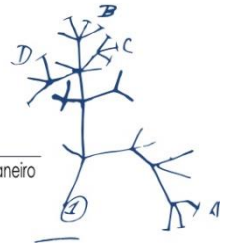




UFRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO

Programa de Pós-graduação em
**Biodiversidade &
Biologia Evolutiva**
Instituto de Biologia - Universidade Federal do Rio de Janeiro



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva

Júlia Bontempo Cardoso Emydio

**Ferramentas Genéticas para Apoio à Reintrodução de Antas
Tapirus terrestris na Mata Atlântica do Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2023

**Ferramentas Genéticas para Apoio à Reintrodução de Antas
Tapirus terrestris na Mata Atlântica do Rio de Janeiro**

Júlia Bontempo Cardoso Emydio

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Orientador: Haydée Andrade Cunha

Coorientador: Maron Galliez

Rio de Janeiro

2023

Ficha Catalográfica

**Ferramentas Genéticas para Apoio à Reintrodução de Antas *Tapirus terrestris*
na Mata Atlântica do Rio de Janeiro**

Júlia Bontempo Cardoso Emydio

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Banca Examinadora:

Dr. Roberto Leonan Morim Novaes – Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Membro Titular Interno)

Dra. Gabriela Medeiros de Pinho – Universidade Federal de São Carlos
(Membro Titular Externo)

Dra. Cibele Biondo – Universidade Federal do ABC
(Membro Titular Externo)

Dr. William Corrêa Tavares – Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Membro Suplente Interno)

Dr. Anderson Vilasboa de Vasconcellos – Universidade do Estado do Rio de Janeiro
(Membro Suplente Externo)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meu agradecimento a todos que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Ao meu coorientador Maron que me aceitou como aluna desde o final de 2018 e me deu a oportunidade de continuar no laboratório como aluna de mestrado. A oportunidade de estar no laboratório me permitiu experiências de campo e, agora, com o mestrado, me permitiu a oportunidade de trazer a visão de genética para a área da conservação.

À minha orientadora, Haydée, que, mesmo em cima da hora, me aceitou como aluna de mestrado. Sua orientação e suporte foram importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA), por terem me aceitado no laboratório mesmo não sendo uma integrante. Na equipe, expressei meu agradecimento ao Hugo e Matheus, que colaboraram comigo no laboratório de genética, oferecendo apoio e assistência.

A todos os zoológicos e criadouros que forneceram amostras de tecido para o meu estudo: BioParque do Rio, Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM), Fazenda Trijunção, Parque Ecológico de São Carlos, Parque Estadual de Dois Irmãos, Parque Ecológico Klabin, Parque Zoobotânico Getúlio Vargas, Refúgio Biológico Bela Vista (RBV), Zoobotânico de São José do Rio Preto, Zoológico de Guarulhos, Zoológico de Ilha Solteira e Zoológico de Sorocaba. A obtenção dessas amostras foi desafiadora e essa colaboração foi essencial.

Aos órgãos financiadores: CAPES, Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), Instituto de Ação Socioambiental (ASA) e Petrobras.

Por último, expresso minha gratidão às pessoas mais importantes. Agradeço aos meus pais pelo apoio incondicional ao longo da minha trajetória.

RESUMO

A anta *Tapirus terrestris* é o maior mamífero terrestre do Brasil. Devido à perda e fragmentação de habitat e caça, foi extinta no Estado do Rio de Janeiro. Para restaurar essa fauna perdida, o Refauna realiza a reintrodução de antas na Mata Atlântica do Rio de Janeiro. Para fins de reintrodução, os indivíduos escolhidos devem ser representativos da linhagem evolutiva da região onde serão inseridos e ter variação genética suficiente para garantir sua aptidão e aumentar a chance de atingir uma população autossustentável. Para essa avaliação torna-se interessante o estudo do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), pois a manutenção da variação nesse gene é crucial para uma resposta imune eficaz. Com isso, o objetivo desse estudo é realizar análises genéticas para subsidiar decisões de manejo da população de antas reintroduzidas na REGUA, RJ, e orientar o manejo *ex-situ* e futuras reintroduções. De 18 cativeiros diferentes, foram amostradas 47 antas, das quais 19 foram reintroduzidas. Nas análises filogenéticas incluindo sequências de antas de vida-livre publicadas em estudos anteriores, foram recuperados quatro Clados evolutivos para o gene mitocondrial Citocromo b. As antas de cativeiro analisadas constituem, majoritariamente, o Clado que ocorre do sul da Amazônia ao norte da Argentina e que estaria presente na Mata Atlântica. Porém, três antas se agruparam em Clados diferentes, que ocorrem na Amazônia ocidental e no norte da Amazônia. A fim de preservar a diferenciação genética entre as linhagens evolutivas na espécie, esses três indivíduos não devem ser reintroduzidos em áreas de Mata Atlântica. Por fim, foram desenvolvidos iniciadores para quatro locos do MHC. A caracterização desses genes será importante para a compreensão do processo evolutivo que influencia a diversidade genética do MHC e a resistência à patógenos nesta espécie,

e para decisões de manejo que maximizem a variação genética adaptativa nas populações *ex-situ* e reintroduzidas.

Palavras-chave: Tapir, Citocromo b, MHC, phylogeography.

ABSTRACT

The Lowland Tapir (*Tapirus terrestris*) is the largest terrestrial mammal in Brazil. However, due to habitat loss, fragmentation, and hunting, it became extinct in the state of Rio de Janeiro. To restore this lost species, Refauna reintroduces tapirs into the Atlantic Forest in Rio de Janeiro. In terms of reintroduction, the selected individuals must represent the evolutionary lineage of the region where they will be inserted and possess sufficient genetic variation to ensure their fitness and enhance the chances of establishing a self-sustaining population. Therefore, studying the Major Histocompatibility Complex (MHC) becomes relevant, as maintaining variation in this gene is crucial for an effective immune response. This study aims to conduct genetic analyses to support management decisions for the reintroduced tapir population at REGUA, RJ, and guide ex-situ management and future reintroductions. Out of 47 tapirs sampled from 19 different captive facilities, 18 were reintroduced. Phylogenetic analysis including sequences from wild ranging tapirs published in previous studies results revealed four evolutionary clades for the cytochrome b mitochondrial gene. The analyzed captive tapirs mostly belonged to the clade occurring from southern Amazon to northern Argentina, believed to occur in the Atlantic Rainforest. However, three tapirs grouped into different clades found in the western and northern Amazon. In order to preserve the genetic differentiation among evolutionary clades, those three tapirs should not be reintroduced in areas of Atlantic Rainforest. Lastly, primers for four MHC loci were developed. Characterizing these genes will be valuable in understanding the evolutionary processes influencing MHC genetic diversity and pathogen resistance in this species, and guiding management decisions aiming to maximize adaptive variation in ex-situ and reintroduced populations.

Keywords: Tapir, Citocromo b, MHC, phylogeography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica e morfologia da anta brasileira <i>Tapirus terrestris</i> em diferentes estágios de desenvolvimento.	14
Figura 2. Mapa das linhagens evolutivas da anta brasileira <i>T. terrestris</i> , baseado em dados de DE THOISY et al. (2010).	23
Figura 3. Árvore filogenética bayesiana de haplótipos de Citocromo b (1039pb, HKY+I+G, N=124).	33
Figura 4. Rede de haplótipos (<i>Median-Joining</i>) do Citocromo b (1039pb, N=124)...	34
Figura 5. Mapa de ocorrência dos quatro Clados evolutivos de anta <i>T. terrestris</i>	40
Figura 6. O reconhecimento pelas células T de peptídeos estranhos associados às proteínas do MHC.	47
Figura 7. Eletroferograma obtido após o sequenciamento do loco do MHC de classe II (DQA) para a amostra Anta 2471, evidenciando polimorfismo A/G no sítio 132. ...	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de amostras de anta <i>Tapirus terrestris</i> obtidas para o presente estudo.	26
Tabela 2. Diversidade genética das antas brasileiras <i>T. terrestris</i>	32
Tabela 3. Resultados das análises de Citocromo b das 27 sequências de anta <i>T. terrestris</i> analisadas no presente estudo.....	32
Tabela 4. Propriedades das proteínas do MHC de classe I e de classe II humanas.	47
Tabela 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de MHC Classe I e II.	53
Tabela 6. Lista de amostras de anta <i>Tapirus terrestris</i> obtidas para o presente estudo.	54
Tabela 7. Resultado do sequenciamento dos locos de MHC para anta <i>Tapirus terrestris</i>	57
Tabela 8. Lista de amostras de anta <i>Tapirus terrestris</i> obtidas para o presente estudo.	70
Tabela 9. Lista das sequências de anta <i>T. terrestris</i> para o gene Citocromo b usadas no presente estudo.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

.+G	Distribuição Gama
.+I	Proporção de sítios invariáveis
APC	Células apresentadoras de antígeno
BA	Bahia
DFTD	doença tumoral facial do diabo-da-tasmânia (<i>tasmanian Devil Facial Tumor Disease</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos (<i>Deoxynucleoside triphosphate</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
F	Fêmea
HKY	Hasegawa-Kishino-Yano
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
LGM	<i>Last Glacial Maximum</i>
M	<i>Macho</i>
MCMC	Monte Carlo via Cadeias de Markov (Markov Chain Monte Carlo)
MG	Minas Gerais
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
Milli-Q	Água ultrapura
mtDNA	DNA mitocondrial
MYA	milhões de anos
nDNA	DNA nuclear
pb	Pares de base
PBR	Região de ligação do peptídeo
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)
PE	Pernambuco
PR	Paraná
REGUA	Reserva Ecológica de Guapiaçu
RJ	Rio de Janeiro
SNPs	polimorfismo de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism)
SP	São Paulo
TCR	Receptor de célula T
UF	Unidades federativas

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	13
Espécie Estudada	13
Conservação	15
Estrutura da Dissertação.....	18
Capítulo 1	20
Filogeografia de Antas <i>Tapirus terrestris</i> e a Procedência dos Indivíduos de Cativeiro	20
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Objetivos	24
1.1.1. Objetivo Geral	24
1.1.2. Objetivos Específicos	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. Amostragem	25
2.2. Extração e amplificação de DNA.....	26
2.3. Eletroforese.....	27
2.4. Purificação e Sequenciamento.....	28
2.5. Edição e Alinhamento das Sequências	28
2.6. Análises das Sequências	28
3. RESULTADOS	30
3.1. Diversidade genética.....	30
3.2. Linhagens Evolutivas	31

4. DISCUSSÃO	35
4.1 Evolução das linhagens mitocondriais em <i>T. terrestris</i>	35
4.2. Caracterização genética das antas de cativeiro no Brasil	37
4.3. Status taxonômico de <i>T. pinchaque</i>	41
4.4. Demografia molecular	42
4.5. Conclusão	43
Capítulo 2	45
Desenvolvimento de Oligonucleotídeos Iniciadores para o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em Anta <i>Tapirus terrestris</i>	45
1. INTRODUÇÃO	46
1.2. Objetivo	52
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
2.1. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores	52
2.2. Amostragem.....	53
2.3. Extração e amplificação de DNA.....	54
2.4. Eletroforese	55
2.5. Purificação e sequenciamento	55
2.6. Edição, alinhamento e análise das sequências.....	56
3. RESULTADOS	56
4. DISCUSSÃO	58
BIBLIOGRAFIA	60
ANEXO	70

Introdução Geral

Espécie Estudada

Atualmente, existem quatro espécies de anta, todas pertencentes ao gênero *Tapirus*, Família Tapiridae, Ordem Perissodactyla (ASHLEY; NORMAN; STROSS, 1996; NOWAK, 1999). Existe uma espécie vivente na Ásia (anta asiática *T. indicus*) e três espécies nas Américas (NOWAK, 1999; TRAEHOLT et al., 2016). A anta centro-americana *T. bairdii* é encontrada no norte da Colômbia, na América Central e sul do México (GARCÍA et al., 2016); a anta da montanha *T. pinchaque* se distribui pela Colômbia, Equador e Peru (LIZCANO et al., 2016); e a anta brasileira *T. terrestris* ocorre na América do Sul em regiões de planície, áreas de planalto e altitude médias do norte da América do Sul ao norte da Argentina (Figura 1; NOWAK, 1999; VARELA et al., 2019).

A anta brasileira (Figura 1B) é o maior mamífero terrestre do Brasil, com peso entre 150 e 300 kg (NOWAK, 1999; REIS et al., 2011). Possui pelagem curta e cor marrom ou cinza e cabeça convexa devido à sua proeminente crista sagital; sua crina é estreita, preta, cinza ou marrom e se estende da base do focinho até a metade do dorso (NOWAK, 1999; PADILLA; DOWLER, 1994; REIS et al., 2011). O corpo é robusto e as pernas são curtas, com altura de 77-108 cm e comprimento total de até 221 cm para as fêmeas e 204 cm para os machos; a cauda é curta com 4,6 a 10,0 cm; e as orelhas possuem cerca de 12 cm de comprimento com coloração esbranquiçada nas pontas (Figura 1A; PADILLA; DOWLER, 1994; REIS et al., 2011). O focinho das antas é provido de uma pequena probóscide móvel e curvada para baixo, formada por um prolongamento da narina e do lábio superior (Figura 1A;

NOWAK, 1999; PADILLA; DOWLER, 1994; REIS et al., 2011).

O filhote (Figura 1B) apresenta coloração marrom a cinza com padrões de listras claras e onduladas longitudinais nas costas e laterais, estendendo até a cauda (NOWAK, 1999). Enquanto, na cabeça, apresentam manchas irregulares (NOWAK, 1999; PADILLA; DOWLER, 1994; REIS et al., 2011). Essas listras podem ter função de camuflagem, onde o filhote permanece abaixado e imóvel entre a vegetação quando se sente ameaçado (REIS et al., 2011). As listras vão desaparecendo até cerca de oito meses, e o desmame total ocorre por volta do décimo mês, quando o filhote começa a ingerir somente alimentos sólidos (REIS et al., 2011).



Figura 1. Distribuição geográfica e morfologia da anta brasileira *Tapirus terrestris* em diferentes estágios de desenvolvimento. Mapa de distribuição geográfica da anta (A), georreferenciado de MEDICI et al. (2012). Anta brasileira na fase adulta (B). Filhote de anta brasileira (C). Fotos do acervo do Laboratório de Ecologia e Manejo de Animais Silvestres (LEMAS) do Instituto Federal do Rio de Janeiro.

A anta é um herbívoro generalista, que se alimenta de frutos, folhas e fibra (BODMER, 1991; MEDICI, 2010; OLIVEIRA-SANTOS et al., 2010; REIS et al., 2011). Possui hábitos solitários e grande associação com corpos d'água (MEDICI, 2010; OLIVEIRA-SANTOS et al., 2010; PADILLA; DOWLER, 1994). O baixo potencial reprodutivo das antas, com uma única prole após gestação de 13 a 14 meses, e sua ampla área de vida resultam em baixas densidades: 0,34 indivíduo/km², no Parque Estadual Morro do Diabo, Estado de São Paulo, (MEDICI, 2010); e 3,3 indivíduos/km², na Estação Ecológica Maracá, Roraima (MENDES PONTES, 2004). A anta é vulnerável à extinção local devido às perdas de diversidade genética, que é agravado pela perda e fragmentação de habitat e pela caça (FERREGUETTI; TOMAS; BERGALLO, 2017).

Conservação

A anta brasileira está classificada como Vulnerável de acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature*, IUCN, 2018) e como Em Perigo de extinção no bioma Mata Atlântica (MEDICI, 2010). Esta classificação ocorre devido à grande redução contínua da população, estimada em mais de 30% nas últimas três gerações (33 anos), que deverá continuar pelas próximas três gerações (VARELA et al., 2019). Além disso, parece improvável que populações da espécie consigam persistir com densidades maiores que 1,0 indivíduo/km² em locais com presença humana (VARELA et al., 2019). No Brasil, a anta foi extinta em partes da região Nordeste e nos estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul (MACEDO, 2017; VARELA et al., 2019). No Rio de Janeiro, o último registro da espécie é datado

de 1914 (MACEDO, 2017).

Junto aos efeitos do desmatamento e da caça, a competição com o gado doméstico também contribuiu para o declínio e o isolamento das populações de antas (VARELA et al., 2019). Outra grande ameaça para *T. terrestris* é o atropelamento (ABRA et al., 2020; VARELA et al., 2019). Em uma Rodovia MS-040 no Estado de Mato Grosso do Sul, Centro-Oeste do Brasil, foram registrados um total de 21 antas mortas por atropelamento em um período de oito meses (ABRA et al., 2020). Os atropelamentos contribuem para o declínio da população de antas no Cerrado, no Pantanal e na Mata Atlântica (VARELA et al., 2019).

A perda ou redução de populações animais pode levar à perda de interações ecológicas nos ecossistemas (VALIENTE-BANUET et al., 2015). Uma vez que muitos aspectos funcionais importantes dos ecossistemas dependem intimamente das interações bióticas, sua perda pode ter efeitos generalizados, acelerando a extinção local das espécies e a deterioração das funções do ecossistema (DONOSO et al., 2020; EMER et al., 2019). Extinções de interações e suas funções ecológicas associadas podem frequentemente preceder o desaparecimento completo de espécies, quando estas estão em abundância tão reduzida que já não exercem seu papel funcional (VALIENTE-BANUET et al., 2015). Como consequência essa perda pode gerar a Síndrome da Floresta Vazia, que deriva da perda de interações ecológicas por ausência de animais que são importantes para a dispersão de sementes (FERNANDEZ et al., 2017; GALETTI et al., 2017; KURTEN, 2013; REDFORD, 1992; WILKIE et al., 2011). Nas florestas tropicais, os mamíferos são importantes componentes ecológicos integrantes da paisagem e exercem papel na dispersão de sementes, predação de sementes, herbivoria, polinização e predação (REDFORD, 1992). Dessa forma os animais são importantes para a manutenção e

desenvolvimento das florestas.

Nas últimas décadas, houve um interesse crescente em restaurar os ecossistemas através da translocação de espécies extintas ecologicamente ou localmente (FERNANDEZ et al., 2017; GALETTI et al., 2017). A refaunação, através da translocação de espécies animais para suas áreas geográficas originais, como é o caso da reintrodução, tem se mostrado um método promissor e eficaz para restaurar processos ecológicos e proteger espécies ameaçadas. (BECK et al., 1994; FERNANDEZ et al., 2017; IUCN/SSC, 2013; KIERULFF et al., 2012).

A reintrodução refere-se ao movimento intencional de animais dentro da distribuição histórica da espécie, para seu habitat natural da qual ele desapareceu, com o objetivo de restabelecer uma população viável e selvagem (BECK et al., 1994; IUCN/SSC, 2013). Nesse processo os organismos podem vir da natureza ou de cativeiro (IUCN/SSC, 2013).

Atualmente, dentre as iniciativas de reintrodução em andamento no Brasil está o Refauna, que procura realizar reintroduções de fauna da Mata Atlântica. Esse bioma sofreu intensa degradação ao longo dos anos e restou somente 13% da vegetação nativa (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA E INPE, 2021; MARQUES; GRELE, 2021). Além disso, a Mata Atlântica é considerada uma das florestas tropicais com mais altos níveis de defaunação de mamíferos (REZENDE et al., 2018; RIBEIRO et al., 2009). Com isso, o presente estudo tem foco na reintrodução da anta *T. terrestris* na Mata Atlântica do Rio de Janeiro realizada pelo Refauna. Esse projeto teve início em 2017, na Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) localizada no município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro. Até o momento, foram reintroduzidas 19 antas, de nove criadouros diferentes. Nesse período, ocorreu o nascimento de seis filhotes e o óbito de sete antas.

Estrutura da Dissertação

Este estudo é composto por dois capítulos que abordam assuntos que buscam contribuir para a reintrodução da anta *Tapirus terrestris*.

O primeiro capítulo teve como propósito conduzir análises genéticas para orientar o manejo das antas reintroduzidas na REGUA, bem como direcionar futuras reintroduções com base em DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA permite a discriminação de linhagens divergidas recentemente, o que o torna uma ferramenta conveniente para reconstruir a história recente de populações e espécies. Ao estudar as relações genéticas dentro de uma espécie em conjunto com mapas, é possível entender a distribuição geográfica das linhagens e inferir processos evolutivos. Assim, pode-se encontrar grupos genéticos diferentes que ocupam áreas separadas ou que coexistem na mesma região. O presente estudo ajuda a ampliar a compreensão da filogeografia da anta, com a inclusão de novas amostras que foram reanalisadas em conjunto com dados gerados em pesquisas anteriores. Os resultados têm aplicação direta na conservação e manejo da espécie.

Já o segundo capítulo aborda o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores para o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II da anta *T. terrestris*. Estudos genéticos de animais selvagens costumam utilizar marcadores como o mtDNA, microssatélites ou polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) para compreender a filogenia, história populacional, fluxo gênico e parentesco. Embora esses marcadores ofereçam informações altamente relevantes, não fornecem detalhes sobre processos seletivos ou mudanças adaptativas. Em contrapartida, a diversidade do MHC fornece dados

valiosos sobre evolução e adaptação, o que pode contribuir para pesquisas em ecologia evolutiva e conservação, e para decisões práticas de manejo.

Assim, este estudo visa unir a perspectiva da genética com os esforços de conservação da anta. Integrar a visão da genética nesse contexto permite direcionar ações mais eficazes e direcionadas para garantir a conservação desses animais, considerando sua variabilidade genética, distribuição geográfica e outras informações genéticas relevantes para a conservação.

Capítulo 1

Filogeografia de Antas *Tapirus terrestris* e a Procedência dos Indivíduos de Cativeiro

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, a pesquisa em genética da conservação tem apresentado um crescimento gradual, concentrando-se principalmente em peixes, mamíferos e aves, especialmente em países do norte global (TKACH; WATSON, 2023). A maioria desses estudos recomendam o emprego das ferramentas genéticas para o manejo de espécies (MCLENNAN et al., 2020; MUELLER et al., 2022; TKACH; WATSON, 2023). Dentro desse contexto, os projetos de reintrodução surgem como uma das áreas de pesquisa mais destacadas, onde a aplicação da genética da conservação é fortemente recomendada, visando garantir o sucesso e a viabilidade desses programas (MOWRY et al., 2015; MUELLER et al., 2022; TKACH; WATSON, 2023).

As reintroduções podem utilizar animais de cativeiro ou provenientes de populações selvagens existentes (MCLENNAN et al., 2020; MUELLER et al., 2022). Idealmente, os indivíduos reintroduzidos não só devem sobreviver e produzir descendentes viáveis, mas a nova população também deve ter estabilidade demográfica e diversidade genética suficientes para ser autossustentável (ARMSTRONG; SEDDON, 2008). No entanto, durante projetos de reintrodução, o número restrito de fundadores pode resultar em um estrangulamento genético (MCLENNAN et al., 2020; MUELLER et al., 2022). Dessa forma, as reintroduções apresentam uma série de riscos que devem ser contrabalanceados com os possíveis benefícios trazidos em longo prazo (IUCN/SSC, 2013).

A aptidão – que inclui aspectos do comportamento, habilidades de natação, respostas ao estresse, crescimento, cuidado parental, morfologia e idade de maturidade – impacta diretamente a capacidade de adaptação e sobrevivência dos organismos (FRASER, 2008). Entretanto, o ambiente em cativeiro pode levar a

alterações na habilidade de sobrevivência nos habitats naturais (FRASER, 2008). Ao longo do tempo, os animais em cativeiro geralmente perdem diversidade genética, destacando a importância de preservar essa variabilidade para possíveis adaptações futuras (KRAAIJEVELD-SMIT et al., 2006). A seleção cuidadosa de indivíduos fundadores que sejam geneticamente representativos da espécie é crucial para preservar o potencial adaptativo da nova população (JAMIESON; LACY, 2012). A consideração dos aspectos evolutivos no planejamento da reintrodução permite ponderar sobre a diversidade que se deseja restaurar (THÉVENIN et al., 2018). Isso reforça a meta das translocações de conservação de restabelecer as trajetórias evolutivas das espécies-alvo e seus ambientes naturais (THÉVENIN et al., 2018).

Através de dados genéticos é possível fazer recomendações específicas de melhoramento para maximizar a retenção da diversidade genética (DA SILVA et al., 2010) e assim, avaliar a necessidade de novas solturas, e a identificação de indivíduos apropriados para a finalidade de restaurar a diversidade genética da população. Dessa forma, o monitoramento genético pode ajudar na tomada de decisões para alcançar a sustentabilidade de populações reintroduzidas a longo-prazo. É essencial que os indivíduos reintroduzidos representem a linhagem genética da região e mantenham variabilidade genética suficiente para garantir a aptidão e aumentar as chances de estabelecer uma população autossustentável (DA SILVA et al., 2010; KRAAIJEVELD-SMIT et al., 2006).

A escassez de dados genéticos de *T. terrestris* é notável, com informações limitadas tanto para DNA mitocondrial (mtDNA) quanto para DNA nuclear (nDNA). Dois estudos feitos com o gene mitocondrial Citocromo b encontraram linhagens evolutivas distintas para a espécie (DE THOISY et al., 2010; RUIZ-GARCÍA et al., 2015). Essas linhagens evolutivas foram detectadas na Amazônia, e somente uma

delas se estende do sul da Amazônia até o norte da Argentina (Figura 2; DE THOISY et al., 2010; RUIZ-GARCÍA et al., 2015).

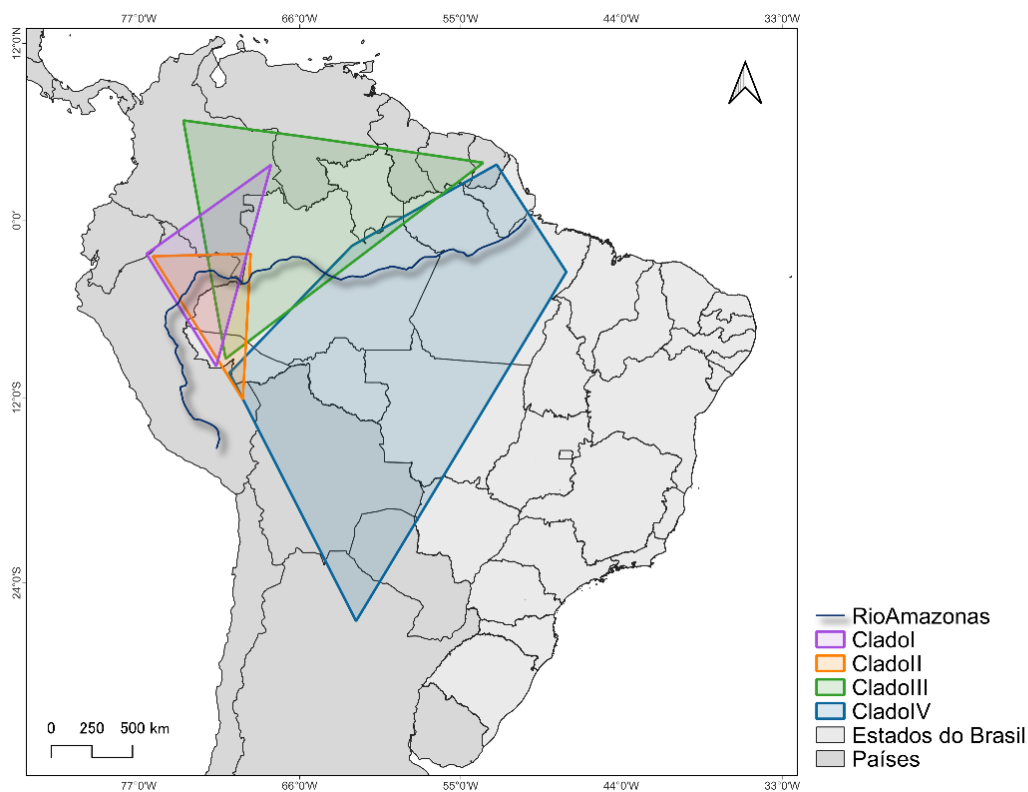


Figura 2. Mapa das linhagens evolutivas da anta brasileira *T. terrestris*, baseado em dados de DE THOISY et al. (2010). Destaque ao Rio Amazonas (linha azul).

1.1. *Objetivos*

1.1.1. *Objetivo Geral*

Realizar análises genéticas para o subsídio de decisões de manejo da população de antas brasileiras *Tapirus terrestris* reintroduzidas na Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), Rio de Janeiro, e orientar futuras reintroduções.

1.1.2. *Objetivos Específicos*

- Determinar a variabilidade genética mitocondrial dos indivíduos de anta mantidos em cativeiro e da população de anta estabelecida na REGUA;
- Comparar os níveis de diversidade genética entre o grupo reintroduzido e as populações naturais;
- Orientar a escolha dos indivíduos mais apropriados, sob o ponto de vista genético, para futuras reintroduções;
- Auxiliar o programa de reprodução *ex-situ* da espécie nos plantéis de zoológicos/criadouros e da construção/validação de pedigrees.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

As amostras analisadas foram coletadas de antas brasileiras provenientes dos cativeiros parceiros do Refauna (Tabela 1). Dentre os indivíduos amostrados, 19 antas foram reintroduzidas, originárias de nove cativeiros diferentes (criadouros e zoológicos) localizados nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. A maioria desses animais nasceram em cativeiro, descendentes de antas com procedência presumida do Cerrado ou Mata Atlântica. Antes da soltura das antas na REGUA, amostras de biópsia foram coletadas, a partir de uma pequena incisão para extração de um fragmento da orelha, pelo Laboratório de Ecologia e Manejo de Animais Silvestres (LEMAS) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rio de Janeiro (IFRJ). Como nos zoológicos a política de bem-estar animal recomenda não realizar biópsias, foram coletadas amostras de sangue em tubo com EDTA para esses animais. As amostras de biópsia foram depositadas em criotubo estéril de 2 ml contendo etanol absoluto e armazenadas em freezer a -20°C , junto com as amostras de sangue.

Como o mtDNA é de herança matrilinear, foi selecionado um indivíduo representativo de cada linhagem materna para as análises. Para isso foram utilizadas informações de parentesco divulgadas pelos próprios cativeiros que cederam as amostras de anta.

Além disso também foram obtidas 97 sequências de antas de vida livre de estudos anteriores. No GenBank foram obtidas 45 sequências do artigo do De Thoisy et al.(2010). Outras 52 sequências, de RUIZ-GARCÍA et al. (2015), foram obtidas do próprio autor.

Tabela 1. Lista de amostras de anta *Tapirus terrestris* obtidas para o presente estudo.

Nome Zoo	Local de Origem		Número de Indivíduos			
	UF	Cidade	F	M	Total	Reintroduzidos
Fazenda Trijunção	BA	Jaborandi	2	1	3	3
Zoológico de Salvador	BA	Salvador	1	0	1	0
Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM)	MG	Araxá	1	1	2	2
Parque Estadual de Dois Irmãos	PE	Recife	0	2	2	0
Refúgio Biológico Bela Vista (RBV)	PR	Foz do Iguaçu	4	6	10	0
Parque Ecológico Klabin	PR	Telêmaco Borba	1	4	5	3
BioParque do Rio	RJ	Rio de Janeiro	1	3	4	2
Zoológico de Guarulhos	SP	Guarulhos	1	0	1	1
Zoológico de Ilha Solteira	SP	Ilha Solteira	1	1	2	2
Parque Ecológico de São Carlos	SP	São Carlos	0	1	1	1
Zoobotânico de S. J. do Rio Preto	SP	São José do Rio Preto	5	3	8	2
Zoológico de Sorocaba	SP	Sorocaba	3	5	8	3
Total			20	27	47	19

2.2. Extração e amplificação de DNA

O DNA das amostras obtidas foi extraído usando o protocolo de Fenol/Clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Essa metodologia foi usada independentemente do tipo de tecido amostrado (biópsia ou sangue)

Para inferência da linhagem evolutiva, a partir de análises filogenéticas e genealógicas, após a extração do DNA foi feita a amplificação do gene mitocondrial Citocromo b, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polimerase chain reaction*, PCR). Para isso foram usados os iniciadores senso H7 (5' – ACCAATGACATGAAAAATCATCGTT – 3') e anti-senso H6 (5' – TCTCCATTTCTGGTTTACAAGAC – 3') desenvolvidos para perissodáctilos

(TOUGARD et al., 2001). Esses iniciadores já foram utilizados em estudos anteriores sobre anta brasileira (DE THOISY et al., 2010; RUIZ-GARCÍA et al., 2015)

As reações de PCR foram feitas em microtubos de 0,2 mL devidamente identificados. Foi preparado um mix dos reagentes, para facilitar a distribuição dos componentes entre cada microtubo. O volume do mix preparado foi de acordo com o número de amostras feitas em cada bateria de amplificação que continha água milli-Q, tampão de enzima (Promega) 1x, 200 μ M de cada dNTP, 2,5 mM de $MgCl_2$, 1 U/amostra de Taq polimerase (GoTaq® Promega) e 10 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador. Para cada amostra, 1 μ L DNA extraído foi misturado a 14 μ L do mix. A amplificação foi realizada em um termociclador de 96 poços (Veriti – Applied Biosystems). Em todas as baterias de amplificação foi incluído um controle negativo, com água milli-Q no lugar do DNA.

As condições térmicas da reação de amplificação foram: uma etapa inicial de 3 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 92°C para a desnaturação, 1 minuto a 50°C para o anelamento dos iniciadores ao DNA e 1 minuto a 72°C para a extensão da sequência, com uma etapa final de 5 minutos a 72°C para a extensão final.

2.3. Eletroforese

Após a amplificação, os produtos da reação de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose com concentração de 1,5% (m/v), em tampão TBE (Tris borato EDTA – 0,5x). O gel foi corado com brometo de etídeo. O resultado foi observado com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta. As bandas de DNA amplificadas de cada amostra foram comparadas com um padrão de peso molecular

para checar se o tamanho do fragmento amplificado estava de acordo com o esperado (1140 pb). Foi verificada, também, a ausência de contaminação do controle negativo.

2.4. Purificação e Sequenciamento

A purificação foi feita em tubo 1,5 ml usando beads magnéticas em uma proporção de 1:1 com o volume final do produto da PCR. Foram feitas duas lavagens com 80 µL de etanol absoluto. Após a lavagem, o DNA foi resuspendido em 15 µL de água milli-Q. Os produtos purificados foram armazenados em um freezer a -20°C até que fossem sequenciados.

A reação de sequenciamento foi feita em ambas as direções (senso e anti-senso) com os mesmos oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de anelamento usados na reação de amplificação, utilizando o reagente BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. O sequenciamento foi realizado em um Sequenciador Automático SeqStudio™ (AppliedBiosystems – ThermoFisher).

2.5. Edição e Alinhamento das Sequências

As sequências foram editadas no programa GeneStudio versão 2.2.0.0 (GeneStudio, Inc.), no qual foi avaliada a qualidade do sequenciamento através da visualização do eletroferograma de cada uma das sequências (senso e anti-senso) e, após isso, foi montada a sequência consenso. Todas as sequências obtidas e geradas foram agrupadas em um único arquivo em formato fasta e alinhadas no programa MEGA (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021). Duas sequências, uma com 762 pb e outra com 740 pb foram retiradas das análises.

2.6. Análises das Sequências

Os haplótipos das sequências de Citocromo b foram definidos no programa DnaSP (ROZAS et al., 2017), assim como a diversidade haplotípica e nucleotídica foram estimadas. Uma rede de haplótipos *median joining* foi construída no programa PopArt (LEIGH; BRYANT, 2015), levando em consideração o número de indivíduos por localização.

Para a construção da árvore filogenética com as sequências de Citocromo b, o melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi escolhido através do programa Jmodeltest (POSADA, 2008) seguindo o Critério de Informação de Akaike (AIC). O melhor modelo para este conjunto de dados foi o HKY + I + G. Uma árvore filogenética Bayesiana foi construída no programa BEAST (DRUMMOND et al., 2012), utilizando o modelo de substituição escolhido no Jmodeltest, relógio molecular relaxado não correlacionado e “*Coalescent: Constant Size*” como *tree prior*. O comprimento da cadeia MCMC (método de Monte Carlo via Cadeias de Markov) foi de 40.000.000 com amostragem sendo feita a cada 4.000 etapas.

Ambas as corridas foram verificadas no programa Tracer e as primeiras 4.000.000 (10%) de cadeias foram descartadas em *burn-in*. Os valores de *Effective Sampling Size* (ESS) foram superiores a 200 para quase todos os parâmetros. As árvores de máxima credibilidade de Clados foram montadas no programa TreeAnnotator e visualizadas e editadas no programa FigTree.

3. RESULTADOS

3.1. *Diversidade genética*

Foram obtidas 47 amostras, todas de antas vindas de cativeiro (Tabela 1), com maior representatividade das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Do total de amostras, 20 vieram de criadouros em São Paulo, SP; 15 do Paraná, PR; quatro do Rio de Janeiro, RJ; quatro da Bahia, BA; duas de Minas Gerais, MG; e duas de Pernambuco, PE. A maioria desses animais é nascida em cativeiro, mas três eram de vida livre (indivíduos Aurora, Frederico e Manga) antes de irem para cativeiro por questões de saúde. Dentre as antas amostradas, 19 foram reintroduzidas na REGUA.

Dentre os 47 indivíduos amostrados, as informações de pedigree indicaram que havia um total de 30 linhagens mitocondriais. Com isso, 30 amostras, cada uma representando uma linhagem matrilinear, foram amplificadas. O sequenciamento foi bem-sucedido para 29 das amostras. Durante o processo de alinhamento das sequências de DNA, foi feito um corte de 1039 pb junto com as sequências de DE THOISY et al. (2010) e RUIZ-GARCÍA et al. (2015). Duas das 29 sequências, por terem menos de 800 pb, foram retiradas das análises. Das 27 sequências analisadas, 12 pertencem a animais reintroduzidos. Ao final, 124 sequências foram analisadas.

No conjunto total de 124 sequências, foram detectados 82 haplótipos. A diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) encontrada foi de 0,983 e 0,011, respectivamente. As amostras analisadas neste estudo pertencem a 11 haplótipos (Tabela 2), dos quais nove são inéditos (H2, H3, H4, H5, H6, H8, H9, H10 e H11). A diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) encontrada para as 42 antas de cativeiro amostradas neste trabalho foi de 0,732 e 0,002. Além disso, as antas que foram reintroduzidas pertencem a seis haplótipos (H1, H3, H4, H5, H10 e H11). A

diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) encontrada para as 15 antas reintroduzidas amostradas foi de 0,743 e 0,002 (Tabela 2).

Doze antas de cativeiro compartilharam o haplótipo H1, e outras doze apresentaram haplótipos geneticamente próximos ao H1, com frequências menores. Três antas apresentaram haplótipos mais divergentes em relação a estes (H7, H8 e H10).

3.2. Linhagens Evolutivas

A análise das 124 amostras reconstituíram os quatro Clados evolutivos descritos por DE THOISY et al. (2010) e não os seis Clados como demonstrado por RUIZ-GARCÍA et al. (2015) (Figura 2). Esses Clados (I a IV) apresentaram valores de probabilidade posterior de 0,97; 0,79; 1,0 e 1,0. Os haplótipos das antas de cativeiro constituem, majoritariamente, o Clado IV de DE THOISY et al. (2010) (Tabela 3).

Os animais que agruparam em outros Clados foram: Antonello, de Foz do Iguaçu (PR); Anta 21002, de Recife (PE); e Adão, de Araxá (MG). Essas antas se agruparam, respectivamente, com os Clados III, II e I de DE THOISY et al. (2010) (Figura 2 e 3). Na árvore filogenética, *T. pinchaque* se agrupou com o Clado II de DE THOISY et al. (2010) (Figura 2).

Embora parte das sequências de RUIZ-GARCÍA et al. (2015), não disponíveis no GenBank, tenham sido recebidas do autor, as informações foram insuficientes para comparar com o resultado encontrado pelos autores.

Na rede de haplótipos também é possível distinguir os quatro Clados de DE THOISY et al. (2010). No Clado IV encontra-se a maioria dos haplótipos presentes nas antas de cativeiro analisadas, sendo que o mais frequente, H1, já havia sido

observado em uma anta da Argentina. Sete dos nove haplótipos inéditos também se agrupam no Clado IV e diferem do H1 por no máximo três mutações.

Três antas apresentaram haplótipos dos Clados I, II e III. Adão (MG) possui um haplótipo novo que se agrupa com os haplótipos do Clado I, e a Anta21002 (PE) também tem um haplótipo novo, mas relacionado aos do Clado II. Já Antonello (PR) compartilhou um haplótipo com antas do Peru e fronteira Colômbia/Brasil (Figura 3 e 4).

Tabela 2. Diversidade genética das antas brasileiras *T. terrestris*. Hd = diversidade haplotídica. π = diversidade nucleotídica.

Grupo	Nº Sequências	Nº Haplótipos	Hd	π
Total	124	82	0,983	0,011
Clado I	33	26	0,981	0,009
Clado II	11	9	0,945	0,008
Clado III	22	14	0,935	0,005
Clado IV	58	33	0,940	0,005
Cativeiro	42	11	0,732	0,002
Reintroduzido	16	6	0,742	0,002

Tabela 3. Resultados das análises de Citocromo b das 27 sequências de anta *T. terrestris* analisadas no presente estudo.

Nome Zoo	Local de Origem		Nº Antas	Haplótipo	Clado
	UF	Cidade			
Fazenda Trijunção	BA	Jaborandi	2	H1	IV
Zoológico de Salvador	BA	Salvador	1	H2	IV
Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM)	MG	Araxá	2	H3 e H10	I e IV
Parque Estadual de Dois Irmãos	PE	Recife	1	H8	II
Refúgio Biológico Bela Vista (RBV)	PR	Foz do Iguaçu	5	H1, H6, H7 e H9	III e IV
Parque Ecológico Klabin	PR	Telêmaco Borba	3	H3 e H5	IV
BioParque do Rio	RJ	Rio de Janeiro	1	H2	IV
Zoológico de Ilha Solteira	SP	Ilha Solteira	2	H1	IV
Parque Ecológico de São Carlos	SP	São Carlos	1	H11	IV
Zoobotânico de S. J. do Rio Preto	SP	São José do Rio Preto	4	H1	IV
Zoológico de Sorocaba	SP	Sorocaba	5	H1, H4 e H5	IV

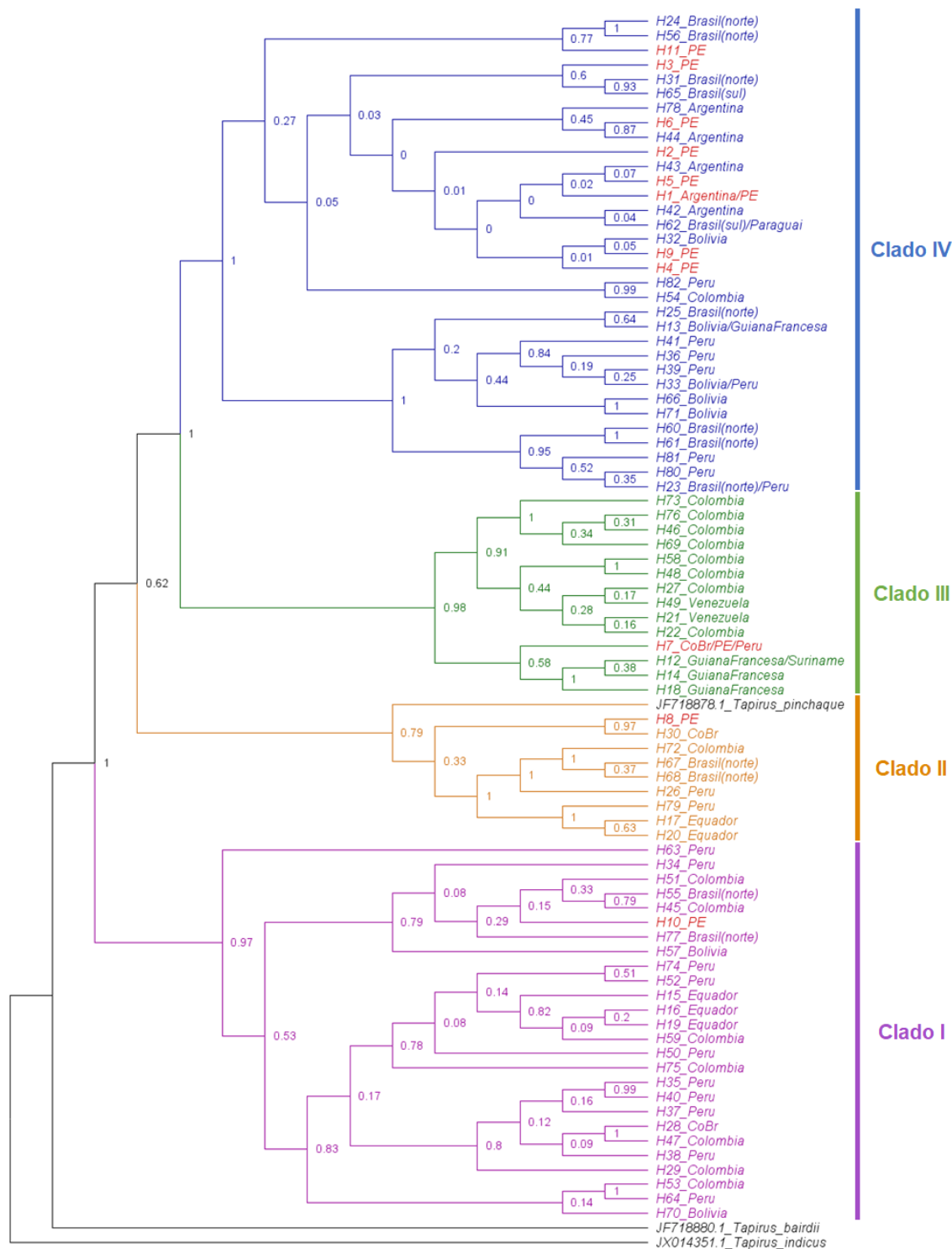


Figura 3. Árvore filogenética bayesiana de haplótipos de Citocromo b (1039pb, HKY+I+G, N=124). Os valores nos nós indicam a probabilidade posterior. Vermelho: amostras do presente estudo. Roxo: Clado I. Laranja: Clado II. Verde: Clado III. Azul: Clado IV. PE: presente estudo. CoBr: fronteira Colômbia-Brasil.

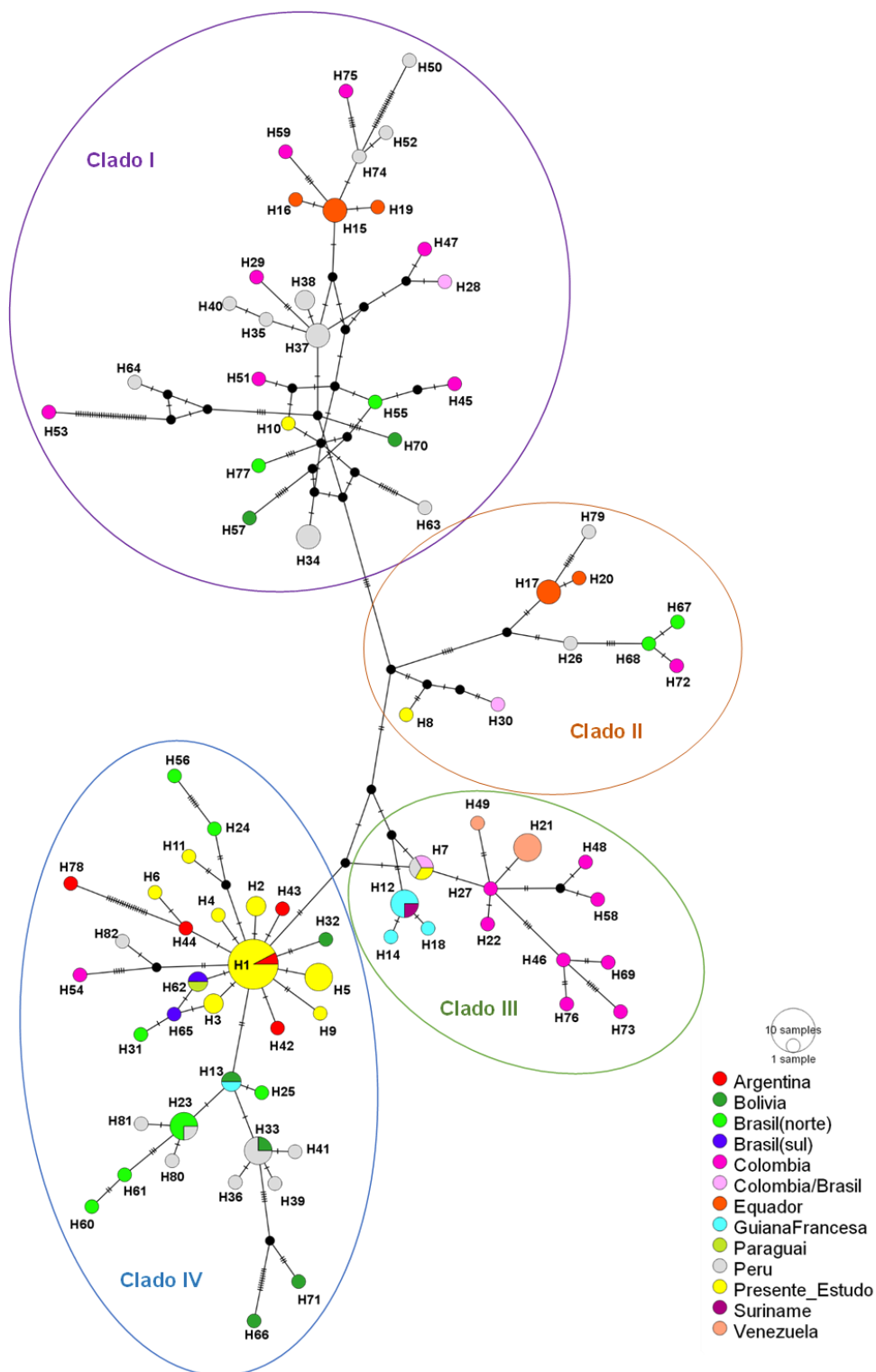


Figura 4. Rede de haplótipos (*Median-Joining*) do Citocromo b (1039pb, N=124). O tamanho do círculo é proporcional ao número de indivíduos de um determinado haplótipo, e a cor indica localidade de coleta. Cada haplótipo se diferencia dos outros por no mínimo uma substituição nucleotídica, e traços nas linhas que os ligam indicam substituições adicionais.

4. DISCUSSÃO

4.1 *Evolução das linhagens mitocondriais em T. terrestris*

O presente estudo ajuda a ampliar a compreensão da filogeografia da anta brasileira, com a inclusão de novas amostras, incluindo as primeiras provenientes da Mata Atlântica, e reanalisando conjuntos de dados de pesquisas anteriores. O mtDNA, de modo geral, sofre mutação a uma taxa mais rápida do que o DNA nuclear, apresentando alta variabilidade em sua sequência de nucleotídeos (LYNCH; KOSKELLA; SCHAACK, 2006). Além disso, o tamanho populacional efetivo no mtDNA é $\frac{1}{4}$ daquele nos marcadores nucleares, acelerando o processo de separação das linhagens (AVISE, 1994). Com isso, o genoma mitocondrial é frequentemente utilizado em estudos populacionais já que permite a discriminação de linhagens divergidas recentemente (BROWN; GEORGE; WILSON, 1979; HARRISON, 1989; PEREIRA, 2000). O mtDNA se torna portanto uma ferramenta conveniente para reconstruir a história recente de populações e espécies (MORITZ et al., 2000).

Os dados sobre as variações do mtDNA dentro de uma espécie podem ser analisados de duas maneiras: (a) observando como as moléculas de mtDNA estão relacionadas geneticamente entre si e (b) estudando onde esses grupos genéticos estão espalhados geograficamente (AVISE et al., 1987). Esses dois aspectos juntos, constituem a disciplina de filogeografia intraespecífica, que tem, como objetivo, entender como as variações genéticas e a distribuição geográfica estão conectadas dentro de uma mesma espécie (AVISE et al., 1987). Ao estudar as relações genéticas dentro de uma espécie em conjunto com mapas, é possível entender a distribuição geográfica das linhagens e inferir processos evolutivos. Através dessas análises pode-se encontrar grupos genéticos diferentes que ocupam áreas separadas ou que

coexistem na mesma região (AVISE et al., 1987).

Em um estudo precursor de 2010 (N = 45), foram identificados 35 haplótipos, distribuídos em quatro Clados evolutivos (DE THOISY et al., 2010). No presente estudo (N = 124), foram encontrados 82 haplótipos, mantendo os mesmos quatro Clados evolutivos previamente estabelecidos por DE THOISY et al. (2010). Em outra pesquisa, realizada em 2015 (N = 141), foram identificados 80 haplótipos, evidenciando um total de seis Clados evolutivos (RUIZ-GARCÍA et al., 2015). Destes, quatro Clados coincidem com os identificados por DE THOISY et al. (2010), enquanto os dois restantes representariam novos Clados da Amazônia (RUIZ-GARCÍA et al., 2015) que não foram recuperados em nossa análise. Segundo RUIZ-GARCÍA et al. (2015), um desses Clados é composto por duas sequências indentificadas como *T. kabomani* por COZZUOL et al. (2013), cujas sequências estavam no grupo de sequências não disponíveis no GenBank e não enviadas pelo autor.

Os quatro Clados evolutivos encontrados no presente estudo e nos dois anteriores estão geograficamente distribuídos na Amazônia ocidental (Clado I e II), no norte da Amazônia (Clado III) e do sul da Amazônia até o norte da Argentina (Clado IV). Nos estudos anteriores, análises de estruturação populacional falharam em encontrar uma estruturação com base na localização geográfica (DE THOISY et al., 2010; RUIZ-GARCÍA et al., 2015). Os resultados mostraram uma alta sobreposição geográfica desses Clados, principalmente na região da Amazônia ocidental (DE THOISY et al., 2010; RUIZ-GARCÍA et al., 2015). Em outras palavras, nessa região parece haver um contato secundário de duas linhagens mitocondriais que haviam divergido.

Em relação aos biomas fora da Amazônia, praticamente não havia informação sobre linhagens mitocondriais. As poucas antas de vida livre sequenciadas fora da

Amazônia eram do Chaco da Argentina, Paraguai e região de Pastizal da Bolívia. RUIZ-GARCIA et al. (2015) analisaram seis antas que segundo o artigo teriam sido coletadas no Rio Grande do Sul, mas não está claro em qual bioma foram coletadas. Essas sequências não estão entre as enviadas pelo autor, mas entre elas há duas sequências codificadas como “Mato Grosso do Sul”, sem indicação também do bioma. Portanto, no presente trabalho foram incluídas pela primeira vez sequências confirmadamente da Mata Atlântica, geradas a partir de antas resgatadas na Mata Atlântica de São Paulo, que agruparam no Clado IV. Com isso, foi confirmado que a extensão geográfica do Clado IV alcança esse bioma.

Adicionalmente, apesar de ter sido feita uma seleção para sequenciamento de antas não aparentadas por linhagem materna, o cálculo da diversidade foi feito considerando inclusive os indivíduos não-sequenciados, mas de haplótipo conhecido, para evitar uma inflação artificial dos índices. A diversidade na REGUA foi próxima da existente no Clado IV e retida nos cativeiros. Novos haplótipos foram encontrados para esse Clado. Dessa forma, o presente estudo contribuiu para aumentar a representatividade genética das antas da Mata Atlântica nas análises e assim dar mais confiança à separação dos Clados evolutivos na espécie.

4.2. Caracterização genética das antas de cativeiro no Brasil

Conforme mencionado, nos estudos anteriores a amostragem de antas de vida livre dos biomas fora da Amazônia foi muito baixa, incluindo poucas amostras da Argentina, Paraguai, Bolívia e uma área não especificada no Rio Grande do Sul ou Mato Grosso do Sul. As três antas de vida livre analisadas neste estudo (Aurora, Frederico e Manga), que foram resgatadas em áreas de Mata Atlântica do estado de

São Paulo, apresentaram o haplótipo H1, que pertence ao Clado IV. Portanto, informações inéditas obtidas no presente estudo mostraram que antas da Mata Atlântica pertencem ao Clado IV.

Como as informações dos cativeiros indicavam que a procedência dos indivíduos ou seus genitores era Cerrado ou Mata Atlântica, o esperado era que todas as antas nascidas em cativeiro amostradas no presente estudo também se agrupassem ao Clado IV. No entanto, três antas de locais diferentes se agruparam em outros Clados. Essas antas vieram de cativeiros do Recife (PE), Araxá (MG) e Foz do Iguaçu (PR), dos quais os dois últimos são potenciais parceiros para o Refauna no projeto de reintrodução de antas. Contudo, como dito anteriormente e comprovado neste estudo, os cativeiros carecem de informações precisas sobre a origem de seus respectivos animais.

Dentre esses três animais, o Adão (H10, Clado I), de Araxá, MG, foi transportado para a REGUA para ser reintroduzido. Porém, durante o período de aclimatação, ele adoeceu de pneumonia, o que o levou a óbito antes de ser solto na natureza. O histórico dele revela que sua mãe foi resgatada de vida livre em uma fazenda na região de Araxá, enquanto seu pai nasceu no criadouro da CBMM. Como os dados genéticos mostraram, sua linhagem materna não era nativa da região, e pode ter sido resgatada na natureza após ter sido liberada ou ter fugido de outro cativeiro. Durante seu período na REGUA, Adão não deixou descendentes.

Já o Antonello (H7, Clado III), de Foz do Iguaçu, PR, vive em um cativeiro que possui um plantel de dez antas. Como esse criadouro é um potencial parceiro para a reintrodução de antas pelo Refauna, se torna importante obter conhecimento genético sobre os animais candidatos a serem soltos na floresta do Rio de Janeiro. O resultado obtido aponta que nove das dez antas desse plantel se agruparam com o Clado IV e

o Antonello foi o único diferente. Com base nisso, o aconselhado para a reintrodução é escolher entre esses nove animais que se agruparam no Clado IV.

Em relação à Anta 21002 (H8, Clado II), de Recife, PE, não existem muitas informações sobre sua procedência. A mãe é oriunda do mesmo cativeiro, enquanto não há registros disponíveis referentes ao pai.

Até o momento, portanto, não houve reintrodução de animais que não pertencem à linhagem evolutiva da Mata Atlântica no Rio de Janeiro. Além disso, a caracterização das linhagens mitocondriais possibilitou identificar, nos plantéis, as candidatas para novas reintroduções nesse bioma. No entanto, a escassez de dados genéticos de *T. terrestris* ainda é notável, com informações limitadas tanto para mtDNA, quanto para DNA nuclear (nDNA). A carência de amostras fora da Amazônia é evidente em todos os três estudos, pois somente foram analisadas três antas da Mata Atlântica (presente estudo), seis do Rio Grande do Sul ou Mato Grosso do Sul (bioma não especificado), cinco antas do Chaco (Argentina e Paraguai) e duas do Pastizal boliviano. Assim, os outros biomas brasileiros carecem de representatividade (Figura 5).

Além disso, é preciso considerar a existência de diferenciação no DNA nuclear entre as antas de vida livre no Brasil. Em um estudo recente, ainda não publicado, que utilizou microssatélites e amostras de todos os biomas brasileiros dentro da distribuição da espécie, foi possível identificar três unidades evolutivas presentes na Amazônia, Mata Atlântica e no Pantanal, respectivamente (PINHO, GM; com. pess.). Nesse cenário, o Cerrado aparece como uma área de transição entre as duas últimas (PINHO, GM; com. pess.). Há, portanto, evidência de uma diferenciação genética entre as antas no Brasil, mas ainda não se sabe como esse resultado se confronta com o mtDNA, nem o grau de separação destas populações.

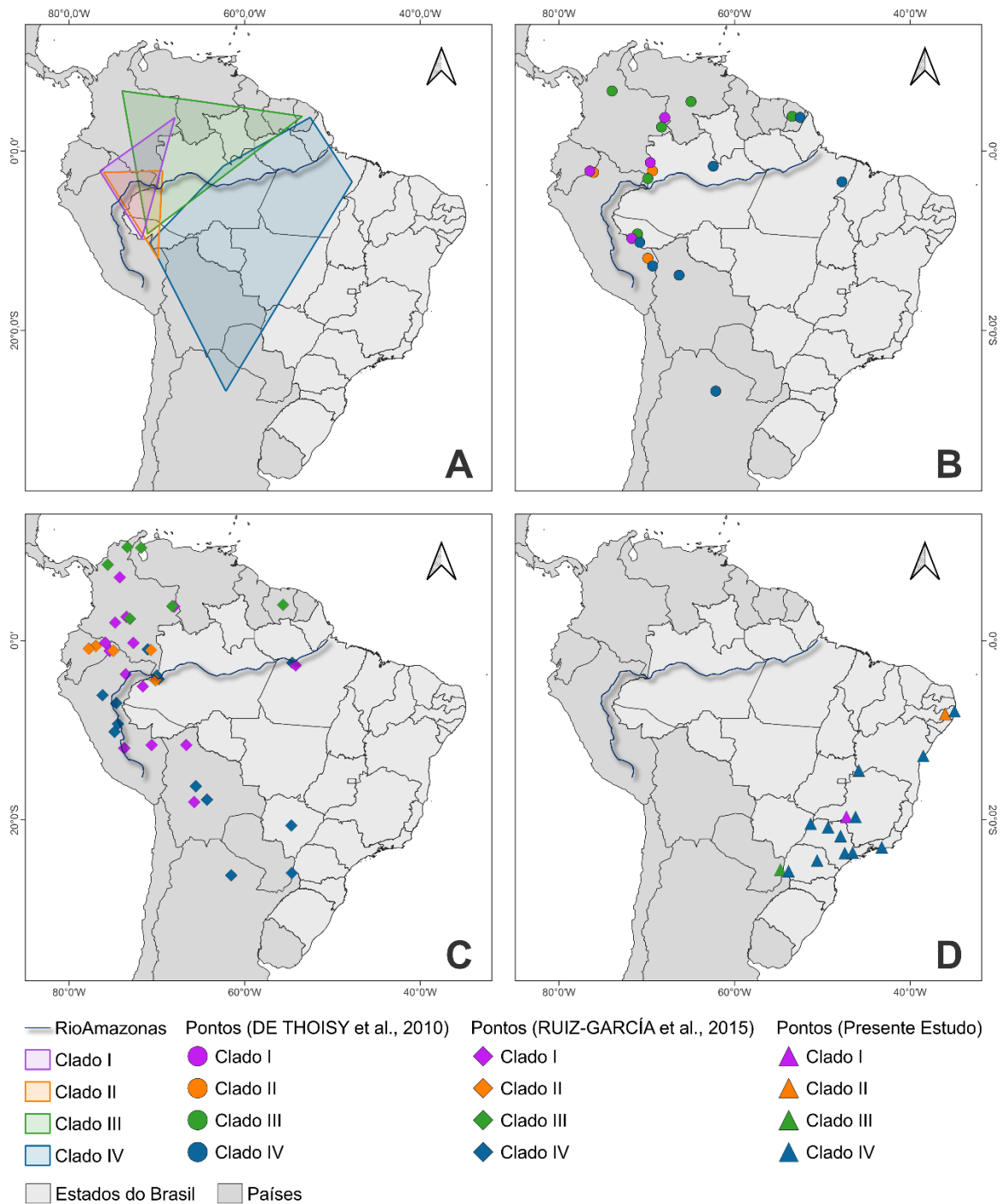


Figura 5. Mapa de ocorrência dos quatro Clados evolutivos de anta *T. terrestris*. Área da distribuição geográfica dos Clados evolutivos da anta brasileira (A). Esse mapa foi feito através da técnica de Mínimo Polígono Convexo (MPC) pelo programa QGIS. Para fazer os polígonos foram usados os pontos de amostragem de DE THOISY et al. (2010) (B). Pontos de amostragem de RUIZ-GARCÍA et al. (2015) (C). Pontos de amostragem do presente estudo (D).

A comparação da diversidade genética entre as antas de cativeiro e as reintroduzidas foi bastante similar. Esperava-se encontrar uma diversidade genética parecida, já que foram usadas antas desses cativeiros para formar a população reintroduzida. Dessa forma, a decisão de reintroduzir antas de diferentes cativeiros contribuiu para uma maior diversidade genética. Contudo, em comparação com o Clado IV inteiro nota-se que as antas de cativeiro têm uma diversidade genética menor, o que também era esperado, pois o Clado VI tem ampla distribuição e provavelmente é formado por mais de uma população. Infelizmente, não existem dados mitocondriais para uma população de anta de vida livre, que serviria como comparação adequada para essas análises. A ausência desses dados pode limitar a compreensão da variação genética ideal a ser alcançada entre as antas de cativeiro e vida livre.

4.3. Status taxonômico de *T. pinchaque*

A associação de *T. pinchaque* a Clados de *T. terrestris*, observada no presente estudo (Figura 2), já foi previamente documentada em pesquisas anteriores (COZZUOL et al., 2013; DE THOISY et al., 2010; VOSS; HELGEN; JANSÁ, 2014). Tal resultado enfraquece a hipótese de validade da anta da montanha, apesar do seu reconhecimento tradicional com base na morfologia (VOSS; HELGEN; JANSÁ, 2014). Para tentar explicar o ocorrido foram especuladas duas hipóteses: *T. pinchaque* é um ecótipo de *T. terrestris*; ou *T. pinchaque* é uma espécie válida abrigando mitocôndrias de *T. terrestris* introgrididas em eventos de hibridização relativamente recentes (DE THOISY et al., 2010; VOSS; HELGEN; JANSÁ, 2014).

Como as diferenças genéticas entre *T. terrestris* e *T. pinchaque* são muito pequenas, isso faria com que *T. pinchaque* se agrupe com *T. terrestris* (RUIZ-GARCÍA

et al., 2015). Apesar disso, outro estudo foi capaz de encontrar monofiletismo recíproco entre *T. terrestris* e *T. pinchaque* (RUIZ-GARCÍA et al., 2015). Segundo RUIZ-GARCIA et al. (2015), isso foi possível ao aumentar o tamanho amostral de *T. pinchaque* nas análises. Contudo, é importante destacar a disponibilidade limitada de sequências genéticas no GenBank referentes à *T. pinchaque*. Mesmo ao incorporar as poucas sequências disponíveis, os resultados continuam a demonstrar a associação de *T. pinchaque* a um Clado de *T. terrestris*. Por isso, não foi possível testar o viés amostral no presente estudo.

4.4. Demografia molecular

A ausência de barreiras geográficas claras na Amazônia ocidental prejudica a explicação da diversificação observada nessa região. Uma teoria alternativa sugere que o gradiente altitudinal dos Andes e os ciclos glaciais do Pleistoceno podem ter levado à divergência parapátrica entre as linhagens de antas (BUSH, 1994; DE THOISY et al., 2010). As mudanças climáticas podem ter causado extinções em certas áreas, deixando apenas refúgios ideais para a sobrevivência das espécies (BUSH, 1994). Isso poderia levar a uma especiação alopátrica, fragmentando as populações durante as glaciações do Quaternário (BUSH, 1994).

Análises das linhagens mitocondriais de *T. terrestris* mostraram grande heterogeneidade genética e indicaram eventos passados de fragmentação e isolamento, seguidos por dispersão, expansão e mistura em áreas simpátricas (RUIZ-GARCÍA et al., 2015). Este fenômeno pode explicar a presença de várias linhagens mitocondriais na mesma área geográfica (RUIZ-GARCÍA et al., 2015).

O Clado IV, abrange amostras do sul da região amazônica (Bolívia, Argentina

e Brasil), diversos haplótipos do Peru, haplótipos do Rio Negro (norte da Amazônia), um haplótipo da Colômbia e um haplótipo compartilhado entre a Bolívia e a Guiana Francesa. Essa distribuição geográfica é notavelmente mais ampla em comparação com os outros três Clados. Este padrão é geralmente interpretado como resultante da expansão de alcance rápido (HEWITT, 2000). Embora a origem geográfica desta expansão seja uma questão em aberto, é estimado que a expansão tenha começado por volta do final do último máximo glacial (*Last Glacial Maximum*, LGM) (DE THOISY et al., 2010). Isto sugeriria que o LGM reduziu significativamente o tamanho da população de antas brasileiras (DE THOISY et al., 2010). Alternativamente, a expansão também coincide com a extinção da megafauna herbívora neotropical e, portanto, uma diminuição da competição interespecífica pode ter permitido que as populações de antas brasileiras se expandissem para habitats anteriormente indisponíveis (DE THOISY et al., 2010).

A Amazônia ocidental, demonstra alta diversidade genética em antas brasileiras, o que apoia a ideia de ser um centro potencial de origem e dispersão para essa espécie (DE THOISY et al., 2010; RUIZ-GARCÍA et al., 2015). Essa teoria também é sustentada para outros mamíferos da região, como primatas, roedores e marsupiais (LAVERGNE et al., 2010; SILVA; PATTON, 1998).

4.5. Conclusão

A reintrodução das antas no Rio de Janeiro segue em curso e necessita de mais indivíduos para alcançar uma população autossustentável. A análise apenas do mtDNA, constatou que todos os cativeiros avaliados possuem animais aptos para essa reintrodução. Destaca-se, como ponto positivo, uma considerável diversidade

genética no grupo de antas do Clado IV mantidas em cativeiro. Os dados de mtDNA indicam que as antas do Clado IV são adequadas para translocação na área que vai do sul do Rio Amazonas até o norte da Argentina. Já os indivíduos pertencentes a outros Clados estariam aptos apenas para translocação dentro do bioma da Amazônia.

As informações obtidas neste estudo também auxiliam nas decisões sobre acasalamento das matrizes nos cativeiros. Recomenda-se que as equipes técnicas evitem o cruzamento de matrizes que pertençam a diferentes linhagens genéticas, a fim de manter a diversidade de cada linhagem e possíveis adaptações aos diferentes biomas, quando a finalidade é produzir indivíduos aptos à reintrodução. A manutenção da diversidade genética adaptativa é importante para aumentar o sucesso das reintroduções, especialmente a médio e longo-prazo.

No entanto, vale ressaltar que o presente estudo possui um viés mitocondrial. Em outras palavras, para melhor entendimento da genética desses animais, são recomendados estudos complementares com base em DNA nuclear.

A colaboração entre a conservação *in-situ* e *ex-situ* desempenha um papel fundamental no manejo da população em cativeiro e na formulação de estratégias para a conservação da espécie. Essa parceria permite um melhor entendimento das necessidades da espécie e promove estratégias eficazes para a preservação.

Capítulo 2

Desenvolvimento de Oligonucleotídeos Iniciadores para o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em Anta *Tapirus terrestris*

1. INTRODUÇÃO

O complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) é considerado um dos complexos gênicos mais diversificados presentes nos vertebrados, desempenhando um papel importante no sistema imunológico adaptativo (HEDRIK, 1994; JANEWAY et al., 2001; POTTS; WAKELAND, 1990). As proteínas do MHC capturam e apresentam os fragmentos peptídicos das proteínas de antígenos estranhos para as células T, o que desencadeia a resposta imune (ALBERTS et al., 2017). Há duas classes de MHC, que são estrutural e funcionalmente distintas (Figura 6 e Tabela 4; ALBERTS et al., 2017; JANEWAY et al., 2001; POTTS; WAKELAND, 1990).

As proteínas do MHC de classe I apresentam, principalmente, peptídeos estranhos às células T citotóxicas, e quase todas as células nucleadas dos vertebrados expressam as proteínas de classe I (Figura 6; ALBERTS et al., 2017; BLUM; WEARSCH; CRESSWELL, 2013). As proteínas do MHC de classe II, apresentam, principalmente, peptídeos estranhos às células T reguladoras e auxiliares (Figura 5; ALBERTS et al., 2017; BLUM; WEARSCH; CRESSWELL, 2013). Em geral, somente as células apresentadoras de antígenos (APCs) expressam as proteínas do MHC de classe II (ALBERTS et al., 2017). Entre as APCs estão células dendríticas, células b e os macrófagos (ALBERTS et al., 2017). Em humanos, os genes da classe I são conhecidos como HLA-A, -B e -C, enquanto os genes da classe II são HLA-DR, -DP, -DQ (BLUM; WEARSCH; CRESSWELL, 2013).

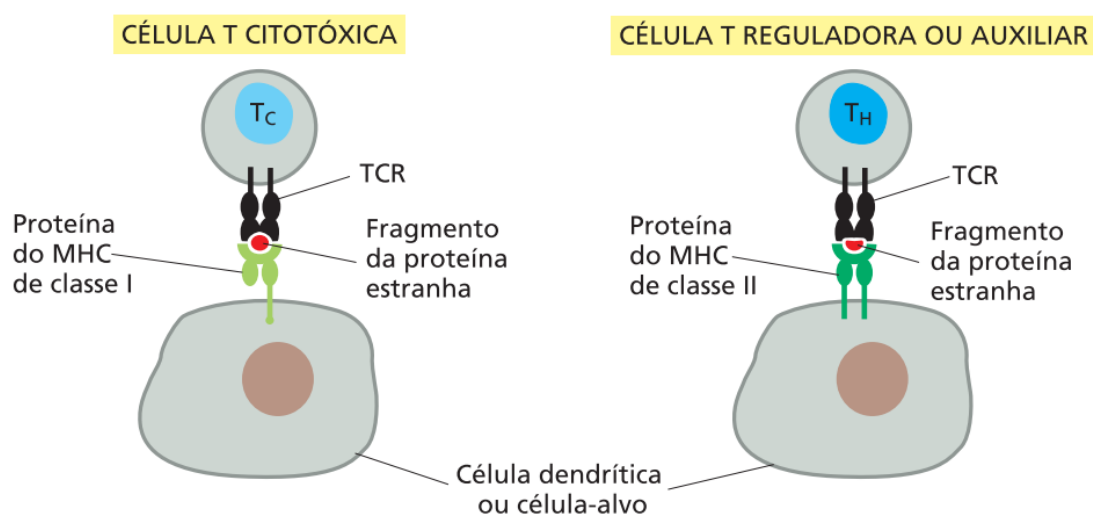


Figura 6. O reconhecimento pelas células T de peptídeos estranhos associados às proteínas do MHC. As células T citotóxicas reconhecem os peptídeos estranhos em associação com proteínas do MHC de classe I, enquanto as células T auxiliares e as células T reguladoras reconhecem os peptídeos estranhos em associação com proteínas do MHC de classe II. Em ambos os casos, as células T reconhecem os complexos peptídeo-MHC na superfície de uma APC – uma célula dendrítica ou uma célula-alvo. Algumas células T reguladoras reconhecem os peptídeos próprios em associação com as proteínas do MHC de classe II (não apresentado). Imagem e texto retirados de ALBERTS et al. (2017).

Tabela 4. Propriedades das proteínas do MHC de classe I e de classe II humanas.

	Classe I	Classe II
Lócus genético	HLA-A, HLA-B, HLA-C	HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR
Distribuição celular	A maioria das células nucleadas	Células dendríticas, células B, macrófagos, células epiteliais tímicas e algumas outras
Células para as quais apresentam antígenos	Células T citotóxicas	Células T auxiliares, células T reguladoras

Os loci de MHC se caracterizam pela poligenia, elevado polimorfismo e co-dominância. Assim, embora um alelo possa produzir somente um pequeno número de proteínas do MHC de classe I e de classe II diferentes, juntas elas devem ser capazes de apresentar fragmentos peptídicos de praticamente qualquer proteína estranha às

células T (ALBERTS et al., 2017). Dessa forma, ao contrário do sítio de ligação ao antígeno de uma proteína de anticorpo (Ig), a região de ligação do peptídeo (*peptide-binding region*, PBR) de cada proteína do MHC deve ser capaz de ligar uma quantidade enorme de peptídeos diferentes (ALBERTS et al., 2017). Por exemplo, na população humana, há mais 2 mil variantes alélicas desses genes (ALBERTS et al., 2017). Dessa forma, altos níveis de polimorfismo são comuns nas PBRs das moléculas do MHC. Assim, a alta variação dos genes permite uma gama mais ampla de reconhecimento de patógenos (SOMMER, 2005).

As doenças infecciosas são consideradas uma das principais razões para o surgimento e manutenção desse notável polimorfismo (ALBERTS et al., 2017; HUGHES; HUGHES, 1995). Na batalha evolutiva entre patógenos e o sistema imunológico adaptativo, os patógenos mutam suas proteínas para evitar a ligação dos peptídeos no MHC (ALBERTS et al., 2017; RADWAN et al., 2020). O sucesso de um patógeno pode resultar em epidemias, favorecendo a seleção de novas formas alélicas do MHC que se ligam aos peptídeos alterados, promovendo assim a diversidade nas proteínas do MHC na população (ALBERTS et al., 2017; EIZAGUIRRE et al., 2012).

Na maioria dos genes codificadores de proteínas onde a seleção não é neutra, a taxa de substituições de nucleotídeos sinônimos (substituição que não resulta em alteração no aminoácido) é maior do que as substituições não-sinônimas (substituições que resultam em alterações no aminoácido). Isso ocorre porque substituições não-sinônimas tendem a alterar o aminoácido e, portanto, são provavelmente deletérias (BERNATCHEZ; LANDRY, 2003). No entanto, observou-se que o éxon que codifica o PBR da molécula MHC apresenta uma taxa mais elevada de substituições não sinônimas do que substituições sinônimas (BERNATCHEZ;

LANDRY, 2003; HUGHES; HUGHES, 1995; SOMMER, 2005). Dessa forma, a elevada proporção de substituições de nucleotídeos não-sinônimas, especialmente na PBR, sugere uma pressão seletiva positiva sobre esses loci gênicos, favorecendo novas variantes e indicando um papel funcional essencial dessas moléculas nas respostas imunes específicas contra patógenos (HUGHES; YEAGER, 1998).

A manutenção da variação no MHC é crucial para uma resposta imune eficaz contra patógenos (SOMMER, 2005). O alto polimorfismo, juntamente com evidências de seleção positiva, tornou os genes do MHC um modelo atraente para estudar como a seleção pode promover e manter a variação genética em populações naturais (RADWAN et al., 2020). Estudos em populações selvagens mostram a importância funcional do MHC na resistência a patógenos (SOMMER, 2005). Além disso, investigações sobre mecanismos de seleção por parasitas em condições naturais podem fornecer insights valiosos para a ecologia evolutiva e conservação (SOMMER, 2005).

A anta (*T. terrestris*) está classificada como vulnerável de acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (IUCN, 2018) e como em perigo de extinção no bioma Mata Atlântica (MEDICI, 2010). Esta classificação ocorre devido à intensa e contínua redução da população (VARELA et al., 2019). No Brasil, a anta foi extinta em partes da região Nordeste e nos estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul (MACEDO, 2017; VARELA et al., 2019). No Rio de Janeiro, o último registro da espécie é datado de 1914 (MACEDO, 2017). Desmatamento, fragmentação de habitat, caça e outras perturbações humanas contribuíram para o declínio e o isolamento das populações de antas (ABRA et al., 2020; VARELA et al., 2019).

A diminuição ou perda de populações animais impacta as interações ecológicas, frequentemente antecedendo a extinção completa das espécies (VALIENTE-BANUET

et al., 2015). A reintrodução de animais em seus habitats originais, conhecida como refaunação, revelou-se uma estratégia eficaz para restaurar processos ecológicos e proteger espécies ameaçadas (FERNANDEZ et al., 2017; KIERULFF et al., 2012). No contexto brasileiro, o Refauna tem como objetivo reintroduzir a anta *Tapirus terrestris* na Mata Atlântica. O projeto ocorre na Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), onde já foram reintroduzidas 18 antas de nove criadouros distintos, resultando em seis nascimentos e sete óbitos. As reintroduções demandam equilíbrio entre riscos e benefícios a longo prazo (IUCN/SSC, 2013). Por esse motivo deve-se empregar esforços que aumentem as chances de êxito das populações reintroduzidas na natureza (IUCN/SSC, 2013; MELO, 2019). É crucial que os animais reintroduzidos apresentem variabilidade genética suficiente para assegurar a autossustentabilidade da população (DA SILVA et al., 2010; KRAAIJEVELD-SMIT et al., 2006). Através de dados genéticos é possível fazer recomendações de melhoramento para maximizar a retenção da diversidade genética (DA SILVA et al., 2010).

A escassez de dados genéticos de *T. terrestris* é evidente, com ausência total de informações sobre loci do MHC na espécie. Os animais que estão sendo reintroduzidos na REGUA são provenientes de cativeiros, a maioria já tendo nascido em cativeiro, locais nos quais o grau de parentesco entre os animais é consideravelmente elevado. Nesse contexto, surge a preocupação acerca da diversidade genética e da possibilidade de ocorrer endogamia. A endogamia, caracterizada pela perda de variabilidade genética, inclusive nos locos do MHC, pode diminuir a sua capacidade de combater patógenos e aumentar a sua suscetibilidade a doenças.

Um exemplo de redução da diversidade do MHC devido à endogamia que levou a impactos negativos está no diabo da Tasmânia (CALDWELL; SIDDLE, 2017). A

doença tumoral facial do diabo-da-tasmânia (*tasmanian Devil Facial Tumor Disease*, DFTD) é um câncer infeccioso recentemente emergido que levou a declínios populacionais maciços e sérias preocupações com a persistência futura do maior carnívoro marsupial vivente (MCCALLUM et al., 2007, 2009). Esta doença parece ter se disseminado como resultado da perda de diversidade genética e do comportamento agressivo da espécie hospedeira, que favorece lesões faciais devido às agressões conspecíficas (SIDDLE et al., 2007). Estudos anteriores demonstraram a ocorrência de baixa diversidade do MHC de Classe I e II, o que pode ter contribuído para a dificuldade do sistema imunológico do diabo-da-tasmânia em reconhecer tumores infecciosos como estranhos (CHENG et al., 2012; SIDDLE et al., 2007, 2010). Isso pode ter contribuído para o alto potencial de disseminação da doença, o que levou a declínios populacionais significativos.

A redução na variação do MHC também foi observada na chita (*Acinonyx jubatus*, SCHWENSOW et al., 2019). Foi relatada alta mortalidade em chitas endogâmicas devido à peritonite infecciosa felina associada a um coronavírus (O'BRIEN; EVERMANN, 1988).

Dessa forma, o presente estudo visou desenvolver oligonucleotídeos iniciadores específicos para loci do MHC da anta brasileira, para possibilitar futuras estimativas de variabilidade nas populações naturais e em cativeiros, o monitoramento genético a longo-prazo, e o subsídio às decisões em relação à reprodução ex-situ, com vistas à manutenção da variação genética adaptativa.

1.2. Objetivo

Desenvolver oligonucleotídeos iniciadores para o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II da anta *Tapirus terrestris*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores foram projetados usando o MEGA 11 (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021) e o programa SnapGene. Foi usado como base o alinhamento de consenso das sequências de anta brasileira (*T. terrestris*, código de acesso do GenBak: JAPYYE010000002.1), anta malaia (*T. indicus*, código de acesso do GenBak: PVIE01006178.1), cavalo (*Equus caballus*, código de acesso do GenBak: NM_001123381.1, MHC de classe I; MT304761.1, DQA; L47172.1, DRA) e rinoceronte (*Diceros bicornis minor*, código de acesso do GenBak: AF055346.1, MHC de classe I) disponíveis no GenBank. Como ponto de partida, foram alinhados os iniciadores desenvolvidos para *T. indicus* (ISMAIL et al. 2023). Os iniciadores de *T. indicus* que se alinharam adequadamente com *T. terrestris* foram selecionados para serem usados no presente estudo. Já para as regiões que demonstraram menor compatibilidade, foram desenvolvidos novos iniciadores, específicos para *T. terrestris* (Tabela 5). Os iniciadores foram sintetizados para teste em amostras de antas de cativeiro.

Tabela 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de MHC Classe I e II. F = senso, R = anti-senso, bp = tamanho do produto em par de bases. TA = temperatura de anelamento,

	Nome	Sequência	pb	TA	Região	Artigo
Classe I	Class1_F1	GTGGACGACACGCAGTTC	654	57	Exon 2	ISMAIL et al. (2023)
	Class1_R2	GCGCTGCAGCGTCTCC		61	Exon 3	ISMAIL et al. (2023)
	Class1_F1	GTGGACGACACGCAGTTC	478	57	Exon 2	ISMAIL et al. (2023)
	Tapir MHC Class I int R	GATCGGTGCCATCGTAGGC		60		Presente Estudo
	Tapir MHC class I int F	GGGTCTCACACCCTCCAGG	273	72	Exon 3	Presente Estudo
	Class1_R2	GCGCTGCAGCGTCTCC				ISMAIL et al. (2023)
Classe II	Tapir_MHCII_DRA_F	ATCATGATGTCCAGGTTGG	188	62	Exon 2 DRA	Presente Estudo
	DRA_R1	TTCTATCTGAACCCTGACC				ISMAIL et al. (2023)
	Tapir MHC class II DQA F	TGGTAGCAGTGGTAGAGTTG	246	68	Exon 2 DQA	Presente Estudo
	Tapir MHC class II DQA R	CTGACCACATTGGCTCCTATG				Presente Estudo
	DQB_F2	TGCTACTTCACCAACGG	207	66	Exon 2 DQB	ISMAIL et al. (2023)
	DQB_R3	GTAGTTGTGTCTGCACAC				ISMAIL et al. (2023)

2.2. Amostragem

Foram analisadas amostras de sangue em tubo EDTA de quatro indivíduos de anta brasileira provenientes de dois zoológicos no Estado de São Paulo (Tabela 6). Três amostras vieram do zoológico de Sorocaba e uma do Parque Ecológico de São Carlos. Das antas de Sorocaba, duas possuem relação de parentesco de mãe e filhote. Já a anta de São Carlos foi reintroduzida na REGUA. Todos os quatro animais são nascidos em cativeiro. As amostras de sangue também foram armazenadas à -20°C.

Tabela 6. Lista de amostras de anta *Tapirus terrestris* obtidas para o presente estudo. Situação: onde o animal está atualmente.

Animal	Sexo	Situação	Cidade	Local de Origem	
				UF	Nome Zoo
Jerivá	M	Reintroduzida	São Carlos	SP	Parque Ecológico de São Carlos
Anta 2471*	F	Cativeiro	Sorocaba	SP	Zoológico de Sorocaba
Anta 2472	F	Cativeiro	Sorocaba	SP	Zoológico de Sorocaba
Anta 2474*	M	Cativeiro	Sorocaba	SP	Zoológico de Sorocaba

*Anta 2474 é filhote da Anta 2471.

2.3. Extração e amplificação de DNA

O DNA das amostras obtidas foi extraído usando o protocolo de Fenol/Clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Para a amplificação do DNA foram utilizados iniciadores para os exons 2 e 3 do MHC de classe I e, para o exon 2 do MHC de classe II (DRA, DQA e DQB). Para isso, foram usados iniciadores já existentes para *T. indicus* (ISMAIL et al., 2023) e iniciadores desenvolvidos no presente estudo (Tabela 7).

As reações de PCR foram feitas em microtubos de 0,2 mL devidamente identificados. Foi preparado um mix dos reagentes, para facilitar a distribuição dos componentes entre cada microtubo. O volume do mix preparado foi de acordo com o número de amostras feitas em cada bateria de amplificação que continha água milli-Q, tampão de enzima (Promega) 1x, 200 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 1 U/amostra de Taq polimerase (GoTaq® Promega) e 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador. Para cada amostra, 1 µL DNA extraído foi misturado a 14 µL do mix. A amplificação foi realizada em um termociclador de 96 poços (Veriti – Applied Biosystems).

As condições térmicas otimizadas da reação de amplificação foram: uma etapa inicial de 3 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 92°C para a

desnaturação, 1 minuto a 57-72°C para o anelamento dos iniciadores ao DNA (Tabela 6) e 1 minuto a 72°C para a extensão da sequência, com uma etapa final de 5 minutos a 72°C para a extensão final. Em todos os lotes de amplificação foram adicionados controles negativos, com água milli-Q no lugar do DNA.

2.4. *Eletroforese*

Após a amplificação, os produtos da reação de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose com concentração de 1,5% (m/v), em tampão TBE (Tris borato EDTA – 0,5x). O gel foi corado com brometo de etídeo. O resultado foi observado com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta. As bandas de DNA amplificadas de cada amostra foram comparadas com um padrão de peso molecular 100pb para checar se o tamanho do fragmento amplificado estava de acordo com o esperado.

2.5. *Purificação e sequenciamento*

A purificação foi feita em tubo 1,5 ml através de beads magnéticas em uma proporção de 1:1 com o volume final do produto da PCR. Foram feitas duas lavagens com 80 µL de etanol absoluto. Após a lavagem, o DNA foi resuspendido em 15 µL da água milli-Q. Os produtos purificados foram armazenados em um freezer a -20°C até que fossem sequenciados.

O sequenciamento ocorreu em um Sequenciador Automático SeqStudio™ (AppliedBiosystems – ThermoFisher). Foi realizado em ambas as direções (senso e anti-senso) com os mesmos oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de anelamento usados na reação de amplificação. Foi utilizado o reagente *BigDye*®

Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit na temperatura padrão de anelamento recomendada pelo fabricante do equipamento (50°C).

2.6. Edição, alinhamento e análise das sequências

As sequências foram editadas no programa GeneStudio versão 2.2.0.0 (GeneStudio, Inc.), no qual foi avaliada a qualidade do sequenciamento através da visualização do eletroferograma de cada uma das sequências e, após isso, foi montada a sequência consenso.

As sequências geradas para cada locus foram agrupadas em um único arquivo em formato fasta e alinhadas através do programa MEGA (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021).

A identidade das sequências foi confirmada por busca por similaridade usando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) no GenBank.

3. RESULTADOS

A amplificação das amostras dos quatro indivíduos funcionou para todos os locos, exceto pelo loco do MHC de classe I exon 2. O sequenciamento foi feito para os locos que foram amplificados e obteve 91,7% de sucesso (Tabela 7). No geral, os eletroferogramas apresentaram boa qualidade (Figura 7).

Tabela 7. Resultado do sequenciamento dos locos de MHC para anta *Tapirus terrestris*. P = amostras que obtiveram resultado positivo no sequenciamento. N = amostras que obtiveram resultado negativo no sequenciamento. Traço = informação ausente.

	Classe I Exon 3	DRA	Classe II DQA	DQB
Anta 2471	P	P	P	P
Anta 2472	-	P	P	P
Anta 2474*	P	-	-	-
Jerivá	P	N	P	P

*Anta 2474 só foi sequenciada para o loco do MHC de classe I exon 3.

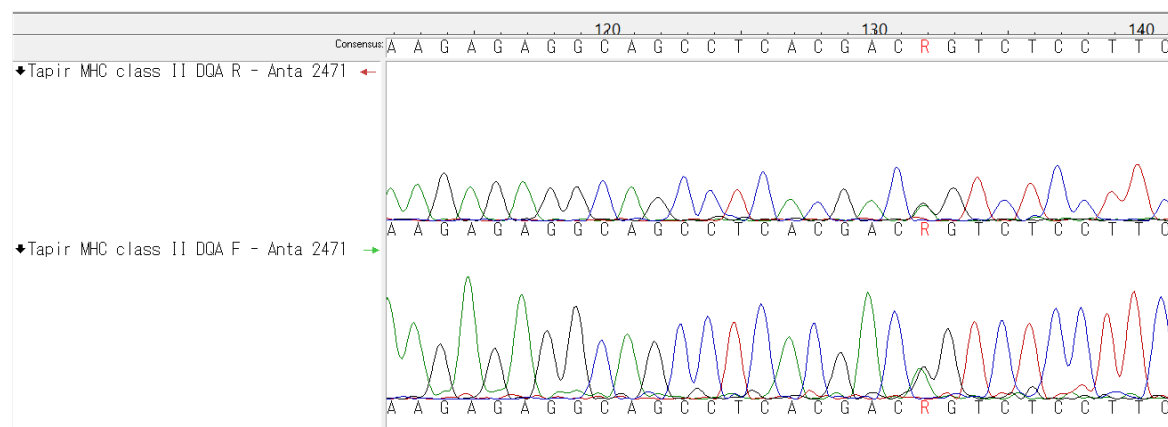


Figura 7. Eletroferograma obtido após o sequenciamento do loco do MHC de classe II (DQA) para a amostra Anta 2471, evidenciando polimorfismo A/G no sítio 132.

O BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) feito para as sequências geradas para MHC de classe I exon 3 resultou em semelhanças de 86,13% com *Diceros bicornes minor* (rinoceronte), 84,42% com *Tursiops truncatus* (golfinho) e 84,31% com *Equus caballus* (cavalo) para MHC de classe I. Para o mesmo loco, a amostra Anta 2474, que teve menor qualidade no eletroferograma, apresentou semelhança de 93,16% com *Equus caballus*, 92,08% com *Rhinolophus ferrumequinum popy* (morcego) e 90,53% com *T. indicus* para o MHC de classe I.

O BLAST feito para as sequências geradas para MHC de classe II resultou, para DRA, em semelhanças de 100% com *T. bairdii* e 99,44% com *T. indicus* para o MHC de classe II DRA. Para o loco do DQA, as semelhanças foram de 91,50% com

Ceratotherium simum simum (rinoceronte) e 82,59% com *Equus caballus* para o MHC de classe II DQA. Por fim, o BLAST feito para DQB foi de 95,65% com *T. indicus* e 95,65% com *Equus caballus* para o MHC de classe II DQB.

4. DISCUSSÃO

Estudos genéticos de animais selvagens frequentemente empregam marcadores neutros como DNA mitocondrial (mtDNA), microssatélites ou polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) para estimar a quantidade de variação presente em indivíduos e populações (AVISE et al., 1987; LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004; SUNNUCKS, 2000). Esses marcadores são altamente informativos para reconstruções filogenéticas, história populacional, relógios moleculares, e para analisar padrões de dispersão de indivíduos (fluxo gênico), bem como para classificar indivíduos por análises de parentesco e paternidade (AVISE et al., 1987; LEMOPOULOS et al., 2019; ROQUES et al., 2019). No entanto, a variação em loci neutros não oferece informações diretas sobre processos seletivos que envolvem a interação dos indivíduos com o ambiente ou sobre a capacidade de mudanças adaptativas futuras (MEYERS; BULL, 2002; TIENDEREN et al., 2002). Ao contrário dos marcadores neutros, a variabilidade do MHC reflete processos adaptativos dentro e entre populações e é muito adequada para investigar uma ampla gama de questões na ecologia evolutiva e conservação (SOMMER, 2005).

O presente estudo teve êxito em desenvolver iniciadores para amplificação e sequenciamento dos genes de MHC de classe I (exon 3) e classe II (DRA, DQA, DQB) da anta brasileira. Isso ajudará na compreensão e elaboração de estratégias de manejo para as antas brasileiras em cativeiro e na natureza. Estratégias como a

seleção de parceiros e a introdução de diversidade genética por meio de translocação ou reintrodução de variantes específicas do MHC podem ser adotadas para assegurar a sustentabilidade da população na natureza, visando a preservação a longo prazo (ISMAIL et al., 2023).

Estudos anteriores demonstraram que populações naturais que sofreram eventos como gargalos evolutivos, redução demográfica e isolamentos, podem apresentar uma menor variabilidade do MHC devido à ação da deriva genética sobrepondo a seleção balanceada (ALCAIDE, 2010; MILLER; ALLENDORF; DAUGHERTY, 2010; O'BRIEN; EVERMANN, 1988). A diminuição da variabilidade genética nos loci do MHC pode comprometer a eficácia na defesa contra patógenos e aumentar a suscetibilidade a doenças. (O'BRIEN; EVERMANN, 1988; SIDDLE et al., 2007). Portanto, estratégias de reprodução *ex-situ* podem ser avaliadas para combinar indivíduos de diferentes populações, ou cativeiros, na tentativa de reduzir as chances de endogamia.

A escolha de parceiros, especialmente optando por indivíduos não aparentados e com maior diversidade no gene do MHC, é mencionada como benéfica em várias espécies selvagens e de cativeiro devido ao seu impacto positivo na reprodução e na resistência a novos patógenos (BRANDIES et al., 2018; EROFEEVA et al., 2022; HAN et al., 2019; SCHWENSOW et al., 2019). Dessa forma, medir a diversidade do MHC entre indivíduos e entre populações são etapas a serem consideradas para identificar possíveis aprimoramentos na gestão em cativeiro e nos planos de conservação (ISMAIL et al., 2023). Além disso, comparar o estado imunológico de populações enfrentando diferentes pressões evolutivas contribuirá para entender a importância da variabilidade genética adaptativa e o papel do MHC na ecologia evolutiva e conservação. (SOMMER, 2005).

BIBLIOGRAFIA

- ABRA, F. D. et al. Use of unfenced highway underpasses by lowland tapirs and other medium and large mammals in central-western Brazil. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 18, n. 4, p. 247–256, 2020.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. [s.l: s.n.].
- ALCAIDE, M. On the relative roles of selection and genetic drift in shaping MHC variation. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 18, p. 3842–3844, 2010.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ARMSTRONG, D. P.; SEDDON, P. J. Directions in reintroduction biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 20–25, 2008.
- ASHLEY, M. V.; NORMAN, J. E.; STROSS, L. Phylogenetic analysis of the perissodactylan family tapiridae using mitochondrial cytochrome c oxidase (COII) sequences. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 3, n. 4, p. 315–326, 1996.
- AVISE, J. C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual review of ecology and systematics**, v. 18, n. 1987, p. 489–522, 1987.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History And Evolution**. [s.l: s.n.].
- BECK, B. B. et al. Reintroduction of captive-born animals. In: **Creative Conservation: Interactive management of wild and captive animals**. [s.l: s.n.]. p. 265–286.
- BERNATCHEZ, L.; LANDRY, C. MHC studies in nonmodel vertebrates: What have we learned about natural selection in 15 years? **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, n. 3, p. 363–377, 2003.
- BLUM, J. S.; WEARSCH, P. A.; CRESSWELL, P. **Pathways of antigen processing**.

[s.l: s.n.]. v. 31

BODMER, R. E. Influence of digestive morphology on resource partitioning in Amazonian ungulates. **Oecologia**, v. 85, n. 3, p. 361–365, 1991.

BRANDIES, P. A. et al. Disentangling the mechanisms of mate choice in a captive koala population. **PeerJ**, v. 2018, n. 8, p. 1–31, 2018.

BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 4, p. 1967–1971, 1979.

BUSH, M. B. Amazonian Spaciation: a Necessarily Complex Model. **Journal of Biogeography**, v. 21, n. 1, p. 5–17, 1994.

CALDWELL, A.; SIDDLE, H. V. The role of MHC genes in contagious cancer: the story of Tasmanian devils. **Immunogenetics**, v. 69, n. 8–9, p. 537–545, 2017.

CHENG, Y. et al. Low MHC class II diversity in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). **Immunogenetics**, v. 64, n. 7, p. 525–533, 2012.

COZZUOL, M. A. et al. A new species of tapir from the Amazon. **Journal of Mammalogy**, v. 94, n. 6, p. 1331–1345, 2013.

DA SILVA, A. G. et al. Genetic approaches refine ex situ lowland tapir (*Tapirus terrestris*) conservation. **Journal of Heredity**, v. 101, n. 5, p. 581–590, 2010.

DE THOISY, B. et al. Population history, phylogeography, and conservation genetics of the last Neotropical mega-herbivore, the lowland tapir (*Tapirus terrestris*). **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2010.

DONOSO, I. et al. Downsizing of animal communities triggers stronger functional than structural decay in seed-dispersal networks. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2020.

DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7.

Molecular Biology and Evolution, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012.

EIZAGUIRRE, C. et al. Rapid and adaptive evolution of MHC genes under parasite selection in experimental vertebrate populations. **Nature Communications**, v. 3, p. 1–6, 2012.

EMER, C. et al. Defaunation precipitates the extinction of evolutionarily distinct interactions in the Anthropocene. **Science Advances**, v. 5, n. 6, p. 1–9, 2019.

EROFEEVA, M. N. et al. Inbreeding Coefficient and Distance in MHC Genes of Parents as Predictors of Reproductive Success in Domestic Cat. **Animals**, v. 12, n. 2, p. 1–16, 2022.

FERNANDEZ, F. A. S. et al. Rewilding the Atlantic Forest: Restoring the fauna and ecological interactions of a protected area. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 15, n. 4, p. 308–314, 2017.

FERREGUETTI, Á. C.; TOMAS, W. M.; BERGALLO, H. G. Density, occupancy, and detectability of lowland tapirs, *Tapirus terrestris*, in Vale Natural Reserve, southeastern Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 98, n. 1, p. 114–123, 2017.

FRASER, D. J. How well can captive breeding programs conserve biodiversity? A review of salmonids. **Evolutionary Applications**, v. 1, n. 4, p. 535–586, 2008.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA E INPE. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica Período 2019-2020**. [s.l: s.n.].

GALETTI, M. et al. Reversing defaunation by trophic rewilding in empty forests. **Biotropica**, v. 49, n. 1, p. 5–8, 2017.

GARCÍA, M. et al. *Tapirus bairdii*, Baird's Tapir. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**, v. 8235, 2016.

HAN, Q. H. et al. MHC class I diversity predicts non-random mating in Chinese alligators (*Alligator sinensis*). **Heredity**, v. 122, n. 6, p. 809–818, 2019.

- HARRISON, R. G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 1, p. 6–11, 1989.
- HEDRIK, P. W. Evolutionary Genetics of the Major Histocompatibility Complex. **The American Naturalist**, v. 143, n. 6, p. 945–964, 1994.
- HEWITT, G. The genetic legacy of quaternary age. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 907–913, 2000.
- HUGHES, A. L.; HUGHES, M. K. Natural selection on the peptide-binding regions of major histocompatibility complex molecules. **Immunogenetics**, v. 42, n. 4, p. 233–243, 1995.
- HUGHES, A. L.; YEAGER, M. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. **Annual Review of Genetics**, v. 32, p. 415–435, 1998.
- ISMAIL, N. A. et al. Low Diversity of Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes in Endangered Malayan Tapir (*Tapirus indicus*). **Zoological Studies**, v. 62, n. 12, 2023.
- IUCN/SSC. Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations IUCN. **Version 1.0. Gland, Switzerland: IUCN Species Survival Commission**, v. viii, p. 57, 2013.
- JAMIESON, I. G.; LACY, R. C. Managing Genetic Issues in Reintroduction Biology. **Reintroduction Biology: Integrating Science and Management**, p. 441–475, 2012.
- JANEWAY, C. A. et al. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. [s.l: s.n.].
- KIERULFF, M. C. M. et al. The Golden lion tamarin *Leontopithecus rosalia*: A conservation success story. **International Zoo Yearbook**, v. 46, n. 1, p. 36–45, 2012.
- KRAAIJEVELD-SMIT, F. J. L. et al. Captive breeding and the fitness of reintroduced species: a test of the responses to predators in a threatened amphibian. **Journal of Applied Ecology**, v. 43, n. 2, p. 360–365, 2006.

- KURTEN, E. L. Cascading effects of contemporaneous defaunation on tropical forest communities. **Biological Conservation**, v. 163, p. 22–32, 2013.
- LAVERGNE, A. et al. Phylogeny and Phylogeography of Squirrel Monkeys (Genus *Saimiri*) Based on Cytochrome b Genetic Analysis. **American Journal of Primatology**, v. 72, p. 242–253, 2010.
- LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.
- LEMOPOULOS, A. et al. Comparing RADseq and microsatellites for estimating genetic diversity and relatedness — Implications for brown trout conservation. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 2106–2120, 2019.
- LIZCANO, D. et al. *Tapirus pinchaque*, Mountain Tapir. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**, v. 8235, 2016.
- LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application**. [s.l: s.n.].
- LYNCH, M.; KOSKELLA, B.; SCHAACK, S. Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1727–1730, 2006.
- MACEDO, L. **What are we missing? Historical loss of populations and landscape use by mammals in the Brazilian Atlantic Foresto Title**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.
- MARQUES, M. C. M.; GRELE, C. E. V. **The Atlantic Forest History, Biodiversity, Threats and Opportunities of the Mega-diverse Forest**. [s.l: s.n.].
- MCCALLUM, H. et al. Distribution and impacts of Tasmanian devil facial tumor disease. **EcoHealth**, v. 4, n. 3, p. 318–325, 2007.
- MCCALLUM, H. et al. Transmission dynamics of Tasmanian devil facial tumor disease may lead to disease-induced extinction. **Ecology**, v. 90, n. 12, p. 3379–3392, 2009.

MCLENNAN, E. A. et al. Mixing genetically differentiated populations successfully boosts diversity of an endangered carnivore. **Animal Conservation**, v. 23, n. 6, p. 700–712, 2020.

MEDICI, E. P. **Assessing the Viability of Lowland Tapir Populations in a Fragmented Landscape**. [s.l.] University of Kent Canterbury, United Kingdom, 2010.

MEDICI, E. P. et al. Avaliação do Risco de Extinção da Anta brasileira *Tapirus terrestris* Linnaeus, 1758, no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 1, p. 3–11, 2012.

MELO, A. S. DE. **Os Estranhos que Nós Amamos: Genética e Taxonomia de Uma População Reintroduzida de Cutias (*Dasyprocta* spp.)**. [s.l.: s.n.].

MENDES PONTES, A. R. Ecology of a community of mammals in a seasonally dry forest in Roraima, Brazilian Amazon. **Mammalian Biology**, v. 69, n. 5, p. 319–336, 2004.

MEYERS, L. A.; BULL, J. J. Fighting change with change: Adaptive variation in an uncertain world. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 17, n. 12, p. 551–557, 2002.

MILLER, H. C.; ALLENDORF, F.; DAUGHERTY, C. H. Genetic diversity and differentiation at MHC genes in island populations of tuatara (*Sphenodon* spp.). **Molecular Ecology**, v. 19, n. 18, p. 3894–3908, 2010.

MORITZ, C. et al. DIVERSIFICATION OF RAINFOREST FAUNAS: An Integrated Molecular Approach. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 31, n. 1, p. 533–563, 2000.

MOWRY, R. A. et al. Genetics and the successful reintroduction of the Missouri river otter. **Animal Conservation**, v. 18, n. 2, p. 196–206, 2015.

MUELLER, S. A. et al. Genome-wide diversity loss in reintroduced Eurasian lynx populations urges immediate conservation management. **Biological Conservation**, v. 266, 2022.

- NOWAK, R. M. **Walker's Mammals of the World**. [s.l.] Johns Hopkins University Press, 1999.
- O'BRIEN, S. J.; EVERMANN, J. F. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 10, p. 254–259, 1988.
- OLIVEIRA-SANTOS, L. G. R. et al. Influence of extrinsic variables on activity and habitat selection of lowland tapirs (*Tapirus terrestris*) in the coastal sand plain shrub, southern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 75, n. 3, p. 219–226, 2010.
- PADILLA, M.; DOWLER, R. C. *Tapirus terrestris*. **Mammalian Species**, n. 481, p. 1–8, 1994.
- PEREIRA, S. L. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 745–752, 2000.
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.
- POTTS, W. K.; WAKELAND, E. K. Evolution of diversity at the major histocompatibility complex. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 5, n. 6, p. 181–187, 1990.
- RADWAN, J. et al. Advances in the Evolutionary Understanding of MHC Polymorphism. **Trends in Genetics**, v. 36, n. 4, p. 298–311, 2020.
- REDFORD, K. H. The Empty of neotropical forest where the vegetation still appears intact. **BioScience**, v. 42, n. 6, p. 412–422, 1992.
- REIS, N. R. et al. **Mamíferos do Brasil**. [s.l.] Universidade Estadual de Londrina, 2011.
- REZENDE, C. L. et al. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 16, n. 4, p. 208–214, 2018.
- RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the

remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009.

ROQUES, S. et al. From microsatellites to single nucleotide polymorphisms for the genetic monitoring of a critically endangered sturgeon. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 12, p. 7017–7029, 2019.

ROZAS, J. et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 2017.

RUIZ-GARCÍA, M. et al. Phylogeography and spatial structure of the lowland tapir (*Tapirus terrestris*, Perissodactyla: Tapiridae) in South America. **Mitochondrial DNA**, v. 27, n. 4, p. 2334–2342, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SCHWENSOW, N. et al. Immunological MHC supertypes and allelic expression: how low is the functional MHC diversity in free-ranging Namibian cheetahs? **Conservation Genetics**, v. 20, n. 1, p. 65–80, 2019.

SIDDLE, H. V. et al. Transmission of a fatal clonal tumor by biting occurs due to depleted MHC diversity in a threatened carnivorous marsupial. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 41, p. 16221–16226, 2007.

SIDDLE, H. V. et al. MHC gene copy number variation in Tasmanian devils: Implications for the spread of a contagious cancer. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1690, p. 2001–2006, 2010.

SILVA, M. N. F. DA; PATTON, J. L. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 475–486, 1998.

SOMMER, S. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary

ecology and conservation. **Frontiers in Zoology**, v. 2, p. 1–18, 2005.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, n. 5, p. 199–203, 2000.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.

THÉVENIN, C. et al. Reintroductions of birds and mammals involve evolutionarily distinct species at the regional scale. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 13, p. 3404–3409, 2018.

TIENDEREN, P. H. VAN et al. Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 12, p. 577–582, 2002.

TKACH, K.; WATSON, M. J. Publication and use of genetic tools in conservation management applications—A systematic review. **Journal of Applied Ecology**, v. 60, n. 8, p. 1522–1536, 2023.

TOUGARD, C. et al. Phylogenetic Relationships of the Five Extant Rhinoceros Species (Rhinocerotidae, Perissodactyla) Based on Mitochondrial Cytochrome b and 12S rRNA Genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 19, n. 1, p. 34–44, 2001.

TRAEHOLT, C. et al. *Tapirus indicus*, Malay Tapir. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**, 2016.

VALIENTE-BANUET, A. et al. Beyond species loss: The extinction of ecological interactions in a changing world. **Functional Ecology**, v. 29, n. 3, p. 299–307, 2015.

VARELA, D. et al. *Tapirus terrestris*, Lowland Tapir. **The IUCN Red List of Threatened Species 2019**, v. 8235, 2019.

VOSS, R. S.; HELGEN, K. M.; JANSA, S. A. Extraordinary claims require extraordinary evidence: A comment on Cozzuol et al. (2013). **Journal of Mammalogy**, v. 95, n. 4,

p. 893–898, 2014.

WILKIE, D. S. et al. The empty forest revisited. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, n. 1, p. 120–128, 2011.

ANEXO

Tabela 8. Lista de amostras de anta *Tapirus terrestris* obtidas para o presente estudo. São 47 amostras no total. H: haplótipo. Situação: onde o animal está atualmente. Parentes maternos receberam o mesmo haplótipo.

Animal	H	Clado	Sexo	Local de Origem		
				Cidade	UF	Nome Zoo
Cachoeiras*	H1	IV	F	Jaborandi	BA	Fazenda Trijunção
Macacu*	H1	IV	M	Jaborandi	BA	Fazenda Trijunção
Amora*	H1	IV	F	Jaborandi	BA	Fazenda Trijunção
Bubbaloo	H2	IV	F	Salvador	BA	Parque Zoobotânico Getúlio Vargas
Adão*	H10	I	M	Araxá	MG	Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM)
Eva*	H3	IV	F	Araxá	MG	Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM)
Anta 21002	H8	II	M	Recife	PE	Parque Estadual de Dois Irmãos
Anta 45070	-	IV	M	Recife	PE	Parque Estadual de Dois Irmãos
Amada	H1	IV	F	Foz do Iguaçu	PR	Refúgio Biológico Bela Vista - RBV
Anita	H1	IV	F	Foz do Iguaçu	PR	Refúgio Biológico Bela Vista - RBV
Pepeu	H9	IV	M	Foz do Iguaçu	PR	Refúgio Biológico Bela Vista - RBV
Nina	H9	IV	F	Foz do Iguaçu	PR	Refúgio Biológico Bela Vista - RBV
Natalino	H1	IV	M	Foz do Iguaçu	PR	Refúgio Biológico Bela Vista - RBV
Batata	H9	IV	M	Foz do Iguaçu	PR	Refúgio Biológico Bela Vista - RBV
Robinho	H6	IV	M	Foz do Iguaçu	PR	Refúgio Biológico Bela Vista - RBV
Margarida	H1	IV	F	Foz do Iguaçu	PR	Refúgio Biológico Bela Vista - RBV
Aipim	H1	IV	M	Foz do Iguaçu	PR	Refúgio Biológico Bela Vista - RBV
Antonello	H7	III	M	Foz do Iguaçu	PR	Refúgio Biológico Bela Vista - RBV
Tapirus terrestris 1292	H3	IV	M	Telêmaco Borba	PR	Prque Ecológico Klabin
Tapirus terrestris 1293	H5	IV	M	Telêmaco Borba	PR	Prque Ecológico Klabin
Flora*	H5	IV	F	Telêmaco Borba	PR	Prque Ecológico Klabin
Valente*	H5	IV	M	Telêmaco Borba	PR	Prque Ecológico Klabin

Animal	H	Clado	Sexo	Local de Origem		
				Cidade	UF	Nome Zoo
Júpiter*	H5	IV	M	Telêmaco Borba	PR	Prque Ecológico Klabin
Alouísio Fazendinha	-		M	Rio de Janeiro	RJ	BioParque do Rio
Anta 12567	H2	IV	M	Rio de Janeiro	RJ	BioParque do Rio
Pumba*	-		M	Rio de Janeiro	RJ	BioParque do Rio
Magali*	-		F	Rio de Janeiro	RJ	BioParque do Rio
Jasmim*	-		F	Guarulhos	SP	Zoológico de Guarulhos
Jequitibá*	H1	IV	M	Ilha Solteira	SP	Zoológico de Ilha Solteira
Aurora*	H1	IV	F	Ilha Solteira	SP	Zoológico de Ilha Solteira
Jerivá*	H11	IV	M	São Carlos	SP	Parque Ecológico de São Carlos
Castanha*	H1	IV	F	São José do Rio Preto	SP	Zoobotânico de São José do Rio Preto
Juçara*	H1	IV	F	São José do Rio Preto	SP	Zoobotânico de São José do Rio Preto
Bia	H1	IV	F	São José do Rio Preto	SP	Zoobotânico de São José do Rio Preto
Julia	H1	IV	F	São José do Rio Preto	SP	Zoobotânico de São José do Rio Preto
Caju	H1	IV	M	São José do Rio Preto	SP	Zoobotânico de São José do Rio Preto
Antônio	H1	IV	M	São José do Rio Preto	SP	Zoobotânico de São José do Rio Preto
Frederico	H1	IV	M	São José do Rio Preto	SP	Zoobotânico de São José do Rio Preto
Manga	H1	IV	F	São José do Rio Preto	SP	Zoobotânico de São José do Rio Preto
Rhianta*	H5	IV	F	Sorocaba	SP	Zoológico de Sorocaba
Paralelepípedo*	H4	IV	M	Sorocaba	SP	Zoológico de Sorocaba
Anta 2470	H5	IV	M	Sorocaba	SP	Zoológico de Sorocaba
Anta 2471	H5	IV	F	Sorocaba	SP	Zoológico de Sorocaba
Anta 2472	H1	IV	F	Sorocaba	SP	Zoológico de Sorocaba
Anta 9545	H5	IV	M	Sorocaba	SP	Zoológico de Sorocaba
Anta 2474*	H5	IV	M	Sorocaba	SP	Zoológico de Sorocaba
Anta 9837	H1	IV	M	Sorocaba	SP	Zoológico de Sorocaba

*Animais reintroduzidos

Tabela 9. Lista das sequências de anta *T. terrestris* para o gene Citocromo b usadas no presente estudo. 124 sequências no total. H: haplótipos. Brasil (sul) refere-se à amostras ao sul do Rio Amazonas.

ID	Genbank	Localidade	País	Artigo	H
Antonio	-	São José do Rio Preto, São Paulo	Brasil (sul)	Presente Estudo	H1
Frederico	-	São José do Rio Preto, São Paulo	Brasil (sul)	Presente Estudo	H1
Margarida	-	Foz do Iguaçu, Paraná	Brasil (sul)	Presente Estudo	H1
Julia	-	São José do Rio Preto, São Paulo	Brasil (sul)	Presente Estudo	H1
Amora	-	Jaborandi, Bahia	Brasil (sul)	Presente Estudo	H1
Anta2472	-	Sorocaba, São Paulo	Brasil (sul)	Presente Estudo	H1
Anta9837	-	Sorocaba, São Paulo	Brasil (sul)	Presente Estudo	H1
Macacu	-	Jaborandi, Bahia	Brasil (sul)	Presente Estudo	H1
Anita	-	Foz do Iguaçu, Paraná	Brasil (sul)	Presente Estudo	H1
Jequitiba	-	Ilha Solteira, São Paulo	Brasil (sul)	Presente Estudo	H1
Manga	-	São José do Rio Preto, São Paulo	Brasil (sul)	Presente Estudo	H1
Aurora	-	Ilha Solteira, São Paulo	Brasil (sul)	Presente Estudo	H1
GQ259953.1	GQ259953.1	Argentina	Argentina	(DE THOISY et al., 2010)	H1
Sebastiao	-	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	Brasil (sul)	Presente Estudo	H2
Bubbaloo	-	Salvador, Bahia	Brasil (sul)	Presente Estudo	H2
Eva	-	Araxá, Minas Gerais	Brasil (sul)	Presente Estudo	H3
Tapirus1292	-	Telemaco Borba, Paraná	Brasil (sul)	Presente Estudo	H3
Paralelepipedo	-	Sorocaba, São Paulo	Brasil (sul)	Presente Estudo	H4
Anta9545	-	Sorocaba, São Paulo	Brasil (sul)	Presente Estudo	H5
Anta2471	-	Sorocaba, São Paulo	Brasil (sul)	Presente Estudo	H5
Valente	-	Telemaco Borba, Paraná	Brasil (sul)	Presente Estudo	H5
Flora	-	Telemaco Borba, Paraná	Brasil (sul)	Presente Estudo	H5
Robinho	-	Foz do Iguaçu, Paraná	Brasil (sul)	Presente Estudo	H6
Antonello	-	Foz do Iguaçu, Paraná	Brasil (sul)	Presente Estudo	H7
GQ259928.1	GQ259928.1	Fronteira Colombia/Brasil	Fronteira Colombia/Brasil	(DE THOISY et al., 2010)	H7
GQ259929.1	GQ259929.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H7
Anta21002	-	Recife, Pernambuco	Brasil (sul)	Presente Estudo	H8
Batata	-	Foz do Iguaçu, Paraná	Brasil (sul)	Presente Estudo	H9
Adão	-	Araxá, Minas Gerais	Brasil (sul)	Presente Estudo	H10
Jerivá	-	São Carlos, São Paulo	Brasil (sul)	Presente Estudo	H11
GQ259910.1	GQ259910.1	Guiana Francesa	Guiana Francesa	(DE THOISY et al., 2010)	H12
GQ259911.1	GQ259911.1	Guiana Francesa	Guiana Francesa	(DE THOISY et al., 2010)	H12
GQ259912.1	GQ259912.1	Guiana Francesa	Guiana Francesa	(DE THOISY et al., 2010)	H12

ID	Genbank	Localidade	País	Artigo	H
Tapirusterrestris2	-	Suriname	Suriname	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H12
GQ259913.1	GQ259913.1	Guiana Francesa	Guiana Francesa	(DE THOISY et al., 2010)	H13
GQ259914.1	GQ259914.1	Bolivia	Bolivia	(DE THOISY et al., 2010)	H13
GQ259915.1	GQ259915.1	Guiana Francesa	Guiana Francesa	(DE THOISY et al., 2010)	H14
GQ259916.1	GQ259916.1	Equador	Equador	(DE THOISY et al., 2010)	H15
GQ259917.1	GQ259917.1	Equador	Equador	(DE THOISY et al., 2010)	H15
TapirusterrestrisE7	-	Cuyabeno	Equador	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H15
GQ259918.1	GQ259918.1	Equador	Equador	(DE THOISY et al., 2010)	H16
GQ259919.1	GQ259919.1	Equador	Equador	(DE THOISY et al., 2010)	H17
Tapirusterrestris26	-	Coca	Equador	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H17
Tapirusterrestris27	-	Rio Misahuallí, Napo	Equador	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H17
GQ259920.1	GQ259920.1	Guiana Francesa	Guiana Francesa	(DE THOISY et al., 2010)	H18
GQ259921.1	GQ259921.1	Equador	Equador	(DE THOISY et al., 2010)	H19
GQ259922.1	GQ259922.1	Equador	Equador	(DE THOISY et al., 2010)	H20
GQ259923.1	GQ259923.1	Venezuela	Venezuela	(DE THOISY et al., 2010)	H21
GQ259924.1	GQ259924.1	Venezuela	Venezuela	(DE THOISY et al., 2010)	H21
GQ259925.1	GQ259925.1	Venezuela	Venezuela	(DE THOISY et al., 2010)	H21
Tapirusterrestris28	-	Zulia	Venezuela	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H21
GQ259926.1	GQ259926.1	Colombia (leste)	Colombia	(DE THOISY et al., 2010)	H22
GQ259927.1	GQ259927.1	Peru (sudeste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H23
Tapirusterrestris46	-	Benjamin Constant, Amazonas	Brasil (norte)	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H23
Tapirusterrestris73	-	Tabatinga, Amazonas	Brasil (norte)	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H23
Tapirusterrestris83	-	Tabatinga, Amazonas	Brasil (norte)	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H23
GQ259930.1	GQ259930.1	Brasil (norte)	Brasil (norte)	(DE THOISY et al., 2010)	H24
GQ259931.1	GQ259931.1	Brasil (norte)	Brasil (norte)	(DE THOISY et al., 2010)	H25
GQ259932.1	GQ259932.1	Peru (sudeste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H26
GQ259933.1	GQ259933.1	Colombia (oeste)	Colombia	(DE THOISY et al., 2010)	H27
GQ259934.1	GQ259934.1	CoBr	Fronteira Colombia/Brasil	(DE THOISY et al., 2010)	H28
GQ259935.1	GQ259935.1	Colombia (leste)	Colombia	(DE THOISY et al., 2010)	H29
GQ259936.1	GQ259936.1	CoBr	Fronteira Colombia/Brasil	(DE THOISY et al., 2010)	H30
GQ259937.1	GQ259937.1	Brasil (norte)	Brasil (norte)	(DE THOISY et al., 2010)	H31
GQ259938.1	GQ259938.1	Bolivia	Bolivia	(DE THOISY et al., 2010)	H32
GQ259939.1	GQ259939.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H33
Tapirusterrestris26	-	Amboro, Santa Cruz	Bolivia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H33
Tapirusterrestris111	-	Lago Imiria, Ucayali	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H33
Tapirusterrestris106	-	Rio Pachitea, Tournavista	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H33
GQ259940.1	GQ259940.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H34
GQ259941.1	GQ259941.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H34

ID	Genbank	Localidade	País	Artigo	H
Tapirusterrestris10	-	Parque Nacional Bahujaja-Sonene, Puno	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H34
GQ259942.1	GQ259942.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H35
GQ259943.1	GQ259943.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H36
GQ259944.1	GQ259944.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H37
GQ259945.1	GQ259945.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H37
Tapirusterrestris4	-	Madre de Dios	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H37
GQ259946.1	GQ259946.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H38
GQ259947.1	GQ259947.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H38
GQ259948.1	GQ259948.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H39
GQ259949.1	GQ259949.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H40
GQ259950.1	GQ259950.1	Peru (leste)	Peru	(DE THOISY et al., 2010)	H41
GQ259951.1	GQ259951.1	Argentina	Argentina	(DE THOISY et al., 2010)	H42
GQ259952.1	GQ259952.1	Argentina	Argentina	(DE THOISY et al., 2010)	H43
GQ259954.1	GQ259954.1	Argentina	Argentina	(DE THOISY et al., 2010)	H44
Tapirusterrestris43	-	Amazonas	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H45
Tapirusterrestris42	-	Sierra Nevada de Santa Marta, Magdalena	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H46
Tapirusterrestris39	-	Puerto Inírida, Guainía	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H47
Tapirusterrestris59	-	Puerto Inírida, Guainía	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H48
Tapirusterrestris30	-	Zulia	Venezuela	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H49
Tapirusterrestris20	-	Iquitos, Loreto	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H50
Tapirusterrestris65	-	Rio Mesai, Caquetá	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H51
Tapirusterrestris21	-	Iquitos, Loreto	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H52
Tapirusterrestris12	-	Colombia	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H53
Tapirusterrestris11	-	Amazonas	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H54
Tapirusterrestris4	-	Santarem, Pará	Brasil (norte)	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H55
Tapirusterrestris3	-	Santarem, Pará	Brasil (norte)	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H56
Tapirusterrestris96	-	Rio Chimoré, Cochabamba	Bolivia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H57
Tapirusterrestris121	-	La Macarena, Meta	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H58
Tapirusterrestris120	-	La Macarena, Meta	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H59
Tapirusterrestris117	-	Tabatinga, Amazonas	Brasil (norte)	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H60
Tapirusterrestris116	-	Tabatinga, Amazonas	Brasil (norte)	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H61
Tapirusterrestris112	-	Hernandarias, Alto Paraná	Paraguai	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H62
Tapirusterrestris18	-	Mato Grosso do Sul	Brasil(sul)	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H62
Tapirusterrestris110	-	Iquitos, Loreto	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H63
Tapirusterrestris107	-	Rio Tambopata, Madre de Dios	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H64
Tapirusterrestris17	-	Mato Grosso do Sul	Brasil (sul)	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H65
Tapirusterrestris84	-	Bolivia	Bolivia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H66
Tapirusterrestris71	-	Tabatinga, Amazonas	Brasil (norte)	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H67
Tapirusterrestris76	-	Tabatinga, Amazonas	Brasil (norte)	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H68

ID	Genbank	Localidade	País	Artigo	H
Tapirusterrestris52	-	Sierra Nevada de Santa Marta, Magdalena	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H69
Tapirusterrestris52	-	Rio Beni, Beni	Bolivia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H70
Tapirusterrestris37	-	Rio Mamoré	Bolivia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H71
Tapirusterrestris48	-	Amazonas	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H72
Tapirusterrestris176	-	Tierralta, Córdoba	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H73
Tapirusterrestris82	-	Rio Curaray	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H74
Tapirusterrestris148	-	Caqueta	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H75
Tapirusterrestris147	-	Puerto Berrío, Antioquia	Colombia	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H76
Tapirusterrestris71	-	Atalaia do Norte, Amazonas	Brasil (norte)	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H77
Tapirusterrestris54	-	Chaco	Argentina	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H78
Tapirusterrestris10	-	Cabo Pantoja, Loreto	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H79
Tapirusterrestris11	-	Contamana, Loreto	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H80
Tapirusterrestris46	-	Tarapoto, San Martín	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H81
Tapirusterrestris53	-	Tarapoto, San Martín	Peru	(RUIZ-GARCÍA et al., 2015)	H82