

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO DNA DE PELOS
COLETADOS POR ARMADILHAMENTO PARA
ESTUDOS GENÉTICOS POPULACIONAIS DE *Mazama
americana* (Erxleben 1777)**

Vinícius Strabelli dos Santos
Zootecnista

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO DNA DE PELOS
COLETADOS POR ARMADILHAMENTO PARA
ESTUDOS GENÉTICOS POPULACIONAIS DE *Mazama
americana* (ERXLEBEN 1777)**

Discente: Vinícius Strabelli dos Santos

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal

S237a

Santos, Vinicius Strabelli dos

Avaliação da viabilidade do DNA de pelos coletados por armadilhamento para estudos genéticos populacionais de *Mazama americana* (Erxleben 1777) /

Vinicius Strabelli dos Santos. -- Jaboticabal, 2024

53 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: José Mauricio Barbanti Duarte

1. *Mazama americana*. 2. Avaliação do DNA. 3. Armadilha de pelos. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO DNA DE PELOS COLETADOS POR ARMADILHAMENTO PARA ESTUDOS GENÉTICOS POPULACIONAIS DE *Mazama americana* (Erxleben 1777)

AUTOR: VINICIUS STRABELLI DOS SANTOS

ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, área: Genética e Melhoramento Animal pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE
Data: 03/02/2024 16:13:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
ELIAS ALBERTO GUTIERREZ CARNELOSSI
Data: 04/02/2024 20:02:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ELIAS ALBERTO GUTIERREZ CARNELOSSI (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal de Sergipe (UFS) - Nossa Senhora da Glória/SE

Prof. Dr. MARCIO LEITE DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas e de Saúde / Universidade de Araraquara (UNIARA) - Araraquara/SP

Documento assinado digitalmente
MARCIO LEITE DE OLIVEIRA
Data: 05/02/2024 10:14:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 31 de janeiro de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Vinicius Strabelli dos Santos – graduado em Bacharel em Zootecnia em dezembro de 2020, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho” (UNESP), câmpus de Jaboticabal. Integrante do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) desde 2016, durante a graduação foi bolsista de iniciação científica FAPESP junto ao departamento de Zootecnia FCAV/UNESP. Ao longo da graduação exerceu o cargo de mestre da Grupo Recreativo Bateria Universitária, Batuka na gestão de 2018 e foi professor voluntário do Cursinho Ativo durante 22 meses. Ingressou no presente curso de em março de 2021 e, durante a execução deste trabalho, foi bolsista por 24 meses financiado pela CAPES, realizou estágio docência da disciplina de Genética para o curso de Zootecnia no ano de 2021. Foi beneficiado pelas ações afirmativas de apoio para estudantes de pós-graduação da UNESP edital 33/2023 – PROPG/COPE. Foi membro da Associação de Alunos da Pós-Graduação, ocupando a função de primeiro tesoureiro durante a gestão de 2023 – 2024.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Aí, maloqueiro, aí, maloqueira
Levanta essa cabeça
Enxuga essas lágrimas, certo? (Você “memo”)
Respira fundo e volta pro ringue (vai)
“Cê” vai sair dessa prisão
“Cê” vai atrás desse diploma
Com a fúria da beleza do Sol, entendeu?
Faz isso por “nóis”
Faz essa por “nóis” (vai)
Te vejo no pódio”

AmarElo – Emicida

“Às vezes é preciso perseverar mesmo
quando não se tem vontade e às vezes
você está fazendo um bom trabalho”

Stephen King

Sumário

Resumo	vii
Abstract	viii
1. Introdução	9
2. Revisão Bibliográfica	13
2.1. Família Cervidae e <i>Mazama americana</i>	13
2.2. Pelos e DNA	16
3. Objetivos:	20
3.1. Objetivo geral:	20
3.2. Objetivo específico:	20
4. Materiais e Métodos	21
4.1. Coleta das amostras	21
4.3. Extração do DNA	23
4.4. Amplificação do DNA	24
4.5. Qualidade do DNA	26
5. Resultados	27
5.1.1. Frequência observada na absorbância 260/280 nm	27
5.1.2. Frequência observada na absorbância 260/230 nm	28
5.4. <i>Primers</i> Mitocondriais (ND5 e Cyb)	30
5.5. Íntrons nucleares	30
6. Discussão	31
7. Conclusão	36
8. Referências	37
Apêndices	46

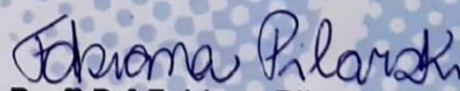
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Análise quantitativa e qualitativa do DNA de pelos coletados por armadilhamento para estudos genéticos populacionais de *Mazama americana*"**, protocolo nº 9506/22, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de dezembro de 2022.

Vigência do Projeto	15/12/2022 a 15/02/2023
Espécie / Linhagem	Mazama americana
Nº de animais	3
Peso / Idade	50 kg
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Plantel NUPECCE

Jaboticabal, 14 de dezembro de 2022.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Resumo

O uso de métodos não invasivos contribui diretamente para estudos genéticos de animais selvagens. Dentre as abordagens utilizadas, a coleta de pelos é comumente realizada com foco em estudos genéticos, que possibilitam inferir sobre a distribuição de espécies, monitoramento de populações e identificação individual. A obtenção dos pelos é normalmente realizada por meio de armadilhas, e as quantidades de pelos coletadas são variáveis, o que influencia diretamente na quantidade de DNA obtida e no sucesso das análises genéticas. Dessa forma, a análise da viabilidade de DNA presente nos pelos torna-se uma ferramenta importante para seleção de amostras viáveis e para o delineamento de estudos genéticos. O presente trabalho avaliou um protocolo utilizado para extrair DNA de alta qualidade, a partir de pelos provenientes da espécie *Mazama americana*, um cervídeo de comportamento elusivo e difícil captura. Foi avaliado o sucesso da amplificação em diferentes quantidades de bulbo, para determinar qual a quantidade mínima de bulbos necessários para amplificação de regiões nucleares e mitocondriais com diferentes tamanhos. Observou-se que os *primers* Goua 11, 29 e 31, apresentaram sucesso de amplificação logo nas categorias 1 e 5 bulbos; entretanto, a amostragem com maior percentual de sucesso foi a de 25 bulbos, onde dois *primers* alcançaram 100% de amplificação. O *primer* ND5 também apresentou amplificação nas primeiras categorias, porém o maior percentual foi obtido na categoria de 50 bulbos, o *primer* Cyb foi o que apresentou menor percentual de amplificação. Os *primers* intrônicos apresentaram resultados consistentes apenas na categoria de 100 bulbos. Esses resultados fornecem informações sobre o DNA presente em pelos de *Mazama americana*, constituem importante subsídio para utilização de pelos como amostra em estudo de cervídeos.

Palavras-Chave: *Mazama americana*; Avaliação do DNA; Armadilha de pelos.

Abstract

The use of non-invasive methods directly contributes to genetic studies of wild animals. Among the approaches used, hair collection is commonly carried out with a focus on genetic studies, which make it possible to infer about species distribution, population monitoring and individual identification. Hair is normally obtained through traps and the amount of hair collected varies, which directly influences the amount of DNA obtained and the success of genetic analyses. Therefore, analyzing the viability of DNA present in hair becomes an important tool for selecting viable samples and designing genetic studies. The present work evaluated a protocol used to extract high-quality DNA from hairs from the *Mazama americana* species, a deer with elusive behavior and difficult to capture. The success of amplification was evaluated in different quantities of bulbs, to determine the minimum quantity of bulbs required for amplification of nuclear and mitochondrial regions with different sizes. It was observed that the *primers* Goua 11, 29 and 31 showed amplification success in categories 1 and 5 bulbs, however the sampling with the highest percentage of success was that of 25 bulbs, where two *primers* achieved 100% amplification. The *primer* ND5 also showed amplification in the first categories, but the highest percentage was obtained in the 50 bulbs category, the *Cyb primer* was the one that showed the lowest percentage of amplification. Intronic *primers* showed consistent results only in the 100-bulb category. These results provide information about the DNA present in *Mazama americana* hair, and constitute an important support for using hair as a sample in deer studies.

Keywords: *Mazama americana*; Hair DNA; Hair trap.

1. Introdução

O advento das técnicas de amostragem não invasiva, tem facilitado estudos com animais selvagens, especialmente entre espécies elusivas, raras e de habitat florestal. O monitoramento, tem sido beneficiado com a coleta de amostras biológicas não invasivas, eliminando a necessidade de visualização ou captura dos animais (Kohn e Wayne 1997, Bremner-Harrison *et al.*, 2006). Os pelos representam uma das diversas amostras utilizadas nesse tipo de abordagem (Taberlet *et al.*, 1999; Beja-Pereira *et al.*, 2009).

A obtenção dos pelos pode ser feita de diversas formas, como por exemplo no estudo de orangotangos (*Pongo pygmaeus*), onde a coleta desse material é realizada em seus ninhos (Goossens *et al.*, 2004). Ninhos de aves também podem ser pontos de coleta, uma vez que elas utilizam pelos de mamífero como material para construção dessa estrutura (Tòth *et al.*, 2008).

A abordagem mais comum é a coleta com armadilhas, sendo utilizada em saídas de tocas de pequenos mamíferos como a *Cricetus cricetus*, com sucesso de coleta ortde pelos de 49,3% em apenas uma noite (Reiners *et al.*, 2011). Técnicas de armadilhamento também foram utilizadas para espécies de carnívoros, como *Martes americana*, apresentando um sucesso de 75 % (Pauli *et al.*, 2008), *Lynx canadenses* apresentando um sucesso de coleta de 45 % (McDaniel *et al.* 2000).

A coleta de pelos por armadilhamento também é utilizada para espécies da mastofauna, como por exemplo *Odocoileus virginianus*, com sucesso de coleta entre 31 e 98% (Belant *et al.* 2007). Duas das espécies mais estudadas através da metodologia de armadilhamento é o *Ursus americanus* e *Ursus arctos*, onde a armadilha baseada em arame farpado apresentou sucesso de 74% (Wood *et al.* 1999)

As armadilhas utilizam uma superfície aderente como arame farpado, fita adesiva ou cola para armadilha de ratos, posicionadas nas saídas das tocas, trilhos de passagem do animal ou ainda utilizando iscas para atrair as espécies alvo (Castro-Arellano *et al.*, 2008; Pauli *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2008; Reiners *et al.*, 2011).

Diferentes resultados podem ser obtidos a partir do material biológico coletados nos pelos, como por exemplo: a análise morfológica desse material permite a identificação de espécies, como javali (*Sus Scrofa*), *Cervus elaphus*, *Capreolus capreolus*,

Dama dama, *Rupicapra pyrenaica*, *Rupicapra rupicapra*, *Capra ibex*, entre outras (De Marinis e Asprea 2006;). Outro uso dos pelos é a dosagem de hormônios como cortisol, estradiol e progesterona para espécie *Ursus arctos* (Cattet *et al.*, 2017).

Os pelos também podem ser empregados para propósitos genéticos dado que apresentam DNA com maior integridade em comparação às fezes, as quais exibem material genético degradado (Golenberg *et al.*, 1996; Taberlet *et al.*, 1999). Adicionalmente, as fezes possuem mais fatores associados a inibição da amplificação do DNA (Constable *et al.*, 1995; Beja-Pereira *et al.*, 2009). Embora os pelos também possuam tais fatores, esse problema pode ser contornado utilizando exclusivamente bulbos como fonte de DNA (Nievergelt *et al.* 2002; Roon *et al.* 2003).

O uso de pequenas quantidades de pelo é viável para estudos genéticos, como por exemplo para identificação de espécies, *Ochotona princeps* (Henry e Russello, 2011), *Leopardus pardalis* (Weaver *et al.* 2005), monitoramento de populações, *Ursus arctos* (Romain-Bondi *et al.*, 2004; , Dumond *et al.*, 2015), *Lynx lynx* (Schmidt e Kowalczyk 2007) distribuição geográfica, *Lynx canadensis* (Mcdaniel *et al.* 2000) e a identificação individual, *Leopardus pardalis* (Weaver *et al.* 2005), *Martes martes* (Mullins *et al.* 2010), *Ursus arctos* (De Barba *et al.* 2010; Rovang *et al.*, 2015 Kopatz *et al.*, 2013; Wirsing *et al.*, 2020),. Até mesmo a utilização de apenas um bulbo pode ser viável para obtenção do DNA (Sloane *et al.* 2000 Henry e Russello, 2011).

Esses possíveis usos genéticos para os pelos estão associados a quantidade e qualidade de DNA mitocondrial (mtDNA) e nuclear (nDNA), que por sua vez está ligada, espécie, idade do indivíduo e sazonalidade (Bengtsson *et al.*, 2012). Outro fator que influencia o DNA presente nos pelos são seus três estágios de crescimento, denominados anagénea, catagénea e telogénea (Graham, 2007). A fase anagénea ocorre quando o pelo inicia o processo de crescimento, sendo a fase com maior número de células germinativas no bulbo e consequentemente com maiores concentrações de mtDNA e nDNA (Mcnevin *et al.*, 2005^a, Graham, 2007).

Na fase catagénea o processo de mitose das células começa a decair, e consequentemente as quantidades de DNA nuclear tendem a diminuir. Por fim, na fase telogénea, as células passam pelo processo de apoptose e iniciam o processo de queratinização e os pelos tendem a cair. Nessa fase, as quantidades de DNA nuclear são baixas, devido a ação de enzimas de degradação, resultando na

difficuldade em trabalhar com esse tipo de amostra (Mcnevin *et al.*, 2005^a, Graham, 2007).

Tendo em vista tais fatores associados a quantidade e qualidade do DNA em pelos, a avaliação do DNA é essencial para o sucesso de estudos genéticos de animais selvagens, com o intuito de fomentar a seleção de amostras em campo, que possuem maior viabilidade e dessa maneira alocar os recursos disponíveis para análises das mesmas (Wirsing *et al.*, 2020).

A seleção de amostras é algo fundamental em estudos, uma vez que o sucesso de amplificação de amostras com alta qualidade chega a 89% (Wirsing *et al.*, 2020), enquanto pode ficar entre 33,3 e 37% nas amostras consideradas de baixa qualidade com apenas um ou dois pelos, *Ochotona princeps* (Henry e Russello, 2011) *Ursus arctos* (Wirsing *et al.* 2020).

Com base nisso a seleção de amostras mais propensas a ter melhor qualidade e quantidade de DNA, facilitaria pesquisas onde as análises dependem diretamente da quantidade do material genético disponível, como a determinação de parentesco, genética de populações, identificação individual (Kohn e Wayne 1997; Bremner e Harrison *et al.*, 2006;) e estudos que envolvem genotipagem (Goossens *et al.* 1998; Frantz *et al.* 2004).

Avaliar o DNA proveniente dos pelos, torna-se uma ferramenta importante para seleção de amostras viáveis e para o delineamento de estudos genéticos, possibilitando o uso dos mesmos para espécies com comportamento evasivo, e que possuem incertezas quanto ao status populacional, o que dificulta a elaboração de programas de manejo e conservação, como é o caso da espécie *Mazama americana*.

O gênero *Mazama* é constituído por espécies de cervídeos florestais, de pequeno porte, comportamento elusivo, territorialistas e de hábito solitário (Weber e González, 2003; Merino e Rossi, 2010). A espécie *Mazama americana* popularmente denominada veado-mateiro, é classificada pela *Red List of Threatened Species* como “Dados Deficientes”, pois é considerada um complexo de espécies crípticas, devido às suas diferenças moleculares e citogenéticas (Duarte *et al.* 2008; Duarte e Vogliotti, 2016 Abril *et al.*, 2010; Cifuentes-Rincon *et al.* 2020).

A partir dessas diferenças, foram realizados estudos validando espécies que outrora foram consideradas sinônimos de *M. americana* como *M. temama* (Jorge e

Benirschke, 1977; Sandoval *et al.* 2022), *M. jucunda* (Mantellatto *et al.* 2021) e *M. rufa* (Luduvério 2018).

A identificação dessas espécies foi possível a partir de análises genéticas, já que os caracteres morfológicos não contribuem para distinção delas (Duarte 1996; Rossi 2000; Gonzalez e Duarte 2020). A alta variabilidade cariotípica em *M. americana* (Abril *et al.*, 2010) sugere a existência de um complexo de espécies crípticas, uma vez que os cromossomos atuam, como uma eficiente barreira reprodutiva pós-zigótica (Cursino *et al.*, 2014; Salviano *et al.*, 2017). Segundo Peres (2020), as variantes cromossômicas podem ser recuperadas por análise do DNA, tornando possível estudos sem a necessidade de captura de animais, a partir de amostragens não invasivas.

Levando em consideração o potencial de aplicação dos pelos em estudos genéticos, foram desenvolvidas armadilhas e testadas em cativeiro, cinco modelos para a obtenção de pelos de cervídeos do gênero *Mazama* (Santos, 2019). A armadilha que apresentou resultados mais satisfatórios para espécie *Mazama americana*, em relação a eficiência, sucesso de coleta e menor impacto para o animal foi a denominada “Altura mínima”.

Ela é estruturalmente composta por 2 hastes de apoio, devidamente cravadas no chão, um fio de nylon tensionado envolto com fita silver tape da marca 3M, posicionado a uma altura de 45 cm em relação ao solo. A mesma apresentou eficiência de coleta que variou de 2 a 100 pelos, bem como um sucesso de coleta de 83,4% (Santos, 2019).

Com base nisso, é preciso determinar qual a viabilidade que os diferentes níveis de amostragem, com o uso de uma quantidade limitada de material genético, sendo necessário avaliar, qual é a quantidade e a qualidade do DNA em extrações com diferentes quantidades de pelos.

Assim o presente trabalho avaliou, se a qualidade e quantidade de DNA dos pelos coletados em armadilha, são viáveis para estudos genéticos de *M. americana*, avaliando qual a quantidade mínima de pelos que fornece DNA com qualidade suficiente para utilização desse material como ferramenta de estudo para espécie *M. americana*, tanto para nDNA como para mtDNA.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Família Cervidae e *Mazama americana*

A ordem Artiodactyla abrange 23 famílias de mamíferos, dentre essas encontra-se a segunda maior família Cervidae (Grubb *et al.* 1993) em termos de diversidade, englobando 18 gêneros (Zurano *et al.*, 2019). A família Cervidae tem sua origem durante o Mioceno na Eurásia (Eisenberg 1987). Durante o Plioceno considera-se que os ancestrais dos cervídeos adentraram à América do Norte através do estreito de Bering (Stephli e Webb 1985).

A entrada dos cervídeos na América do Sul, ocorreu, há 2,5 milhões de anos, através do istmo do Panamá (Stephli e Webb 1985). Essa rota é considerada a via que possibilitou a interligação da biota norte-americana e sul-americana (Simpson 1980; Stephli e Webb 1985), bem como seu fechamento é considerado um marco para o estabelecimento da biogeografia Neotropical (Gentry 1982, Wendt 1993, Graham 1999).

Apesar da compreensão na formação da biogeografia neotropical, bem como alguns aspectos evolutivos dos cervídeos neotropicais, como chifre, caninos superiores desenvolvidos e tamanho corporal (Gilbert *et. al.*, 2006), a sistemática dessas espécies ainda é controversa (Grooves e Grubb 1987, Eisenberg 2000).

Diversos estudos foram realizados, com intuito de classificar os gêneros da família Cervidae (Gilbert *et. al.* 2006). O primeiro deles tomou como diferenças na estrutura do metacarpo, essa classificação abarcou os cervídeos em dois grupos Pleiometacarpalia, abrangendo Cervinae e Muntiacinae, e Telemetacarpalia, que inclui Odocoileinae e Hydropotinae (Brooke 1817). Posteriormente foram propostas outras classificações baseadas em taxonomia morfológica (Simpson 1945, McKenna e Bell 1997, Webb 2000, Pocock 1923, Kraglievich 1932).

Embora a taxonomia morfológica tenha contribuído para classificação de outros espécies de animais (Strauss 1990, Hirayama 2009), as inconformidades desses estudos, no âmbito da cervidologia, podem ser explicadas pela utilização de diferentes caracteres para realização dos mesmos (Groves e Grubb, 1987; Meijaard e Groves, 2004), ausência de diafaneidade na metodologia (Gilbert *et. al.* 2006) e ainda da falta de registros fósseis dos cervídeos neotropicais (Webb, 2000)

Dentre essas, a subfamília Odocoileinae foi a que apresentou maior discrepância nas relações entre gêneros (Gilbert *et al.* 2006).

O estudo de Webb (2000) propõe a divisão dos cervídeos neotropicais em duas tribos, sendo elas Rangiferini e Odocoileini.

Entretanto a complexidade dessa questão continua a levantar dúvidas, e vários outros estudos foram realizados nesse âmbito (Grooves e Grubb 1987, Scott e Janis 1987, Duarte e Merino 1997, Webb 2000, Grubb 2000)

Ao todo, assume-se 52 espécies dentro da família Cervidae (Grubb 2005), com o gênero *Mazama* possuindo 9 espécies (Rafinisque 1817). Entretanto a taxonomia desse gênero, bem como análises filogenéticas, que demonstram que o gênero *Mazama* é polifilético (Gilbert *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2008; Hassanin *et al.*, 2012;) indicando que a relação entre as espécies ainda apresenta lacunas (Grooves e Grubb 1987, Eisenberg 2000). Recentemente as espécies até então denominadas *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga* foram reclassificadas, com base em análises filogenéticas, sendo então redenominadas *Subulo gouazoubira* (Bernegossi *et al.*, 2023) e *Passalites nemorivagus* (Morales-Donoso *et al.*, 2023).

Apesar das dificuldades na classificação das espécies no âmbito da cervidologia, são nítidos os esforços e avanços realizados para soluções dessa problemática, entretanto ainda existem incógnitas a serem resolvidas, como o caso da espécie *Mazama americana*.

A espécie *Mazama americana* descrita por Erxleben 1777, apresenta como características morfológicas o comprimento de 90 a 145 cm (Duarte 1996; Emmons; Feer 1997), altura de 58 e 80 cm e peso médio de 30 Kg, sua coloração de pelagem é predominantemente marrom-avermelhado (DUARTE 1996) (Figura 1).



Figura 1. Exemplar de macho da espécie *Mazama americana*

Segundo a IUCN, a distribuição da espécie abarca os países: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago e Venezuela e no norte da Argentina. Apesar disso, a espécie ainda é classificada pela Red List of Threatened Species como “Dados Deficientes”, visto que certas incertezas ainda pairam sobre essa espécie.

Um dos fatores que justificam essa classificação são as diferenças moleculares e citogenéticas apresentadas entre indivíduos de regiões distintas (Duarte *et al.* 2008; Abril *et al.*, 2010; Cifuentes-Rincon *et al.* 2020), o que dificulta a delimitação de estratégias de conservação, uma vez que tais variações, outrora tratados como sinônimos júnior de *M.americana* mostram-se tratar de outras espécies, como o caso do *Mazama jucunda* (Mantellatto *et al.* 2021), *Mazama rufa* (Luduvério,2018) e *Mazama temama* (Jorge e Benirschke, 1977; Sandoval *et al.* 2022).

2.2. Pelos e DNA

A amostragem não invasiva tem contribuído significativamente para os estudos de animais selvagens, tornando possível desvendar informações sobre espécies difíceis de amostrar, como por exemplo as de comportamento elusivo e habitat de difícil acesso, que impedem que abordagens diretas sejam utilizadas. Adicionalmente a coleta de amostras biológicas de maneira não invasiva, evita injúrias e estresse ao animal (Duarte *et al.* 2010)

Dentre as diversas amostras biológicas já utilizadas em estudos de amostragem não invasiva, pode-se citar: saliva, urina, fluido menstrual, casca de ovos, pele (no caso de cobras), penas, fezes e pelos (Taberlet *et al.* 1999), cada qual com seus prós e contras que devem ser considerados para sua utilização. No caso dos pelos, com finalidade para estudos genéticos, a obtenção de DNA está diretamente associada ao estágio de crescimento que o mesmo se encontra.

Segundo Bengtsson *et al.* 2012, diferente de tecidos metabolicamente ativos, que possuem renovação celular constante, o que contribui para uma maior disponibilidade de DNA, seja ele mitocondrial e nuclear, o processo de formação dos pelos tem uma duração finita, já que após as fases de crescimento, suas células passam pelo processo de apoptose e de queratinização, o que contribui para que, dependendo da fase em que o pelo se encontra, a quantidade e integridade do DNA sejam baixas.

Dentre as estruturas consideradas anexas da pele, os pelos são estruturas queratinizadas formadas a partir da epiderme. O uso desse material para estudos e abordagens práticas envolvem a análise morfológica, utilizada para identificação de espécies (De Marinis e Asprea 2006; Beja-Pereira *et al.*, 2009), bem como para determinação da dieta de carnívoros (Andheria *et al.*, 2007), determinação dos níveis de hormônios, como cortisol, estradiol e progesterona também pode ser realizada através dos pelos (Cattet *et al.*, 2017) e além disso como fonte de DNA para estudos genéticos nas mais diversas áreas.

Os pelos, dentro do escopo genético, já foram utilizados para estudos de DNA antigo, seja ele humano (Alonso *et al.* 2004) ou animal (Bonnichsen *et al.*, 2001, Jeffrey *et al.* 2007, Willerslev *et al.*, 2009), no âmbito forense por ser um dos principais

materiais encontrados como evidências (Graham, 2007), além de ser uma amostra biológica utilizada para estudos voltados para fauna, aplicando-se em: identificação de espécies (Henry e Russello, 2011), monitoramento de populações (Romain-Bondi *et al.*, 2004; Schmidt e Kowalczyk 2007, Dumond *et al.*, 2015), distribuição geográfica (Mcdaniel *et al.* 2000) e a identificação individual (De Barba *et al.*, 2010; Rovang *et al.*, 2015; Kopatz *et al.*, 2013; Wirsing *et al.*, 2020). Até mesmo a utilização de apenas um bulbo pode ser viável para obtenção do DNA (Henry e Russello, 2011). Entretanto para que essas abordagens possam ser realizadas é preciso compreender as condições do DNA da amostra em questão.

Dessa maneira quando se aborda a questão de condição do DNA, seja ele mitocondrial (mtDNA) ou nuclear (nDNA), pode-se tratar de fatores extrínsecos, como idade do indivíduo, época do ano, e até mesmo fatores nutricionais (Bengtsson *et al.*, 2012), como também o método de extração utilizado para obter o DNA () fatores intrínsecos da amostra como a quantidade desse material e também a sua qualidade, normalmente associada a integridade desse DNA. Nos pelos tais características estão inicialmente ligadas às fases de crescimento do pelo denominadas anagênea, catagênea e telogênea (Graham, 2007; Jeffrey *et al.* 2007).

A fase anagênea ocorre quando o pelo inicia o processo de crescimento, sendo a fase com maior número de células germinativas no bulbo e consequentemente com maiores concentrações de mtDNA e nDNA. Na fase catagênea o processo de mitose das células começa a decair, consequentemente as quantidades de DNA nuclear tendem a diminuir. Por fim, na fase telogênea, as células passam pelo processo de apoptose e iniciam o processo de queratinização e os pelos tendem a cair. Nessa fase, as quantidades de DNA nuclear são baixas, devido a ação de enzimas de degradação, resultando na dificuldade em trabalhar com esse tipo de amostra (Mcnevin *et al.*, 2005a).

A partir dessa relação entre as fases de crescimento e as condições do DNA nos pelos, pode-se inferir que pelos em fase anagênea são os mais adequados para abordagens cujas análises são realizadas a partir de DNA nuclear, entretanto a duração dessas fases bem como a identificação morfológica delas não é de fácil execução, principalmente pela duração de cada fase ser diferente entre as espécies, por exemplo humanos essas durações já são conhecidas sendo que a fase anagênea tem duração de 2 a 6 anos, 2 a 3 semanas para fase catagênea e 2 a 4 meses para

fase telogénea (Kligman *et al.* 1959), entretanto para outros mamíferos essas informações ainda não são descritas.

Apesar das fases de crescimento de um pelo gerarem informações sobre a condição do DNA, o tempo de duração de cada uma delas é variável, além disso a duração das mesmas é influenciada por fatores como idade do indivíduo, época do ano, e até mesmo fatores nutricionais (Bengtsson *et al.*, 2012), o que gera mais desafios sobre a aferição da condição do DNA nos pelos.

Outro fator complicador de se trabalhar com o DNA de pelos está na melanina, proteína responsável pela pigmentação do pelo. Existem duas formas dessa proteína, feomelanina, responsável pela coloração amarela e vermelha, e eumelanina responsável pela cor marrom e preta. Estudos em humanos, indicaram que a concentração de eumelanina pode atuar como inibidor da Taq polimerase (YOSHII *et al.*, 1993), porém esse contratempo pode ser solucionado utilizando BSA na preparação da reação de PCR (Eckhart *et al.* 2000),

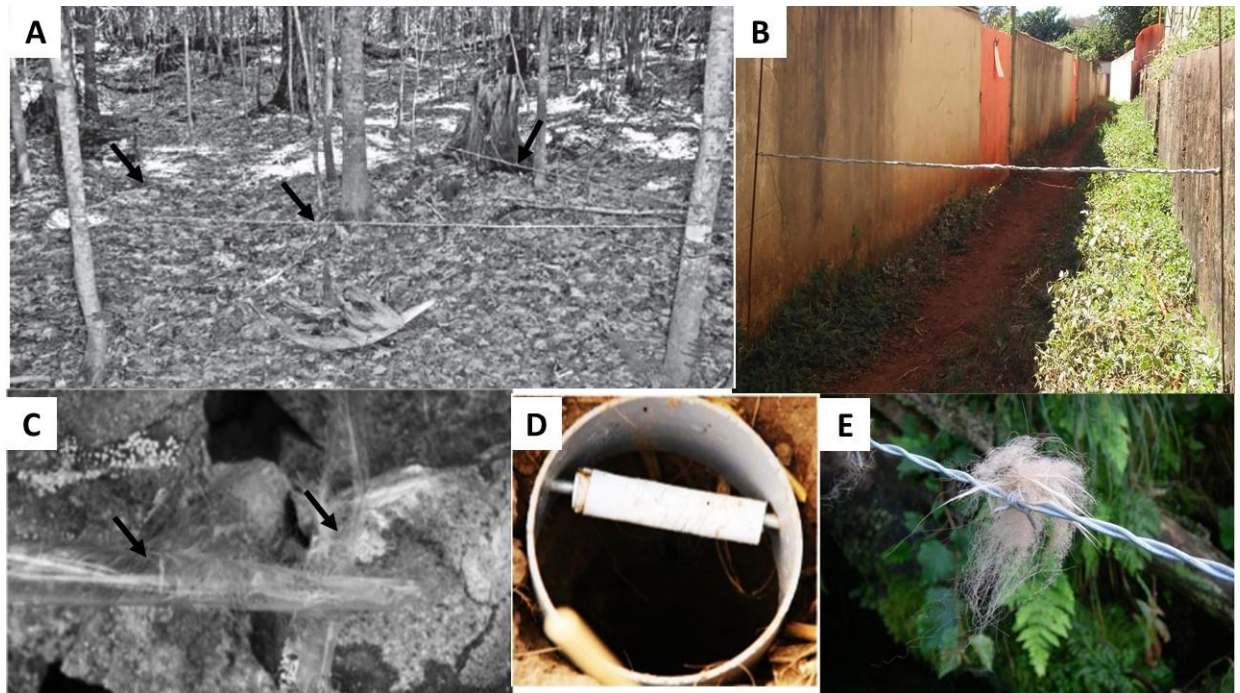


Figura 2. Armadilhas de pelo utilizadas em diversos estudos. **A.** Armadilha para coleta de pelos da espécie *Odocoileus virginianus* (Belant *et al.* 2007), as setas indicam os fios de arame farpado. **B.** Armadilha para coleta de pelos da espécie *Mazama americana*. **C.** Armadilha para coleta de pelos da espécie *Ochotona princeps* (Hernry e Russello, 2011) as setas indicam fitas adesivas posicionadas na saída da toca. **D.** *Cricetus cricetus* (Reiners *et al.* 2011). **E.** Armadilha para coleta de pelos da espécie *Ursus arctos* (Wirsing *et al.* 2020).

Para que isso seja possível, a coleta de amostras e a avaliação da qualidade e quantidade de DNA são essenciais para o sucesso de estudos genéticos de animais selvagens, pois permite a seleção e coleta de amostras de pelos que apresentam maior viabilidade (Wirsing *et al.*, 2020).

3. Objetivos:

3.1. Objetivo geral:

Possibilitar a seleção de amostras de pelo com quantidade e qualidade adequadas de DNA para estudos genéticos populacionais da espécie *Mazama americana*.

3.2. Objetivo específico:

Avaliar a quantidade mínima de pelos para se obter DNA em quantidade e qualidade suficientes para amplificação de nDNA e mtDNA.

4. Materiais e Métodos

4.1. Coleta das amostras

Os pelos coletados pertenciam a 1 animal, macho da espécie *M. americana*, o indivíduo faz parte do plantel do Criadouro Científico do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos – NUPECCE, do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Jaboticabal (Figura 3). Os pelos foram coletados com bastão de madeira envolto em fita Silver Tape 3M Scotch™ (Figura 4) simulando a metodologia de coleta por armadilhamento proposta por Santos (2019).

No mesmo dia em que foi realizada a coleta dos pelos, eles foram retirados da fita com auxílio de uma pinça previamente esterilizada com hipoclorito de sódio, álcool etílico 70% e fogo de modo a evitar contaminação. Em seguida, os pelos foram armazenados em microtubos de 1,5 ml contendo álcool etílico absoluto e colocados sobre refrigeração até o momento de corte dos bulbos.

4.2. Corte dos bulbos

Como o intuito do projeto era verificar a viabilidade do DNA mitocondrial e nuclear em pelos da espécie *M. americana*, optou-se por realizar essa análise a partir do corte dos pelos obtendo somente os bulbos, uma vez que é nessa região do pelo em que se pode obter maiores quantidades de DNA, principalmente de DNA nuclear.

Para realização do corte dos bulbos, as amostras que estavam sobre refrigeração a no máximo 3 dias, foram colocadas em Placas de Petri com álcool etílico absoluto, para facilitar o processo. Essa placa foi colocada sob uma lupa binocular Coleman XTB-3AT, com intuito de visualizar de forma precisa os bulbos (Figura 4). Com o auxílio de uma pinça, devidamente esterilizada através do método descrito anteriormente, realizou-se a apreensão do pelo e em seguida foi realizado o corte do bulbo com uma tesoura também esterilizada. Os bulbos cortados foram colocados em microtubos de 1,5 ml e colocados sob refrigeração até o momento da extração, que foi realizada no dia seguinte após a realização do corte dos bulbos.



Figura 3. Vista aérea das instalações do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos – NUPECCE. Fonte: Google Imagens.

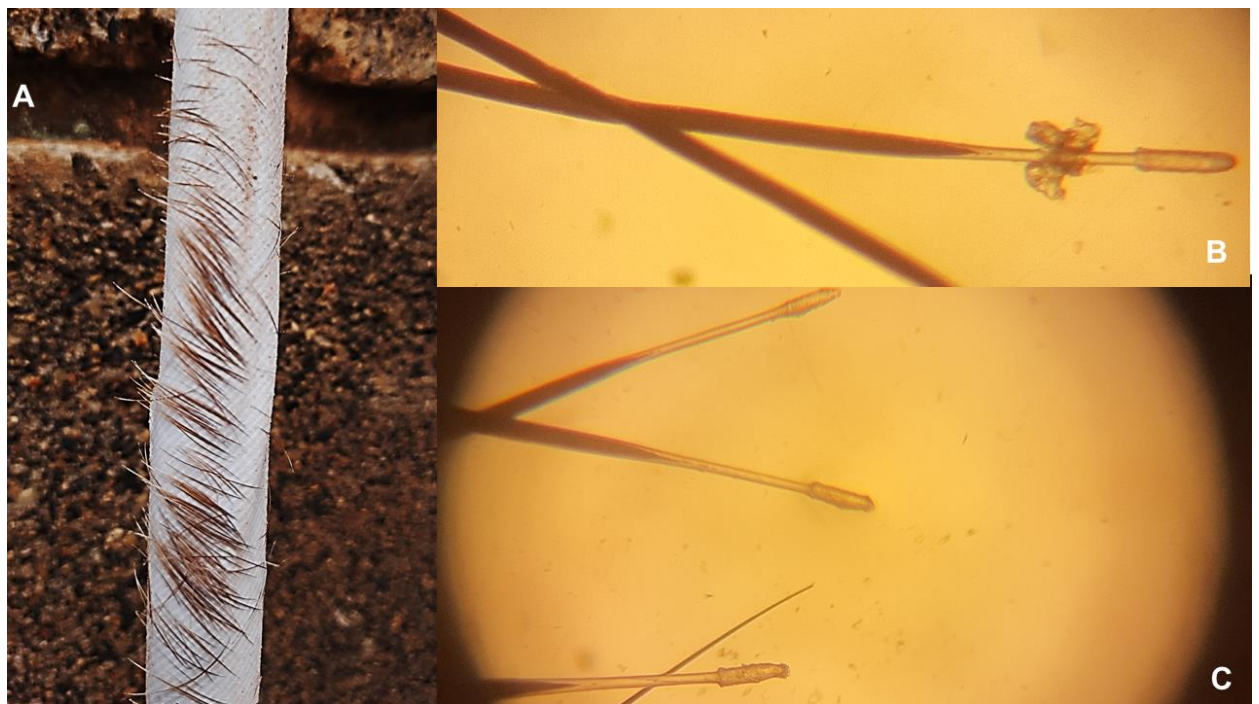


Figura 4. Exemplificação de pelos coletados, **A.** Pelos recém coletados. **B.** Pelo com sugestiva presença de um fragmento de epiderme aderido. **C.** Pelos com bulbo utilizados para extração de DNA.

4.3. Extração do DNA

A quantidade de bulbos que seguiram para as extrações foi dividida em seis categorias, sendo essas: 1 bulbo, 5 bulbos, 10 bulbos, 25 bulbos, 50 bulbos e 100 bulbos. Cada categoria foi testada com 25 amostras.

A extração foi realizada através do protocolo adaptado de fenol-clorofórmio proposto por Sambrook *et al.* 1989.

O protocolo de fenol-clorofórmio iniciou-se com o seguinte passo, os tubos com bulbos foram centrifugados, de forma a garantir que os bulbos se alokassem no fundo dos microtubos.

Após a realização desse procedimento, adicionou-se 250 µl de TE -Tween em cada amostra, em seguida as amostras foram colocadas em banho a 65 °C por 2 horas, realizando a agitação delas periodicamente. Passado esse período, adicionou-se 30 µl de proteinase K por tubo, em seguida as amostras foram incubadas a 55 °C por 6 horas, com agitação periódica, ou incubadas a 37 °C por uma noite.

Passado o período de incubação, adicionou-se 280 µl de fenol-clorofórmio, em seguida as amostras foram agitadas no vórtex por 10 s, posteriormente elas foram centrifugadas 10 min a 14.000 RPM. Realizado esse procedimento, com auxílio de uma pipeta, transferiu-se para um novo microtubo (1,5 ml) 2/3 do sobrenadante. Nesse passo do procedimento deve-se evitar aspirar a interfase com objetivo de evitar possíveis contaminações. Esse passo foi realizado mais uma vez, porém com clorofórmio.

Realizado esse procedimento, iniciou-se o processo de precipitação do DNA, adicionou-se, 1/10, do volume da amostra, de acetato de sódio com concentração de 3 M, homogeneizando-a no vórtex e completou o volume com álcool etílico absoluto. Feito isso, misturou-se a amostra por inversão, após isso ela ficou no freezer por 2 horas e periodicamente realizava-se a inversão do tubo.

Por fim centrifugou-se as amostras a 12.000 RPM por 20 a 30 min a 4°C, feito isso, descartou-se o sobrenadante com auxílio de uma pipeta e ressuspende-se o pellet, no caso da extração de pelos ele não é visível, em 100 µl de TE 10:1, esse volume foi utilizado para a diluição do DNA proveniente de todas as seis categorias testadas.

Terminada a extração, todas as amostras foram analisadas através do espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop ND-1000 UV-VIS), com intuito de verificar a concentração de DNA, em ng/μl, e a pureza do DNA obtido através das relações de absorbância 260/280 nm, que mensura a proporção de DNA e proteínas, presentes na amostra. Mensurações pra essa relação no intervalo de 1,8 e 2,0 são consideradas “DNA puro”, e 260/230 nm, que mensura a proporção de DNA e compostos presentes na amostra que podem atuar como contaminantes, como por exemplo: fenol, guanidina, etc., que podem atuar como inibidores da reação de amplificação do DNA. O intervalo considerado adequado para essa relação de absorbância é entre 1,5 a 1,8 (Dejardins e Conklin, 2010).

4.4. Amplificação do DNA

A partir dos resultados obtidos de concentração e pureza do DNA dupla fita através da técnica de espectrofotometria, iniciou-se os testes de amplificação, com o objetivo de determinar qual a quantidade mínima de bulbos, e consequentemente pelos, necessários para se obter DNA em quantidade e qualidade suficientes para amplificação de microssatélites, regiões mitocondriais e regiões nucleares. Os testes de amplificação foram realizados nas categorias 1 bulbo, 5 bulbos, 10 bulbos, 25 bulbos, 50 bulbos e 100 bulbos, cada qual com 25 amostras.

A amplificação foi testada para três regiões microssatélites, Goua 11, Goua 29 e Goua 31, (Caparroz *et al.* 2015), duas regiões mitocondriais, Citocromo B e NADH desidrogenase subunidade 5 e duas regiões nucleares, íntron do gene CARHSP-1 e íntron do gene PNPO-3.

Os *primers* dos microssatélites foram previamente testados em DNA extraído a partir de cultivo de fibroblastos da *M. americana* apresentando bom desempenho (VACARI *et al.* 2022), assim como as regiões mitocondriais, Cyb (GILBERT *et al.* 2006) e ND5 (CAPARROZ *et al.* 2015) e ambos os íntrons (Tabela 1).

Tabela 1: Regiões do DNA avaliadas no presente estudo, segundo o locus, sua sequência, tamanho do fragmento e temperatura de anelamento.

Locus	Sequência do primer (5'-3')/ Identificação no GenBank	Tamanho do Fragmento (bp)	Temperatura de anelamento (°C)	Fonte
Goua11	F- GCCATAACCAACGAAAGGATAC R- CCTTGTTGAGGAGTGGAGGTAG	220	55	Caparroz <i>et al.</i> (2015)
Goua29	F- CGGTCCCATTATTTTCATAGCAA R- AGCGTCTTTAATTTTCATGGCTG	144	55	Caparroz <i>et al.</i> (2015)
Goua31	F- CCTTGCAGTTATGGGACTTGTT R- ATCTATGGGGTTGCACAGAGTT	115	55	Caparroz <i>et al.</i> (2015)
Cyb	F-GACTAATGATATGAA AAA CCATCGTTG R-TTGTTCTTCATCTCTGGTTTACAAGAC	1140	55	Randi et al (1998)
ND5	F-TCTAGCAATAGCATGATTYC R-TGTTATTAGGAGGGCTCAGG	690	52	Caparroz <i>et al.</i> (2015)
CARHSP1 -1	F- ACYCGCCGSACSAGG ACCTTCT R-GTRATGAAGCCRTG GCCCTTGGA	812	65	Igea <i>et al.</i> (2010)
PNPO-3	F-GATGGCTTCCRHTTC TWACTAACTT R-GGYTCCCARTAGAA GACMAKSGA	938	58	Igea <i>et al.</i> (2010)

As reações foram padronizadas para um volume final de 25 µL, contendo 5 µL de DNA proveniente da extração de fenol-clorofórmio e que foi ressuspendido em 100 µL de TE, 0,5 µM de cada *primer*, 5 mM Tris-HCl(pH=8,3), KCl 25 mM, 3 mM MgCl₂, 0,6 µM dNTPS, 1,7 µg BSA e 1,5 U TaqPolimerase, todas as reações contavam com um controle negativo como forma de garantir a ausência de uma possível contaminação dos reagentes. A reação foi realizada em um termociclador Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler.

As condições da reação variaram de acordo com o tipo de primer utilizado, para os microssatélites: um passo inicial de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72°C por 1 min e por fim 72°C durante 10 min.

Para as regiões mitocondriais as condições foram: um passo inicial de 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72°C por 1 min e por fim 72°C durante 10 min.

Para os íntrons as condições foram: um passo inicial de durante 94°C durante 5 min, 94°C, 35 ciclos 94°C por 1 min, 50-60°C por 1 min e 72°C por 1 min.

A observação do produto da PCR, como resultado positivo da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 2%.

4.5. Qualidade do DNA

A qualidade do DNA foi determinada de duas formas, a primeira foi através das relações de absorbância 260/280 nm deve estar entre o intervalo de 1,8 e 2,0, indicando a obtenção de um DNA com maior pureza, e a relação de absorbância 260/230 nm entre 1,5 a 1,8, indicando a ausência de substâncias que podem atuar como contaminantes. O segundo forma é a observação do padrão das bandas no gel de agarose 2% buscando verificar qual a quantidade mínima de DNA em pelos que gerava um produto de amplificação que se apresentava com uma banda nítida.

5. Resultados

Para realização desse estudo foram processados 4775 bulbos de pelos de *M. americana*. Foi possível extrair DNA de todas as categorias testadas, assim como a determinação da concentração de DNA dupla fita, em ng/μl e os padrões de pureza das extrações, que se refere as absorvâncias 260/280 nm e 260/230 nm. As estatísticas descritivas desses parâmetros, média e desvio padrão, estão expressos na tabela 2. A média de concentração de DNA, variou de 7,908 a 107,97, entretanto houve uma alta dispersão da mesma, 10,887 a 117,637. Os resultados das absorvâncias 260/280 e 260/230, foram mais consistentes, apresentando menor variação dos valores apresentados.

Tabela 2. Valores de média e desvio padrão da absorvância $A_{260/A280}$ e $A_{260/230}$, bem como a concentração do DNA dupla fita obtidos nas 6 categorias

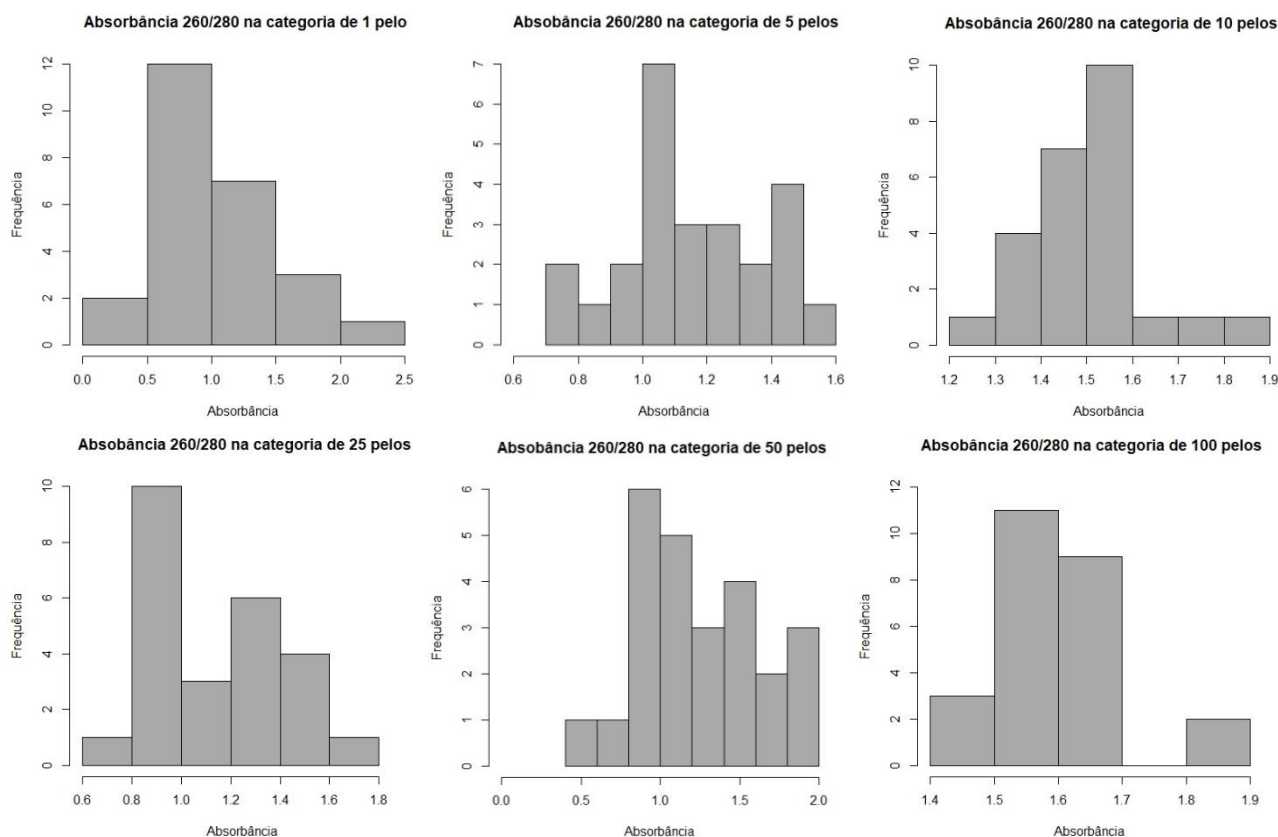
Categoria	1 bulbo	5 bulbos	10 bulbos	25 bulbos	50 bulbos	100 bulbos
A280/260	1,032+0,474	1,164+0,215	1,512+0,214	1,15+0,267	1,251+0,378	1,604+0,111
A260/230	0,337+0,205	0,552+0,288	0,898+0,279	0,401+0,301	0,56+0,435	1,151+0,364
ng/μl	7,908+10,887	15,472+17,272	86,248+73,748	53,09+138,3	61,944+117,637	107,97+83,783

5.1. Pureza do DNA extraído de bulbos de pelos a partir das relações de absorvâncias 260/280 e 260/230 nm.

5.1.1. Frequência observada na absorvância 260/280 nm

O gráfico 1 apresenta as frequências da absorvância 260/280, que representa a proporção de DNA em relação a proteínas, observadas nas categorias de bulbos de pelos, 1 bulbo, 5 bulbos, 10 bulbos, 25 bulbos, 50 bulbos e 100 bulbos, pertencentes a espécie *M. americana*. Das 150 amostras testadas, 25 por categoria, 140 amostras apresentaram absorvâncias 260/280 entre 0,46 a 1,69. Nota-se que para categoria de 1 bulbo apresentou o maior número de amostras com absorvância abaixo do considerado adequado, 21 amostras com absorvâncias entre 0,5 e 1,5.

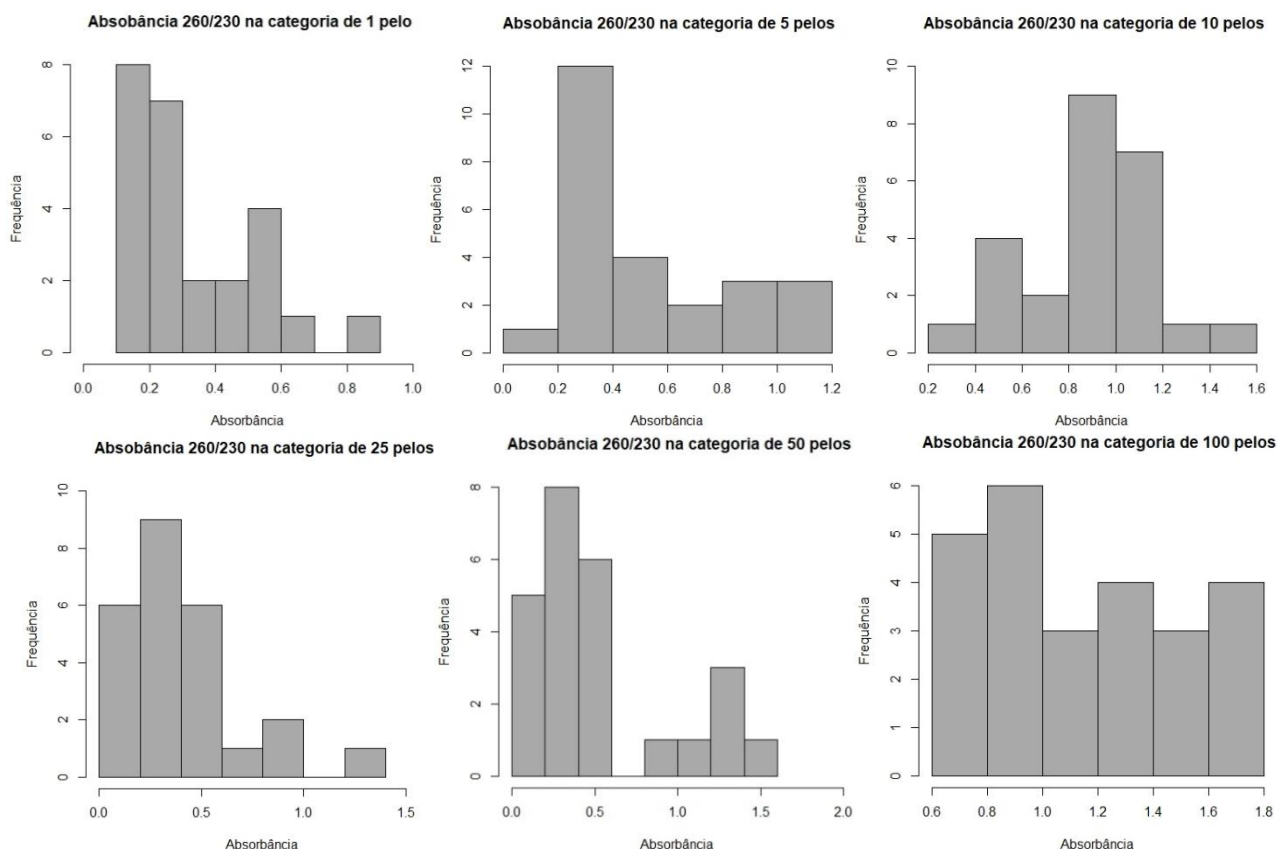
Figura 5. Histogramas demonstrando as absorvâncias 260/280 nm observadas, para as categorias de bulbos de pelos da espécie *M. americana*. Na parte superior, da esquerda para a direita, categoria: 1 bulbo, 5 bulbos e 10 bulbos. Na parte inferior, da esquerda para direita, categorias: 25 bulbos, 50 bulbos e 100 bulbos.



5.1.2. Frequência observada na absorvância 260/230 nm

O gráfico 2 expõe as frequências da absorvância 260/230 nm, que representa a proporção de DNA em relação a compostos que podem atuar como contaminantes, como por exemplo: fenol, guanidina, etc., observadas nas categorias de bulbos de pelos, 1 bulbo, 5 bulbos, 10 bulbos, 25 bulbos, 50 bulbos e 100 bulbos, pertencentes a espécie *M. americana*. Os parâmetros considerados adequados para essa relação são entre 1,5 a 1,8, do total de 150 amostra testadas nas categorias de bulbos, 142 apresentaram absorvância entre 0,1 e 1,48, apenas 8 amostras estão dentro do intervalo considerado adequado, das quais 7 pertencem a categoria de 100 bulbos. Nas categorias de 5 bulbos, 10 bulbos e 25 bulbos apresentaram todas as amostras fora do intervalo adequado, apresentando relação de absorvância a 260/230 entre 0,1 e 1,48.

Figura 6. Histogramas demonstrando as absorbâncias 260/230 nm observadas, para as categorias de bulbos de pelos da espécie *M. americana*. Na parte superior, da esquerda para a direita, categoria: 1 bulbo, 5 bulbos e 10 bulbos. Na parte inferior, da esquerda para direita, categorias: 25 bulbos, 50 bulbos e 100 bulbos



5.2. Sucesso de amplificação

Os sucessos de amplificação, ou seja a obtenção de bandas nítidas no produto de amplificação foram obtidos para todos os *primers*, Goua 11, Goua 29, Goua 31, ND5, Cyb, CARHSP e PNPO em cada categoria de bulbos de pelos, 1 bulbo, 5 bulbos, 10 bulbos, 25 bulbos, 50 bulbos e 100 bulbos, pertencentes a espécie *M. americana* estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Resultados das amplificações de todos os *primers* para cada uma das categorias, Tam.(pb) = Tamanho do produto de DNA amplificado em pares de bases (pb), n= corresponde ao número total de amostras testadas, (x) = número de amostras amplificadas

<i>Primer</i>	Tam.(pb)	n	Categorias					
			1 pelo	5 pelos	10 pelos	25 pelos	50 pelos	100 pelos
Goua 11	220	25	8% (2)	88% (22)	60% (20)	100% (25)	100% (25)	100% (25)
Goua 29	144	25	100% (25)	80% (20)	92% (23)	100% (25)	100% (25)	96% (24)
Goua 31	115	25	68% (17)	76% (19)	76% (19)	96% (24)	52% (13)	92% (23)
ND5	690	25	20% (5)	60% (15)	72% (18)	52% (13)	96% (24)	88% (22)
Cyb	1140	25	0%	0%	8% (2)	0%	16% (4)	0%
CARHSP	812	25	0%	0%	0%	0%	0%	100% (25)
PNPO	938	25	0%	0%	0%	0%	12% (3)	84% (21)

5.3. Microssatélites (Goua 11, Goua 29 e Goua 31)

Os microssatélites, Goua 11, Goua 29 e Goua 31, apresentaram 150 amostras, onde o sucesso de amplificação atingiu 100%, totalizando 6 eventos em categorias distintas, sendo 3 eventos do *primer* Goua 11 e outros 3 do *primer* Goua 29, um desses eventos ocorreu na categoria de 1 pelo. O *primer* Goua 29 foi o que obteve maior percentual de sucesso de amplificação do estudo, que variou de 80 a 100%. A categoria de 25 bulbos apresentou o maior percentual de amplificação entre os microssatélites, variando de 96 a 100%.

5.4. *Primers* Mitocondriais (ND5 e Cyb)

Os *primers* de regiões mitocondriais, ND5, cujo produto de amplificação gera fragmentos de 690 pb, apresentou amplificação em todas as categorias de bulbos de pelos, com percentual de amplificação variando de 20 a 96%, o maior sucesso foi obtido na categoria de 50 pelos. Comparativamente o *primer* CyB, que gera um produto de amplificação com o tamanho de 1139 pb, foi o que apresentou menor número de amostras que gerou produto de amplificação, apenas 6 amostras, sendo 2 delas na categoria de 10 pelos e 4 na categoria de 50 pelos.

5.5. Íntrons nucleares

Ambos os *primers* de íntrons nucleares, PNPO, cujo produto de amplificação gera fragmentos de 938 pb, bem com CARHSP -1, gera um produto de amplificação de 690 pb originalmente, porém em estudos anteriores para cervídeos já foi observado

fragmentos de 816 pb, apresentaram sucesso de amplificação considerável apenas na categoria de 100 bulbos, 84 e 100% respectivamente.

6. Discussão

O protocolo de extração de DNA baseado em fenol-clorofórmio descrito por Sambrook *et al.* 1989, apesar de ser proposto para uma quantidade de 40 bulbos, mostrou-se efetivo para obtenção de DNA de *Mazama americana* em todas as categorias testadas,

Apesar disso, não significa que a quantidade obtida será suficiente para amplificação de todos os fragmentos testados, uma vez que, segundo a literatura, a maior parte dos pelos coletados encontra-se na fase telogénea, que fornecem DNA fragmentado (Beja-Pereira *et al.* 2009, Graham, 2007 Mcnevin *et al.*, 2005^a). Ainda assim o protocolo pode uma possibilidade para utilização em pesquisas futuras para extração de DNA com pelo de *Mazama americana*.

Um aspecto fundamental para a obtenção de DNA viável em pelos, além dos estágios de crescimento cuja a principal causa de degradação do DNA é o processo de apoptose das células (Jeffrey *et al.* 2007), é o tempo em que a amostra fica exposta ao ambiente. No estudo realizado por Roon *et al.* 2003 com pelos da espécie *Ursus arctos*, avaliando os métodos de conservação de DNA, demonstrou que para microssatélites houve um decréscimo no sucesso de amplificação a partir de 6 meses, enquanto para *primers* mitocondriais de 1000 pb de base, diminuiu em 2 semanas.

Fatores ambientais influenciam na degradação do DNA em amostras de pelos, com o tempo principalmente nas hastas sofre danos devido ao processo de oxidação (Gilbert *et al.* 2004). Esse processo acontece de maneira mais intensa em temperaturas mais elevadas, o que pode influenciar na condição do DNA em estudos de mamífero tropicais, uma vez que a muitos estudos utilizando pelos ocorrem em locais de clima temperado (Castro-Arellano *et al.* 2008)

Esse aspecto demonstra que possivelmente os resultados obtidos com os *primers* de microssatélites (GOUA 11, GOUA 29 e GOUA 31), genes mitocondriais (CyB e ND5) e íntrons nucleares (CARHSP-1 e PNPO-3) utilizados no estudo de pelos de *M. americana* potencialmente ocorreram devido ao processamento das amostras no dia seguinte a coleta. Esse fato implica que, a depender do tempo que a amostra

ficar em campo bem como o tempo de processamento da mesma pós-coleta pode influenciar no decréscimo do sucesso de amplificação em estudos futuros.

A utilização do Nanodrop forneceu a concentração de DNA, em ng/μl, e as razões de absorbância para todas as categorias testadas. A concentração média em cada categoria foi 1 bulbo: 7,908+10,887; 5 bulbos: 15,472+17,272, 10 bulbos: 86,248+73,748; 25 bulbos: 53,09+138,3; 50 bulbos: 61,944+117,637; 100 bulbos: 107,97+83,783. Apesar de fornecer um valor associado a quantidade de DNA dupla fita (dsDNA), o princípio em que se baseia a técnica de espectrofotometria, referente a absorção de luz em um determinado comprimento de onda, não distingue de forma precisa ácidos nucleicos livres, DNA fragmentado, RNA e dsDNA, dessa forma os mesmos podem ser contabilizados nessa concentração (Thermo Fisher Scientific,2010),

Em relação a pureza do DNA extraído, que se refere a quantidade de ácidos nucleicos e proteínas ($A_{260/280}$) Os valores médios obtidos para a relação de absorbância 260/280 (1 bulbo: 1,032+0,474, 5 bulbos: 1,164+0,215, 10 bulbos: 1,512+0,214, 25 bulbos: 1,15+0,267, 50 bulbos: 1,251+0,378, 100 bulbos: 1,604+0,111), divergem das proporções descritas na literatura que indicam a obtenção de ácidos nucleicos puros no Nanodrop. cujo o valor deve estar entre 1,8 e 2,0 para a absorbância de 260/280 (Dejardins e Conklin,2010).

Apenas duas amostras na categoria de 10 bulbos, três amostras na categoria de 50 bulbos e duas amostras na categoria de 100 bulbos apresentaram proporção $A_{260/280}$ igual ou superior a 1,8. Esse resultado indica possivelmente a presença de proteínas nas amostras, mesmo que essas tenham passado por processo de degradação de proteínas, através da adição de proteinase K, durante o processo de extração. Porém as absorbâncias obtidas condizem com as absorbâncias observadas em em outros trabalhos, que realizaram a extração de DNA de através do método de Fenol-Clorofórmio (Macedo *et al.* 2023), o que indica que o nem toda a proteína é eliminada através desse protocolo de extração.

Com relação aos valores obtidos para a relação $A_{260/230}$ (1 bulbo: 0,337+0,205, 5 bulbos: 0,552+0,288, 10 bulbos: 0,898+0,279, 25 bulbos: 0,401+0,301, 50 bulbos: 0,56+0,435, 100 bulbos: 1,151+0,364), que se refere a proporção de DNA em relação a compostos que podem atuar como contaminantes,

todas as categorias apresentaram parâmetros abaixo do intervalo de 1,5 a 1,8, considerado o ideal (Dejardins e Conklin, 2010). Tal observação indica que em futuros estudos um processo de aperfeiçoamento adicional no protocolo utilizado é necessário.

Apesar da maioria das amostras em todas categorias apresentarem parâmetros de absorbância que divergem do considerado ideal, para utilização do DNA, as amplificações obtidas comprovam que o DNA em pelos apresenta viabilidade para utilização desse material para pequenos e eventualmente em grandes fragmentos. Os parâmetros obtidos podem ser utilizados como base para o uso em futuros estudos.

O comprimento do marcador utilizado mostrou uma associação direta com o sucesso de amplificação, bem como a quantidade de bulbos utilizados o que também foi observado em outros estudos (Morin *et al.* 2001; Buchan *et al.* 2005; Hoffman e Amos 2005 Jeffrey *et al.* 2007, Henry e Russelo, 2011). Em vista disso, se justifica o fato de os microssatélites apresentarem amplificação nas primeiras categorias, 1 e 5 bulbos, fato também observado em outros estudo que utilizaram bulbos como fonte de DNA (von Beroldingen *et al.* 1987, Belant *et al.* 2007, Jeffrey *et al.* 2007, Wirsing *et al.* 2020).

As taxas de sucesso de amplificação para os microssatélites na categoria de 1 bulbo variaram de 8% a 100%. Comparativamente a outros estudos, o sucesso de amplificação para categoria com 1 bulbo, variou entre 33,3 e 37%, para as espécies *Ochotona princeps* (Henry e Russelo 2011) e *Ursus arctos* Wirsing *et al.* 2020) ambos os estudos utilizando kits comerciais de extração de DNA. Tal divergência possivelmente se dá pelo tamanho dos *amplicons* utilizados, os microssatélites utilizados nesses estudos possuíam entre 185 a 587 pb.

Estudos como de McNevin *et al.* 2005b confirmam que a obtenção de pequenos fragmentos de DNA pode ser realizada até em hastes de cabelo, tal característica também é observada em estudos genéticos de animais selvagens, onde considerável parte das abordagens utilizam de microssatélites (Taberlet *et al.*, 1997, Jeffrey *et al.* 2007, Wirsing *et al.*, 2020), mostrando que ainda há alternativas a serem exploradas para aproveitamento do DNA em pelos de cervídeos.

Contudo vale ressaltar que o sucesso de amplificação dos microssatélites nas categorias 1 a 10 bulbos, variou de 8 a 100% com apenas um evento com a totalidade de amostras amplificadas. Já na categoria de 25 bulbos o sucesso variou de 96 a 100%, dessa forma essa categoria demonstrou ser a quantidade mínima de bulbos utilizados para obter maior percentual de sucesso, sendo assim a categoria recomendada para estudos que utilizam microssatélites.

A utilização de pelos como fonte de DNA mitocondrial é descrita como uma abordagem comum, visto que devido ao menor tamanho da mitocôndria a prevalência da mesma foi observada até em estudos de pelos em DNA antigo (Gilbert *et al.* 2007). Entretanto, comumente, são utilizados fragmentos de até 800 pb (Henry e Russelo, 2011), o que provavelmente justifica a maior taxa de sucesso do *primer* ND5, 690pb, em detrimento ao *primer* Cyb, 1139 pb.

O *primer* ND5 apresentou amplificação em todas as categorias de pelo, com sucesso de amplificação variando de 20 a 96%. A categoria de 50 pelos foi a que apresentou maior percentual de sucesso, sendo essa então a quantidade recomendada para obtenção de melhores resultados em estudos futuros.

Os íntrons nucleares apresentaram amplificação expressiva apenas na categoria de 100 bulbos, uma vez que há maior possibilidade de dentro dessas categorias fornecer bulbos em fase anagênea e telogênea com fragmentos de pele, dificilmente observados devido ao método de visualização utilizado e pelo desconhecimento de tais estruturas em cervídeos, compactuando com os resultados observados em trabalhos anteriores com outras espécies de mamíferos (Jeffrey 2007).

Apesar da amplificação das regiões intrônicas terem ocorrido como maior sucesso apenas na categoria de 100 bulbos, a confirmação da amplificação desse tipo de marcador nuclear em pelos de cervídeos neotropicais abre uma nova perspectiva sobre a utilização de amostras não invasivas para estudos e auxílio na solução de incertezas taxonômicas através da genotipagem do DNA nuclear dos atuais citótipos de *M. americana*.

Com base nos testes realizados demonstrou-se o potencial que o DNA proveniente de bulbos de pelos da espécie *M. americana* pode atingir em diferentes níveis de amostragem para diferentes tamanhos de *amplicons*, tal conhecimento permite o delineamento de futuros estudos, para as populações de *M. americana*.

Levando em conta esse potencial, como perspectivas futuras espera-se que a metodologia de armadilhamento para cervídeos neotropicais seja aplicada em estudos de campo, dessa forma informações sobre níveis de amostragem em campo e resposta de animais de vida livre podem ser obtidas.

Em seu trabalho sobre armadilhas de pelo, Santos (2019) discorre sobre a importância de uma alta tensão do fio de nylon nas armadilhas como uma forma de potencializar a coleta de pelos, com base nos resultados obtidos na análise de viabilidade do DNA, que demonstrou que as melhores amostragens para amplificação foram 25, 50 e 100 bulbos, confirma que esse princípio pode ter um impacto fundamental na obtenção de maior quantidade de pelos e por consequência mais bulbos.

Outro ponto importante é que a partir dos experimentos de avaliação da viabilidade do DNA realizados, qualifica a utilização da metodologia de armadilhamento proposta por Santos (2019), uma das principais vantagens é o custo para montagem de armadilhas, considerando a compra de todos os materiais necessários, cada armadilha custa em torno de R\$ 12,00, o que torna esse mecanismo de coleta mais acessível.

Quando se aborda o tema de genética, os avanços e possibilidades que surgem abrangem as mais diversas áreas. Ciência forense, medicina humana, saúde animal, são algumas áreas com avanço expressivo no âmbito da genética, por mais que normalmente não ocorra o cruzamento de referências entre as áreas, o estudo das mesmas pode fornecer novas possibilidades sobre abordagens de estudo e aplicações de técnicas que podem beneficiar a genética da conservação (Beja-Pereira *et al.* 2009).

Um exemplo disso é a metodologia de triagem, baseada na coloração de núcleos de células em bulbos provenientes de pelos arrancados e soltos, a partir de corantes de ligação com o DNA, EvaGreen™, Diamond™ Nucleic Acid Dye e RedSafe™, como intuito de visualizar, através de microscópio fluorescente o número

de núcleos no bulbo dos pelos, e dessa forma selecionar aqueles com maior probabilidade de fornecer DNA (Haines e Linacre, 2016). Tal abordagem pode futuramente servir para seleção de bulbos com maior probabilidade de fornecer DNA nuclear.

7. Conclusão

O DNA obtido a partir de bulbos de pelos da espécie *Mazama americana* comprovou-se eficiente para futura utilização em estudos genéticos dessa espécie. Apesar das relações de absorbância obtidas estarem abaixo das proporções ideais, o que possivelmente está relacionado ao protocolo utilizado, foi possível a obtenção de *amplicons* desde a categoria de 1 bulbo, o que demonstra a existência de DNA viável mesmo em pequenas amostragens.

Apesar do sucesso de amplificação obtido para microssatélites nas categorias de 1 e 5 bulbos, a utilização de amostras com 25 bulbos ou mais pode diminuir o número de insucessos de amplificação, podendo assim fornecer mais informações em estudos que utilizam esse tipo de *amplicon*. O mesmo ponto é válido para o *primer* ND5.

Em relação aos *primers* CARHSP-1 e PNPO, devido à o tamanho dos *amplicons* gerados pelo mesmo, recomenda-se o uso de amostras com 100 pelos ou mais para futuros estudos utilizando os mesmos. Porém, a obtenção de nDNA de alto peso molecular a partir de bulbos de pelo de *M. americana*, tornam o uso de amostras de pelo, uma alternativa para obtenção desse tipo de DNA para estudos genéticos populacionais, podendo ser uma ferramenta valiosa para resolução das incertezas taxonômicas que permeiam essa espécie bem como a diferenciação a nível molecular dos seus citótipos.

8. Referências.

- ABRIL, V. V., CARNELOSSI, E. A. G., GONZÁLEZ, S., DUARTE, J. M. B. Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 128, n. 1-3, p. 177-187, 2010.
- ALONSO, A., MARTÍN, P., ALBARRÁN, C., GARCÍA, P., GARCÍA, O., DE SIMÓN, L. F., ... & FERNÁNDEZ-PIQUERAS, J. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. **Forensic science international**, v. 139, n. 2-3, p. 141-149, 2004.
- ANDHERIA, A. P.; KARANTH, K. U.; KUMAR, N. S. Diet and prey profiles of three sympatric large carnivores in Bandipur Tiger Reserve, India. **Journal of Zoology**, v. 273, n. 2, p. 169-175, 2007
- BEJA-PEREIRA, A. L. B. A. N. O., OLIVEIRA, R., ALVES, P. C., SCHWARTZ, M. K., LUIKART, G. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. **Molecular ecology resources**, v. 9, n. 5, p. 1279-1301, 2009.
- BELANT, J.L., SEAMANS, T.W., PAETKAU, D. Genetic tagging free-ranging white-tailed deer using hair snares. **The Ohio Journal of Science**, v. 107, n. 4, p. 50, 2007.
- BENGTTSSON, C. F., OLSEN, M. E., BRANDT, L. Ø., BERTELSEN, M. F., WILLERSLEV, E., TOBIN, D. J., ANDREW S. W., GILBERT, M. T. P. DNA from keratinous tissue. Part I: hair and nail. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 194, n. 1, p. 17-25, 2012.
- BERNEGOSI, A. M., BORGES, C. H. D. S., SANDOVAL, E. D. P., CARTES, J. L., CERNOHORSKA, H., KUBICKOVA, S., VOZDOVA, M., CAPARROZ, R., GONZALEZ S. & DUARTE, J. M. B. Resurrection of the genus *Subulo* for the gray brocket deer, with designation of a neotype. **Journal of Mammalogy**, v. 104, n. 3, p. 619-633, 2023
- BONNICHSEN, R., HODGES, L., REAM, W., FIELD, K. G., KIRNER, D. L., SELSOR, K., TAYLOR, R. E. Methods for the study of ancient hair: radiocarbon dates and gene sequences from individual hairs. **Journal of Archaeological Science**, v. 28, n. 7, p. 775-785, 2001.
- BOOM, R. C. J. A., SOL, C. J., SALIMANS, M. M., JANSEN, C. L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M., VAN DER NOORDAA, J. P. M. E. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990
- BREMNER-HARRISON, S.; HARRISON, S. W. R.; CYPHER, B. L.; MURDOCH, J. D.; MALDONADO, J. DARDENS. K. Development of a single-sampling noninvasive hair snare. **Wildlife Society Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 456-461, 2006.
- BROOKE, V. On the Classification of the Cervidæ, with a Synopsis of the existing Species. In: **Proceedings of the Zoological Society of London**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 1878, p. 883-928.

- BUCHAN, J. C., ARCHIE, E. A., VAN HORN, R. C., MOSS, C. J., & ALBERTS, S. C., Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 3, p. 680-683, 2005.
- CAPARROZ, R.; MANTELLATTO, A.; BERTIOLI, D. J.; FIGUEIREDO, M. G.; DUARTE, J. M. B. Characterization of the complete mitochondrial genome and a set of polymorphic microsatellite markers through next-generation sequencing for the brown brocket deer *Mazama gouazoubira*. **Genetics and molecular biology**, v. 38, p. 338-345, 2015.
- CASTRO-ARELLANO, I.; MADRID-LUNA, C.; LACHER, T.E.; LEÓN-PANIAGUA, L. Hair-Trap Efficacy for Detecting Mammalian Carnivores in the Tropics. **The Journal of Wildlife Management**, 72: 1405–1412, 2008.
- CATTET, M., STENHOUSE, G. B., JANZ, D. M., KAPRONCZAI, L., ANNE ERLNBACH, J., JANSEN, H. T., NELSON O. L., ROBBINS C. T., BOULANGER, J. The quantification of reproductive hormones in the hair of captive adult brown bears and their application as indicators of sex and reproductive state. **Conservation physiology**, v. 5, n. 1, p. cox032, 2017.
- CHEN, C., LIN, Y., TAO, R., XIA, R., ZHANG, X., ZHANG, J., YANG J., LI C., ZHANG, S. An enhanced DNA amplification method to detect the species origins of the rootless hair shafts. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 7, n. 1, p. 647-648, 2019.
- CIFUENTES-RINCÓN, A.; MORALES-DONOSO, J. A.; SANDOVAL, E. D. P.; TOMAZELLA, I. M.; MANTELLATTO, A. M. B.; DE THOISY, B.; DUARTE, J. M. B. Designation of a neotype for *Mazama americana* (Artiodactyla, Cervidae) reveals a cryptic new complex of brocket deer species. **ZooKeys**, v. 958, p. 143, 2020.
- CONSTABLE, J. J.; PACKER, C.; COLLINS, D. A.; PUSEY, A. E. Nuclear DNA from primate dung. **Nature**, v. 373, n. 6513, p. 393, 1995.
- CURSINO, M. S.; SALVIANO, M. B.; ABRIL, V. V.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, p. 40, 2014.
- DE BARBA, M.; WAITS, L. P.; GENOVESI, P.; RANDI, E.; CHIRICHELLA, R.; CETTO, E. Comparing opportunistic and systematic sampling methods for non-invasive genetic monitoring of a small translocated brown bear population. **Journal of Applied Ecology**, v. 47, n. 1, p. 172-181, 2010.
- DE GROOT, P. V. C., WONG, P. B., HARRIS, C., DYCK, M. G., KAMOOKAK, L., PAGÈS, M., MICHAUX J. BOAG, P. T. toward a non-invasive inuit polar bear survey: Genetic data from polar bear hair snags. **Wildlife Society Bulletin**, v. 37, n. 2, p. 394-401, 2013.
- DE MARINIS, A. M.; ASPREA, A. Hair identification key of wild and domestic ungulates from southern Europe. **Wildlife Biology**, v. 12, n. 3, p. 305-320, 2006.
- DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 45, p. e2565, 2010.

- DUARTE, J.M.B. **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**. Jaboticabal: FUNEP, 1996, 14p.
- DUARTE J.M.B.; GONZALEZ S.; MALDONADO J.E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49:17-22. 2008.
- DUARTE, J.M.B.; UHART, M.M.; GALVEZ, C.E.S. Capture and physical restraint. In: DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical cervidology**. Jaboticabal: FUNEP, 2010, cap.25 p. 218-227,
- DUARTE, J.M.B., VOGLIOTTI, A. 2016. *Mazama americana*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016: e.T29619A22154827. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T29619A22154827.en>. Acesso em 20 de dezembro 2023.
- DUMOND, M.; BOULANGER, J.; PAETKAU, D. The estimation of grizzly bear density through hair-snagging techniques above the tree line. **Wildlife Society Bulletin**, v. 39, n. 2, p. 390-402, 2015.
- ECKHART, L., BACH, J., BAN, J., TSCHACHLER, E., Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 271, n. 3, p. 726-730, 2000
- EISENBERG, J. F. The evolutionary history of the Cervidae with special reference to the South American radiation. **Biology and management of the Cervidae (CM Wemmer, ed.)**. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, p. 60-64, 1987.
- EISENBERG, J. F. The contemporary cervidae of central and south america. In: **Antilopes, deer, and relatives: Fossil record, behavioral ecology, systematics and conservation**, p. 189-202, 2000.
- EMMONS, L.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. 2 ed. Chicago: The University of Chicago Press 1997.
- ERXLEBEN J.C.P., Systema regni animalis per classes, ordines, genera, species, varietates cum synonymia et history animalium, Classis 1. Mammalia. Impensis Weygandianis 1:1–636, 1777.
- FRANTZ, A. C., SCHAUL, M., POPE, L. C., FACK, F., SCHLEY, L., MULLER, C. P., & ROPER, T. J. Estimating population size by genotyping remotely plucked hair: the Eurasian badger. **Journal of Applied Ecology**, v. 41, n. 5, p. 985-995, 2004.
- GENTRY, A.H. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the Andean orogeny?. **Annals of the Missouri Botanical garden**, 69(3), pp.557-593, 1982.
- GILBERT, C, ROPIQUET A., HASSANIN A. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 40:101-117, 2006.

- GILBERT, M. T. P., TOMSHO, L. P., RENDULIC, S., PACKARD, M., DRAUTZ, D. I., SHER, A., ... SCHUSTER, S. C. Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts. **Science**, v. 317, n. 5846, p. 1927-1930, 2007.
- GOLENBERG, E. M., BICK EL, A., WEIHS, P. Effect of highly fragmented DNA on PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 24, p. 5026-5033, 1996.
- GONZÁLEZ S.; MALDONADO J.E.; ORTEGA J.; TALARICO A.C.; BIDEGARAY-BATISTA L.; GARCIA J.E.; DUARTE J.M.B. Identification of the emdangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources**, 9:754-758, 2009.
- GONZALEZ, S.; DUARTE, J.M.B. Speciation, evolutionary history and conservation trends of neotropical deer. **Mastozoologia Neotropical**, v. 27, n. 10.31687, 2020.
- GOOSSENS, B., WAITS, L. P., TABERLET, P. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 9, p. 1237-1241, 1998.
- GOOSSENS B., ABDULLAH Z.B., SINYOR J.B., Which nests to choose: collecting shed hairs from wild orang-utans, **Folia Primatol**, v. 75, n. 1, p. 23, 2004.
- GRAHAM, E. A. M. DNA reviews: hair. **Forensic science, medicine, and pathology**, v. 3, n. 2, p. 133-137, 2007
- GRISEDAL, K. S.; MURPHY, G. M.; BROWN, H.; WILSON, M. R.; SINHA, S. K. Successful nuclear DNA profiling of rootless hair shafts: a novel approach. **International journal of legal medicine**, v. 132, n. 1, p. 107-115, 2018.
- GROVES, C.P., GRUBB, P. Relationships of living deer. In: **Biology and Management of the Cervidae**, 1987. p. 21-59,
- GRUBB, P.. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. In: **Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.)**, Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 384–392 1993
- GRUBB, P. Valid and invalid nomenclature of living and fossil deer, Cervidae. **Acta theriologica**, v. 45, n. 3, p. 289-307, 2000.
- HAINES, A. M.; LINACRE, A. A rapid screening method using DNA binding dyes to determine whether hair follicles have sufficient DNA for successful profiling. **Forensic science international**, v. 262, p. 190-195, 2016.
- HIRAYAMA, K.; TANAKA, K.. Taxonomic revision of Lophiostoma and Lophiotrema based on reevaluation of morphological characters and molecular analyses. **Mycoscience**, v. 52, n. 6, p. 401-412, 2011.
- HARTMANN, S. A.; STEYER, K.; KRAUS, R. H.; SEGELBACHER, G.; NOWAK, C. POTENTIAL barriers to gene flow in the endangered European wildcat (*Felis silvestris*). **Conservation Genetics**, v. 14, n. 2, p. 413-426, 2013.

- . HASSANIN, A., DELSUC, F., ROPIQUET, A., HAMMER, C., VAN VUUREN, B. J., MATTHEE, C., ... & COULOUX, A. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes rendus biologies**, v. 335, n. 1, p. 32-50, 2012.
- HENRY, P.; RUSSELLO, M. A. Obtaining high-quality DNA from elusive small mammals using low- tech hair snares. **European Journal of Wildlife Research**, v. 57, n. 3, p. 429-435, 2011.
- HOFFMAN, J. I., AMOS, W., Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. **Molecular ecology**, v. 14, n. 2, p. 599-612, 2005
- HÖSS, M.; PÄÄBO, S. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. **Nucleic acids research**, v. 21, n. 16, p. 3913, 1993.
- IGEA, J.; JUSTE, J.; CASTRESANA, J. Novel intron markers to study the phylogeny of closely related mammalian species. *BMC Evolutionary Biology*, v. 10, n. 1, p. 369-381, 2010.
- IRWIN, D. M.; KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. **Journal of molecular evolution**, v. 32, n. 2, p. 128-144, 1991.
- JORGE, W.; BENIRSCHKE, K. Centromeric heterochromatin and G-banding of the red brocket deer, *Mazama americana* temama (Cervoidea, Artiodactyla) with a probable non-Robertsonian translocation. **Cytologia**, v. 42, n. 3-4, p. 711-721, 1977.
- KRAGLIEVICH, Lucas. **Contribución al conocimiento de los ciervos fósiles del Uruguay**. 1932.
- KLIGMAN, Albert M. The human hair cycle. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 33, n. 6, p. 307-316, 1959.
- KOHN, M. H.; WAYNE, R. K. Facts from feces revisited. **Trends in Ecology & Evolution** v. 12, n. 6, p. 223-227, 1997.
- KOPATZ, A.; HAGEN, S. B.; SMITH, M. E.; OLLILA, L. E.; ASPHOLM, P. E.; EIKEN, H. G. A modification of the hair-trapping method for surveillance of problematic bear activity close to a farm—a case study from the Pasvik Valley in Norway. In: **Annales Zoologici Fennici**. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board, v. 50, n. 6 p. 327-332. 2013.
- MACEDO, D. B., MELO, D. S. D., DOS SANTOS CORREA, R. M., DA COSTA MONTEIRO, J. V., DE MATOS, T. D. S., RIBEIRO, A. S. S., MOREIRA, H.L.M., MOREIRA, C.G.A., TAVARES, R.A. RODRIGUES, M. D. N. Modified phenol chloroform protocol for genomic DNA extraction from keratinous tissue. **DELOS: DESARROLLO LOCAL SOSTENIBLE**, v. 16, n. 49, p. 3614-3624, 2023.
- MANTELLATTO, A. M. B.; GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J. M. B. Cytochrome b sequence of the *Mazama americana jucunda* Thomas, 1913 holotype reveals *Mazama bororo* Duarte, 1996 as its junior synonym. **Genetics and Molecular Biology**, v. 45, 2021.

- MEIJAARD, E., GROVES, C. P. Morphometrical relationships between South-east Asian deer (Cervidae, tribe Cervini): evolutionary and biogeographic implications. **Journal of Zoology**, v. 263, n. 2, p. 179-196, 2004
- MERINO, M.L.; ROSSI, R.V. Origin, Systematics, and Morphological Radiation. In: Duarte JMB e Gonzalez S (Eds.) **Neotropical Cervidology**, Biology and Medicine of Latin American Deer. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland, pp. 2-11, 2010.
- MCDANIEL, G. W.; MCKELVEY, K. S.; SQUIRES, J. R.; RUGGIERO, L. F. Efficacy of lures and hair snares to detect lynx. **Wildlife Society Bulletin**, p. 119-123, 2000.
- MCKENNA, M. C.; BELL, S. K. **Classification of mammals: above the species level**. Columbia University Press, 1997.
- MCNEVIN, D.; WILSON-WILDE, L.; ROBERTSON, J.; KYD, J.; LENNARD, C. Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair: Part 1. Review of current status and knowledge gaps. **Forensic science international**, v. 153, n. 2-3, p. 237-246, 2005a.
- MCNEVIN, D., WILSON-WILDE, L., ROBERTSON, J., KYD, J., LENNARD, C., Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair Part 2. An optimised genomic DNA extraction procedure reveals donor dependence of STR profiles. **Forensic science international**, v. 153, n. 2-3, p. 247-259, 2005b.
- MILLS, L. S.; CITTA, J. J.; LAIR, K. P.; SCHWARTZ, M. K.; TALLMON, D. A. Estimating animal abundance using noninvasive DNA sampling: promise and pitfalls. **Ecological applications**, v. 10, n. 1, p. 283-294, 2000.
- MORALES-DONOSO, J. A., VACARI, G. Q., BERNEGOSI, A. M., SANDOVAL, E. D. P., PERES, P. H. F., GALINDO, D. J., DE THOSY, B., VOZODOVA, M., KUBICKOVA, S. & DUARTE, J. M. B. Revalidation of *Passalites Gloger*, 1841 for the Amazon brown brocket deer *P. nemorivagus* (Cuvier, 1817) (Mammalia, Artiodactyla, Cervidae). **ZooKeys**, v. 1167, p. 241, 2023.
- MORIN, P. A., CHAMBERS, K. E., BOESCH, C., VIGILANT, L., Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes* versus). **Molecular ecology**, v. 10, n. 7, p. 1835-1844, 2001
- OTAÑO-RIVERA, V., BOAKYE, A., GROBE, N., ALMUTAIRI, M. M., KURSAN, S., MATTIS, L. K., CASTROP, H., GURLEY, S. B., ELASED, K. M., BOIVIN, G. P., DI FULVIO, M., A highly efficient strategy to determine genotypes of genetically-engineered mice using genomic DNA purified from hair roots. **Laboratory animals**, v. 51, n. 2, p. 138-146, 2017.
- MULLINS, J., STATHAM, M. J., ROCHE, T., TURNER, P. D., O'REILLY, C. Remotely plucked hair genotyping: a reliable and non-invasive method for censusing pine marten (*Martes martes*, L. 1758) populations. **European Journal of Wildlife Research**, v. 56, p. 443-453, 2010

- PÄÄBO, S., HIGUCHI, R. G., WILSON, A. C. Ancient DNA and the polymerase chain reaction: the emerging field of molecular archaeology (Minireview). **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 17, p. 9709-9712, 1989.
- PAULI, J. N.; HAMILTON, M. B.; CRAIN, E. B.; BUSKIRK, S. W.; A Single-Sampling Hair Trap for Mesocarnivores. **The Journal of Wildlife Management**, 72: 1650–1652, 2008
- POCOCK, R. I. 22. The Homologies between the Branches of the Antlers of the Cervidae based on the Theory of Dichotomous Growth. In: **Proceedings of the Zoological Society of London**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 1933. p. 377-406.
- POZEBON, D.; SCHEFFLER, G. L.; DRESSLER, V. L. A review of procedures and applications. **Analytica chimica acta**, v. 992, p. 1-23, 2017.
- RAFINESQUE C.S. Analyse de la Nature. Tableau de l'Univers et des Corps organisés. Palerme, 1:224,1817.
- RANDI, E., MUCCI, N., PIERPAOLI, M., DOUZERY, E. New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome b gene. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1398, p. 793-801, 1998.
- REINERS, T. E.; ENCARNAÇÃO, J. A.; WOLTERS, V. An optimized hair trap for non-invasive genetic studies of small cryptic mammals. **European Journal of Wildlife Research**, v. 57, n. 4, p. 991-995, 2011.
- , ROON, D. A.; WAITS, L. P.; KENDALL, K. C. A A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 1, p. 163-166, 2003
- ROPIQUET, A.; HASSANIN, A.; Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (Mammalia, Bovidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, n. 1, p. 154-168, 2005.
- ROSSI R.V. **Taxonomia de *Mazama* Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**, 2000. 174f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ROMAIN-BONDI K. A.; WIELGUS R. B.; WAITS L.; KASWORM W. F.; AUSTIN M.; WAKKINEN W. Density and population size estimates for North Cascade grizzly bears using DNA hair-sampling techniques. **Biological Conservation**, v. 117, n. 4, p. 417-428, 2004.
- ROVANG, S.; NIELSEN, S. E.; STENHOUSE, G. In the trap: detectability of fixed hair trap DNA methods in grizzly bear population monitoring. **Wildlife Biology**, v. 21, n. 2, p. 68-79, 2015.
- SALVIANO M.B.; CURSINO M.S.; ZANETTI E.S.; ABRIL VV, DUARTE J.M.B. Intraspecific chromosome polymorphisms can lead to reproductive isolation and speciation: an example in red brocket deer (*Mazama americana*). **Biology of Reproduction** 96:1279–1287, 2017.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH E.; MANIATIS T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, New York. 1989.
- SANDOVAL, E. D. P., ROLA, L. D., MORALES-DONOSO, J. A., GALLINA, S., REYNA-HURTADO, R., DUARTE, J. M. B. Integrative analysis of *Mazama temama* (Artiodactyla: Cervidae) and designation of a neotype for the species. **Journal of Mammalogy**, v. 103, n. 2, p. 447-458, 2022.
- SANTOS, V.S. (2019) **Desenvolvimento e avaliação de armadilhas de pelo para amostragem genética de veados do gênero *Mazama***. Trabalho de conclusão de curso de Zootecnia-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus Jaboticabal, Jaboticabal
- SCHMIDT, K.; KOWALCZYK, R. Using scent-marking stations to collect hair samples to monitor Eurasian lynx populations. **Wildlife Society Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 462-466, 2006
- SCOTT, K. M., JANIS, C.M. Phylogenetic relationships of the Cervidae, and the case for a superfamily 'Cervoidea'. **Biology and management of the Cervidae**, p. 3-20, 1987.
- SIMPSON, G. G. **The principles of classification and a classification of mammals**. American Museum of Natural History, 1945.
- SIMPSON, G. G. *Splendid isolation: the curious history of South American mammals*. **Yale University Press**, 1980
- SLOANE, M. A., SUNNUCKS, P., ALPERS, D., BEHEREGARAY, L. B., TAYLOR, A. C. Highly reliable genetic identification of individual northern hairy-nosed wombats from single remotely collected hairs: a feasible censusing method. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 9, p. 1233-1240, 2000
- STRAUSS, RICHARD E.; BOND, CARL E. Taxonomic methods: morphology. **Methods for fish biology**, p. 109-140, 1990.
- STHLI, L.M., WEBB S.D. *The great American Biotic Interchange*. **Plenum Press**, New York e London, 1985.
- TABERLET, P., CAMARRA, J. J., GRIFFIN, S., UHRES, E., HANOTTE, O., WAITS, L. P., DUBOIS-PAGANON C., BURKET., BOUVET, J., Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. **Molecular ecology**, v. 6, n. 9, p. 869-876, 1997.
- TABERLET, P.; WAITS, L. P.; LUIKART, G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. **Trends in Ecology; Evolution**, v. 14, n. 8, p. 323-327, 1999.
- Thermo Fisher Scientific, 2010, Nucleic acids quantification Disponível em: Nucleic Acid Quantification Support—Getting Started | Thermo Fisher Scientific - BR. Acesso em: 19/10/2023
- TÓTH M., A new noninvasive method for detecting mammals from birds' nests. **The Journal of Wildlife Management**, v. 72, n. 5, p. 1237-1240, 2008.
- VACARI, G.Q.; PERES, P.H.F.; DUARTE J.M.B. Cross-amplified microsatellite loci for the red brocket deer complex (*Mazama americana* Erxleben, 1777). **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research (BJAER)**, v. 5, n. 1, p. 256-265, 2022.
- VON BEROLDINGEN, C. H., HIGUCHI, R. G., SENSABAUGH, G. F., ERLICH, H. A., Analysis of enzymatically amplified HLA-Dqalpha DNA from single human hairs. **American Journal of Human Genetics**, v. 41, p. 725, 1987

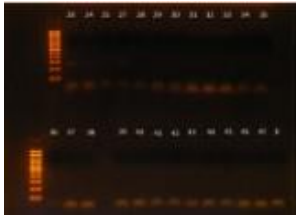
- WALKER F. M.; SUNNUCKS, P.; TAYLOR, A. C., Evidence for habitat fragmentation altering within-population processes in wombats. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 7, p. 1674-1684, 2008.
- WEAVER, J. L., WOOD, P., PAETKAU, D., LAACK, L. L. Use of scented hair snares to detect ocelots. **Wildlife Society Bulletin**, v. 33, n. 4, p. 1384-1391, 2005.
- WEBB, S. D. Evolutionary history of new world Cervidae. **Antelopes, deer, and relatives: Fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation**, p. 38-64, 2000.
- WEBER M.; GONZALEZ S. Latin American deer diversity and conservation: a review of status and distribution. **Ecoscience**, v. 10, n. 4, p. 443-454, 2003.
- WENDT, T. Composition, floristic affinities and origins of the Mexican Atlantic slope rain forests. – In: T. P. Ramamoorthy et al (eds), *Biological diversity of Mexico, origins and distribution*. Oxford Univ. Press, pp. 595–680, 1993.
- WILLERSLEV, E., GILBERT, M. T. P., BINLADEN, J., HO, S. Y., CAMPOS, P. F., RATAN, A., Tomsho, L. P, da Fonseca R. R., Sher A., Kuznetsova T. V., Nowak-Kemp M., Roth T. L., Miller W., SCHUSTER, S. C., Analysis of complete mitochondrial genomes from extinct and extant rhinoceroses reveals lack of phylogenetic resolution. **BMC evolutionary biology**, v. 9, p. 1-11, 2009.
- WIRSING, A. J.; QUINN, T. P.; ADAMS, J. R.; WAITS, L. P. Optimizing selection of brown bear hair for noninvasive genetic analysis. **Wildlife Society Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 94-100, 2020.
- YOSHII, T., TAMURA, K., TANIGUCHI, T., AKIYAMA, K., ISHIYAMA, I., Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal. **Nihon hoigaku zasshi= The Japanese journal of legal medicine**, v. 47, n. 4, p. 323-329, 1993.
- ZURANO, J. P., MAGALHÃES, F. M., ASATO, A. E., SILVA, G., BIDAÚ, C. J., MESQUITA, D. O., & COSTA, G. Cetartiodactyla: updating a time-calibrated molecular phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2019

Apêndices

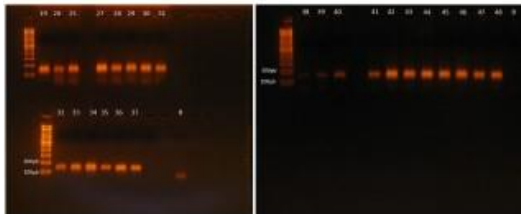
1 BULBO

MICROSSATÉLITE

GOUA 11–220pb



GOUA 29 – 144pb



GOUA 31–115pb



MITOCONDRIAL

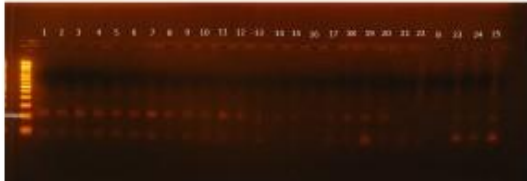
ND5–690



Figura 7. Fotodocumentação do produto de amplificação a partir do DNA obtido de 1 bulbo de pelo da espécie *M. americana*.

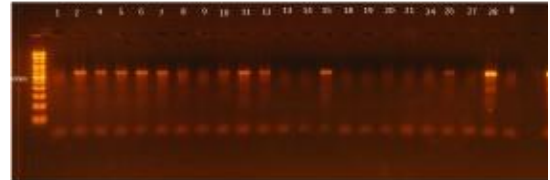
5 BULBOS

MICROSSATÉLITE
GOUA 11–220pb

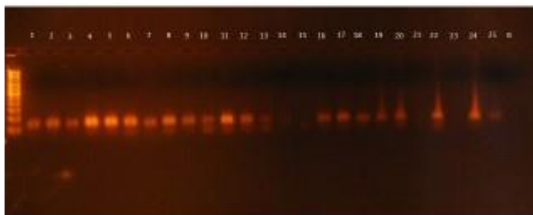


MITOCHONDRIAL

ND5–690pb



GOUA 29–144pb



GOUA 31–115pb

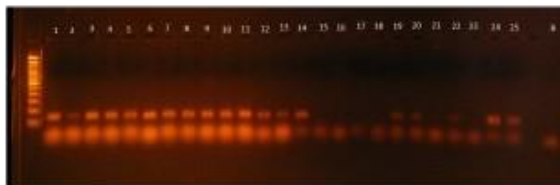
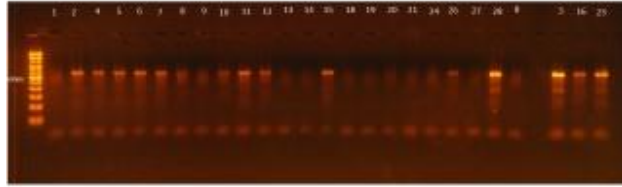


Figura 8. Fotodocumentação do produto de amplificação a partir do DNA obtido de 5 bulbos de pelos da espécie *M. americana*.

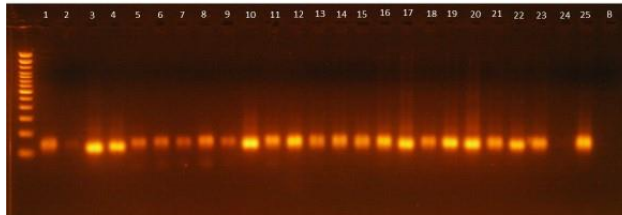
10 BULBOS

MICROSSATÉLITE

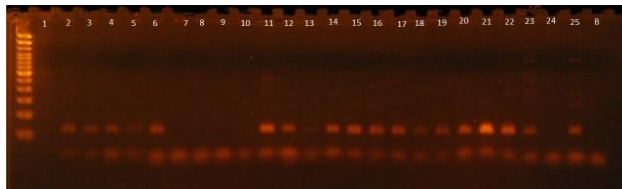
GOUA 11–220pb



GOUA 29–144pb

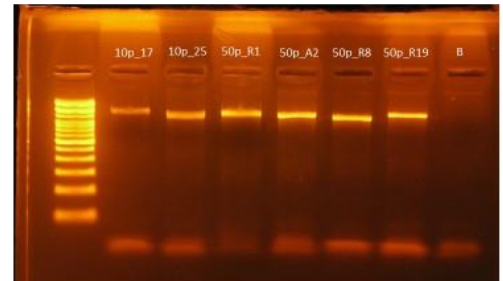


GOUA 31–115pb



MITOCONDRIAL

CITB 10 E 50B–1140pb



ND5–690pb

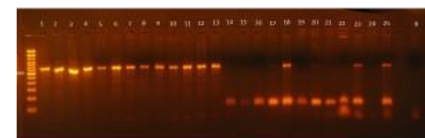
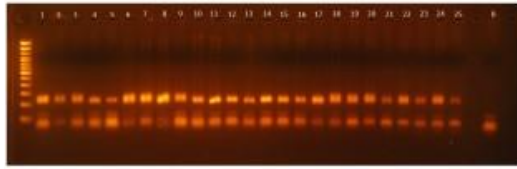


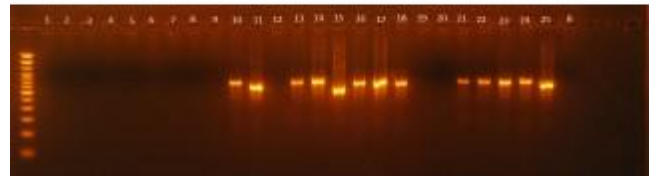
Figura 9. Fotodocumentação do produto de amplificação a partir do DNA obtido de 10 bulbos de pelos da espécie *M. americana*.

25 BULBOS

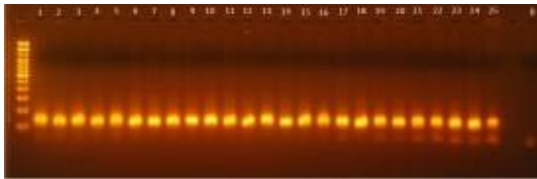
MICROSSATÉLITE
GOUA 11–220pb



MITOCONDRIAL
ND5–690pb



GOUA 29–144pb



GOUA 31–115pb

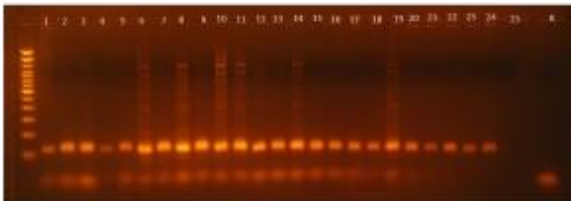
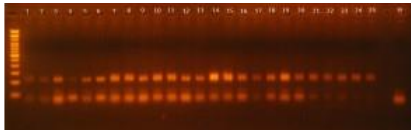


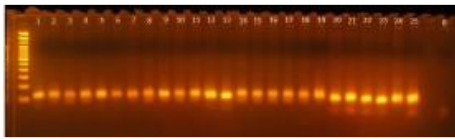
Figura 10. Fotodocumentação do produto de amplificação a partir do DNA obtido de 25 bulbos de pelos da espécie *M. americana*

- 50 BULBOS

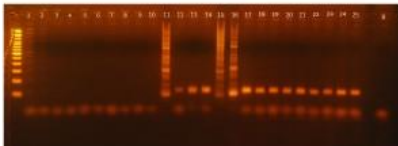
MICROSSATÉLITE
GOUA 11–220pb



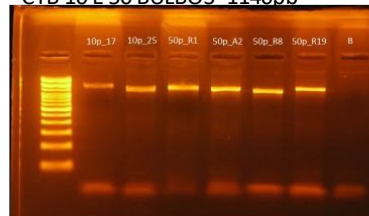
GOUA 29–144pb



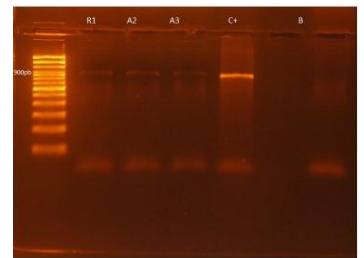
GOUA 31–115pb



MITOCHONDRIAL
CYB 10 E 50 BULBOS–1140pb



INTRONS NUCLEARES
PNPO-3–938pb



ND5–690PB

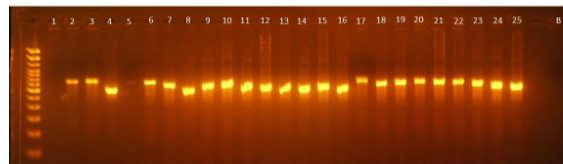
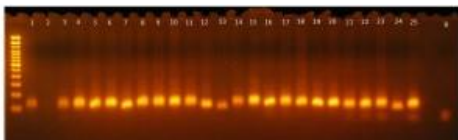
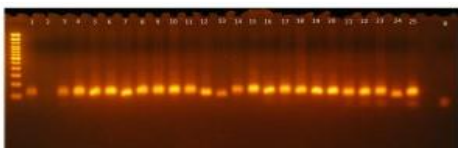


Figura 11. Fotodocumentação do produto de amplificação a partir do DNA obtido de 50 bulbos de pelos da espécie *M. americana*

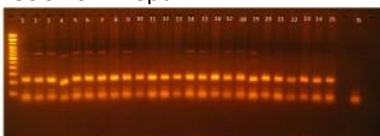
100 BULBOS

MICROSSATÉLITE
GOUA 11–220pb

GOUA 29–144pb

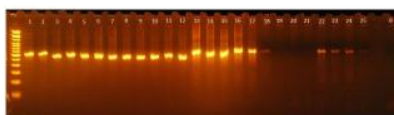


GOUA 31–115pb



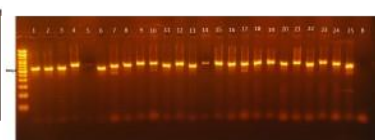
MITOCONDRIAL

ND5–690pb



INTRON NUCLEARES

CARHSP-1–



PNPO-3–938pb

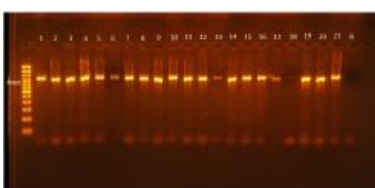


Figura 12. Fotodocumentação do produto de amplificação a partir do DNA obtido de 100 bulbos de pelos da espécie *M. americana*