
Ciências Biológicas

Cristiane Pelizzon Garcia

Identificação Sexual da Anta (*Tapirus terrestris*) por Meio de Marcadores de DNA



Rio Claro
2010

Cristiane Pelizzon Garcia

Identificação Sexual da Anta (*Tapirus terrestris*) por Meio de Marcadores de DNA

Orientadora: Alexandra Sanches

Co-orientador: Mauro Galetti

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Rio Claro
2010

599 Garcia, Cristiane Pelizzon
G216i Identificação sexual da anta (*Tapirus terrestris*) por meio
de marcadores de DNA / Cristiane Pelizzon Garcia. - Rio
Claro : [s.n.], 2010
40 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro
Orientador: Alexandra Sanches
Co-Orientador: Mauro Galetti

1. Mamífero. 2. Marcadores sexuais. 3. Amelogenina. 4.
KY1/KY2. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

À minha avó Lourdes, que nunca vai deixar de estar presente na minha vida.

“Enquanto houver você do outro lado
Aqui do outro eu consigo me orientar”

(Teatro Mágico)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro na execução deste trabalho.

Um obrigada muito especial à minha orientadora Lele (Alexandra), pois, sem sua ajuda e paciência, este projeto não teria sido possível. Obrigada por tudo que me ensinou e pelo apoio nas horas em que eu desanimava.

Obrigada ao meu co-orientador Mauro, por cada coisa em que ele se preocupava que nós aprendêssemos, por tantos conselhos sempre querendo nos ajudar.

Obrigada à Cibs (Cibele) por tudo que me ensinou e pelo seu alto astral que contagiava a todos; isso com certeza trazia coisas boas para o nosso dia-a-dia.

As pessoas a quem devo eternos agradecimentos são os meus pais e minha irmã, José Maria, Angela e Fernanda. São eles que me apóiam em minhas escolhas, que me orientam quando surgem dúvidas, que me encorajam a continuar mesmo nas derrotas e que comemoram comigo em cada conquista. É neles que posso me espelhar, é deles o meu maior orgulho e é com eles meu porto seguro. Ainda não conheci palavra que fosse suficiente pra expressar minha gratidão e admiração por vocês!

Infinitos obrigadas à Coró (Carol) que sempre foi uma super amiga, este ano mais do que nunca. Este ano aprendi tanto com você mas acho que você nem imagina metade das coisas que ensinou. Obrigada por me ouvir nas horas de desespero, de dúvidas e por dividir infinitas risadas em tantos lugares e situações que até perco a conta!

Agradeço também à Jú (Juliana) pela companhia nas viagens sem fim, todo fim de semana, de volta pra Rio Claro. Obrigada por me oferecer essa amizade!

Obrigada também ao Quase (Fábio), por ser um amigo tão presente, mesmo que na maioria das vezes sempre distante. Obrigada por confiar, por ajudar, por me ensinar e pela sincera amizade!

Um obrigada às minhas queridas “Siriemas”! Tibúzinha (Gabriela), Jacque, Milhouse (Gabriela), Larva (Tatiana), Curiosa (Ana Clara) e Gabizinha! Esse foi um ano de muito aprendizado e a convivência com essas meninas deixou uma marca muito especial na minha vida. Obrigada pelas conversas e discussões que me fizeram enxergar e apreciar as diferenças, pelos 365 dias de risadas infinitas, pelas brincadeiras, pelos ensinamentos, pela amizade e pelo carinho.

Obrigada ao Kittie (Renato) que sempre me apoiou nos meus momentos de crise e desespero, e que sempre esteve pronto pra me escutar, aconselhar e comemorar minhas vitórias. Você já faz parte da minha história!

Obrigada a todos que de alguma forma ajudaram na execução deste trabalho.

As pessoas aqui citadas são pessoas que admiro infinitamente e a quem devo muito das minhas conquistas!

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios...

Por isso,

cante,

ria,

dance,

chore

e viva

INTENSAMENTE

cada momento da sua vida”

Charles Chaplin

RESUMO

A identificação sexual de indivíduos é extremamente importante para planos de conservação de espécies ameaçadas, pois em muitas espécies, machos e fêmeas apresentam diferenças quanto ao uso de hábitat, estratégias comportamentais e sucesso reprodutivo. A diferença de comportamento entre machos e fêmeas em antas (*Tapirus terrestris*) ainda é pouco conhecida, mas estudos vem mostrando que esses animais podem apresentar diferentes comportamentos quanto à dispersão, uso de áreas e marcação de territórios por latrina. Antas compreendem animais de um antigo gênero de perissodáctilos, gênero *Tapirus*. Mesmo sendo a espécie deste gênero que possui a maior distribuição, que se estende por toda a América do sul cis-andina, as populações de *T. terrestris* vêm sendo reduzidas devido à destruição de seu habitat e à caça ilegal, sendo considerada, atualmente, uma espécie vulnerável segundo a IUCN. As antas desempenham um importante papel como dispersores de sementes, especialmente porque podem dispersar sementes maiores, em grande quantidade e a longas distâncias. Participam desse modo, da estrutura, manutenção e regeneração das florestas, sendo assim, seu declínio pode significar uma grande ameaça às espécies vegetais que produzem grandes frutos. Diante da dificuldade de realização de estudos por meio de técnicas tradicionais, análises genéticas não invasivas por meio de marcadores moleculares têm sido amplamente empregadas, utilizando-se amostras de DNA provenientes de fezes, urina e pêlo como fonte de DNA. A implementação de técnicas de obtenção de DNA a partir de amostras não-invasivas e o desenvolvimento de marcadores de DNA para identificação individual (microsatélites), tem possibilitado a geração de dados para estudos de censo populacional, os quais podem ser utilizados no desenvolvimento de planos de conservação de espécies. Uma forma de complementar os resultados obtidos de identificação individual a partir de amostras não-invasivas seria a identificação do sexo. Neste contexto, este trabalho tem por objetivo testar marcadores moleculares para a identificação sexual das antas. Serão utilizados marcadores já disponíveis na literatura desenvolvidos para grupos taxonômicos próximos ao grupo das antas. Foram testados pares de *primers* que amplificam porções do gene da amelogenina que estão presentes nos cromossomos X e Y com diferentes tamanhos, sendo possível a identificação do sexo em gel de agarose. Tal diferença de tamanho se deve à uma deleção variando em torno de 60 pb neste gene observada somente no cromossomo Y. Os pares de marcadores moleculares testados não apresentaram sucesso nos testes realizados. Com uma análise da similaridade das sequências do gene da amelogenina das espécies consideradas neste estudo, dois fatores estiveram envolvidos no insucesso dos marcadores testados: a ausência da deleção esperada no cromossomo Y e à baixa eficiência de anelamento dos *primers* heterólogos testados para *T. terrestris*. A partir disso, se fez necessário o desenvolvimento de *primers* específicos para a identificação do sexo de *T. terrestris*, uma vez que estes não se encontram disponíveis. Com a identificação dos sexos das antas, será possível observar diferenças que possam existir entre os sexos, quanto à dispersão diferencial, uso de áreas ou marcação de territórios por latrina.

Palavras-chave: *Tapirus terrestris*, marcadores sexuais, amelogenina, identificação sexual.

SUMÁRIO

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVO .	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1. Extração de DNA de amostras sanguíneas.....	15
3.2. Testes e padronização dos marcadores para identificação sexual	17
3.3. Purificação do produto de PCR para sequenciamento	19
3.4. Sequenciamento	20
3.5. Alinhamento das sequências do gene da amelogenina	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Ensaio com marcadores KY1/KY2 e SE47/SE48	21
4.2. Similaridade da sequência de AMEL de <i>T. terrestris</i> (Tt1) e outras espécies	24
4.2.1. Similaridade com espécies próximas	24
4.2.2. Similaridade com <i>Alces alces</i> , <i>Oreamnos americanus</i> e <i>Odocoileus hemionus sitkensis</i>	27
4.2.3. Primers SE47/SE48 na amplificação do gene da amelogenina em <i>T. terrestris</i>	29
4.2.4. Análise Filogenética	31
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÕES FINAIS	36
LITERATURA CITADA	37

1. INTRODUÇÃO

A identificação sexual de indivíduos é extremamente importante para planos de conservação de espécies ameaçadas, pois em muitas espécies, machos e fêmeas apresentam diferenças quanto ao uso de habitat, estratégias comportamentais e sucesso reprodutivo. Sendo assim, estudos que identifiquem o sexo dos indivíduos são utilizados em muitos métodos de monitoramento (MCGREGOR & PEAKE, 1998). Além disso, a identificação individual dos sexos oferece um conhecimento detalhado da vida de cada indivíduo que poderá ser usado em medidas preventivas de conservação (MCGREGOR & PEAKE, 1998).

A territorialidade é um tipo de comportamento muito evidenciando em mamíferos, e geralmente se apresenta de forma diferente entre machos e fêmeas. A função de territorialidade em fêmeas de algumas espécies de mamíferos pode ser aplicada na defesa de filhotes, depositando-os em tocas ou locais protegidos. No entanto, em espécies que não apresentam filhotes com desenvolvimento altricial (que necessitam de cuidado parental logo após o nascimento), esse padrão de territorialidade por parte das fêmeas, não é observado (WOLFF & PETERSON, 1998).

Em machos de espécies de ungulados, padrões de territorialidade podem ser observados em situações em que seja necessário, manter as fêmeas em seu rebanho ou quando ocorre o estabelecimento de um sistema de marcação de limites do território (marcando o centro e/ou o entorno) por meio de urina, fezes ou secreções de glândulas da pele (WALTHER et al., 1983).

Entre os ungulados pouco conhecidos, está a anta, *Tapirus terrestris*, que é uma espécie de comportamento solitário. *T. terrestris* não apresenta padrão de territorialidade por parte das fêmeas, quando considera-se o desenvolvimento precocial dos filhotes. Entretanto a diferença de comportamento entre machos e fêmeas ainda é pouco conhecida, mas estudos vem mostrando que esses animais podem apresentar diferentes comportamentos quanto à dispersão, uso de áreas e marcação de territórios por latrina (A. SANCHES et al., dados não publicados).

Antas compreendem animais de um antigo gênero de perissodáctilos, *Tapirus*, que já foi tanto abundante quanto diversificado por todo o globo (EMMONS & FEER, 1997). São mamíferos ungulados, agrupados com os cavalos (Subordem Hippomorpha) e rinocerontes

(Subordem Ceratomorpha) (PITRA & VEITS, 2000). Estes mega-mamíferos têm uma baixa taxa reprodutiva visto que apresentam um longo período de gestação (13 meses) e também o nascimento de apenas um filhote por gestação (SEKIAMA et al., 2006).

Existem quatro espécies sobreviventes de antas, sendo que *T. bairdii*, *T. terrestris* e *T. pinchaque* são encontradas nos Neotrópicos das Américas Central e do Sul e *T. indicus* habitando regiões na floresta tropical do Sudoeste da Ásia (BROOKS et al., 1997). Historicamente as antas já constituíram uma importante fonte de alimento para os indígenas e para o povo rural da América Central (NARANJO & CRUZ, 1998; FLESHER, 1999).



Figura 1. *Tapirus terrestris*; Pantanal (Foto: Mauro Galetti).

Destas espécies, a anta da planície, *T. terrestris*, um dos maiores mamíferos terrestres neotropicais (EMMONS & FEER, 1997), é a que possui a maior distribuição, ocorrendo por toda a América do Sul cis-andina até o Norte da Argentina (BODMER & BROOKS, 1997) (Figura 2). Porém, suas populações vêm sendo reduzidas como resultado da destruição de seu habitat e da caça ilegal (CULLEN et al., 2000; PERES, 2000; SANCHES et al., in press). A situação se torna ainda mais agravante quando se considera aspectos relacionados com a biologia desses animais, como a baixa taxa reprodutiva e a dependência de grandes áreas de vida (PADILLA & DOWLER, 1994; BODMER & BROOKS, 1997). Atualmente, a anta é considerada como uma espécie globalmente vulnerável pela IUCN. Suas populações vêm sofrendo reduções a uma taxa maior que 30% nas últimas três gerações (33 anos), a qual tende a continuar durante as próximas três gerações.

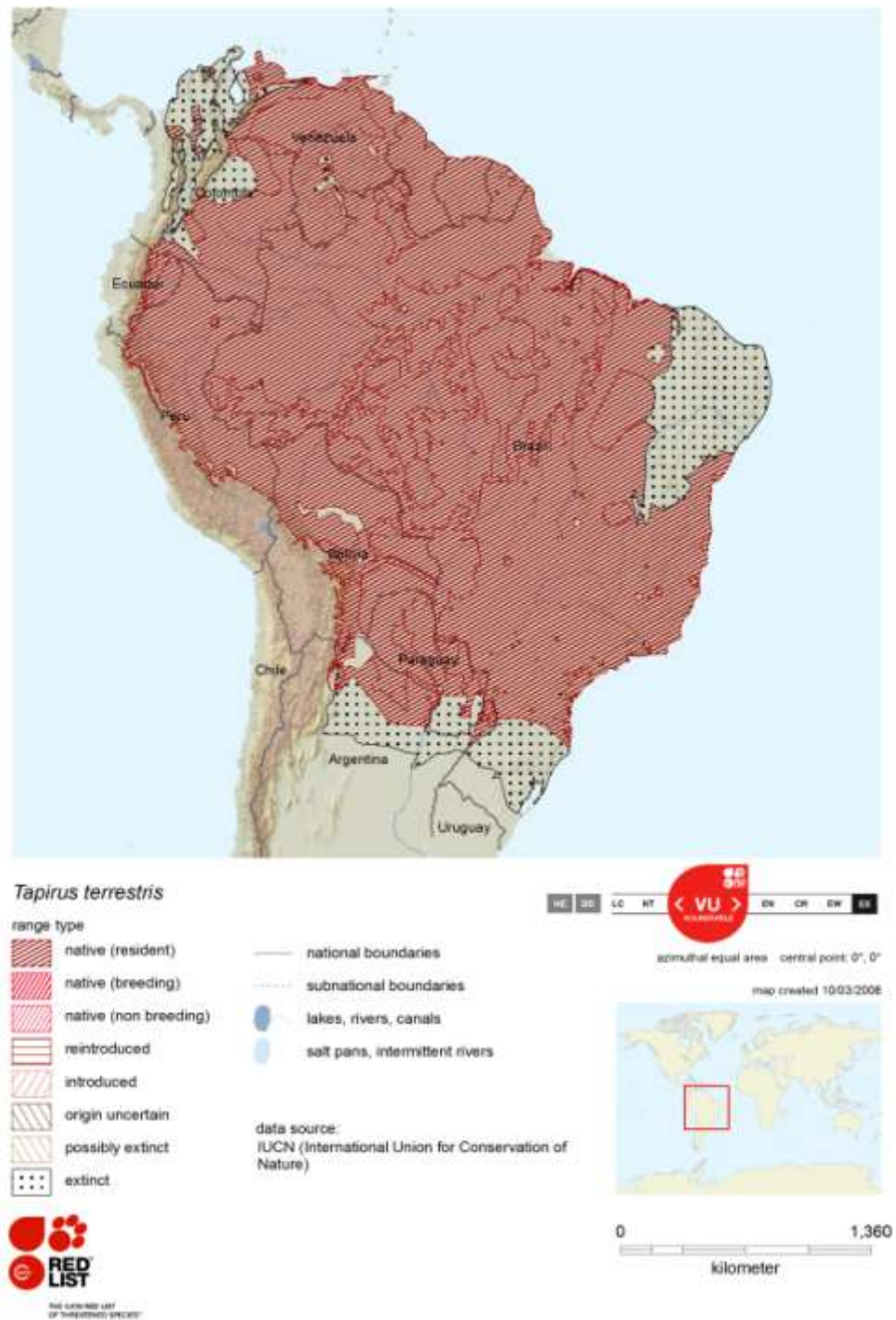


Figura 2: Mapa da distribuição da anta (*T. terrestris*) (retirado de IUCN - www.iucnredlist.org).

T. terrestris tem sua dieta consistindo basicamente de folhas, caules tenros, brotos, pequenos ramos, plantas aquáticas, cascas de árvores, organismos aquáticos e frutos caídos (FRAGOSO, 1994; EMMONS & FEER, 1997). Esses mega-mamíferos desempenham um

importante papel como dispersores de sementes, especialmente porque podem dispersar sementes maiores, em grande quantidade e a longas distâncias (FRAGOSO & HUFFMAN, 2000; GALETTI et al., 2001). Desse modo, participam da estrutura, manutenção e regeneração das florestas. Como consequência, o declínio de suas populações pode significar uma grande ameaça às espécies vegetais que produzem grandes frutos já que sua capacidade em dispersá-las a grandes distâncias parece ser única entre os frugívoros neotropicais (CHAPMAN & ONDERDONK, 1998; PIZO, 2004).

Geralmente, esforços aplicados na conservação são realizados quando determinada espécie já está sofrendo algum tipo de ameaça. Portanto, estudos visando à conservação dessas espécies necessitam que a análise seja eficiente (ou seja, num período curto de tempo), apresente custos reduzidos e, ao mesmo tempo, apresentem resultados precisos e relevantes (MCGREGOR & PEAKE, 1998).

Atualmente, as análises populacionais relacionadas a estudos de conservação, quando se tratando de estimar o tamanho populacional, são realizadas através de transectos, quadrantes e pontos fixos. Quando a análise necessita da identificação de indivíduos da espécie ou da população em estudo, as técnicas normalmente aplicadas requerem a captura do animal, o que pode muitas vezes ocasionar em danos para o próprio aumentando seu risco por predadores, patógenos, parasitas, etc. (MCGREGOR & PEAKE, 1998).

As antas dificilmente são estudadas via técnicas tradicionais de campo e muito pouco é conhecido sobre sua estrutura social, sistema de acasalamento ou estrutura populacional, dificultando a determinação das prioridades para a conservação dessas espécies (NORTON & ASHLEY, 2004). Uma forma de contornar este impasse é a utilização das análises genéticas não-invasivas por meio de marcadores moleculares, que utilizam fezes, urina e pêlos para obtenção de amostras de DNA (MORIN & WOODRUFF, 1996; KOHN & WAYNE, 1997). Análises genéticas não-invasivas são importantes para estudos com espécies raras, sensíveis ou em risco de extinção (HEDMARK, 2004). A implementação de técnicas de obtenção de DNA por este método e o desenvolvimento de marcadores de DNA para identificação individual (microsatélites), tem possibilitado abordagens alternativas para o censo da população e também tem sido implementada em planos de conservação de espécies (e.g. ERNEST et al., 2000; LUCCHINI et al., 2002; HEDMARK, 2004).

Marcadores microsatélites são extensivamente utilizados em estudos populacionais e na identificação individual quando utilizados na análise genética não-invasiva. Existiam somente dois loci polimórficos isolados para *T. bairdii* e quatro para *T. terrestris* (NORTON & ASHLEY, 2004). Esses loci apresentavam um reduzido nível de polimorfismo (3 a 7

alelos) e foram utilizados somente na análise genética de *T. bairdii*. Os autores ressaltaram a necessidade de aumentar o tamanho amostral e o número de loci, mas ainda assim encontraram uma moderada diferenciação entre populações da Costa Rica e Panamá. Este resultado foi considerado um indicativo de um padrão histórico de fluxo gênico reduzido entre ambas as populações, mas que atualmente, com a destruição do habitat, este fluxo pode estar completamente impedido. Desta forma, foi recomendado pelos autores o restabelecimento da conectividade entre essas populações por meio da criação de um Corredor Biológico Mesoamericano.

Uma população de *T. terrestris* do Pontal do Paranapanema foi objeto de um estudo genético com a utilização de microssatélites heterólogos (isolados para outra espécie) e um específico (SILVA, 2007). Mesmo com o pequeno tamanho amostral estudado, o autor encontrou uma significativa estruturação genética para as populações analisadas, ressaltando que o curto período (número de gerações) poderia significar que alguns padrões de estruturação genética estão ainda em transição, podendo ser reflexo de graus de conectividade e fragmentação do passado.

Recentemente, microssatélites foram prospectados para a anta da planície (SANCHES et al., 2009) os quais estão sendo utilizados em um estudo genético populacional (A. SANCHES et al., dados não publicados). Com este estudo que utiliza amostras fecais como fonte de DNA, pretende-se estimar o tamanho das populações e verificar o padrão de movimentação dos animais através da área de estudo. No entanto, além da identificação individual das antas por meio dos microssatélites, a identificação do sexo dos indivíduos por meio de marcadores moleculares ligados a cromossomos X e Y seria mais uma ferramenta importante para estudos populacionais. Com a identificação do sexo das antas, é possível verificar diferenças que possam existir entre os sexos, quanto à dispersão diferencial, uso de áreas e formação de latrinas. A identificação do sexo torna possível avaliar o PVA (*Population Viability Analysis*) em estudos de populações de *Tapirus*. Este compreende um conjunto de modelos e abordagens analíticas para avaliar o risco de extinção de uma espécie levando em consideração sua história de vida, demografia e aspectos genéticos que, quando integrados com a variabilidade ambiental, projetam o curso de populações futuras (BEISSINGER & MCCULLOUGH, 2002).

A utilização de marcadores moleculares no diagnóstico sexual das espécies

A determinação do sexo por análise genética torna-se uma ferramenta essencial quando se tem apenas amostras de tecidos da espécie em estudo ou quando os caracteres sexuais secundários não estão presentes ou são difíceis de serem observados (GRIFFITHS & TIWARI, 1993; GRIFFITHS et al. 1998). A utilização de métodos de sexagem molecular tem sido largamente utilizados em estudos com amostragem não-invasiva, através do DNA das fezes dos animais em estudo (YAMAUCHI et al., 2000). Algumas técnicas podem ser utilizadas para identificar a presença do cromossomo X ou Y, utilizando dois grupos de *primers* (um para a sequência do cromossomo X e outro para a sequência do cromossomo Y), apenas um único par de *primers* (podendo diferir em amplificar comprimentos idênticos ou diferentes dos homólogos X e Y) e também amplificando um marcador específico no cromossomo Y (BRINKMAN, 2008).

A presença ou ausência do cromossomo Y tem sido utilizada para identificação sexual, sendo que muitos dos métodos utilizados nesse processo estão baseados na presença de genes específicos do cromossomo Y. Na síndrome de reversão de sexo em éguas, no tipo mais comum, estas apresentam cariótipo do tipo 64-XY e falta do gene SRY, que pode ser causada pela transferência deste gene do cromossomo Y para o cromossomo X devido a uma permutação anormal na meiose. Dessa forma, em análises moleculares fica evidenciada a presença dos *loci* que representam o cromossomo Y (ZFY, AMEL-Y e STS-Y) e também dos *loci* que representam o cromossomo X (ZFX, AMEL-X e STS-X). Foi observada a ausência do gene SRY, apontada como a única diferença que poderia distinguir um cavalo macho normal. Dessa forma, a presença de um gene presente tanto no cromossomo X como no cromossomo Y torna-se uma grande vantagem na identificação do sexo (BUGNO et al., 2003).

O gene amelogenina (AMEL) codifica uma proteína responsável pelo desenvolvimento da matriz do esmalte do dente em mamíferos (LAGERSTROM et al., 1990; TERMIM et al., 1980) e vem sendo conservado entre os vertebrados durante o processo evolutivo (LYNGSTADAAS et al., 1990). Este gene pode ser encontrado nos cromossomos sexuais X e Y, sendo que em cavalos é 24 bases mais curto no cromossomo Y (AMEL-Y) que no cromossomo X (AMEL-X) (FUKUSHIMA, 1999), e essas diferenças no tamanho podem ser empregadas na determinação de sexagem embriológica, diagnósticos pré-natais e casos forenses (GRZYBOWSKI, 2006). Em campos como filogenética molecular (DELGADO et

al., 2005) e análises de investigação biológica que buscam a determinação do sexo tanto em humanos como em animais, AMEL tem sido extensivamente usado como modelo (SULLIVAN et al., 1993).

Hasegawa et al. (2000) propõe que a análise de ambos genes SRY e AMEL-Y providenciam um diagnóstico preciso e rápido de fêmeas-XY confirmando a existência do cromossomo Y e a falta do gene SRY. Os genes zinc finger (ZF), são outro exemplo de genes presentes em ambos os cromossomos X e Y, que vem sendo estudados em métodos de identificação sexual (PEPPIN et al., 2009; AASEN & MEDRANO, 1990; BÉRUBÉ & PALSROLL, 1996; GARCÍA et al., 1997, FERNANDO & MELNICK, 2001; LUCCHINI, 2002). Os fragmentos amplificados relativamente grandes (868-1278 bp) podem não ser apropriados em amostras com DNA degradado (SHAW et al., 2003). Da modificação dos *primers* descritos por Shaw et al. (2003), Ball et al. (2007) desenvolveram a amplificação de fragmentos do cromossomo X e Y com respectivamente 220 e 200 bp. Essa diferença no comprimento de Zfx e Zfy, segundo Lindsay e Belant (2007) mostra promessas na identificação sexual por meio destes genes.

Entretanto, como não existem relatos sobre a utilização de marcadores moleculares na identificação sexual de *T. terrestris*, este projeto propõe testar e padronizar alguns dos marcadores existentes para espécies próximas. Optou-se por utilizar o gene da amelogenina, dada a necessidade de um único par de *primers* para a amplificação dos segmentos de diferentes tamanhos nos cromossomos X e Y. Com isso, além da identificação individual que vem sendo realizada utilizando amostras fecais de antas coletadas em campo, será possível a identificação do sexo do animal que depositou as fezes. Portanto, tais marcadores serão muito importantes para os estudos populacionais de *T. terrestris*, possibilitando obter valores relacionados ao PVA (*Population Viability Analysis*) e podendo ainda ser utilizados em outras espécies de antas.

2. OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo padronizar um método para a identificação sexual da anta (*Tapirus terrestris*), por meio de análises genéticas utilizando marcadores moleculares presentes nos cromossomos sexuais X e Y, disponibilizando uma ferramenta potencialmente útil para estudos populacionais com métodos não-invasivos.

3. METODOLOGIA

Para a padronização dos marcadores foram utilizadas amostras de DNA de boa qualidade, ou seja, que não fossem degradadas. Para tanto, foram utilizadas amostras sanguíneas de anta previamente coletadas, com as devidas autorizações, em estudos desenvolvidos por pesquisadores do Parque Nacional de Emas, sob responsabilidade do Dr. Leandro Silveira. Como os animais foram capturados para a coleta sanguínea, o sexo dos indivíduos já foi identificado (Tabela 1).

Tabela 1: Amostras sanguíneas de dez indivíduos de *Tapirus terrestris* do Parque Nacional de Emas, Goiás, Brasil.

Identificação do Indivíduo	Sexo
300	Macho
301	Fêmea
302	Macho
303	Fêmea
304	Macho
305	Fêmea
306	Fêmea
307	Macho
308	Macho
309	Fêmea

3.1. Extração de DNA de amostras sanguíneas

Para as extrações de DNA das amostras sanguíneas de antas, foi utilizado o protocolo proposto por Lahiri e Nurnberger (1991), com algumas modificações:

- 1) Colocou-se 25 μ L de sangue em tubo de 1,5 mL contendo 150 μ L de EDTA (0,5 M).
- 2) Misturou-se vigorosamente por 30 a 40 segundos.
- 3) Centrifugou-se por 7 minutos a 5000 rpm para separação das células e do plasma.
- 4) Retirou-se o sobrenadante com cuidado para não retirar o pellet, e adicionou-se 500 μ L de TTKM 1 para lise das hemácias. Misturou-se vigorosamente.

- 5) Centrifugou-se por 7 minutos a 5000 rpm e descartou-se o sobrenadante.
 - 6) Lavou-se o precipitado em 500 μ L de TTKM 1 e centrifugou-se por 2 minutos.
 - 7) O sobrenadante foi descartado e lavado em 500 μ L de TKM 1. Centrifugou-se por 2 minutos.
 - 8) Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 200 μ L de TKM 2, 20 μ L de SDS 10% e ressuspendeu-se até dissolver por completo, misturando vigorosamente por 3 minutos.
 - 9) Incubou-se a 65° C por 15 minutos.
 - 10) Adicionou-se 50 μ L de NaCl 5M e misturou-se vigorosamente por 3 minutos.
 - 11) Centrifugou-se a 13.000 rpm por 10 minutos, recuperou-se o sobrenadante passando para um novo tubo.
 - 12) Adicionou-se 600 μ L de etanol (100%) gelado. Inverteu-se o tubo (mexer) para que o DNA precipitasse. Centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 rpm.
 - 13) Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 500 μ L de etanol (70%) gelado e centrifugou-se por 2 minutos.
 - 14) Descartou-se o sobrenadante com cuidado e inverteu-se o tubo sobre um papel absorvente até que secasse totalmente.
 - 15) Ressuspendeu-se em 50 μ L de TE.
- Soluções:
 - TTKM 1: Tris-HCl 10 mM pH 7,6; MgCl₂ 10 mM; EDTA 2 mM; Triton X -100 0,25%.
 - TKM 1: Tris-HCl 10 mM pH 7,6; MgCl₂ 10 mM; EDTA 2 mM.
 - TKM 2: Tris-HCl 10 mM pH 7,6; MgCl₂ 10 mM; EDTA 2 mM; NaCl 100mM.
 - TE: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8

3.2. Testes e padronização dos marcadores para identificação sexual

Para a identificação do sexo foi utilizado como marcador o gene da amelogenina que está presente nos cromossomos X e Y de mamíferos, com tamanhos diferenciados já que no cromossomo Y esse gene apresenta uma deleção. Anteriormente ao desenvolvimento deste projeto, um par de *primers* desenvolvido para cavalos havia sido testado pela Dra. Alexandra Sanches. Como não foi obtida amplificação para nenhuma das amostras, foi dado início ao teste com outros marcadores disponíveis na literatura. Dois pares de *primers* foram testados para a amplificação do gene:

- par SE47 (5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGC-3') e SE48 (5'-CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC-3'), desenvolvido para bovinos que amplifica um fragmento de 280 pb em fêmeas e em machos um de 280 pb e outro 217 pb (ENNIS & GALLAGHER, 1994).

- par KY1 (5'-GCCCAGCAGCCCTTCCAG-3') e KY2 (5'-TGGCCAAGCTTCCAGAGGCA-3'), desenvolvido para uma espécie de cervídeo da Ásia (*Cervus nippon*) que amplifica uma sequência parcial do gene amelogenina, sendo que nas fêmeas um fragmento de 219 pb é amplificado e nos machos um de 219 pb e outro de 165 pb (YAMAUCHI et al., 2000).

Esses marcadores foram selecionados, pois de acordo com a literatura, este gene se mantém conservado entre diferentes espécies (LYNGSTADAAS et al., 1990) e, além disso, amplificam fragmentos curtos entre 165-280 pb, o que os torna ideais para análises de DNA provenientes de amostras não-invasivas.

Foram adotados marcadores que estão presentes em ambos os cromossomos sexuais, os quais são amplificados com um único par de *primers*, minimizando a possibilidade de erros de identificação. As PCRs foram inicialmente realizadas conforme descrito pelos respectivos autores, e conforme a necessidade algumas variações foram testadas, como as concentrações de DNA e MgCl₂, além das temperaturas de anelamento.

Experimento 1

No primeiro teste, a PCR foi realizada com quatro amostras de *T. terrestris* (dois machos, duas fêmeas), onde cada reação conteve em um volume final de 10 μ L, 50 ng de DNA, 1x de tampão da PCR 10 x, 2 mM $MgCl_2$, 2,5 mM de dNTP, 10 pmol de cada um dos *primers* (KY1 e KY2) e 1 U de Taq DNA polimerase. O ciclo foi iniciado com uma desnaturação a 95° C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94° C por 1 min, 58° C por 1 min, 72° C por 1 min, e uma extensão final de 15 minutos a 72° C.

Experimento 2

Neste experimento, foi realizada uma PCR de gradiente de temperatura de anelamento para identificar aquela que produzisse uma amplificação consistente. Para tanto, foram utilizados cerca de 50 ng de DNA de dois indivíduos (um macho e um fêmea), 10 pmol de cada um dos *primers* (KY1 e KY2), 0.4 μ g de BSA, 0.5 mM de $MgCl_2$ adicional e 12.5 μ l de *GoTaq Green Master Mix (Promega)* em um volume final de 25 μ l. Foi utilizado o mesmo ciclo do experimento acima, onde foram testadas as temperaturas de anelamento de 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C e 62° C. Este experimento foi repetido por cerca de onze vezes, com variações nas temperaturas de anelamento dos *primers*.

Experimento 3

Neste terceiro experimento, foi realizada uma PCR de gradiente de temperatura de anelamento, utilizando os *primers* SE47 e SE48. Foram utilizados cerca de 50 ng de DNA de três indivíduos (dois machos e uma fêmea), 10 pmol de cada um dos *primers* (SE47 e SE48), 0.4 μ g de BSA, 0.5 mM de $MgCl_2$ adicional e 12.5 μ l de *GoTaq Green Master Mix (Promega)* em um volume final de 25 μ l. Foi utilizado o mesmo ciclo dos outros experimentos acima, onde foram testadas as temperaturas de anelamento de 52°C, 54°C, 56°C

e 58°C. Este experimento foi repetido por mais duas vezes com variações nas temperaturas de anelamento dos *primers*.

Experimento 4

Neste experimento, foi realizada novamente uma PCR de gradiente de temperatura de anelamento para identificar aquela que produzisse uma amplificação consistente. Foram utilizados cerca de 50 ng de DNA de três indivíduos (dois machos e uma fêmea), 10 pmol de cada um dos *primers* (KY1 e KY2), 0.4 µg de BSA, 0.5 mM de MgCl₂ adicional e 12.5 µl de *GoTaq Green Master Mix (Promega)* em um volume final de 25 µl. Foi utilizado o mesmo ciclo dos outros experimentos acima, onde foram testadas as temperaturas de anelamento de 50°C, 52°C, 54°C, 56°C.

3.3. Purificação do produto de PCR para Sequenciamento

A fim de obter amplificações mais consistentes e padrões que fossem repetitivos e confiáveis, foi realizada a purificação da banda de tamanho esperado, produto da PCR do experimento 4, e posterior seqüenciamento para o desenho de *primers* específicos para *T. terrestris*. Para a purificação foi utilizado o kit “*Kit Wizard SV gel and PCR clean up systems*” (*PROMEGA*) seguindo as recomendações do fabricante.

Após a purificação, o produto de PCR foi enviado para o Centro de Estudos do Genoma Humano – USP para seqüenciamento dos fragmentos obtidos.

3.4. Sequenciamento

Foram realizadas oito reações de sequenciamento, quatro fragmentos de fêmeas e quatro fragmentos de machos (banda menor do Experimento 4).

Os fragmentos de interesse foram sequenciados com a utilização do *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (código 4337456) em um sequenciador automático *ABI 3730 DNA Analyser* pertencente ao Centro de Estudos do Genoma Humano – USP sob coordenação da Prof^a. Dra. Mayana Zatz e da Prof^a. Dra. Maria Rita Passos Bueno.

3.5. Alinhamento das sequências do gene da amelogenina

As sequências do gene da amelogenina obtidas para *T. terrestris* no presente estudo foram submetidas ao *MEGABLAST*, como forma de obter sequências nucleotídicas mais similares depositadas no *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*. As sequências mais similares à sequência obtida foram adquiridas por *download* do banco de dados do GenBank. O programa *MEGA Version 3.1* (KUMAR et al., 2004) permitiu o alinhamento da sequência de nucleotídeos AMEL de *T. terrestris* com as sequências de outras espécies obtidas pelo *MEGABLAST*, possibilitando observar o grau de similaridade entre as mesmas. Estimativas de distância genética foram calculadas entre os pares de espécies utilizando o modelo de Kimura dois-parâmetros (Kimura 1980), as quais foram utilizadas para a construção de uma árvore de *neighbor-joining* (Saitou & Nei 1987) que teve o grau de confiança da configuração dos ramos avaliado pelo método de *bootstrap* (1000 réplicas).

Através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) foram construídas as figuras com as sequências já alinhadas das espécies próximas da anta, evidenciando suas similaridades e diferenças.

Para a confecção dos *primers* específicos para *T. terrestris* foi utilizado o programa *GeneRunner* (Hastings Softwares, INC, Hastings, NY, USP).

4. Resultados

4.1. Ensaios com marcadores KY1/KY2 e SE47/SE48

Após a extração do DNA das amostras dos dez indivíduos de *T. terrestris*, provenientes do Parque Nacional de Emas, foram realizados vários testes com variações nas concentrações dos diferentes componentes da PCR. Além disso, foram testadas diferentes temperaturas de anelamento em PCR com gradiente de temperatura. Os ensaios foram iniciados com a utilização do par de *primers* KY1 e KY2 (YAMAUCHI et al., 2000) e os resultados obtidos em cada tipo de ensaio estão relatados abaixo:

Experimento 1

Este primeiro teste realizado com o par de *primers* KY1 e KY2 produziu ampliações inconsistentes quanto ao que era esperado da sexagem (Figura 3). Foi verificada tanto em machos como em fêmeas a presença de uma única banda de cerca de 250 pb acompanhada de bandas espúreas maiores e mais fracas.

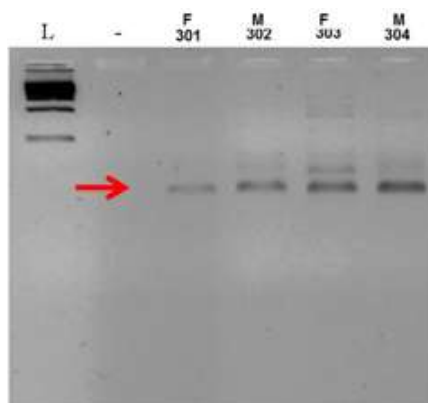


Figura 3. Resultados do experimento 1 - Gel de agarose 1,5% mostrando o resultado da amplificação com os *primers* KY1 e KY2 em quatro amostras de DNA de *T. terrestris*, sendo duas fêmeas (F) e dois machos (M). Marcador de peso molecular (L) e controle negativo (-). Seta indica a banda esperada.

Experimento 2

Nesse teste, realizado com os *primers* KY1 e KY2, a temperatura de 52°C produziu resultados próximos do esperado para o macho, entretanto as temperaturas de 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C não apresentaram a segunda banda referente ao cromossomo Y. As amostras de fêmea não amplificaram para nenhuma temperatura (Figura 4).

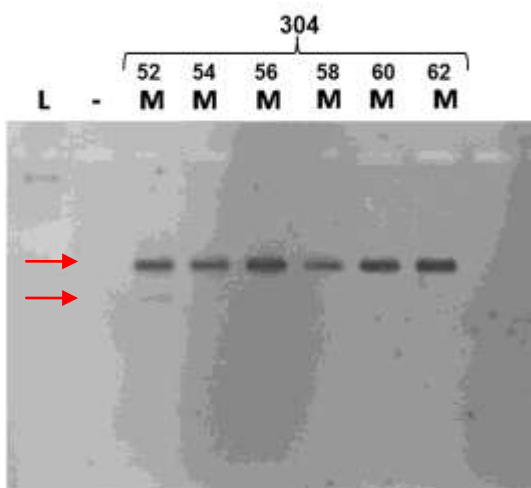


Figura 4. Resultados do experimento 2 - Gel de agarose 1,5% mostrando o resultado da amplificação com gradiente de temperatura (52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C) utilizando-se os *primers* KY1 e KY2 em uma amostra de DNA de macho (M) de *T. terrestris* (amostra nº304), em diferentes temperaturas. Marcador de peso molecular (L) e controle negativo (-). Setas indicam as bandas esperadas.

Experimento 3

Num terceiro experimento foram utilizados os *primers* SE47 e SE48. A amplificação não produziu os resultados esperados tanto para machos como para fêmeas em todas as temperaturas testadas (Figura 5.)

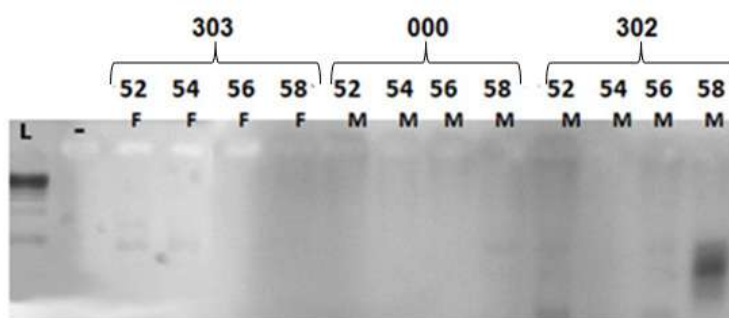


Figura 5. Resultados do experimento 3 - Gel de agarose 1,5% mostrando o resultado da amplificação com os *primers* SE47 e SE48 em três amostras de DNA de *T. terrestris*, sendo dois machos (M) e uma fêmea (F) em diferentes temperaturas. Marcador de peso molecular (L) e controle negativo (-).

Experimento 4

Neste experimento, foram utilizados os *primers* KY1 e KY2. As temperaturas utilizadas produziram resultados próximos ao que era esperado, onde o macho apresentava uma banda adicional menor. Porém, os resultados tanto para macho como fêmea, mostram muitas bandas espúrias ou amplificações inespecíficas. Além disso, um dos machos não apresentou amplificação (Figura 6).

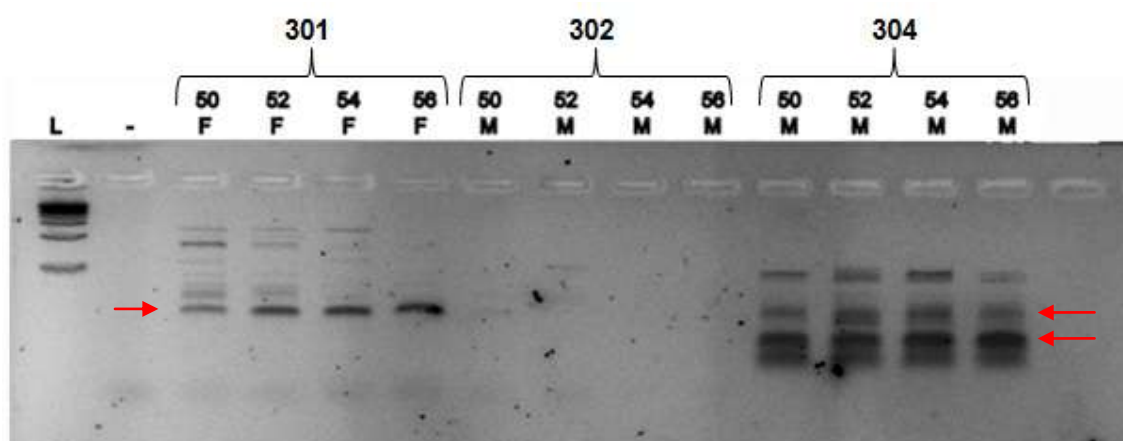


Figura 6. Resultados do experimento 4 - Gel de agarose 1,5% mostrando o resultado da amplificação com gradiente de temperatura com a utilização *primers* KY1 e KY2 em três amostras de DNA de *T. terrestris*, sendo dois machos (M) e uma fêmea (F). Marcador de peso molecular (L) e controle negativo (-). Setas indicam as bandas esperadas.

Este padrão não foi obtido em repetidas PCRs, indicando a necessidade de mais ajustes nas reações ou, como outra possibilidade, do seqüenciamento dos fragmentos obtidos para o desenho de novos marcadores específicos para *T. terrestris*. Portanto, as bandas de tamanho esperado foram eluídas do gel, purificadas e seqüenciadas.

4.2. Similaridade da sequência de AMEL de *T. terrestris* (Tt1) e outras espécies

4.2.1. Similaridade com espécies próximas

Das amostras enviadas para seqüenciamento, somente a banda maior resultou em sequências de boa qualidade, dentre estas somente uma (aquela com menos ruído) foi utilizada para as análises (Tt 1). Para a banda de menor tamanho foram obtidas sequências repletas de ruídos e picos duplos. A sequência Tt1 foi submetida ao *MEGABLAST* para uma busca das dez sequências mais similares resultando na relação descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Sequências obtidas após pesquisa no *MEGABLAST* de formas mais próximas da sequência de consulta resultante do seqüenciamento de Tt1.

Número de Acesso	Espécies	Score	E Value	Max ident %
EU168871.1	<i>Tapirus terrestris</i> amelogenin (AMELX) gene, exon 6 and partial cds	235	0.0	98%
EU168872.1	<i>Ceratotherium simum</i> amelogenin (AMELX) gene, exon 6 and partial cds	213	0.0	95%
EU168869.1	<i>Equus caballus</i> amelogenin (AMELX) gene, exon 6 and partial cds	213	0.0	95%
AB091793.1	<i>Equus caballus</i> AMELX gene for amelogenin, partial cds	213	0.0	95%
NM 001085422.1	<i>Equus caballus</i> amelogenin, Y-linked (AMELY), mRNA>dbj AB032194.1	213	0.0	95%
NM 001081827.1	<i>Equus caballus</i> amelogenin, X-linked (AMELX), mRNA>dbj AB032193.1	213	0.0	95%
EU168876.1	<i>Halichoerus grypus</i> amelogenin (AMELX) gene, exon 6 and partial cds	196	0.0	93%
AY171059.1	<i>Taxidea taxus</i> isolate BadgerM tooth enamel protein (AMEL) gene, exon 5 and partial cds	193	0.0	92%
AY171058.1	<i>Taxidea taxus</i> isolate BadgerF tooth enamel protein (AMEL) gene, exon 5 and partial cds	193	0.0	92%
EU879967.1	<i>Felis catus</i> AMELX mRNA, complete sequence	191	0.0	92%

A sequência AMEL-X de *Tapirus terrestris* (número de acesso GenBank EU168871.1), apresentou o maior grau de similaridade com a sequência Tt1 na análise do BLAST. As sequências de AMEL-X de *Tapirus terrestris* (GenBank) e de AMEL-X e AMEL-Y de *Equus caballus* (número de acesso GenBank AMEL-X AB091793.1 e AMEL-Y AB091794.1) foram obtidas no GenBank para gerar o alinhamento com a sequência obtida no presente estudo (Tt1) (Figura 7). Vale ressaltar que das espécies mais próximas da anta, que apresentavam sequência AMEL disponíveis no GenBank, apenas *E. caballus* continha AMEL-X e AMEL-Y.

Nas sequências alinhadas buscou-se pelos sítios de anelamento dos *primers* KY1 e KY2 e, utilizando as sequências AMEL-X e AMEL-Y de *E. caballus* buscou-se pela deleção esperada no cromossomo Y. Com isso foi possível verificar que os *primers* são complementares à sequência alvo em *T. terrestris*. A análise das sequências AMEL-X e AMEL-Y de *E. caballus* mostra que a deleção de cerca de 45 pb não está presente no cromossomo Y desta espécie, porém pode-se verificar que o *primer* KY1 está posicionado sobre as bases iniciais de uma deleção de 15 pb. Não foi possível analisar na Figura 7 o anelamento do *primer* KY2 ao cromossomo Y de *E. caballus*, já que a sequência disponível no GenBank não mostra essa região.

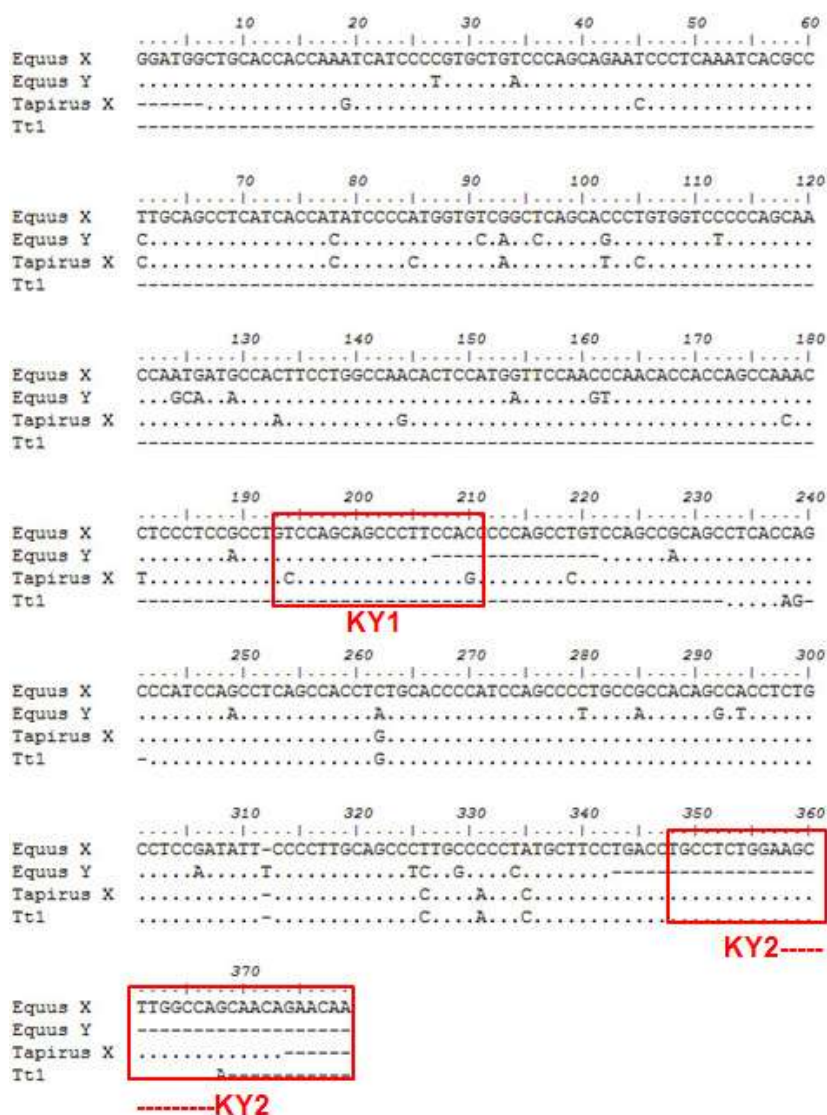


Figura 7. Comparação da sequência de DNA de AMEL-X e AMEL-Y de *Equus caballus*, AMEL-X de *Tapirus terrestris* e da sequência Tt-1. Quadros vermelhos indicam o local em que os *primers* KY1 e KY2 se anelam em AMEL de *T. terrestris*. Pontos indicam similaridade com o nucleotídeo tendo a sequência do topo da coluna como referência. Traço indica ausência de um nucleotídeo. Número de acesso no GenBank para *E. caballus* AMEL-X AB091793.1 e AMEL-Y AB091794.1 e *T. terrestris* AMEL-X EU168871.1.

4.2.2. Similaridade com *Alces alces*, *Oreamnos americanus* e *Odocoileus hemionus sitkensis*

Ao alinhamento entre as espécies próximas a Tt1 mostrado no sub-item anterior, foram adicionadas também as sequências de três ungulados que tiveram a sexagem realizada com sucesso, a partir de DNA de amostras não-invasivas, por meio dos *primers* KY1/KY2 segundo Brinkman & Hundertmark (2009). Foi evidenciado, por meio deste alinhamento (Figura 8), que a deleção existente no cromossomo Y de *A. alces*, *O. americanus* e *O. sitkensis* não existe no cromossomo Y de *E. caballus*, espécie próxima de *T. terrestris*.

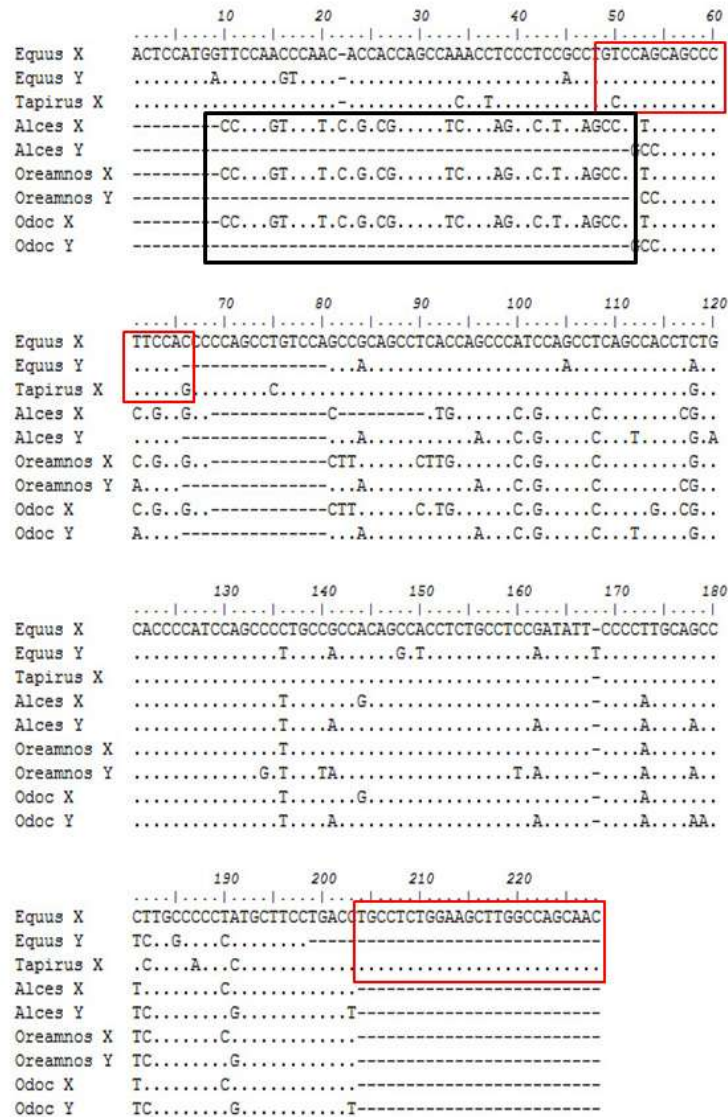


Figura 8. Alinhamento de uma porção de AMEL de *Equus caballus*, *Tapirus terrestris*, *Alces alces*, *Oreamnos americanus* e *Odocoileus hemionus sitkensis*. Pontos indicam um nucleotídeo em comum com a sequência-referência (*Equus X*). Traço indica ausência de um nucleotídeo em relação à sequência referência. O quadro preto mostra a deleção em AMEL-Y de *A. alces*, *O. americanus* e *O. hemionus sitkensis*, que não é observada em AMEL-Y de *E. caballus*. Os quadros vermelhos indicam os sítios de anelamento dos primers KY1 e KY2 em *T. terrestris* e *E. caballus*. O sítio de anelamento de KY1 não foi encontrado nos cervídeos pois não possuíam sequência FORWARD disponível que evidenciasse. Número de acesso no GenBank EU168871 (*Tapirus X*), AB091793 (*Equus X*), AB091794 (*Equus Y*), FJ434496 (*Alces X*), FJ434497 (*Alces Y*), FJ434492 (*Oreamnos X*), FJ434493 (*Oreamnos Y*), FJ434490.1 (*Odoc X*), FJ434491.1 (*Odoc Y*).

4.2.3. *Primers* SE47/SE48 na amplificação do gene da amelogenina em *T. terrestris*

Como mostra a Figura 5 do experimento 3, não foi obtida amplificação consistente com a utilização dos *primers* SE originalmente desenvolvidos para bovinos (ENNIS & GALLAGHER, 1994). Foram submetidas ao alinhamento as sequências de AMEL Tt1 e as sequências obtidas do GenBank de *T. terrestris*, *E. caballus* e *Bos taurus* (Figura 9). A região de anelamento do *primer* SE47 em *T. terrestris* possui duas bases não complementares. A região de anelamento do *primer* SE48 não pôde ser visualizada, pois a sequência de *Bos taurus* disponível no MEGABLAST não se estendia até o ponto de seu anelamento. Como pode ser observado na Figura 9, a deleção de aproximadamente 60 pb presente no cromossomo Y utilizada para a identificação sexual em *B. taurus* está presente em ambos os cromossomos de *E. caballus* (X e Y), bem como AMEL-X de *T. terrestris*.

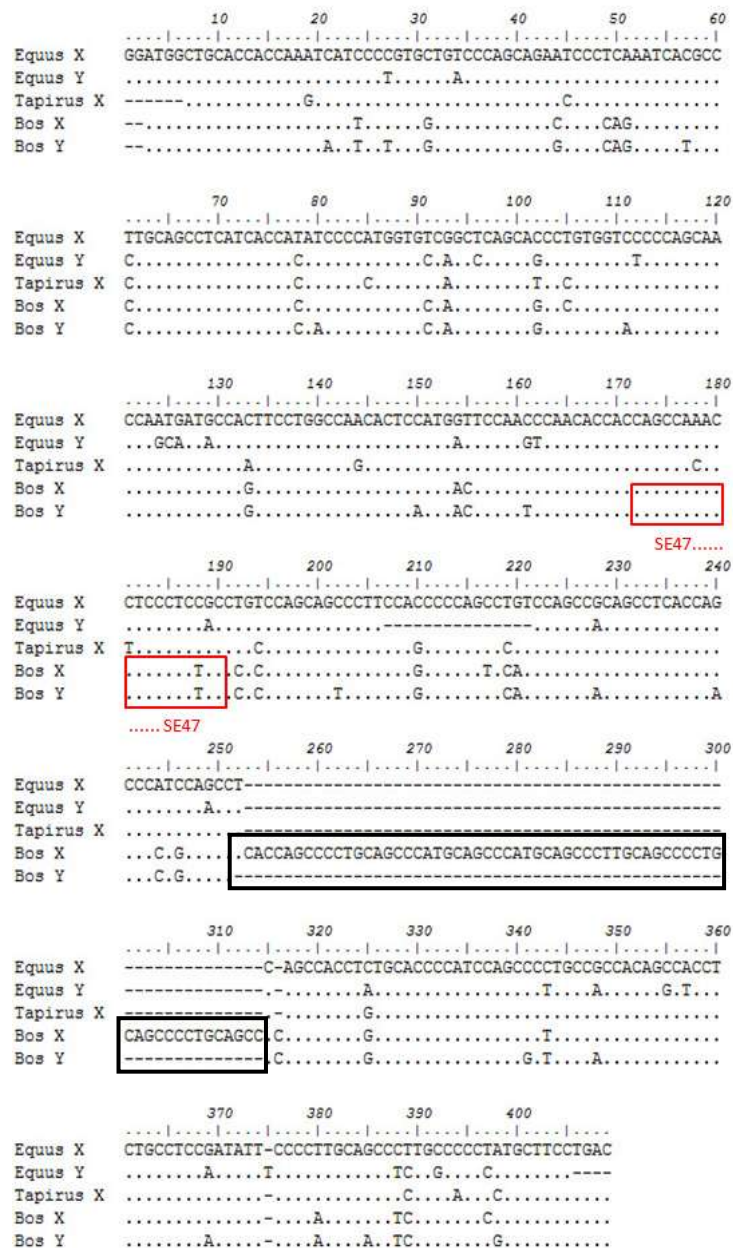


Figura 9. Comparação da sequência de DNA de AMEL para as espécies *Equus caballus*, *Tapirus terrestris*, *Bos taurus* e região de anelamento de SE47/SE48. O quadro vermelho indica a região de alinhamento do *primer* SE47. O quadro preto mostra a região da deleção no cromossomo Y de *B. taurus*, utilizada para a identificação sexual. Pontos indicam similaridade com o nucleotídeo da sequência-referência no topo da coluna. Traço indica ausência de um nucleotídeo. Número de acesso no GenBank AB091793 (*Equus* X), AB091794 (*Equus* Y), EU168871 (*Tapirus* X), AB091789 (*Bos* X), AB091790 (*Bos* Y).

4.2.4. Análise Filogenética

A partir das sequências AMEL de *A. alces*, *O. sitkensis*, *O. americanus*, *B. taurus*, *E. caballus* e *T. terrestris* foi obtida a matriz de distância genética (Tabela 3) utilizada para construir a árvore (Figura 10) que ilustra a relação filogenética entre as espécies.

Tabela 3. Matriz de distância genética entre *A. alces*, *O. sitkensis*, *O. americanus*, *B. taurus*, *E. caballus* e *T. terrestris* a partir das sequências AMEL X.

	X <i>Equus caballus</i>	X <i>Tapirus terrestris</i>	X <i>Bos taurus</i>	X <i>Alces alces</i>	X <i>Odocoileus hemionus</i>	X <i>Oreamnos americanus</i>
X <i>Equus caballus</i>	-	-	-	-	-	-
X <i>Tapirus terrestris</i>	0.042	-	-	-	-	-
X <i>Bos taurus</i>	0.222	0.214	-	-	-	-
X <i>Alces alces</i>	0.229	0.237	0.061	-	-	-
X <i>Odocoileus hemionus</i>	0.237	0.245	0.067	0.006	-	-
X <i>Oreamnos americanus</i>	0.229	0.222	0.048	0.024	0.030	-

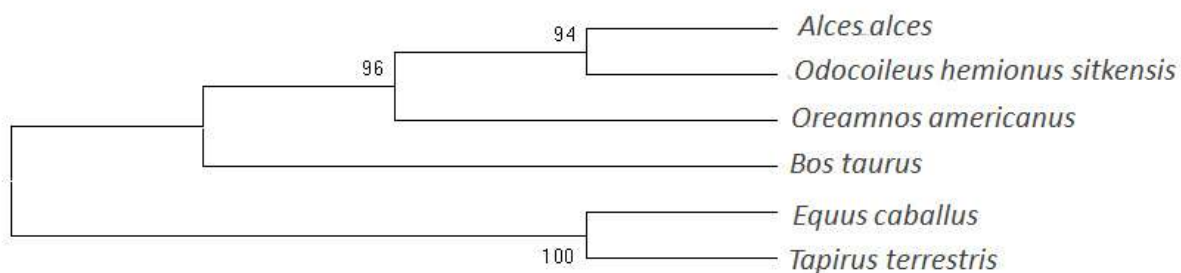


Figura 10. Árvore Filogenética produzida no programa *MEGA Version 3.1*, pelo método de *Neighbor-Joining*, *Bootstrap* 1000 réplicas, modelo de Kimura 2 parâmetros.

5. DISCUSSÃO

Em um estudo recente os marcadores testados no presente estudo, mostraram ser efetivos na sexagem de diferentes espécies de ungulados (BRINKMAN & HUNDERTMARK, 2009) e sua padronização para a sexagem das antas, especialmente de amostras não-invasivas, seria um grande avanço para os estudos populacionais de *T. terrestris*, podendo ainda ser utilizados em outras espécies de antas. Em experimentos com amostras sanguíneas de *T. terrestris* com *primers* de identificação sexual já desenvolvidos para *Equus caballus* (HASEGAWA et al., 2000), as amplificações não tiveram sucesso (A. SANCHES, dados não publicados).

Diante disso, buscou-se na literatura marcadores de identificação sexual para espécies próximas da anta. Foi utilizado o par de *primers* desenvolvido para uma espécie de cervídeo (*Cervus nippon*), KY1/KY2 (YAMAUCHI et al., 2000), e o par de *primers* desenvolvido para bovinos, SE47/SE48 (ENNIS & GALLAGHER, 1994). Estes marcadores foram selecionados, pois amplificam com apenas um par de *primers*; seus *primers* foram desenhados também para ungulados; o gene da amelogenina é conservado entre espécies (LYNGSTADAAS et al., 1990) e inclusive utilizado em estudos filogenéticos (DELGADO et al., 2005); o fragmento amplificado é relativamente curto (cerca de 220 pb) e, portanto, se mostra como uma ferramenta promissora para análises genéticas não-invasivas.

Foram realizados 20 testes com o par de *primers* KY1/KY2. A banda de cerca de 220 pb, esperada para a porção do gene no cromossomo X era eventualmente amplificada. A maior dificuldade estava na obtenção do padrão esperado nos machos (duas bandas). Dos testes realizados, apenas um deles produziu amplificações um pouco mais próximas do resultado esperado, especialmente para os machos, porém, com muitas bandas inespecíficas. Entretanto, em novos testes este padrão não pôde ser repetido. Quanto ao par de *primers* SE47/SE48, em todos os testes realizadas, nenhum êxito foi obtido.

Após a realização de inúmeros testes, a inconsistência e falta de repetibilidade das amplificações mostraram a necessidade de confecção de *primers* específicos para determinação sexual de *T. terrestris*. Para tanto, um fragmento amplificado com sucesso em um dos testes foi purificado e sequenciado. Com a sequência seria possível verificar o motivo

da inconsistência nas amplificações e se este marcador seria realmente eficaz na sexagem das antas.

A alta similaridade encontrada entre a sequência gerada no presente estudo (Tt1) com a sequência AMEL-X de *T. terrestris* e AMEL-X e AMEL-Y de *E. caballus*, conforme análise no *MEGABLAST*, justifica a utilização destas sequências como base para o entendimento do insucesso na utilização dos *primers* KY na sexagem das antas, bem como para o desenho de *primers* específicos.

Foi possível verificar com a análise dessas sequências que os *primers* KY apresentam sítios de anelamento com *T. terrestris*, o que possibilitou gerar a sequência descrita no presente estudo (Tt1).

O alinhamento de AMEL de Tt1 com essas espécies próximas, especialmente com a sequência AMEL-Y de *Equus caballus*, mostra que não existe diferença entre as porções amplificadas do cromossomo X e Y do gene da amelogenina para *T. terrestris* e *E. caballus*, explicando os resultados negativos encontrados na sexagem de machos na grande maioria dos testes. Dentre essas espécies a deleção esperada no cromossomo não existe como o que foi relatado para as espécies de cervídeos em Brinkman & Hundertmark (2009).

A banda adicional apresentada por um macho, observada em um único dentre os inúmeros testes possivelmente se tratava de uma amplificação inespecífica, visto que, a estringência das reações era diminuída conforme o insucesso da sexagem dos machos. Esta banda também foi purificada e sequenciada, o que resultou em uma sequência com picos duplos e com ruídos.

Entretanto, no sentido de verificar a região em que se encontrava a deleção do Y nas outras espécies, as sequências nucleotídicas de AMEL-X e AMEL-Y das três espécies de cervídeos testadas em Brinkman & Hundertmark (2009), *Oreamnos americanus*, *Alces alces* e *Odocoileus hemionus sitkensis*, foram adicionadas ao alinhamento anterior (*Tapirus terrestris* e *E. caballus*). Este alinhamento (Figura 8) evidenciou a localização da deleção presente em AMEL-Y nas três espécies de cervídeos, enquanto que em AMEL-Y de *E. caballus* essa deleção não ocorre. Com base na proximidade de *T. terrestris* com *E. caballus*, tal deleção também não deve existir para a anta.

Diante deste último alinhamento é possível ainda verificar que a extremidade do *primer* KY1 tem o sítio de alinhamento sobre o início de uma deleção presente no AMEL-Y de *E. caballus*. Este fato reforça a inconsistência na sexagem dos machos de antas com a utilização deste par de *primers*. A partir da identificação desta deleção no AMEL-Y de

cavalo, verificou-se que este mesmo padrão se repetia em diferentes sequências de *E. caballus* disponíveis no GenBank.

Quanto a SE47/SE48, o alinhamento de AMEL para as espécies *Equus caballus*, *Tapirus terrestris* e *Bos taurus* evidencia que a deleção presente no cromossomo Y de *B. taurus* apresenta-se também no cromossomo X de *T. terrestris* e também nos cromossomos X e Y de *E. caballus*. Observando a árvore filogenética produzida no MEGABLAST, como *E. caballus* apresentou maior semelhança com AMEL de *T. terrestris*, e também por estar mais próximo filogeneticamente quando comparado com *B. taurus*, essa deleção provavelmente está presente também em AMEL-Y de *T. terrestris*. Dessa forma, mesmo que estes marcadores apresentassem alguma amplificação para fragmentos de *T. terrestris*, haveria erros na distinção de machos e fêmeas.

Frente à necessidade de marcadores para a determinação sexual da anta e aos marcadores testados sem êxito, essa deleção identificada em *E. caballus* significou uma nova possibilidade para a sexagem desses animais. Na literatura, um par de *primers* é amplamente utilizado na sexagem de cavalos (HASEGAWA, 2000). Esse foi o primeiro par de marcadores utilizado como teste para *T. terrestris*, porém não produziram amplificação alguma. Estes *primers* são longos (30 pb) e não são perfeitamente complementares a *T. terrestris*.

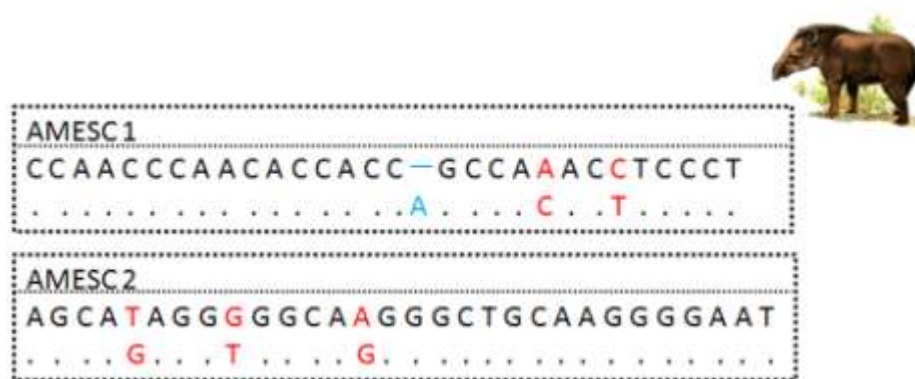


Figura 11. Sequência dos *primers* AMESC 1 e AMESC 2 específicos para *Equus caballus*. Os pontos representam similaridade da sequência AMEL de *T. terrestris* com os nucleotídeos do *primer*. Letras em vermelho representam bases não complementares de *T. terrestris* com AMESC 1 e 2. Letras em azul representam inserção/deleção de bases.

Com isso, um par de *primers* foi desenhado para a *T. terrestris* utilizando as mesmas regiões dos *primers* desenhados para cavalos. Porém, esse novo par de oligonucleotídeos, além da vantagem de ser específico sendo perfeitamente complementar a *T. terrestris*, foi desenhado com 20 pb cada um, facilitando a amplificação de DNA de amostras não-invasivas.

Esses marcadores podem ser ferramentas promissoras em estudos genéticos populacionais, fornecendo dados sobre a razão sexual dos indivíduos da população, auxiliando em planos de manejo visando à conservação da espécie.

6. CONCLUSÕES FINAIS

- ✓ O método de identificação sexual de *Tapirus terrestris* testado neste trabalho, utilizando marcadores moleculares presentes nos cromossomos sexuais, sendo estes específicos para espécies de bovinos (SE47/SE48), não apresentou sucesso em nenhum dos testes realizados. Além disso, ainda que sua amplificação tivesse êxito para *T. terrestris*, com base na utilização de AMEL de *E. caballus* como referência já que é sua espécie mais próxima, não existiria diferença em tamanho entre os cromossomos X e Y, como observada para os bovinos.
- ✓ O método de identificação sexual testado em *T. terrestris* utilizando marcadores moleculares desenvolvidos para a espécie *Cervus nippon* (KY1/KY2), não obteve resultados positivos. A deleção presente no cromossomo Y em cervídeos utilizada para identificar os machos, não ocorre em *T. terrestris*.
- ✓ Com base nesses resultados foram desenvolvidos novos pares de *primers* específicos para *T. terrestris*.

LITERATURA CITADA

- AASEN, E., MEDRANO, J.F. 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology*. 8: 1279–1281.
- BALL, M.C., PITHER, R., MANSEAU, M., CLARK, J., PETERSEN, S.D., KINGSTON, S., MORRILL, N., WILSON, P. 2007. Characterization of target nuclear DNA from faeces reduces technical issues associated with the assumptions of low-quality and quantity template. *Conservation Genetics*. 8:577–586.
- BEISSINGER, S. R. & MCCULLOUGH, D. R. 2002. *Population Viability Analysis*. 1a ed. University of Chicago Press. (1): 5-10.
- BÉRUBÉ, M., PALSBOLL, P. 1996. Identification of sex in Cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*. 5: 283–287.
- BODMER, R. E. & BROOKS, D. 1997. Status and action plan of the lowland Tapir (*Tapirus terrestris*). In: D. M. Brooks, R. E. Bodmer, S. Matola, (org). *Tapirs - Status survey and conservation action plan*. Gland and Cambridge: IUCN/SSC Tapir Specialist Group. p. 46-56.
- BRINKMAN, T. J. & HUNDERTMARK, K. J. 2009. Sex identification of northern ungulates using low quality and quantity DNA. *Conservation Genetics*. 10:1189–1193.
- BROOKS, D.M., BODMER, D.M., MATOLA, S. 1997. Status survey and conservation action plan-Tapirs. IUCN/SSC Tapir Specialist Group-Action Plan. Gland, Switzerland: IUCN.
- BUGNO, M., KLUKOWSKA, J., SLOTA, E., TISCHNER, M., SWITONSKI, M. 2003. A sporadic case of the sex-reversed mare (64, XY; SRY negative): molecular and cytogenetic studies of the Y chromosome. *J Vet Med Sci*. (59): 1597-1603
- CHAPMAN, C.A. & ONDERDONK, D.A. 1998. Forest without primates: primate/plant codependency. *American Journal of Primatology*. 45: 127-141.
- CULLEN JR, L., BODMER, R.E., PÁDUA, C.V. 2000. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. *Biol Conserv* 95:49-56.
- DELGADO, S., GIRONDOT, M., SIRE, J-Y. 2005. Molecular evolution of amelogenin in mammals. *Journal of Molecular Evolution* 60, 12-30.
- EMMONS, L. H., FEER, F. 1997. *Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide*. 2a ed. The University of Chicago Press. 307 p.
- ENNIS, S. & GALLAGHER, T.F. 1994. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Anim Genet*. 25:425–427.

- ERNEST, H.B., PENEDO, M.C.T., MAY, B.P., SYVANEN, M., BOYCE, W.M. 2000. Molecular tracking of mountain lions in Yosemite Valley region in California: Genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Mol. Ecol.* 9: 433–441.
- FERNANDO, P. J., MELNICK, D. J. 2001. Molecular sexing eutherian mammals. *Mol. Ecol. Notes.* 1: 350–353.
- FLESHER, K. 1999. Preliminary notes on the conservation status of Baird's tapir, *Tapirus bairdii*, in north-eastern Honduras. *Oryx* 33: 294–300.
- FRAGOSO, J. M. V. 1994. Large mammals and the community dynamics of an Amazonian rain forest. Dissertation. University of Florida, Gainesville, Florida, USA.
- FRAGOSO, J. M. V. & HUFFMAN, J. 2000. Seed-dispersal and seedling recruitment patterns by the last Neotropical megafaunal element in Amazonia, the tapir. *Journal of Tropical Ecology*, 16:369–385.
- FUKUSHIMA, Y., MUKOYAMA, H., SATO, F., HASEGAWA, T., ISHIDA, N., MURAMATSU, S. 1999. *Anim. Sci. J.* 70: J6-J10 (in Japanese).
- GALETTI, M., KEUROGHLIAN, A., HANADA, L. AND MORATO, M.I. 2001. Frugivory and seed dispersal by the lowland Tapir (*Tapirus terrestris*) in Southeast Brazil. *Biotropica*, 33: 723-726.
- GARCÍA, M.E. et al. 1997. Sex specific PCR/RFLP in the canine ZFY/ZFX loci. *Anim. Genet.* 28: 150–158.
- GRIFFITHS, R., & TIWARI, B. 1993. Primers for the differential amplification of the sex-determining region Y gene in a range of mammal species. *Molecular Ecology.* 2: 405-406
- GRIFFITHS, R., DOUBLE, M. C., ORR, K., DAWSON, R. J. G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology.* 7: 1071-1075.
- GRZYBOWSKI, G., PRUSAK, B., ROMANIUK, B. 2006. *Animal Science Papers and Reports.* (24) 2: 111-118
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- HASEGAWA, T., ISHIDA, M., HARIGAYA, T., SATO, F., ISHIDA, N. & MUKOYAMA, H. 1999. Linear SRY transcript in equine testis. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 97–100.
- HASEGAWA, T. et al. 2000. Sex Determination by Simultaneous Amplification of Equine SRY and Amelogenin Genes. *J. Vet. Med. Sci.* 62 (10): 1109-1110.
- HEDMARK, E., FLAGSTAD, O., SEGERSTROM, P., PERSSON, J., LANDA, A., ELLEGREN, H. 2004. DNA-based individual and sex identification from wolverine (*Gulo gulo*) faeces and urine. *Conservation Genetics.* 5: 405-410.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.* 16 (2): 111-120.

- KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5:150-163.
- KOHN, M.H. & WAYNE, R.K. 1997. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution*. 12: 223-227.
- LAGERSTROM, M., DAHL, N., ISELIUS, L., BACKMAN, B., PETTERSON, U. 1990. Mapping of the gene for X-linked amelogenesis imperfect by linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 120-125.
- LAHIRI, D.K. & NURNBERGER JR, J.I. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*. 19:5444.
- LINDSAY, A.R., BELANT, J.L. 2007. A simple and improved PCR-based technique for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) sex identification. *Conserv. Genet.* 9:443-447.
- LUCCHINI, V., FABBRI, E., MARUCCO, F., RICCI, S., BOITANI, L., RANDI, E. 2002. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Mol. Ecol.* 11: 857-868.
- LYNGSTADAAS, S. P., RISNES, S., NORDBO, H., FLONES, A. G. 1990. Amelogenin gene similarity in vertebrates: DNA sequences encoding amelogenin seem to be conserved during evolution. *J. Comp. Physiol.* 160: 469-472.
- MCGREGOR, P., PEAKE, T. 1998. The Role of Individual Identification in Conservation Biology in: Edited by: CARO, T. *Behavioral Ecology and Conservation Biology*. Oxford University Press. (2): 31-37.
- MORIN, P.A. & WOODRUFF, D.S. 1996. Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. *Molecular Genetics Approaches in Conservation*. p: 298-313.
- NARANJO, P. E. J. & CRUZ, A. 1998. Ecology of tapirs (*Tapirus bairdii*) in the Sepultura Biosphere Reserve Chiapas, Mexico. *Acta Zoo. Mex.* 73: 111-125.
- NORTON, J. E. & ASHLEY, M. V. 2004. Genetic Variability and population genetic structure among Bairds tapirs. *Animal Conservation*, 7: 211-220.
- PADILLA, M. & DOWLER, R.C. 1994. *Tapirus terrestris*. *Mammalian Species*. 481: 1-8.
- PEPPIN, L., MCEWING, R., OGDEN, R., HERMES, R., HARPER, C., GUTHRIE, A., CARVALHO, G. R. 2009. Molecular Sexing of African rhinoceros. *Conservation Genetics*. 11 (3): 1181-1184.
- PERES, C. 2000. Effects of subsistence hunting on vertebrate community structure in Amazon forests. *Consev Biol.* 14:240-253.
- PITRA, C. & VEITS, J. 2000. Use of mitochondrial DNA sequences to test the Ceratomorpha (Perissodactyla: Mammalia) hypothesis. *J. Zool. Syst. Evol. Research*. 38: 65-72.
- PIZO, M.A. 2004. Frugivory and habitat use by fruit-eating birds in a fragmented landscape in southeast Brazil. *Ornitologia Neotropical*. 15 (suppl.): 117-126.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Bio. Evol.* 4: 406-425.

- SANCHES, A., FIGUEIREDO, M. G., HATANAKA, T., PAULA, F. F. P., SILVEIRA, L., JÁCOMO, A., GALETTI JR, P. M. 2009. Microsatellite loci isolated from the lowland tapir (*Tapirus terrestris*), one of the largest Neotropical mammal. *Conservation Genetics Resources*. 1:115-117.
- SANCHES, A., PEREZ, W. A. M., FIGUEIREDO, M. G., ROSSINI, B. C., CERVINI, M., GALETTI JR, P., GALETTI, M. 2011. Wildlife forensic DNA and lowland tapir (*Tapirus terrestris*). *Conservation Genetic Resources*. 3: 189-193.
- SEKIAMA, M. L., LIMA, I. P., ROCHA, V.J. 2006. Ordem Perissodactyla. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I.P. *Mamíferos do Brasil*. Universidade Estadual de Londrina. 277-280.
- SILVA, G.A. 2007. Causes of spatial genetic structure in mammals: a case study in the Atlantic Forest, Brazil. Doctoral Thesis. Columbia University.
- SHAW, C.N., WILSON, P.J., WHITE, B.N. 2003. A reliable molecular method of gender determination for mammals. *J. Mammal*. 84:123–128.
- SULLIVAN, K.M., MANNUCCI, A., KIMPTON, C.P., GILL, P. 1993. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques*. 15:636–641
- TERMIN, J. D., BELCOURT, A. B., CHRISTINER, P. J., CONN, K. M., NYLEN, M. U. 1980. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix protein. 1. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J. Biol. Chem*. 255: 9760-9768.
- WALTHER, F. R., MUNGALL, E. C., GRAU, G. A. 1983. *Gazelles and their relatives: A study in territorial behavior*. Noyes Publications. United States of America.
- WOLFF, J. O., PETERSON, J. A. 1998. An offspring-defense hypothesis for territoriality in female mammals. *Ethology & Evolution*. 10 (3): 227-239.
- YAMAUCHI, K., HAMASAKI, S., MIYAZAKI, K., KIKUSUI, T., TAKEUCHI, Y., MORI, Y. 2000. Sex determination based on fecal DNA analysis of the amelogenin gene in sika deer (*Cervus nippon*). *J Vet Med Sci*, 62:669–671.