

Paulo Gonzalez Hofstatter

Evolução da meiose e sexo em Amoebozoa

Evolution of meiosis and sex in Amoebozoa

São Paulo

2019

Paulo Gonzalez Hofstatter

Evolução da meiose e sexo em Amoebozoa

Evolution of meiosis and sex in Amoebozoa

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências, na área de Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel José Galafasse Lahr

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,
com os dados fornecidos pelo autor no formulário:
<http://www.ib.usp.br/biblioteca/ficha-catalografica/ficha.php>

Hofstatter, Paulo Gonzalez
Evolução da meiose e sexo em Amoebozoa / Paulo
Gonzalez Hofstatter; orientador Daniel José Galafasse
Lahr. -- São Paulo, 2019.
157f.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Zoologia.

1. ameba. 2. Amoebozoa. 3. meiose. 4. sexo. I. Lahr,
Daniel José Galafasse, orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura da catalogação da publicação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Comissão julgadora

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Orientador:

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a toda a equipe do laboratório de evolução de protistas por terem me acolhido com carinho e compartilhado os últimos três ou quatro anos de nossas rotinas diárias, em especial Giulia, Alfredo e Tainá.

Gostaria de agradecer também ao meu orientador Daniel Lahr por ter me recebido em sua equipe e por todos estes anos de orientação, nos quais aprendi muito e cresci academicamente.

Cabe também um agradecimento especial ao meu amigo Igor Cesarino por todo o apoio dado desde o começo deste doutorado e pelos longos anos de amizade e acolhida dentro e fora do Brasil. Sem ele, este doutorado não seria possível.

Agradeço à Sociedade Internacional de Protistologia e à Sociedade de Protistologia Evolucionária pelos auxílios para participar de congressos.

Finalmente, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro oferecido pelos projetos nº 2015/06306-0 e 2017/04391-5. Sem o apoio da Fapesp, a execução deste projeto não seria possível.

Resumo

O sexo é inerente à vida eucariótica. Distante do senso comum, sexo pode ser definido como plasmogamia (fusão celular) seguida, eventualmente, de meiose. Ambos os processos são fundamentais para qualquer ciclo de vida sexual e requerem uma maquinaria específica. Muitos componentes desta maquinaria já foram identificados e permanecem altamente conservados entre as linhagens mais distantes, realizando basicamente as mesmas funções em todos os grupos. Esta caixa de ferramentas da meiose pode ser usada como uma indicação de processos meióticos, mesmo quando tais processos não foram observados ainda. Mesmo que o ancestral de todos os eucariotos seja presumidamente sexuado, alguns grupos são tratados como assexuais por muitos autores na literatura baseados na falta de ciclos sexuais observáveis em cultura. Entre estes 'assexuais' estão as amebas pertencentes a Amoebozoa, um super-grupo eucariótico. Muitas linhagens de Amoebozoa são consideradas assexuadas, mas alguns gêneros mais bem estudados dentro do super-grupo foram demonstrados como sendo plenamente sexuados, por exemplo, *Trichosphaerium*, *Physarum*, *Dictyostelium*. Alguns outros gêneros exibem evidências indiretas para processos sexuais e podem ser sexuadas também. A ocorrência de organismos sexuais dentro de Amoebozoa aponta para um ancestral sexuado para o super-grupo inteiro, de outra maneira o sexo teria que ter evoluído novamente em Amoebozoa, o que não seria uma visão parcimoniosa. Nós coletamos dados moleculares de várias linhagens de Amoebozoa com representativos da maior parte de sua diversidade conhecida e procuramos um caixa de ferramentas estendida, com adição da maquinaria da plasmogamia. Como resultado, pudemos encontrar todos os componentes desta maquinaria em basicamente todos os grupos de Amoebozoa. Estes resultados não só suportam a ocorrência de ciclos sexuais em todo o grupo Amoebozoa, mas também um provável alto nível de conservação para os principais processos sexuais. Adicionalmente, realizamos análises similares para toda a diversidade eucariótica conhecida com resultados similares, exceto para alguns grupos isolados. Reconstruções profundas também forneceram evidências para uma nova história evolutiva para o sistema de reparo de bases mal-pareadas (*mismatch-repair*) em eucariontes, um mecanismo de reparo de DNA que integra a maquinaria da meiose. Todos os resultados apontam para uma origem arqueal para a maquinaria meiótica e para uma ampla presença de processos sexuais em basicamente todos os eucariontes.

Palavras-chave: Amoebozoa, meiose, plasmogamia, sexo.

Abstract

Sex is an inherent part of eukaryotic life. Far from the common sense, sex can be defined as plasmogamy (cell fusion) eventually followed by meiosis. Both processes are fundamental to any sexual life cycle and require a specific machinery. Several components of this machinery have been already identified and remain highly conserved among the most distantly related eukaryotic lineages, performing basically the same functions in all groups. This meiosis toolkit may be used as an indication of sexual processes, even when such processes have not been observed yet. Even though the ancestor of all eukaryotes is assumed to be sexual, some eukaryotic groups are normally treated as asexuals by many authors in the literature based on the lack of observable sexual cycles in culture. Among these 'asexuals' are the amoebae belonging to Amoebozoa, a major eukaryotic supergroup. Several lineages of Amoebozoa are considered asexual, but some well studied genera inside this supergroup were demonstrated to be fully sexual, i.e., *Trichosphaerium*, *Physarum*, *Dictyostelium*. Some other genera exhibit indirect evidence for sexual processes and may be sexual as well. The occurrence of sexual organisms inside Amoebozoa points to a sexual ancestor for the whole supergroup, otherwise sex would have to evolve again in Amoebozoa, not exactly a parsimonious view. We collected molecular data from several amoebozoan lineages with representatives of most of its known diversity and searched for an expanded meiosis toolkit, adding the plasmogamy machinery to it. As a result, we were able to find every component of this machinery in basically all amoebozoan groups. These results support not only the occurrence of sexual processes in all Amoebozoa, but also a probable high level of conservation for main sexual processes. Additionally, we performed similar analyses for all known eukaryotic diversity with similar results, except for a few isolated groups. Deep reconstructions also provided evidence for a new evolutionary history for the mismatch-repair system in eukaryotes, a DNA repair mechanism that is part of the meiotic machinery. All results point to an archaeal origin for the meiotic machinery and for a widespread presence of sexual processes in basically all eukaryotes.

Keywords: Amoebozoa, meiosis, plasmogamy, sex.

Introdução

Quando decidi iniciar um doutorado, vi-me diante de um novo grupo de eucariontes para realizar um trabalho em evolução molecular: Amoebozoa. Um desafio duplo: o primeiro seria abandonar meu antigo grupo de estudo – Apicomplexa – e me dedicar a um nova linhagem de eucariotos cuja circunscrição era mais recente – datando da década de 1990 (T. Cavalier-Smith 1998) – e sobre a qual muito pouco eu sabia; o segundo seria efetuar a transição de uma abordagem meramente taxonômica e morfológica para a evolução molecular com o uso de ferramentas de bioinformática aplicadas a sequências biológicas. A dúvida inicial pairava entre dois diferentes recortes no tema de evolução de Amoebozoa: evolução do flagelo no grupo e evolução da maquinaria molecular responsável pela meiose (e da meiose *per se*); optou-se pela última. Um grande volume de dados de transcriptomas havia sido anteriormente gerado como parte de uma colaboração internacional entre nosso laboratório e um grupo sediado em Mississippi (grupo de Matthew W. Brown). Tais dados, aliados aos genomas disponíveis, forneceriam um rico conjunto de dados para se explorar o tema do presente estudo iniciado em meados de 2015 com apoio da FAPESP.

Amoebozoa, um super-grupo de eucariontes, é composto por diversas linhagens ameboides, flageladas e ameboflageladas, tradicionalmente entendidas como grupos asexuais, capazes de mitose somente (Adl et al. 2019). Tal super-grupo inclui organismos-modelo e agentes infecciosos, a saber: *Dictyostelium discoideum*, *Physarum polycephalum*, *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba castellanii*, entre outros. Em reconstrução filogenética recente e abrangente, três grandes linhagens foram estabelecidas: Tubulinea (inclui grupos majoritariamente aflagelados que se locomovem por pseudópodes lobosos ou tubulares podendo ser nuas ou tecadas; inclui *Amoeba proteus*, *Copromyxa* sp., *Arcella* sp., *Vermamoeba* sp., *Trichosphaerium* sp.), Evosea (grupo diverso contendo representantes flagelados ou não; inclui archamoebídeos como *Entamoeba* sp e

Mastigamoeba, Myxogastria, *Dictyostelium sp.*, protostelídeos e outros), Discosea (constituído por um conjunto de linhagens aflageladas diversas como *Acanthamoeba*, *Sappinia*, *Vannella* e *Vexillifera*) (Kang et al. 2017; Adl et al. 2019). Amoebozoa apresenta como grupos próximos os Opisthokonta e pequenos flagelados não-afiliados a quaisquer super-grupos ('linhagens órfãs') (Brown et al. 2013). Apesar da existência de linhagens com ciclos sexuais bem caracterizados dentro do grupo, a literatura se refere com frequência a Amoebozoa e muitos de seus sub-grupos como 'assexuados' (A. Smirnov et al. 2005; A. V. Smirnov et al. 2011; Thomas Cavalier-Smith et al. 2015). Este aparente paradoxo nos chamou a atenção, já tendo sido abordado previamente na literatura de forma mais teórica (Lahr et al. 2011). Os padrões filogenéticos de distribuição de ciclos sexuais em Amoebozoa são compatíveis com um ancestral plenamente sexuado, pois esta é a solução mais parcimoniosa para o grupo; a existência de diversas linhagens assexuadas espalhadas em diferentes regiões da árvore de Amoebozoa exigiria a perda do sexo e meiose várias vezes independentemente. São muito raros os exemplos de eucariotos assexuados na literatura e a perda dos ciclos sexuais diversas vezes independentemente não seria parcimoniosa. Em tese, a hipótese mais razoável seria a de que o grupo é constituído por linhagens sexuadas, mas artefatos de observação levaram à suposição de que diversos grupos seriam assexuados simplesmente porque ciclos sexuais jamais foram observados para tais grupos.

Entre as possíveis razões para se explicar esta suposta falta de observações, poder-se-ia citar, além das dificuldades inerentes de se observar processos em organismos unicelulares, a ausência de gametas complementares em cultura, a possibilidade da meiose ser modificada em relação a animais, plantas e fungos e não ser percebida mesmo quando observada (podendo até ser confundida com mitose), falta de estímulos ambientais específicos para a meiose ou plasmogamia etc. Ciclos sexuais são mais bem conhecidos em membros de Myxogastria. Este grupo foi por muito tempo considerado parte de Fungi e alvo de mais estudos que outras amebas em geral, o que pode explicar o fato dos ciclos sexuais serem descritos para este grupo e não para vários outros (Spiegel

2011). Indícios diretos e indiretos de processos sexuais, como plasmogamia, formação de cistos, formação de corpos de frutificação, cistos multinucleados, perfis de expressão gênica, entre outros são sugestivos de que diversos processos sexuais podem ocorrer, mas carecem de mais atenção e estudo. Entre as evidências diretas ou indiretas de processos sexuais em amebas pode-se citar: ocorrência de complexo sinaptonemal em *Arcella* (Mignot and Raikov 1992), expressão de proteínas da meiose em cistos de *Entamoeba* (Ehrenkauf et al. 2013), plasmogamia em *Paratubalula* com formação de cisto (Lüftenegger and Foissner 1991), formação de cisto bicelular em *Sappinia* (Brown, Spiegel, and Silberman 2007). A confirmação da presença da maquinaria específica da meiose em diversas linhagens de Amoebozoa forneceria evidências adicionais para a ocorrência de processos sexuais no grupo.

Durante as análises preliminares das famílias gênicas que compõem a maquinaria especializada da meiose, a topologia das árvores das recombinases nos chamou a atenção. Recombinases são enzimas altamente conservadas que realizam o processo de reparo de DNA em quebras de dupla fita através da recombinação entre regiões homólogas (Sherratt D. J. et al. 2004). Este tipo de reparo é mais preciso que outros (pela busca por homologia) e termina com uma menor probabilidade de ocorrência de mutação. Existem outros mecanismos de reparo não relacionados a este e que apresentam taxas maiores de mutação por ocasião do reparo, inclusive com a perda de trechos da fita de DNA na região da quebra de dupla-fita. Eucariontes apresentam três grupos básicos de recombinases de acordo com sua origem: as mitocondriais, oriundas de Alpha-Proteobacteria (recAmt), as plastidianas, oriundas de Cyanobacteria (recAp) e as eucarióticas ancestrais nucleares, de origem arqueal, grupos Rad α e Rad β (Lin et al. 2006). Recombinases nucleares são essenciais para a ocorrência da meiose por causa da quebra de dupla-fita inerente ao processo de recombinação meiótica. Embora todas as recombinases nucleares possam participar da meiose, o grupo Rad α (produzido por uma duplicação ancestral em algum ancestral dos eucariontes e formado por RAD51A e DMC1, esta última específica da meiose (Bishop et al. 1992)) tem papel

mais relevante no processo. Durante o processo de busca de recombinases que ocorrem em Amoebozoa, uma base de dados com todos os proteomas disponíveis [derivados de genomas completos, rascunhos (*drafts*) de genomas e transcriptomas], um conjunto de recombinases formou um grupo muito homogêneo e distante das outras recombinases; buscas de sequências deste clado em bases de dados públicas (como Genbank) revelou seu caráter bacteriano/mitocondrial. A reconstrução das relações filogenéticas entre as sequências encontradas em amebas e outros eucariontes revelou uma história complexa de aquisição e perda de recombinases bacterianas em eucariontes [**Capítulo 2**, (Hofstatter et al. 2016)]. Há uma forma mitocondrial adquirida por ocasião da endossimbiose que deu origem à mitocôndria, esta mantida em muitos grupos, porém perdida em Opisthokonta, Apicomplexa, Ciliophora e outros; há uma segunda forma, derivada de Cyanobacteria, adquirida durante o processo de endossimbiose que originou os cloroplastos em Archaeplastida, esta duplicada em plantas Angiospermae e transferida em endossimbioses secundárias de algas verde e vermelhas para Phaeophyta e Chlorarachniophyta. O entendimento da história destas recombinases foi importante para se isolar este grupo das recombinases nucleares, pois somente estas últimas são relevantes para o estudo dos processos meióticos em amebas, o objetivo central deste projeto de doutorado. O trabalho com a evolução da recombinase A (*recA*) em eucariontes foi apresentada em um congresso internacional de protozoologia em Moscou, Rússia, em meados de 2016.

Com o isolamento prévio de todo um grupo de recombinases não relacionadas a meiose, procedeu-se à busca geral por similaridade de homólogos específicos da meiose. A presente abordagem foi desenvolvida de forma a fornecer evidências moleculares e de bioinformática que suportassem a provável presença de ciclos meióticos/sexuais em Amoebozoa. A provável natureza sexual das amebas pode ser derivada teoricamente da presença de ciclos sexuais no ancestral dos eucariontes, nos ancestrais dos grupos atuais e na presença de linhagens sexuais derivadas dentro de Amoebozoa (**Figura 1**). A confirmação da existência da maquinaria de meiose em amebas

forneceria uma evidência a mais para a ocorrência de meiose e sexo nos diversos grupos de amebas, além da previsão teórica estabelecida por parcimônia. Nesta abordagem, ferramentas de busca por similaridade foram usadas para a identificação das sequências candidatas a ortólogos de proteínas específicas da meiose, plasmogamia e cariogamia. A confirmação da ortologia transcende a simples busca por similaridade pois a maioria das enzimas específicas da meiose é derivada de eventos de duplicação gênica ancestral e somente por meio de processos de reconstrução de árvores de proteínas pode-se concluir com maior segurança quais ortólogos de proteínas específicas da meiose estão presentes. Tais proteínas específicas foram anteriormente caracterizadas em organismos-modelo distantemente relacionados, a saber *Saccharomyces cerevisiae* (um fungo ascomiceto unicelular, a levedura), *Arabidopsis thaliana* (uma planta angiosperma modelo), *Homo sapiens* (modelo animal vertebrado), entre outros e compiladas na literatura sob o apelido de 'caixa de ferramentas da meiose' [*meiosis toolkit* (Schurko and Logsdon 2008)]. O presente trabalho se constituiu como uma aplicação que tal abordagem a toda a diversidade conhecida - e sequenciada - de Amoebozoa de forma compreensiva, com diversas amostras das três principais linhagens moleculares dentro do grupo, Tubulinea, Evosea e Discosea. Tais relações foram descritas em trabalho recente (Kang et al. 2017); o mesmo conjunto de dados forneceu material para o presente projeto.

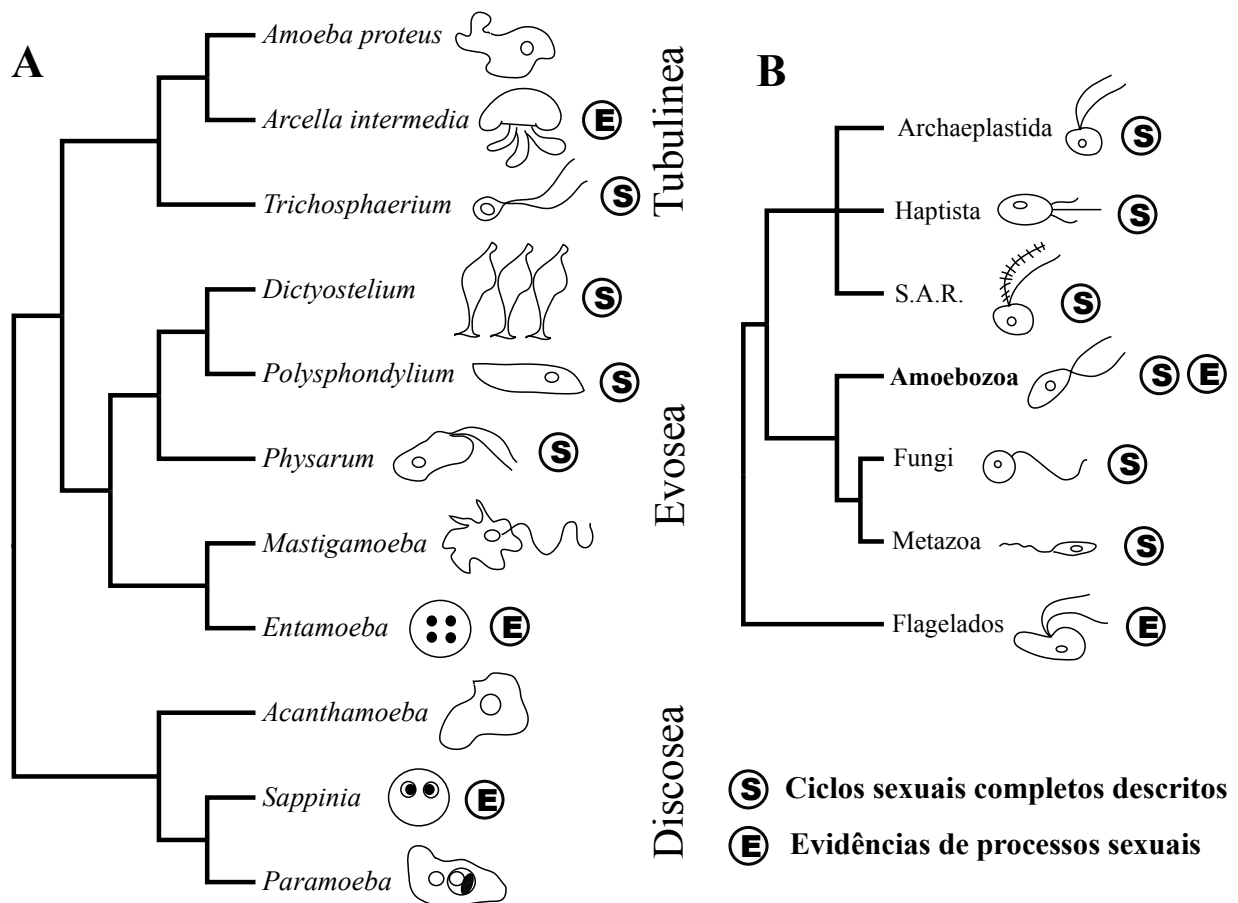


Figura 1. A. Relações filogenéticas entre representativos de Amoebozoa e a distribuição de ciclos sexuais ou evidências para processos sexuais nos diferentes grupos; B. Posição de Amoebozoa em relação a outros eucariotos e a distribuição de processos sexuais nos grandes grupos.

Para a busca de sequências candidatas, perfis de HMMER (Eddy 2011) foram construídos a partir do alinhamento de proteínas específicas da meiose caracterizadas em organismos modelos. Os alinhamentos foram produzidos por MAFFT (Katoh and Standley 2013). As sequências candidatas foram, a seguir, submetidas ao processo de reconstrução de árvores filogenéticas para posterior diferenciação dos ortólogos em questão. Candidatos para as seguintes proteínas foram buscados: HAP2 (fusão de gametas), GEX1 (fusão de núcleos), SPO11, MER11, RAD50 (introdução de quebras de dupla-fita de DNA), SMC1, SMC3, RAD21, REC8 (complexo de coesão de cromossomos/coesina), HOP1, PCH2 (pareamento de homólogos), DMC1, RAD51A, HOP2,

MND1 (recombinação de homólogos), MER3, ZIP4, MSH4, MSH5 (complexo 'ZMM' de resolução de Junções duplas de Holiday/primeira via de resolução de crossing-over – específica da meiose), MLH1, MLH3, EXO1 (resolução da primeira via de crossing-over), MUS81, MMS4 (segunda de via de resolução de crossing-over – acessória nos principais modelos), MSH2, MSH6, PMS1, PMS2 (complexo de conversão gênica pós-meiotica baseada no processo de '*mismatch-repair*'). O processo de reconstrução consistiu de alinhamento com MAFFT (candidatos, sequências caracterizadas em modelos e grupos externos conhecidos – Bacteria e Archaea), remoção (*trimming*) de sítios não-alinhados ou não-homólogos e reconstrução com algoritmos de máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) como RAxML (Stamatakis 2014) ou IQ-TREE (Nguyen et al. 2015).

As reconstruções obtidas desta forma revelaram a existência de todas as proteínas específicas da plasmogamia, cariogamia e meiose no grupo (**Capítulo 3**, (Hofstatter, Brown, and Lahr 2018)). Todas ocorrem nas três principais linhagens de Amoebozoa com exceção de REC8 cuja presença não pôde ser confirmada em Evosea até o momento. A presença do sistema ancestral de gametas complementares em Amoebozoa é fortemente sugestivo de ciclos sexuais heterotáticos (sistema de reconhecimento mútuo entre gametas de tipos diferentes a fim de se evitar autofecundação por meio da expressão da proteína de membrana HAP2). A detecção de tal sistema sugere que ciclos sexuais dificilmente devem ocorrer em culturas monoclonais de laboratório por falta de gametas complementares na cultura. Em suma, a presença de todas as proteínas específicas de meiose indica não só a ocorrência do processo, mas que este é provavelmente canônico e inclui recombinação extensiva entre cromossomos homólogos com participação de DMC1 e ambas as vias conhecidas de resolução de *crossing-over* na meiose, a primeira via composta por MSH4, MSH5, MLH3 e portadora de interferência (específica da meiose) e a segunda via, mais simples e sem sinais de interferência meiótica, composta por MUS81 e MMS4. Tais evidências suportam a ocorrência de meiose em Amoebozoa, assim como ciclos sexuados, com implicações para o

entendimento da biologia de todo o grupo. Os resultados obtidos neste projeto, o principal do doutorado, foram apresentados em congresso de protozoologia em Praga, Tchécua em meados de 2017.

Apesar de amplo, o recorte proposto acima foi restrito a Amoebozoa e ao modesto conjunto de dados gerados para este grupo. Questões similares estão postas para os eucariontes em geral. Seria o ancestral de todos os eucariontes um ser sexuado capaz de realizar plasmogamia e meiose? Estaria o mesmo conjunto de proteínas presente em todos os grandes grupos de eucariontes e nas chamadas 'linhagens órfãs', conservado e executando as mesmas funções? A observação de que a maioria das proteínas específicas da meiose são resultantes de eventos de duplicação gênica forneceu pistas para um entendimento mais profundo de como a meiose poderia ter evoluído nos primeiros eucariontes a partir de mecanismos que já existiam nas formas ancestrais. Tais questões profundas, envolvendo Archaea (especialmente Asgard), nos levaram a um segundo projeto de pesquisa dentro do projeto inicial. Este projeto, que buscava fornecer indícios para o entendimento da evolução inicial da meiose em eucariontes em geral, aplicando uma abordagem semelhante àquela aplicada a Amoebozoa, mas desta vez a eucariontes em geral, para os quais dados moleculares estivessem disponíveis. Posteriormente, o projeto produziu dois trabalhos: um que apresenta os resultados dos padrões de distribuição e evolução das proteínas da meiose em eucariontes, com o tratamento de alguns casos especiais de possíveis assexuados secundários [**Capítulo 4**, (Hofstatter and Lahr, 2019)]; e um segundo trabalho que apresenta os resultados das análises filogenéticas das famílias de proteínas que participam de processos de reparo de DNA do tipo '*mismatch-repair*', as quais fornecem subsídios para um melhor entendimento da origem e evolução deste sistema de reparo nos eucariotos (**Capítulo 5**). Em conjunto, ambos os trabalhos poderiam fornecer subsídios para se entender a origem da meiose e sexo em eucariontes e a própria evolução dos eucariontes (considerando-os como seres inerentemente sexuais).

Assim como no caso de Amoebozoa, a distribuição de proteínas específicas da meiose na

árvore dos eucariotos é compatível com um ancestral plenamente sexuado (**Capítulo 4**, (Hofstatter and Lahr, 2019)). Além disso, todos os grandes grupos de eucariotos e 'linhagens órfãs', mesmo aquelas consideradas 'assexuadas', apresentam uma distribuição de proteínas da meiose compatível com a ocorrência de ciclos sexuais em toda sua diversidade. No entanto, alguns pequenos grupos podem ter perdido a meiose e/ou sexo ao longo da evolução de forma secundária, como é o caso de *Malassezia*. Este gênero de fungos (Basidiomycota), que conta com genomas sequenciados para quatro espécies pelo menos, não apresenta praticamente nenhuma proteína da meiose e, paralelamente, não existem observações de processos sexuais ou meiose para o grupo. Um grupo próximo, *Ustilago*, é sabidamente sexual (O'Donnell and McLaughlin 1984; Banuett 1995). Estas evidências sugerem a perda secundária do sexo em *Malassezia*. Adicionalmente, um pequeno grupo de animais, os Bdelloidea, são considerados assexuados por diferentes abordagens e já foram referidos como “escândalos assexuados” na literatura (Judson and Normark 1996; Flot et al. 2013; Debortoli et al. 2016). Casos como esses (*Malassezia* e Bdelloidea) parecem ser raros. Há uma forte tendência no sentido da manutenção de processos sexuais (ainda que teoricamente dispendiosos) em todos os grandes grupos. Inversamente, Glomeromycota, um grupo de fungos considerados totalmente assexuados, apresenta toda a maquinaria molecular da meiose sem nenhuma perda. Estes resultados indicam a ocorrência de ciclos sexuais canônicos no grupo (da mesma forma que em Amoebozoa, como discutido previamente), mas prováveis artefatos de observação foram responsáveis pela descrição do grupo como uma linhagem assexuada. Glomeromycota é um grupo diverso e muito importante por suas associações ecológicas com plantas, com as quais formam extensas redes de micorrizas e a possibilidade de ciclos sexuais no grupo tem implicações para o entendimento de sua biologia. A presença da maquinaria de meiose já foi reportada previamente em *Glomus*, um membro do grupo (Halary et al. 2011). *Oenothera* (Angiospermae), *Cryptococcus* (Basidiomycota), *Candida* (Ascomycota), Microsporidia e outros grupos tratados como assexuados foram também analisados. Resultados positivos para a presença da maquinaria sugerem

a ocorrências de possíveis ciclos sexuais nestes grupos. Nucleomorfos (de Chlorarachniophyta e Cryptophyta) também foram analisados; a maquinaria da meiose desapareceu completamente neste caso.

O estudo da evolução das maquinarias de reparo de DNA na transição de Archaea para Eukarya (especialmente com a possibilidade de se utilizar dados de Asgardarchaea) oferece subsídios para se entender como o sexo e a meiose surgiram ao longo da evolução. Um melhor entendimento da evolução do sexo nos primeiros eucariotos nos permite entender a evolução dos próprios eucariotos. A maquinaria da meiose surgiu a partir de eventos de duplicação de componentes dos diversos processos de reparo de DNA já presentes em Archaea, entre eles recombinação homóloga e *mismatch-repair*. Em suma, toda a maquinaria de replicação e manutenção do genoma nuclear (quando apresenta homólogos rastreáveis) tem origem em Archaea, mesmo as famílias tipicamente bacterianas (*mutS* e *mutL*, componentes da maquinaria de *mismatch-repair*). A introdução de Asgardarchaea nos permitiu revisitar a história evolutiva do sistema de reparo de DNA *mismatch-repair* em eucariotos. Previamente considerada uma contribuição mitocondrial, é possível encontrar o sistema em Asgard e outros grupos de Archaea. Como o sistema é tipicamente bacteriano, é razoável se supor que tenha sido adquirido lateralmente de algum grupo de bactérias por Archaea e herdado posteriormente por Eukarya (seguido de diversos eventos de duplicação gênica). Mas as análises filogenéticas indicam três origens para o sistema em eucariotos: uma ancestral obtido de Archaea e sujeito a diversos eventos de duplicação gênica e que realiza processos de reparo de DNA no núcleo e meiose; uma forma mitocondrial, a qual realiza reparo de DNA mitocondrial; uma forma cianobacteriana, a qual realiza reparo de DNA nos cloroplastos. Alguns parálogos nucleares e as formas mitocondriais e dos cloroplastos foram perdidas em alguns grupos. É possível que outras famílias gênicas encontradas em eucariotos tenham sido adquiridas da mesma forma, especialmente quando ausentes em dados obtidos até o momento a partir de Archaea. A proposta de uma nova história evolutiva para o sistema *mutS-mutL*

de *mismatch-repair* em eucariotos (uma atualização de uma proposta anterior feita por outros autores (Lin, Nei, and Ma 2007)) foi apresentada em congresso de protozoologia evolucionária em Paphos, Chipre em meados de 2018 (**Capítulo 5**).

A própria abordagem bioinformática para o estudo do sexo e meiose em eucariotos diversos tem sido questionada. A principal crítica seria a de que a simples presença de proteínas de meiose em um dado genoma não seria demonstração suficiente da ocorrência de processos sexuais e meiose no grupo. Alguns revisores poderiam alegar que as proteínas específicas de meiose poderiam ter passado por processos de neofuncionalização e realizariam outras funções atualmente, sendo mantidas para este fim. Embora possível hipoteticamente, ainda não existe nenhuma demonstração de neofuncionalização de proteínas específicas da meiose que possa ser encontrada na literatura até o momento. Além do mais, mesmo que uma dessas proteínas tenha adquirido uma nova função, seria extremamente improvável que várias ou todas tenham adquirido novas funções ao mesmo tempo. Em caso recente, a abordagem bioinformática previu a existência de ciclos sexuais (meiose) em Choanoflagellata por meio da confirmação de proteínas específicas da meiose ocorrendo em genomas de espécies do grupo (Carr, Leadbeater, and Baldauf 2010); poucos anos mais tarde processos sexuais foram observados de forma inequívoca no grupo (Woznica et al. 2017). A presença de proteínas específicas da meiose foi demonstrada em Amoebozoa e outras linhagens de eucariotos neste estudo; o próximo passo seria a demonstração dos processos sexuais por meio de uma observação mais cuidadosa dos organismos considerados assexuados, cuja maquinaria da meiose se encontra presente em seus genomas. Entre as possíveis abordagens estariam: observação sistemática de organismos em cultura, sujeitar os indivíduos a estímulos externos ou estresse (uma vez que a meiose e processos sexuais em geral estão normalmente associados a condições de estresse em diversos organismos), evitar culturas monoclonais, aplicação de técnicas de microscopia eletrônica para se visualizar modificações ultra-estruturais em cistos, contagem de cromossomos em diferentes estágios do ciclo de vida de um dado grupo por meio de cariótipos, medição de expressão

gênica diferencial com foco em proteínas relacionadas à meiose etc.

Finalmente, propomos um texto de divulgação resumindo e esclarecendo os avanços no entendimento da meiose e sexo em eucariontes, sua evolução e sua importância central para a biologia do grupo (**Capítulo 6**). Neste texto, discutimos avanços no entendimento atual da evolução dos eucariontes, relações de parentesco entre os diferentes grupos e o papel do sexo eucariótico como algo inerente à própria vida eucariótica.

Referências

- Adl, Sina M., David Bass, Christopher E. Lane, Julius Lukeš, Conrad L. Schoch, Alexey Smirnov, Sabine Agatha, et al. 2019. “Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes.” *Journal of Eukaryotic Microbiology* 66 (1): 4–119.
<https://doi.org/10.1111/jeu.12691>.
- Banuett, F. 1995. “Genetics of *Ustilago Maydis*, a Fungal Pathogen That Induces Tumors in Maize.” *Annual Review of Genetics* 29: 179–208.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.001143>.
- Bishop, D. K., D. Park, L. Xu, and N. Kleckner. 1992. “DMC1: A Meiosis-Specific Yeast Homolog of *E. Coli* RecA Required for Recombination, Synaptonemal Complex Formation, and Cell Cycle Progression.” *Cell* 69 (3): 439–56.
- Brown, Matthew W., Susan C. Sharpe, Jeffrey D. Silberman, Aaron A. Heiss, B. Franz Lang, Alastair G. B. Simpson, and Andrew J. Roger. 2013. “Phylogenomics Demonstrates That Breviate Flagellates Are Related to Opisthokonts and Apusomonads.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280 (1769). <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1755>.
- Brown, Matthew W., Frederick W. Spiegel, and Jeffrey D. Silberman. 2007. “Amoeba at Attention: Phylogenetic Affinity of *Sappinia pedata*.” *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 54 (6): 511–19. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2007.00292.x>.

- Carr, Martin, Barry S. C. Leadbeater, and Sandra L. Baldauf. 2010. "Conserved Meiotic Genes Point to Sex in the Choanoflagellates." *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 57 (1): 56–62. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2009.00450.x>.
- Cavalier-Smith, T. 1998. "A Revised Six-Kingdom System of Life." *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73 (3): 203–66.
- Cavalier-Smith, Thomas, Anna Maria Fiore-Donno, Ema Chao, Alexander Kudryavtsev, Cédric Berney, Elizabeth A. Snell, and Rhodri Lewis. 2015. "Multigene Phylogeny Resolves Deep Branching of Amoebozoa." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 83 (February): 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.08.011>.
- Debortoli, Nicolas, Xiang Li, Isobel Eyres, Diego Fontaneto, Boris Hespels, Cuong Q. Tang, Jean-François Flot, and Karine Van Doninck. 2016. "Genetic Exchange among Bdelloid Rotifers Is More Likely Due to Horizontal Gene Transfer Than to Meiotic Sex." *Current Biology: CB* 26 (6): 723–32. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.01.031>.
- Eddy, Sean R. 2011. "Accelerated Profile HMM Searches." *PLOS Computational Biology* 7 (10): e1002195. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195>.
- Ehrenkaufer, Gretchen M., Gareth D. Weedall, Daryl Williams, Hernan A. Lorenzi, Elisabet Caler, Neil Hall, and Upinder Singh. 2013. "The Genome and Transcriptome of the Enteric Parasite *Entamoeba Invadens*, a Model for Encystation." *Genome Biology* 14 (7): R77. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-7-r77>.
- Flot, Jean-François, Boris Hespels, Xiang Li, Benjamin Noel, Irina Arkhipova, Etienne G. J. Danchin, Andreas Hejnl, et al. 2013. "Genomic Evidence for Ameiotic Evolution in the Bdelloid Rotifer *Adineta Vaga*." *Nature* 500 (7463): 453–57. <https://doi.org/10.1038/nature12326>.
- Halary, Sébastien, Shehre-Banoo Malik, Levannia Lildhar, Claudio H. Slamovits, Mohamed Hijri, and Nicolas Corradi. 2011. "Conserved Meiotic Machinery in *Glomus* Spp., a Putatively

Ancient Asexual Fungal Lineage.” *Genome Biology and Evolution* 3: 950–58.

<https://doi.org/10.1093/gbe/evr089>.

Hofstatter, Paulo G., Matthew W. Brown, and Daniel J. G. Lahr. 2018. “Comparative Genomics Supports Sex and Meiosis in Diverse Amoebozoa.” *Genome Biology and Evolution* 10 (11): 3118–28. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy241>.

Hofstatter, Paulo G., and Daniel J. G. Lahr. n.d. “All Eukaryotes Are Sexual, Unless Proven Otherwise.” *BioEssays* 0 (0): 1800246. <https://doi.org/10.1002/bies.201800246>.

Hofstatter, Paulo G., Alexander K. Tice, Seungho Kang, Matthew W. Brown, and Daniel J. G. Lahr. 2016. “Evolution of Bacterial Recombinase A (RecA) in Eukaryotes Explained by Addition of Genomic Data of Key Microbial Lineages.” *Proceedings. Biological Sciences* 283 (1840). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1453>.

Judson, O. P., and B. B. Normark. 1996. “Ancient Asexual Scandals.” *Trends in Ecology & Evolution* 11 (2): 41–46.

Kang, Seungho, Alexander K. Tice, Frederick W. Spiegel, Jeffrey D. Silberman, Tomáš Pánek, Ivan Cepicka, Martin Kostka, et al. 2017. “Between a Pod and a Hard Test: The Deep Evolution of Amoebae.” *Molecular Biology and Evolution* 34 (9): 2258–70. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx162>.

Katoh, Kazutaka, and Daron M. Standley. 2013. “MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability.” *Molecular Biology and Evolution* 30 (4): 772–80. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.

Lahr, Daniel J. G., Laura Wegener Parfrey, Edward A. D. Mitchell, Laura A. Katz, and Enrique Lara. 2011. “The Chastity of Amoebae: Re-Evaluating Evidence for Sex in Amoeboid Organisms.” *Proceedings. Biological Sciences* 278 (1715): 2081–90. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0289>.

Lin, Zhenguo, Hongzhi Kong, Masatoshi Nei, and Hong Ma. 2006. “Origins and Evolution of the

RecA/RAD51 Gene Family: Evidence for Ancient Gene Duplication and Endosymbiotic Gene Transfer.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (27): 10328–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604232103>.

Lin, Zhenguang, Masatoshi Nei, and Hong Ma. 2007. “The Origins and Early Evolution of DNA Mismatch Repair Genes--Multiple Horizontal Gene Transfers and Co-Evolution.” *Nucleic Acids Research* 35 (22): 7591–7603. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm921>.

Lüftenegger, G., and W. Foissner. 1991. “Morphology and Biometry of Twelve Soil Testate Amoebae (Protozoa, Rhizopoda) from Australia, Africa and Austria.” *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)* 57: 1–16.

Mignot, Jean-Pierre, and Igor B. Raikov. 1992. “Evidence for Meiosis in the Testate Amoeba Arcella.” *The Journal of Protozoology* 39 (2): 287–89. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1992.tb01316.x>.

Nguyen, Lam-Tung, Heiko A. Schmidt, Arndt von Haeseler, and Bui Quang Minh. 2015. “IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies.” *Molecular Biology and Evolution* 32 (1): 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>.

O’Donnell, K. L., and D. J. McLaughlin. 1984. “Ultrastructure of Meiosis in *Ustilago Maydis*.” *Mycologia* 76 (3): 468–85. <https://doi.org/10.2307/3793330>.

Schurko, Andrew M., and John M. Logsdon. 2008. “Using a Meiosis Detection Toolkit to Investigate Ancient Asexual ‘Scandals’ and the Evolution of Sex.” *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 30 (6): 579–89. <https://doi.org/10.1002/bies.20764>.

Sherratt D. J., West S. C., Haber James E., Ira Gregorz, Malkova Anna, and Sugawara Neal. 2004. “Repairing a Double-strand Chromosome Break by Homologous Recombination: Revisiting Robin Holliday’s Model.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*.

Series B: Biological Sciences 359 (1441): 79–86. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1367>.

Smirnov, Alexey, Elena Nasonova, Cédric Berney, José Fahrni, Ignacio Bolivar, and Jan Pawlowski. 2005. “Molecular Phylogeny and Classification of the Lobose Amoebae.” *Protist* 156 (2): 129–42. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.06.002>.

Smirnov, Alexey V., Ema Chao, Elena S. Nasonova, and Thomas Cavalier-Smith. 2011. “A Revised Classification of Naked Lobose Amoebae (Amoebozoa: Lobosa).” *Protist* 162 (4): 545–70. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.04.004>.

Spiegel, Frederick W. 2011. “Commentary on the Chastity of Amoebae: Re-Evaluating Evidence for Sex in Amoeboid Organisms.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278 (1715): 2096–97. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0608>.

Stamatakis, Alexandros. 2014. “RAxML Version 8: A Tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies.” *Bioinformatics* 30 (9): 1312–13. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.

Woznica, Arielle, Joseph P. Gerdt, Ryan E. Hulett, Jon Clardy, and Nicole King. 2017. “Mating in the Closest Living Relatives of Animals Is Induced by a Bacterial Chondroitinase.” *Cell* 170 (6): 1175–1183.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.005>.