393–401. doi:10.1007/s10709-015-9838-1
- ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, MOLA LM (2016) Sex-linked chromosome heterozygosity in males of *Tityus confluens* (Buthidae): a clue about the presence of sex chromosomes in scorpions. *PLoS ONE* 11:10.
- ADILARDI RS, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, RODRÍGUEZ GIL SG, SCIOSCIA CL, AND MOLA LM. (2013) Meiotic studies in *Brachistosternus alienus* (Scorpiones; Bothriuridae). *The Journal of Arachnology* 41:222-226.
- ALMEIDA BRR, MILHOMEM-PAIXÃO SSR, NORONHA RCR, NAGAMACHI CY, COSTA MJR, PARDAL PPO, COELHO JS, PIECZARKA JC (2017) Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). *BMC Genetics* 18:35.
- ALTIERO T, REBECCHI L (2003) First evidence of achiasmatic male meiosis in the water bears *Richtersius coronifer* and *Macrobiotus richtersi* (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Hereditas* 139: 116–120.
- BRASIL, Ministério da saúde (2009) Manual de Controle de Escorpiões. Ministério da Saúde, Brasília, 72p.
- BRAZIL TK, PORTOTJ (2011) Os escorpiões. Edufba, Salvador, 83p.
- CABRAL G, MARQUES A, SCHUBERT V, PEDROSA-HARAND A, SCHLÖGELHOFER P (2014) Chiasmatic and achiasmatic inverted meiosis of plants with holocentric chromosomes. *Nat Commun* 5:1-11

CABRAL-DE-MELO DC, MOURA RC, MARTINS C (2010) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provide the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity* 104:393-400.

CARVALHO LS, BRESCOVIT AD, SOUZA CAR, RAIZER J (2017) Checklist dos escorpiões (Arachnida, Scorpiones) do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 107:e2017108.

CHIPPAUX JP e GOYFFON M (2008) Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Tropica*, 107 (2):9-71.

CHUNG KS, WEBER JÁ, HIPPEL AL (2011) Dynamics of chromosome number and genome size variation in a cytogenetically variable sedge (*Carex scoparia* var. *scoparia*, Cyperaceae). *American Journal of Botany* 98:122-129.

COLGAN DJ, MCLAUCHLAN A, WILSON GDF, LIVINGSTON SP, EDGECOMBE GD, MACARANAS J, CASSIS G, GRAY MR (1998) Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Austral J Zool* 46: 419–437.

CUACOS MH, FRANKLIN FC, HECKMANN S (2015) Atypical centromeres in plants what they can tell us. *Frontiers in Plant Science*, 6:1-15.

D'ALENÇON E, SEZUTSU H, LEGEAI F, PERMAL E, BERNARD-SAMAIN S, GIMENEZ, S, ET AL. (2010) Extensive synteny conservation of holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangements. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107: 7680–7685.

DRINNENBERG IA, YOUNG D, HENIKOFF S, MALIK HS (2014) Recurrent loss of cenH3 is associated with independent transitions to holocentricity in insects. *Elife* 3: e03676.

ESPOSITO LA, YAMAGUTI HY, SOUZA CA, PINTO-DA-ROCHA R, PRENDINI L. (2017) Systematic revision of the neotropical club-tailed scorpions, *Physoctonus*, *Rhopalurus*, and *Troglophopalus*, revalidation of *Heteroctenus*, and descriptions of two new genera and three new species (Buthidae, Rhopalurusinae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 415.

- FELSENSTEIN J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- FUJIWARA H, OSANAI M, MATSUMOTO T, KOJIMA KK (2005) Telomere-specific non-LTR retrotransposons and telomere maintenance in the silkworm, *Bombyx mori*. *Chromosome Res.* 13:455–467.
- GASSMANN R, RECHTSTEINER A, YUEN KW, MUROYAMA A, EGELHOFFER T, GAYDOS L, BARRON F, MADDOX P, ESSEX A, MONEN J, ERCAN S, LIEB JD, OEGEMA K, STROME S, DESAI A. (2012) An inverse relationship to germline transcription defines centromeric chromatin in *C. elegans*. *Nature* 484:537–584
- GERLACH WL, BEDBROOK JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* 7:1869–1885.
- GRAY S, COHEN PE (2016) Control of meiotic crossovers: from double-strand break formation to designation. *Annu Rev Genet.* 23:175-210
- GUIDON S, DUFAYARD JF, LEFORT V, ANISIMOVA M, HORDJIK W, GASCUEL O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307-321
- GUO J, WANG L, WU H, CAO Y, XIAO R, LAI X, XUESHUANG L, JIANBO L, JIEQUN YI, ZHANG, G (2018) Molecular characterization and expression of vitellogenin genes from the wolf spider *Pardosa pseudoannulata* (Araneae: Lycosidae). *Physiological Entomology*. doi:10.1111/phen.12259
- HALL TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- HAMMER Ø, HARPER DAT, RYAN PD (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. Disponível em: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- HAWLEY RS (2002) Meiosis: how male flies do meiosis. *Curr Biol* 12:660-662
- HECKMANN S, SCHROEDER-REITER E, KUMKE K, MA L, NAGAKI K, MURATA M, WANNER G, HOUBEN A (2011) Holocentric chromosomes of *Luzula*

elegans are characterized by a longitudinal centromere groove, chromosome bending, and a terminal Nucleolus Organizer Region. Cytogenet Genome Res. 134:220-228

HECKMANN S, JANKOWSKA M, SCHUBERT V, KUMKE K, MA W, *et al.* (2014) Alternative meiotic chromatid segregation in the holocentric plant *Luzula elegans*. Nat Commun 5:, 4979. (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms5979>

HILL J, RASTAS P, HORNETT EA, NEETHIRAJ R, CLARK N, MOREHOUSE N, CELORIO-MANCERA MLP, COLS JC, DIRCKSEN H, MESLIN C, *et al.* (2019). Unprecedented reorganization of holocentric chromosomes provides insights into the enigma of lepidopteran chromosome evolution. Science Advances, 5: eaau3648.

HOLLINGSWORTH NM, BRILL SJ (2004) The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions. Genes Dev 15:117-125. doi: 10.1101/gad.1165904

HOLM PB, RASMUSSEN SW (1980) Chromosome pairing, recombination nodules and chiasma formation in diploid *Bombyx* males. Carlsberg Res Commun 45:483–548

HOWARD RJ, EDGECOMBE GD, LEGG DA, PISANI D, LOZANO-FERNANDEZ J (2019) Exploring the evolution and terrestrialization of scorpions (Arachnida: Scorpiones) with rocks and clocks. Org Divers Evol 19:71–86

HUELSENBECK JP, RONQUIST F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17: 754–755

JANKOWSKA M, FUCHS J, KLOCKE E, FOJTOVÁ M, POLANSKÁ P, FAJKUS J, SCHUBERT V, HOUBEN A (2015) Holokinetic centromeres and efficient telomere healing enable rapid karyotype evolution. Chromosoma.124:519-528.

KIMURA M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16:111–120.

KIROV I, KHRUSTALEVA L, VAN LAERE K, SOLOVIEV A, MEEUS S, ROMANOV D, FESENKO I (2017) DRAWID: user-friendly java software for

chromosome measurements and idiogram drawing. *Comparative Cytogenetics* 11(4): 747-757

KOHL KP, JONES CD, SEKELSKY J (2012) Evolution of an MCM complex in flies that promotes meiotic crossovers by blocking BLM helicase. *Science* 338:1363-1365.. doi: 10.1126/science.1228190.

KRÁL J, FORMAN M, KOŘÍNKOVÁ T, LERMA ACR, HADDAD CR, MUSILOVÁ J, ŘEZÁČ M, HERRERA IMA, THAKUR R, DIPPENAAR-SCHOEMAN AS, *et al.* (2019) . Insights into the karyotype and genome evolution of haplogyne spiders indicate a polyploid origin of lineage with holokinetic chromosomes. *Sci Rep* 9, 3001. (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39034-3>

KURY A, GIUPPONI A, CHAGAS-JR A, GONZÁLEZ A (2016) Amblypygi, Opiliones, Schizomida, Scorpiones and Chilopoda, Tocantins, Brazil. *Check List* 6: 564-571.

LAMPE DJ, WITHERSPOON DJ, SOTO-ADAMES FN, ROBERTSON HM (2003) Recent horizontal transfer of mellifera subfamily Mariner transposons into insect lineages representing four different orders shows that selection acts only during horizontal transfer. *Mol Biol Evol*, 20:554–562.

LEO L, MARCHETTI M, GIUNTA S, FANTI L (2020). Epigenetics as an Evolutionary Tool for Centromere Flexibility. *Genes* 2020, 11: 809.

LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.

LIMA JF, CARVALHO LS, SCHNEIDER MC (2020) The first chromosomal analysis of bisexual populations of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* (Scorpiones: Buthidae). *The Journal of Arachnology* 48:77-83.

LOURENÇO WR (2002) Scorpiones. In: ADIS,J. (org.). *Amazonian Arachnida and Miryapoda: identification keys to all classes, orders, families, some genera an list of know terrestrial species*. Pensoft Publishes, Moscow, 399-438p.

LOURENÇO WR (2010) The disrupted pattern of distribution of the genus *Hadrurochactas* Pocock; evidence of past connections between Amazon and the Brazilian Atlantic forest. *Comptes Rendus Biologies*, 333: 41–47.

LOURENÇO WR (2015) What do we know about some of the most conspicuous scorpion species of the genus *Tityus*? A historical approach. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 21:1-20

LOURENÇO WR (2017) Description of a new species of *Opisthacanthus* Peters (Scorpiones: Hormuridae) from Suriname/Brazil border with some biogeographic considerations. *Acta Biológica Paranaense*, 46. doi:10.5380/abpr.v46i0.50350

LOURENÇO WR (2018). Scorpions and life-history strategies: from evolutionary dynamics toward the scorpionism problem. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 24(19).

LUKHTANOV VA, DINČA V, FRIBERG M, ŠÍCHOVÁ J, OLOFSSON M, VILA R, MAREC F *et al.* (2018) Versatility of multivalent orientation, inverted meiosis, and rescued fitness in holocentric chromosomal hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: E9610-E9619.

MARQUES A, PEDROSA-HARAND (2016) Holocentromere identity: from the typical mitotic linear structure to the great plasticity of meiotic holocentromeres. *Chromosoma* 125:669-681

MARQUES A, RIBEIRO T, NEUMANN P, MACAS J, NOVÁK P, SCHUBERT V, PELLINO M, FUCHS J, MA W, KULMANN M, *et al.* (2015). Holocentromeres in *Rhynchospira* are associated with genome-wide centromere-specific repeat arrays interspersed among euchromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44),: 13633–13638. doi:10.1073/pnas.1512255112

MATTONI CI, GARCÍA-HERNÁNDEZ S, BOTERO-TRUJILLO R, OCHOA JA, OJANGUREN-AFFILASTRO AA, PINTO-DA-ROCHA R, *et al.* (2015) Scorpion Sheds ‘Tail’ to Escape: Consequences and Implications of Autotomy in Scorpions (Buthidae: Ananteris). *PLoS ONE* 10(1): e0116639.

MATTOS VF, CARVALHO LS, CARVALHO MA, SCHNEIDER MC (2018) Insights into the origin of the high variability of multivalent-meiotic associations in holocentric chromosomes of *Tityus*(*Archaeotityus*) scorpions. PLoS ONE 13(2): e0192070.

MATTOS VF, CARVALHO LS, CELLA DM, SCHNEIDER MC (2014) Location of 45S ribosomal genes in mitotic and meiotic chromosomes of Buthid scorpions. Zoolog Sci. 31:603-607.

MATTOS VF, CELLA DM, CARVALHO LS, CANDIDO DM, SCHNEIDER MC (2013) High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. Chromosome Res. 21:121-136

MELTERS DP, PALIULIS LV, KORF IF, CHAN SWF (2012) Holocentric chromosome: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. Chromosome Research 20: 579-593.

MIRZAGHADERI G, HÖRANDL E (2016). The evolution of meiotic sex and its alternatives. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 283: 20161221.

MOENS PB, MARCON E, SHORE JS, KOCHAKPOUR N, SPYROPOULOS B (2007) Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. J. Cell Sci. 120:1017-1027

MOLA LA, PAPESCHI AG (2006) Holokinetic chromosome an glance. Journal of Basic & Applied Genetics 17(1): 17-33.

MONOD L, PRENDINI L (2014) Evidence for Eurogondwana: the roles of dispersal, extinction and vicariance in the evolution and biogeography of Indo-Pacific Hormuridae (Scorpiones: Scorpionoidea). Cladistics 31: 71–111.

OCHOA JA, ROJAS-RUNJAIC FJM, PINTO-DA-ROCHA R, PRENDINI L (2013) Systematic revision of the neotropical scorpion genus *Chactopsis* Kraepelin, 1912 (Chactioidea: Chactidae), with descriptions of two new genera and four new species. Bulletin of the American Museum of Natural History, 378.

OJANGUREN-AFFILASTRO AA, ADILARDI RS, CAJADE R, RAMÍREZ MJ, CECCARELLI FS, MOLA LM (2017) Multiple approaches to understanding the taxonomic status of an enigmatic new scorpion species of the genus *Tityus* (Buthidae)

from the biogeographic island of Paraje Tres Cerros (Argentina). PLoS ONE 12(7): e0181337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181337>

OLIVEIRA L, NEUMANN P, JANG T-S, KLEMME S, SCHUBERT V, KOBLÍŽKOVÁ A, HOUBEN A, AND MACAS J (2020) Mitotic Spindle Attachment to the Holocentric Chromosomes of *Cuscuta europaea* Does Not Correlate With the Distribution of CENH3 Chromatin. Front. Plant Sci. 10:1799. doi: 10.3389/fpls.2019.01799.

POLIS GA (1990) The biology of Scorpions. Stanford University Press, California, 587 p.

POPA A (2011) The evolution of recombination and genomic structures: a modeling approach. Bioinformatics [q-bio.QM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. English.

PORTO TJ, BRAZIL TK, LIRA-DA-SILVA RM (2010). Scorpions, state of Bahia, northeastern Brazil. Check List, 6: 292.

QUMSIYEH MB, AMR ZS, SROUR KTA, AL-FAWAGHRA N. (2014) Karyotype for *Nebo hierichonticus* (Simon 1872) from the Palestinian Territories (Scorpiones: Scorpionidae). Cytologia. 2014;79(2):277–80.. 10.1508/cytologia.79.277

QUMSIYEH MB, SALMAN INA, SALSAA M, AMR ZS (2013) Records of scorpions from of Palestinian Territories, with the first chromosomal data (Arachnida: Scorpiones). Zoology in the Middle East, 59 (1):70-76.

REIN JO (2021) The Scorpion Files. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology. [Accessed 2021.01.23]. Available from <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>

RIBEIRO T, MARQUES A, NOVÁK P, SCHUBERT V, VANZELA ALL, MACAS J, HOUBEN A, PEDROSA-HARAND A (2016) Centromeric and non-centromeric satellite DNA organization differs in holocentric *Rhynchospora* species. Chromosoma 126:325-335.

- SADÍLEK D, NGUYEN P, KOÇ H, KOVAŘÍK F, YAĞMUR EA, ŠTÁHLAVSKÝ F (2015). Molecular cytogenetics of Androctonusscorpions: an oasis of calm in the turbulent karyotype evolution of the diverse family Buthidae. *Biological Journal of the Linnean Society*, 115(1), 69–76.
- SAHARA K, MAREC F, TRAUT W (1999) TTAGG Telomeric Repeats in Chromosomes of Some Insects and Other Arthropods. *Chromosome Res* 7: 449–460
- SANTOS GCS DG, DIONISIO-DA-SILVA W, SOUZA-ALVES JP, ALBUQUERQUE CM RD, LIRA AF DA (2018) Random or clumped: How litter dwelling scorpions are distributed in a fragment of Brazilian Atlantic forest. *Eur. J. Entomol.* 115: 445-449.
- SANTOS-DA-SILVA ADP, CARVALHO LS, BRESCOVIT AD (2017). Two new species of *Bothriurus* Peters, 1861 (Scorpiones, Bothriuridae) from Northeastern Brazil. *Zootaxa* 4258: 238.
- SATOMURA K, OSADA N, ENDO T (2019). Achiasmy and sex chromosome evolution. *Ecological Genetics and Genomics* 13:100046.
- SCHNEIDER MC, CELLA DM (2010) Karyotype conservation in 2 populations of the parthenogenetic scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and Its associated heterochromatin are concentrated on only one chromosome. *Journal of Heredity* 101(4): 491-496.
- SCHNEIDER MC, MATTOS VF, CELLA, DM (2020) The scorpion cytogenetic database. Available in www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpiondatabase
- SCHNEIDER MC, ZACARO AA, PINTO-DA-ROCHA R, CANDIDO DM, CELLA DM (2009a) A comparative cytogenetic analysis of 2 Bothriuridae species and overview of the chromosome data of Scorpion. *Journal of Heredity*, 100: 545-555.
- SCHNEIDER MC, ZACARO AA, PINTO-DA-ROCHA R, CANDIDO DM, CELLA DM (2009b) Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. *Chromosome Res.* 17: 883-898
- SCHNEIDER MC, MATTOS VF, CARVALHO LS, CELLA DM (2015) Organization and behavior of the synaptonemal complex during achiasmatic meiosis of four buthid scorpions. *Cytogenet Genome Res.* 144:341-347.

SCHUBERT V, NEUMANN P, MARQUES A, HECKMANN S, MACAS J, PEDROSA-HARAND A, SCHUBERT I, JANG TS *et al.* (2020). Super-Resolution Microscopy Reveals Diversity of Plant Centromere Architecture. *International Journal of Molecular Sciences*, 21:(10), 3488. doi:10.3390/ijms21103488

SHANAHAN CM (1989a). Cytogenetics of Australian Scorpions I. Interchange polymorphism in the family Buthidae. *Genome*, 32: 882-889.1989A.

SHANAHAN CM (1989b) Cytogenetics of Australian Scorpions II. Chromosome polymorphism in species of *Urodacus* (family Scorpionidae). *Genome*, 32: 890-900.1989B

SHANAHAN CM HAYMAN DL (1990). Synaptonemal complex formation in male scorpions exhibiting achiasmate meiosis and structural heterozygosity. *Genome*, 33(6): 914–926.

SHARMA PP, FERNANDEZ R, ESPOSITO LA, GONZALEZ-SANTILLAN E, MONOD L (2015). Phylogenomic resolution of scorpions reveals multilevel discordance with morphological phylogenetic signal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282: 20142953–20142953.

SIMON P (2003) Q-gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 19(11):1439-1440.

SLOANE MA, SUNNUCKS P, WILSON ACC, HALES DF (2001). Microsatellite isolation, linkage group identification and determination of recombination frequency in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Genetics Research*, 77:251-260

SOLEGLAD ME, FET V (2003) The scorpion sternum: structure and phylogeny (Scorpiones: Osthosterni). *Euscorpius*, 5: 1-36.

ŠTÁHLAVSKÝ F, NGUYEN P, SADÍLEK D, ŠTUNDLOVÁ J, JUST P, HADDAD CR, KOČ H, RANAWANA KB, STOCKMANN M, YAĞMUR EA, KOVAŘÍK F. (2020) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of buthid scorpions (Chelicerata: Arachnida)., *Biological Journal of the Linnean Society*, blaa118, <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa118>

ŠTÁHLAVSKÝ F, ŠTUNDLOVÁ J, LOWE G, STOCKMANN M, KOVAŘÍK F (2018) Application of cytogenetic markers in the taxonomy of flat rock scorpions (Scorpiones: Hormuridae), with the description of *Hadogenes weygoldti* sp. n. Zoologischer Anzeiger, 273:, 173–182.

ŠTUNDLOVÁ J, ŠMÍD J, NGUYEN P, ŠTÁHLAVSKÝ F (2019) Cryptic diversity and dynamic chromosome evolution in Alpine scorpions (Euscorpiidae: Euscorpius). Molecular Phylogenetics and Evolution 134:152-163.

SUBIRANA JA, MESSEGUER X (2013) A Satellite Explosion in the Genome of Holocentric Nematodes. PLoS One, 8(4), e62221.

SUMNER AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Research 75: 304–306.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S., (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30:2725-2729.

UBINSKI CV, CARVALHO LS, SCHNEIDER MC (2018) Mechanisms of karyotype evolution in the Brazilian scorpions of the subfamily Centruroidinae (Buthidae). Genetica 146: 475–486

VIERA A, SANTOS JL, PARRA MT, CALVENTE A, GÓMEZ R, DE LA FUENTE R, SUJA JA, PAGE J, RUFAS JS (2009) Cohesin axis maturation and presence of RAD51 during first meiotic prophase in a true bug. Chromosoma. 118:575-589

VÍTIKOVÁ M, KRÁL J, TRAUT W, ZRZAVÝ J, MAREC F (2005) The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n. Chromosome Research, 13 (2): 145-156

WARBURG MR (2011) Scorpion reproductive strategies, allocation and potential; a partial review. Eur. J. Entomol. 108(2): 173-181.

WERNER PFARR, GERALD WEBERSINKE, CHRISTIAN PAAR, AND CHRISTIAN WECHSELBERGER (2005) Immunodetection of 5'-methylcytosine on Giemsa-stained chromosomes. BioTechniques 38:527-530

YAMAZAKI, K., YAHATA, H., KOBAYASHI, N., & MAKIOKA, T. (2000). Egg maturation and parthenogenetic recovery of diploidy in the scorpion *Liocheles australasiae* (Fabricius) (Scorpions, Ischnuridae). *Journal of Morphology*, 247(1), 39–50. doi:10.1002/1097-4687(200101)247:1<39::aid-jmor1002>3.0.co;2-h

YTHIER E (2018) A synopsis of the scorpion fauna of French Guiana, with description of four new species. *ZooKeys* 764: 27-90.

ZEDEK F, BUREŠ P (2017) Holocentric chromosomes: from tolerance to fragmentation to colonization of the land. *Annals of Botany* 121: 9–16.

ZICKLER D (2006) From early homologue recognition to synaptonemal complex formation. *Chromosoma* 115:158-174