

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

PAMELA KETRYA BARREIROS BAKER

**VARIABILIDADE DO GENE *DQB* DO COMPLEXO PRINCIPAL DE
HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) DE CLASSE II EM PEIXES-BOI-DA-
AMAZÔNIA (*Trichechus inunguis*, SIRENIA, MAMMALIA)**

Belém – PA

2015

PAMELA KETRYA BARREIROS BAKER

VARIABILIDADE DO GENE *DQB* DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) DE CLASSE II EM PEIXES-BOI-DA-AMAZÔNIA (*Trichechus inunguis*, SIRENIA, MAMMALIA)

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, da Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena.

Belém – PA

2015

PAMELA KETRYA BARREIROS BAKER

VARIABILIDADE DO GENE *DQB* DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) DE CLASSE II EM PEIXES-BOI-DA-AMAZÔNIA (*Trichechus inunguis*, SIRENIA, MAMMALIA)

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, da Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena (Presidente)

Profa. Dra. Maria Helena Thomaz Maia (Membro)

Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha (Membro)

Profa. Dra. Maria Paula Cruz Schneider (Membro)

Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos (Suplente)

Belém – PA

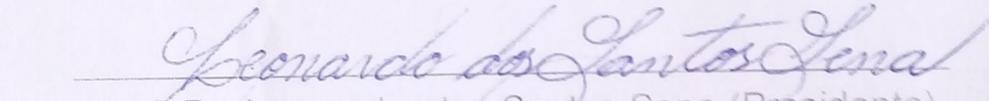
2016

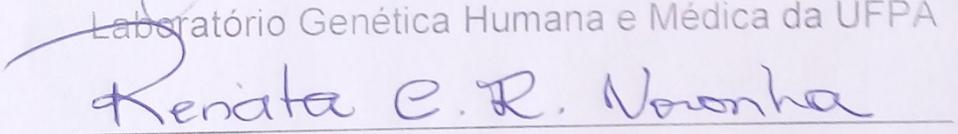
VARIABILIDADE DO GENE *DQB* DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) DE CLASSE II EM PEIXES-BOI-DA-AMAZÔNIA (*Trichechus inunguis*, SIRENIA, MAMMALIA)

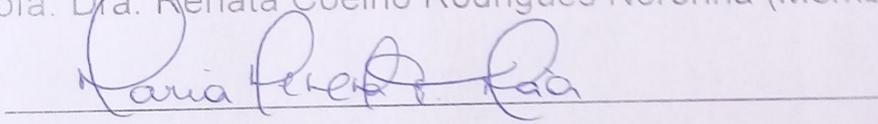
Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, da Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas.

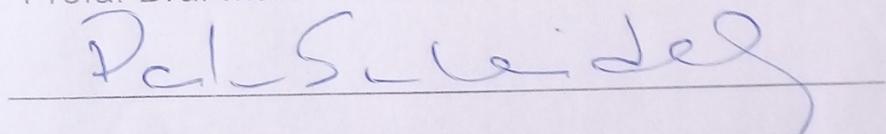
Data: 30 de março de 2016

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Leonardo, dos Santos Sena (Presidente)
Laboratório Genética Humana e Médica da UFPA


Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha (Membro)


Profa. Dra. Maria Helena Thomaz Maia (Membro)


Profa. Dra. Maria Paula Cruz Schneider (Membro)

Belém – PA

2016

VARIABILIDADE DO GENE *DQB* DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) DE CLASSE II EM PEIXES-BOI-DA-AMAZÔNIA (*Trichechus inunguis*, SIRENIA, MAMMALIA)

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, da Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas.

Data: 30 de março de 2016

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leonardo, dos Santos Sena (Presidente)
Laboratório Genética Humana e Médica da UFPA

Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha (Membro)

Profa. Dra. Maria Helena Thomaz Maia (Membro)

Profa. Dra. Maria Paula Cruz Schneider (Membro)

Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos (Suplente)

Belém – PA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Baker, Pamela Ketrya Barreiros, 1992-
Variabilidade do gene *dqb* do complexo principal de histocompatibilidade (*mhc*) de classe *ii* em peixes-boi-da-amazônia (*trichechus inunguis*, *sirenia*, *mammalia*) / Pamela Ketrya Barreiros Baker. - 2016.

Orientador: Leonardo dos Santos Sena.
Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências
Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Ecologia Aquática e Pesca, Belém, 2016.

1. Genética Animal. 2. Mamífero Aquático -
Amazônia. 3. Peixe-boi - Amazônia. I. Título.

CDD 22. ed. 591.35

Dedico essa dissertação a todos aqueles que acreditam no poder do conhecimento científico.

I see trees of green, red roses too.
I see them bloom for me and you.
And I think to myself,
“what a wonderful world!”

Bob Thiele e George David Weiss

What a Wonderful World (1967)

It takes all the running you can do, to keep in the same place.

Lewis Carroll

Through the Looking-Glass and What Alice Found There (1871)

AGRADECIMENTOS

Sendo otimista, a carreira acadêmica é semelhante à vida real em todos os âmbitos. Na vida real precisamos de suporte humano e sentimental para que nossa vida seja vivida de forma plena. São pessoas que constroem a vida que você vive e são pessoas que te ajudam a superar as dificuldades que esta vida também insiste em te impor. No período de realização deste projeto, a vida e a carreira me impuseram inúmeros fatores, e, por sorte, tive o prazer de ter as melhores pessoas ao meu lado para fazer com que eu vivesse e aprendesse com todas essas experiências. Durante o período em que estive desenvolvendo o projeto, e até mesmo antes desse período começar, obtive fundamental ajuda de atores que contribuíram massivamente para o desfecho desse ciclo.

Agradeço primordialmente à minha mãe, que mesmo sob todas as dificuldades em inúmeras situações, pôde me presentear com sua força e carinho quando eu mais precisei, ou seja, durante minha vida toda.

Ao Prof. Dr. Leonardo Dos Santos Sena, por ser um verdadeiro mestre em lições e benevolências, sendo o melhor orientador que qualquer aluno poderia pedir. Falando em sorte, acho que o acaso acertou em cheio na escolha de quem me indicar como exemplo.

Ao amigo e co-orientador não formal André Sá, que por tantas vezes abriu a chama que faltava para que enxergássemos o caminho entremeado de desafios sombrios e que, por vezes, parecia assustador.

À Profa. Dra. Maria Paula Cruz Schneider, por todo o empenho e estímulos vitais para a conclusão deste projeto. Poucos têm a vontade inata de produção científica que pude observar na convivência com esta profissional.

Ao amigo Davi César Santos, por tantos dias dedicados ao trabalho de bancada e pelo sucesso deste projeto. Pela boa vontade que sustentou durante longos meses de acertos e falhas na execução dos experimentos, bem como pelo bom humor que fez reinar em nosso contato diário com a ciência.

À Roberta Rezende pela ajuda com análises de dados e solicitude em dúvidas cotidianas.

Ao pesquisador Michael Criscitiello e sua equipe da Texas A&M University (TAMU), especialmente Bre Breux, pelo fornecimento de primers e dados de sequenciamento dos peixes-boi da Flórida, além de toda ajuda que foi necessária para o andamento do projeto.

À amiga Profa. Dra. Maria Helena Thomaz Maia, pelo incentivo científico e motivacional que por tantas vezes ofereceu a mim nos momentos difíceis. Por tantas dúvidas sanadas e pelo compartilhamento, sem hesitação, de conhecimento científico.

Ao Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA pelo apoio quanto à realização de boa parte das análises e por ser quase uma extensão familiar de suporte que tenho na UFPA.

Ao Alex Klautau e ao Kristian Legatzki, do Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Norte – CEPNOR, Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio), que foram essenciais na viabilidade da coleta e na própria coleta dos animais encontrados aqui.

Ao Jairo Moura de Oliveira, Sidcley, Ianny Rosse Gomes e Sidcley Pereira Matos, do Zoológico das Faculdades Integradas Tapajós – ZOOFIT, que cuidam com tanto carinho da maioria dos animais utilizados neste estudo. Sem a sua colaboração, definitivamente este trabalho não seria possível. Espero que nossos resultados possam ajudar na compreensão dos peixes-boi-da-amazônia e valorizar ainda mais o seu trabalho.

À Dra. Fabia Luna e à Dra. Fernanda Attademo, do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos –CMA, que sempre nos apoiaram e compartilharam conhecimento.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca – PPGEAP, por ser inequivocamente comprometida com seu corpo discente e magnífica na composição do seu corpo docente.

Logo, não poderia deixar de agradecer à própria Universidade Federal do Pará pelo apoio institucional e pelo incentivo à pesquisa básica que provê aos futuros cientistas.

Aos amigos Amanda Vieira, Pamella Russo, Amanda Nunes, Ester Benitah, Elana Benitah e tantos outros que ajudaram emocionalmente a esta pesquisadora que está nascendo para a ciência.

Certamente escreveria uma dissertação inteira minuciando a importância de todos os atores contribuintes dessa empreitada, mas limito-me a dizer que, sem vocês, nada do que aqui consta escrito poderia se tornar real. Obrigada!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	9
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O MHC.....	17
1.2. BREVE HISTÓRICO SOBRE O MHC	20
1.3. MOLÉCULAS DE CLASSE I.....	21
1.4. MOLÉCULAS DE CLASSE II.....	22
1.5. MAMÍFEROS AQUÁTICOS	23
1.5.1. Evolução.....	23
1.5.2. Peixe-boi (<i>Trichechus</i> spp.).....	24
1.5.3. Estudos genéticos em <i>Trichechus</i> sp.	26
1.5.4. Subespécies e hibridização em <i>Trichechus</i> sp.	27
1.6. IMUNOLOGIA GENÉTICA E ECOLÓGICA.....	28
1.8. OBJETIVOS.....	30
1.8.1. Objetivo Geral.....	30
1.8.2. Objetivos Específicos	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. AMOSTRAGEM	31
2.2. MÉTODOS LABORATORIAIS.....	32
2.2.1. Extração de DNA	32
2.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.....	32
2.2.3. Purificação dos Produtos de PCR.....	33
2.2.4. Sequenciamento dos produtos de PCR	33
2.2.5. Purificação dos produtos da reação de sequenciamento.....	34
2.2.6. Clonagem dos produtos da PCR de indivíduos heterozigotos	34
2.3. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	35
2.3.1. Edição e alinhamento das sequencias nucleotídicas.....	35
2.3.2. Análise estatística das sequências nucleotídicas e de aminoácidos.....	35
2.3.3. Análise Filogenética.....	35

3. RESULTADOS	37
3.1. PADRÕES DE VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA	37
4. DISCUSSÃO	45
5 CONCLUSÕES	49
6 REFERÊNCIAS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação gráfica do HLA humano e as respectivas posições dos genes no braço curto do cromossomo 6, em humanos.....	19
Figura 2 - Representação gráfica de uma molécula de MHC de classe I.....	22
Figura 3 - Representação gráfica de uma molécula de MHC de classe II.....	23
Figura 4 - Distribuição de Sirenia no mundo.	26
Figura 5 - Mapa com a localização em GPS do local de resgate de cada animal utilizado na pesquisa.	
Figura 6 - Gel de agarose (2%) utilizando fluorescência por brometo de Etídeo.....	35
Figura 7 - Median-joining network (MJN) de todos os haplótipos D-loop de <i>T. inunguis</i> , <i>T. manatus</i> e <i>T. senegalensis</i>	38
Figura 8 - Sequência de aminoácidos do éxon 2 de todos os alelos Trma-DQB (<i>Trichechus manatus</i>), Trin-DQB (<i>T. inunguis</i>), Loaf-DQB (<i>Loxodonta africana</i>), Oraf-DQB (<i>Orycteropus afer</i>) ELA-DQB (<i>Equus sp.</i>) e HLA-DQB e HLA-DQB1 (<i>Homo sapiens</i>).....	40
Figura 9 - Rede filogenética das sequências alélicas do éxon 2 de MHC-DQB de peixe-boi-da-Amazônia (Trin-DQB) e peixe-boi marinho (TrMa-DQB).....	43
Figura 10 - Árvore filogenética não enraizada, obtida pelo método Neighbor-joining, das sequências do éxon 2 de MHC-DQB de <i>T. inunguis</i> (Trin-DQB) e <i>T. manatus</i> (Trma-DQB).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista da localização de coleta e sexo dos animais resgatados pela ZOOFIT utilizados no presente estudo.....	29
Tabela 2 - Condições de temperatura e ciclos a serem utilizadas nas PCR para o gene <i>DQB</i> e mtDNA.....	330
Tabela 3 Primers utilizados nesse estudo com suas respectivas referências e sequências de nucleotídeos.....	331
Tabela 4 - Proporção de substituições sinônimas (d_s) e não-sinônimas (d_n), divergência nucleotídica e valores de diversidade nucleotídica para sequências do éxon 2 do MHC-DQB de <i>Trichechus inunguis</i> e <i>Trichechus manatus</i>	38

RESUMO

O peixe-boi-da-Amazônia (*Trichechus inunguis*) é um mamífero aquático herbívoro de água doce distribuído na Bacia Amazônica, e uma espécie da família Trichechidae, ordem Sirenia, cujos outros membros são o peixe-boi marinho (*T. manatus*) e o peixe-boi africano (*T. senegalensis*). Próximo à foz do Amazonas, *T. inunguis* e *T. manatus* supostamente hibridizam, o que foi revelado por citogenética, DNA mitocondrial (mtDNA) e dados de microssatélite. *T. inunguis* é uma espécie ameaçada cuja variabilidade genética em genes funcionais tem sido pouco acessada. O objetivo deste estudo foi estimar a variabilidade genética do éxon 2 de um locus *DQB* (classe II) pertencente ao Complexo Principal de Histocompatibilidade – MHC no peixe-boi-da-amazônia, cuja função principal quando traduzida é ligar peptídeos estranhos e apresentá-los a linfócitos T auxiliares, desempenhando um papel essencial no sistema imune adaptativo. Nove indivíduos de *T. inunguis* tiveram alelos *MHC-DQB* isolados usando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguida de clonagem em vetores PGEM-T e sequenciamento didesoxiterminal. Detectamos 13 alelos de *MHC-DQB* nas amostras analisadas e as comparamos com sequências *DQB* de peixe-boi marinho e outros mamíferos. Os alelos também mostraram forte evidência de seleção positiva na região de ligação a peptídeos, que também é uma ocorrência comum para alelos MHC. Um alelo *DQB* foi compartilhado entre ambas as espécies de peixe-boi, que tanto pode ser atribuído a polimorfismo transespecífico quanto a hibridização, e um elefante-africano-da-savana (*Loxodonta africana*) mostrou evidência de polimorfismo transespecífico. Recombinação intra-alélica parece ter desempenhado um importante papel na geração de diversidade genética no éxon 2 dos alelos de *DQB* de *T. inunguis*. Esperamos que alelos de *MHC-DQB* possam servir como marcadores genéticos úteis para *T. inunguis* e em que última instância possa lançar luz sobre resistência/susceptibilidade a patógenos nesta espécie no ambiente natural e em cativeiro, contribuindo para a sua conservação.

Palavras-chave: peixe-boi, peixe-boi-da-amazônia, MHC, *DQB*, *Trichechus inunguis*, variabilidade genética

ABSTRACT

The Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*) is a freshwater herbivore aquatic mammal distributed throughout in the Amazon Basin and a species of the family Trichechidae, order Sirenia, whose other members are the West-Indian manatee (*T. manatus*) and the West-African manatee (*T. senegalensis*). Close to the Amazon mouth, *T. inunguis* and *T. manatus* are supposed to interbreed, which has been revealed by cytogenetics, mitochondrial DNA (mtDNA) sequences and microsatellite data. *T. inunguis* is a threatened species whose genetic variability in functional genes has been poorly assessed. The aim of this study was to estimate the genetic variability of the exon 2 from a *DQB* locus (class II) of the Major Histocompatibility Complex – MHC in Amazonian manatee, whose main function when translated is to bind foreign peptides and present them to T helper lymphocytes, performing an essential role in the adaptive immune system. Nine individuals of *T. inunguis* had *MHC-DQB* alleles isolated using the Polymerase Chain Reaction (PCR), followed by cloning in pGEM T-vectors and dideoxyterminal sequencing. We detected thirteen alleles of *MHC-DQB* in the samples analyzed and compared them to West-Indian manatee and other mammals *DQB* sequences. The alleles also showed strong evidence of positive selection on the peptide binding region, which is common occurrence for MHC alleles. One *DQB* allele was shared among both manatee species, which may be due to either trans-species polymorphism or hybridization, and one African-bush elephant (*Loxodonta africana*) showed evidence of trans-species polymorphism. Intra-allelic recombination seem to play an important role in generating genetic diversity in the exon 2 of *DQB* alleles of *T. inunguis*. We hope that alleles of *MHC-DQB* may serve as a useful genetic marker for *T. inunguis* and that ultimately it will shed light on the pathogen resistance/susceptibility of this species in the wild and captivity, contributing to its conservation.

Key-words: Amazonian manatee. MHC, *DQB*, *Trichechus inunguis*, genetic variability

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O MHC

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) é um conjunto de genes que faz parte do sistema imune adaptativo, presente nos vertebrados, exceto em agnatos (Abbas et al. 2000; Frank 2002), que é responsável por codificar as moléculas que apresentam peptídeos não-próprios a células T (MHC Sequencing Consortium, 1999), sendo atrativo para estudos evolutivos comparativos devido à sua diversidade encontrada na maioria das espécies (Klein, 1986).

Com uma alta densidade gênica, o MHC (Figura 1) é dividido em três classes, sendo os genes da classe I responsáveis por codificar as moléculas de histocompatibilidade HLA-A, B e C, envolvidas na resposta a patógenos intracelulares, como os vírus; os de classe II codificam as moléculas HLA-DR, DQ e DP, lidando com patógenos extracelulares, como bactérias e parasitas; já os genes pertencentes à classe III, apesar de não codificarem moléculas específicas de apresentação, são enquadrados no complexo por codificarem moléculas C4 e C2 da via clássica e o fator B da via alternativa do sistema complemento e, ainda, os fatores responsáveis pela necrose tumoral (TNF- α e TNF- β), a proteína do choque térmico (Hsp 70) e as enzimas 21-hidroxilase, que não participam ativamente do sistema imune (MHC Sequencing Consortium, 1999).

Em mamíferos, a imunidade inata e a adaptativa são ativadas através de genes que regulam receptores de superfície celular. O MHC desenvolve papel central na resposta imune contra agentes externos, sendo o de classe I e II moléculas responsáveis por realizar a apresentação dos epítomos peptídicos aos receptores de células-T (TCR), dando início à resposta imune adaptativa, que garante a defesa do organismo à recorrência de uma infecção (Klein, 1986). Em geral, as populações grandes possuem polimorfismo abundante quanto a alguns loci do MHC, tendo alelos divergentes no primeiro e segundo éxons dos genes de MHC de classe I e no segundo éxon do MHC de classe II, divergência que é mantida nos alelos por alguma forma de seleção balanceadora (Bernatchez, 2003; Piertney & Oliver, 2006).

Cadeias de glicopeptídeos de classe II são altamente polimórficas em algumas espécies. Em especial, o éxon 2 das cadeias β , que inclui as regiões de ligação ao antígeno (Peptide Binding Region, PBR), que mostra altos níveis de variação genética em algumas espécies (Parham & Ohta, 1996), sendo assim as regiões mais estudadas (Otting et al., 2002; Musolf et al., 2004; Bos & DeWoody, 2005; Wegner et al., 2006). Os genes de classe II compreendem seis éxons e são expressas em células apresentadoras de antígeno profissionais (macrófagos, células B e células dendríticas), que apresentam peptídeos a células TCD4+, para então desencadear a resposta imune (Brown et al., 1993).

Em mamíferos placentários, existem cinco genes pertencentes ao MHC de classe II que codificam proteínas de ligação ao peptídeo: DQ, DR, DN, DO e DP, sendo o papel do DO o menos elucidado até agora (Beck & Trowsdale 1999). O MHC mais conhecido depois do humano é o de camundongo, seguido pelo bovino, devido à sua grande importância em saúde, pesquisa e economia, respectivamente. Em humanos, o MHC possui aproximadamente 4.000 kb (Figura 1) e está localizado no braço curto do cromossomo 6, sendo conhecido como a região mais variável do genoma (Horton et al., 2008).

Em populações pequenas ou em número reduzido pela ameaça de extinção, efeitos demográficos e deriva genética podem resultar na limitação da variabilidade do MHC, levando a um aumento da vulnerabilidade das espécies a patógenos e parasitas (O'Brien, 1988; Lochmiller, 1996). Embora conhecimentos acerca das variações de polimorfismos no MHC sejam evidenciados em algumas espécies de mamíferos como o Íbex-ibérico (*Capra pyrenaica*) (Amills et al., 2004) e a Vaquita (*Phocoena sinus*) (Munguia-vega et al., 2007), uma relação entre o nível de variação do Complexo e a condição de populações ou espécies ainda não foi demonstrada de forma convincente (Acevedo-Whitehouse & Cunningham, 2006). Por outro lado, estudos evidenciam espécies que também sofrem de estrangulamento populacional e mantêm níveis moderados a altos de variabilidade do MHC, como é o caso da Raposa-das-ilhas (*Urocyon littoralis*) (Aguilar et al., 2004) e do Golfinho-lacustre-chinês ou Baiji (*Lipotes vexillifer*) (Xu et al., 2012). Desse modo, a

história demográfica de uma espécie e o equilíbrio de seleção orientado por parasitas e patógenos pode, portanto, desempenhar um papel importante na definição do padrão de variação do MHC (Bernatchez, 2003; Piertney & Oliver, 2006; Yuhki & O'Brien, 1990; Edwards & Hendrick, 1998; Xu et al., 2012).

Entende-se, portanto, que o MHC é o conjunto de genes mais importante no genoma humano e de mamíferos placentários, com relação à resposta imune (Lechler & Warrens, 2000). Em peixe-boi (*Trichechus* spp.), estudos com genes relacionados ao MHC ainda não foram realizados. Apesar do pouco conhecimento a respeito dos patógenos que possam estar presentes em mamíferos aquáticos, acredita-se que, através da seleção natural, genes polimórficos tenham se mantido em uma dada população, incluindo os genes do MHC.

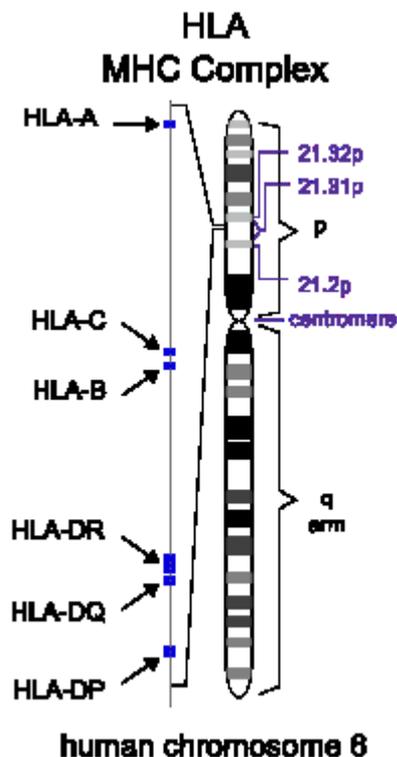


Figura 1- Representação gráfica do HLA humano e as respectivas posições dos genes no braço curto do cromossomo 6, em humanos. **Adaptado de Philip Deitiker (2009).**

1.2. BREVE HISTÓRICO SOBRE O MHC

Estudos sobre compatibilidade de tecidos enxertados em camundongos já eram realizados desde o século XX, onde, quando os doadores não eram gêmeos idênticos, o receptor rejeitava o enxerto. Gorer, em 1936, foi o primeiro pesquisador a estudar a base genética da rejeição: um grupo de genes que codificavam antígenos de grupos sanguíneos. Mas Gorer, em seus resultados, não pôde estabelecer uma relação entre a cascata de reações que levavam, esses antígenos identificados em seu trabalho, a desencadear a reação imunológica de rejeição no receptor. Snell (1948), entretanto, conseguiu descobrir em sua pesquisa que a rejeição era uma reação imunológica do receptor e que essa rejeição era causada pelo reconhecimento de células não-próprias ao organismo do receptor. Snell ainda revelou que esse mecanismo era desencadeado por células presentes na superfície das células do doador. Então, os genes identificados na pesquisa de Gorer, foram chamados por Snell de “genes de histocompatibilidade-2” ou H-2. Durante 14 anos, apenas o MHC de camundongo era conhecido e descrito.

Seguindo essa linha de pesquisa, Briles e seus colaboradores (1950) descreveram por completo os genes do MHC de galinha. Oito anos depois, Dausset (1958) descreveu os mesmos genes das pesquisas anteriores, os quais chamou de genes HLA, em humanos, especificamente em pessoas que haviam passado por transfusões sanguíneas. Dausset, Snell e Benacerraf ganharam mais tarde (1980) o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia por suas descobertas. Assim, o conhecimento sobre o MHC deteve-se em estudos com genes H-2 e HLA em humanos, sendo estes respectivamente de classe I e II. Comparando o MHC murino e o humano, temos uma antiga divergência evolutiva entre roedores e o restante dos mamíferos eutérios, logo o MHC murino é bastante distinto dos outros grupos de mamíferos estudados (cão, gato, coelho, porco, boi, cavalo, cabra, ovelha e outros primatas), que são bem semelhantes uns aos outros. Portanto, apesar dos amplos estudos sobre H-2, este não é um bom modelo para estudos com HLA, logo, desviando-se do conceito de paradigma para o MHC (Figuerola et al., 1990).

1.3. MOLÉCULAS DE CLASSE I

As glicoproteínas transmembranas chamadas de moléculas do MHC de classe I são responsáveis basicamente pelo reconhecimento do próprio e do não-próprio pelo indivíduo, dada a sua distribuição nas células de praticamente todos os tecidos. Através do retículo endoplasmático, essas moléculas migram para a superfície celular deixando expostos seus domínios extracelulares ligados ao peptídeo que, por sua vez, irão apresentar os peptídeos às células específicas de reconhecimento – Linfócitos T citotóxicos. Uma vez que essas células examinam a conformação da molécula de MHC classe I ligada ao peptídeo apresentado, estas realizam a identificação desse peptídeo como próprio ou não próprio, através de outra proteína transmembrana chamada de receptor de células T (ou TCR do inglês *T cell receptor*). Caso o peptídeo for avaliado como não próprio, a célula em questão irá ser destruída. A célula só realiza essa identificação do peptídeo do organismo invasor se a apresentação for mediada pela molécula de MHC de classe I (Kuby, 1997).

A molécula de MHC de classe I funcional é composta por dois polipeptídeos, a cadeia alfa, com os domínios citoplasmático, transmembranar, alfa 3, alfa 2 e alfa 1 – sendo que os antígenos são apresentados ligados aos domínios alfa 1 e alfa 2, onde encontramos as porções mais polimórficas (Figura 2); e a beta 2 microglobulina (que não é codificada no MHC) também faz parte da molécula de classe I, aparentemente com a função principal de estabilização (Figura 2).

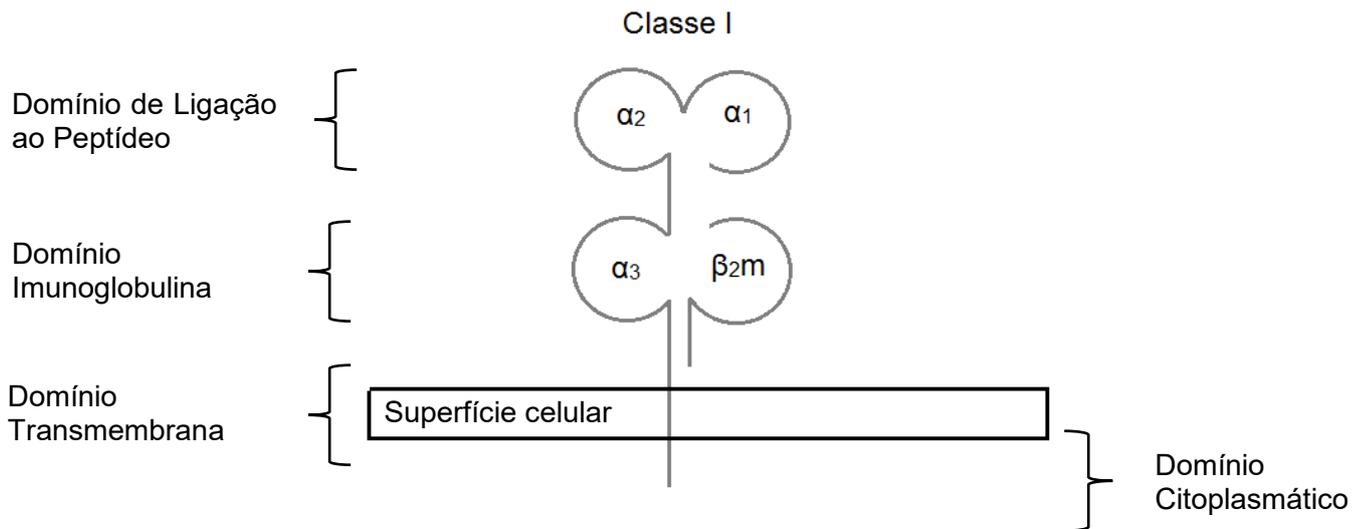


Figura 2 - Representação gráfica de uma molécula de MHC de classe I. Onde pode-se observar seis domínios (domínio de ligação ao peptídeo, domínio imunoglobulina, região transmembrana e domínio citoplasmático).

1.4. MOLÉCULAS DE CLASSE II

O reconhecimento do não-próprio com as moléculas de classe II acontece principalmente por meio das células apresentadoras de antígenos profissionais, àquelas que possuem a capacidade de fagocitose e endocitose de patógenos extracelulares. Quando um desses processos ocorre, esse patógeno é degradado dentro da célula, para poder, então, ser apresentado na superfície celular para as células chamadas de linfócitos T auxiliares (LTH ou T helper). Os polipeptídios se ligam às moléculas de MHC de classe II via lisossomo, onde são degradados e seguem em direção à membrana celular, onde, juntamente com a molécula de classe II serão apresentados às células LTH, dando início, assim, a uma série de eventos químicos em cascata, que por sua vez culminarão na ativação de células B, linfócitos T citotóxicos e macrófagos (Kuby, 1997). Sucintamente, a diferença básica entre moléculas de classe I e II está na forma com que essas moléculas são carregadas até a superfície celular e os tipos de peptídeos que elas são capazes de apresentar.

Sabe-se que o número de moléculas de MHC de classe I e II é relativamente baixo em cada indivíduo. Mas a alta variedade de moléculas, advindas de *loci* distintos, possuindo alelos distintos em cada um desses *loci*

torna a possibilidade de reconhecimento dos mais diversos peptídeos não-próprios ainda maior. O polimorfismo apresentado por um número maior de genes clássicos é responsável pelo grande número de moléculas estranhas que podem ser apresentadas aos linfócitos (Kuby, 1997). Sabemos que a maioria dos *loci* do MHC são polimórficos, porém sabe-se da existência de loci considerados como monomórficos e que por isso são chamados de *loci* não-clássicos, ou seja, monomórficos. Estes genes monomórficos ou pouco polimórficos, são genes caminhando para se tornarem pseudogenes (Edwards & Hedrick, 1998). Os genes chamados de clássicos, são conhecidos por serem mais expressos e mais polimórficos do que os não clássicos. Uma molécula funcional de classe II é formada por dois polipeptídeos, cadeia alfa e cadeia beta (Figura 3).

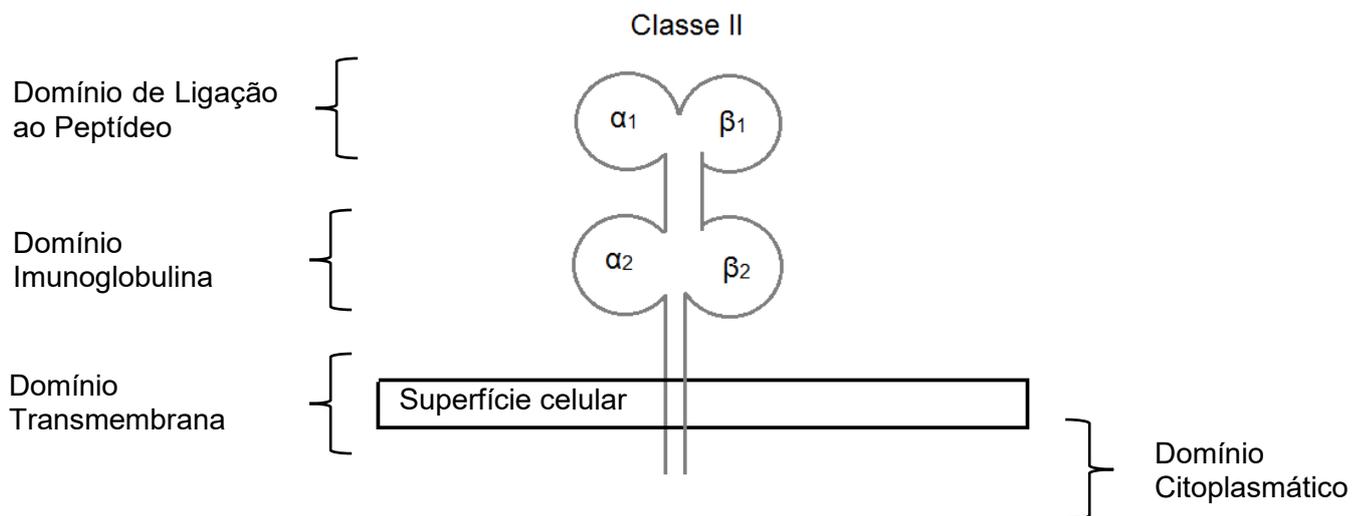


Figura 3 – Representação gráfica de uma molécula de MHC de classe II.

1.5. MAMÍFEROS AQUÁTICOS

1.5.1. Evolução

O período Holoceno, iniciado a cerca de 11.784 milhões de anos, após o fim da última era glacial principal, e que se estende até os dias atuais, foi importante na biologia evolutiva dos mamíferos aquáticos. Nesse período, estes animais – anteriormente terrestres – sofreram mudanças significativas em sua estrutura interna e externa para retornar ao ambiente aquático. Sendo bem adaptados à água, o grau de adaptação a este ambiente difere entre eles

(Meyer, 2000). Pinípedes, lontras e ursos polares são considerados “anfíbios”, diferente dos cetáceos (golfinhos e baleias) e sirênios (peixes-boi e dugongos), que são completamente aquáticos, ou seja, completam seu ciclo de vida na água (Berta et al., 2006). Sabe-se que os três grupos de mamíferos aquáticos marinhos – cetáceos, pinípedes e sirênios – tem evoluído de diferentes ancestrais comuns terrestres, os quais pertencem aos artiodátilos, carnívoros e proboscídeos, respectivamente (Gatesy & O’Leary, 2001; Flynn & Nedbal, 1998; Lavergne et al., 1996).

É provável que a independência do ambiente terrestre, além de ter trazido adaptações em estruturas morfológicas e na fisiologia, dieta e reprodução de peixes-boi, tenha transformado a necessidade de defesa contra micro-organismos patogênicos desses animais. Kennedy (1998) relata alguns tipos de infecção em mamíferos aquáticos, incluindo peixes-boi, mas somente para espécimes marinhos.

1.5.2. Peixe-boi (*Trichechus* spp.)

Os peixes-boi são mamíferos aquáticos de grande porte, conhecidos por manterem dieta exclusivamente herbívora (Best, 1982). Compondo a ordem Sirenia, esses animais pertencem às famílias Dugongidae e Trichechidae, tendo como representantes dugongos e peixes-boi, respectivamente. Dentro da família Trichechidae, um único gênero representa as duas espécies de peixes-boi conhecidas: *Trichechus inunguis* (Natterer, 1883) e *Trichechus manatus* (Linnaeus, 1758). Os indivíduos *T. manatus*, ainda, são classificados em duas subespécies: *T. manatus manatus* e *T. manatus latirostris*, de acordo com a sua área de ocorrência (Husar, 1977; 1978). Indivíduos de *T. manatus manatus* são encontrados desde a costa Sul dos Estados Unidos até a costa Nordeste do Brasil (Figura 4), tendo alguns espécimes de *T. manatus* sido observados no estuário amazônico, tolerando baixos níveis de salinidade e provavelmente coabitando com a espécie *T. inunguis* (Sousa, 2011). Os espécimes de *T. inunguis*, por sua vez, habitam somente ambientes de água doce (Sioli, 1984), distribuindo-se por todos os

afluentes da bacia amazônica (Figura 4), incluindo Peru, Colômbia e Equador (Best, 1982a, 1983, 1984).

Como já ocorreu com animais conhecidos como vacas de Steller (*Rytina*), representantes extintos da família Dugongidae que habitavam o Mar de Bering (Figura 4) nos anos de 1970 (Stejneger, 1887), os riscos de extinção são também evidentes sobre as espécies de peixe-boi. As espécies de *Trichechus* têm sofrido historicamente com pressões de caça e acidentes com embarcações no país (Domning, 1981). Como a maioria dos mamíferos, os peixe-boi são K estrategistas, preservando características de baixa taxa reprodutiva que, por sua vez, não garantem uma grande quantidade de prole, sendo gerado apenas um filhote por ano (Husar 1978; Bossart, 1999) com uma taxa de 1,4% dos nascimentos de gêmeos (Rathbun et al., 1995). Aliado à especificidade alimentar desses animais e a outros fatores relacionados à degradação de seu habitat, encalhes de filhotes e captura acidental em aparelhos de pesca, a International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), reconhece as espécies *T. inunguis* e *T. manatus* como um táxon vulnerável à extinção (Luna et al., 2012; Luna, 2013). Estimativas apontam para um número de aproximadamente 500 indivíduos vivendo na costa brasileira, que é considerado um número crítico de indivíduos (Luna, 2013).

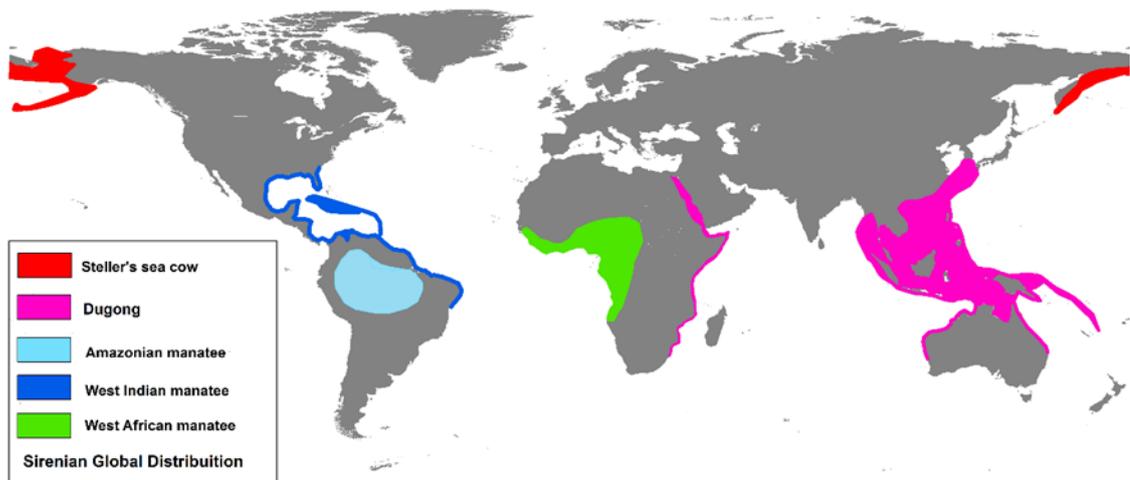


Figura 4 - Distribuição de Sirenia no mundo, onde em vermelho estão ilustradas as vacas marinhas, indivíduos já extintos. Adaptado de Bonde et al., 2012.

1.5.3. Estudos genéticos em *Trichechus sp.*

Estudos sobre o grau de heterogeneidade genética da população de peixes-boi na Flórida mostram que estes animais são praticamente homogêneos em relação a sua variabilidade genética (McClenaghan & O'Shea, 1988). Os autores dessa pesquisa descreveram ainda uma forte mistura interna entre as populações da península da Flórida, porém pouca variabilidade genética entre elas. Outros autores (Bradley et al. 1993) realizaram um estudo utilizando sequências da região do citocromo b do genoma mitocondrial, podendo assim evidenciar que três amostras dos animais possuíam o mesmo haplótipo. Garcia-Rodriguez et al. (1998) fizeram um estudo similar, centrando-se na região de controle do DNA mitocondrial (mtDNA), pois este segmento é caracterizado por acumular mutações em um ritmo mais rápido do que as sequências codificadoras, como é o caso do citocromo b, trazendo resultados mais específicos com o estudo de diversidade de mtDNA (Quinn 1992; Encalada et al. 1996).

Estudos genéticos mais recentes têm sido realizados ainda com mtDNA, microssatélites e outros marcadores neutros. Estas pesquisas tiveram como objetivo descrever padrões de biogeografia e relação entre táxons existentes e extintos de sirênios (Garcia-Rodriguez, 1998; Cantanhede et al., 2005; Vianna et al., 2006; Hunter et al., 2010; Nourisson et al., 2011). Sucintamente, estes resultados mostram que as populações existentes de

peixes-boi marinhos são geograficamente estruturadas, havendo uma separação entre os viventes na península da Flórida e das Antilhas daqueles espécimes habitantes das costas do Brasil e das Guianas. O tamanho populacional estimado por censo pode justificar a baixa diversidade genética que também é encontrada nos peixes-boi da costa brasileira. Diferindo de sua espécie irmã, o peixe-boi-da-Amazônia não aponta estruturação geográfica, apesar de sua ampla distribuição, e, segundo estudos com marcadores neutros, apresenta maior heterogeneidade genética (Cantanhede et al., 2005; Vianna et al., 2006; Luna, 2013).

1.5.4. Subespécies e hibridização em *Trichechus* sp.

A primeira classificação das subespécies de *T. manatus* foi realizada com base em características ósseas do crânio dos representantes de *T. manatus latirostris* e *T. manatus manatus* por Hatt & Lang (1934) e mais tarde confirmadas por Domning & Hayek (1986). Porém, esta mesma classificação foi questionada por Husar (1978), por não considerar suficientes as características morfológicas para a distinção de duas subespécies, e, mais tarde, por Garcia-Rodriguez et al. (1998), em estudo que mostrou evidências de compartilhamento de haplótipos de mtDNA entre população do peixe-boi da Flórida e as populações regionais que ocorrem nas Grandes Antilhas, como Porto Rico e República Dominicana. O último estudo publicado sobre essa discussão foi o de Hunter et al. (2012), o qual demonstra por evidências genéticas a existência da separação das subespécies já mencionadas.

Vianna et al. (2006) realizaram estudo abrangente acerca da hibridização de sirênios em várias partes do mundo com foco na conservação dos peixes-boi e, no Brasil, foi detectada a presença de indivíduos híbridos entre as espécies *T. inunguis* e *T. manatus* na foz do Rio Amazonas, também com base em estudos de marcadores neutros.

Indivíduos de *T. inunguis* são encontrados principalmente em água doce, porém há registros de ocorrência dos mesmos próximos à costa paraense (Domning, 1981; Luna, 2001). O complexo estuário paraense é considerado uma área simpátrica entre as duas espécies de peixe-boi, e

acredita-se que a hibridização possa ocorrer nesses locais, com dúvidas quanto ao valor adaptativo para as espécies (Vianna et al., 2006; Luna, 2013). Com estes fatos, podemos inferir que esteja ocorrendo introgressão genética entre esses animais e que esta pode não ser benéfica para os mesmos.

1.6. IMUNOLOGIA GENÉTICA E ECOLÓGICA

A imunologia ecológica basicamente reconhece a importância da variação entre indivíduos e também as complexas interações que determinam a história de vida de um organismo em seu ambiente natural (Schulenburg et al., 2009). Estudos relacionados a esta temática com peixes-boi deverão trazer informações essenciais de como patógenos e hospedeiros se relacionam na vida de um indivíduo numa escala evolutiva.

Testes iniciais de imunologia têm sido realizados baseados em técnicas utilizadas em humanos, logo a falta de conhecimento básico sobre a imunocompetência específica desses animais torna o diagnóstico pouco eficaz e inibe o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e terapêuticas, além de pouco contribuir com estratégias de manejo e conservação das espécies. Nos EUA foram realizados estudos sobre a imunologia de peixes-boi da Flórida, no intuito de conhecer melhor a biologia molecular desses animais para, assim, aplicar técnicas de manejo e conservação envolvendo os mesmos (Walsh & Luer, 2000). Além de estudos sobre posição filogenética e uso de ferramentas genômicas (Catanhede et al., 2005; Bonde et al., 2012; Luna et al., 2012; Luna, 2013), principalmente em animais em cativeiro, estudos sobre doenças infecciosas que podem ser portadas por ambas as espécies viventes no Brasil são de extrema relevância científica, bem como o entendimento de como o sistema imune desses animais evoluiu para adaptar-se a diferentes condições de habitat.

A saúde humana, de animais domésticos e selvagens podem estar interrelacionadas pelo compartilhamento de patógenos entre eles (Currier & Steele, 2011). Desse modo, é fundamental a aplicação do conhecimento sistêmico sobre essas doenças entre humanos e outros mamíferos, em especial os peixe-boi. A interação com parasitas e, mais do que isso, a co-evolução que permitiu a coexistência entre parasito e hospedeiro, necessitam

de análises detalhadas a respeito da diversidade desses parasitos e suas linhagens existentes, gerando assim conhecimento básico em saúde pública, incluindo percepções que podem ser adquiridas através da investigação interdisciplinar.

Brock et al. (2013) descrevem o que já tem sido feito no campo da imunologia ecológica e os vastos campos que ainda carecem de investigação por parte dos cientistas, dentre esses caminhos, investigações que permeiam a relação parasito/hospedeiro. Análises imunogenéticas de espécies-chave, como é o caso dos peixes-boi, que estão em grupos com poucos estudos filogenéticos, residem em ambientes subestudados e/ou ameaçados, possuem um grande grupo de profissionais focados na conservação e preservação de indivíduos tanto em ambiente natural como em cativeiro, e gozam de apoio público, podem levar a maiores avanços na imunologia ecológica.

Partindo das premissas já citadas, questiona-se quais as diferenças, em relação à resposta imune, entre organismos terrestres (Elefantes) e aqueles que voltaram ao ambiente aquático (peixes-boi)? E ainda, de que forma esses organismos aquáticos se adaptam, quanto ao seu sistema imune, à diversas condições de habitat, como água salgada e água doce?

Pergunta-se ainda, como a evolução e a pressão dos patógenos impulsionaram evolutivamente as espécies de mesmo gênero e isoladas geograficamente?

1.7. HIPÓTESES

H1: Espécies de peixe-boi mantém uma alta variabilidade no MHC de classe II comparadas às espécies de mamíferos terrestres.

H0: Espécies de peixe-boi apresentam baixa variabilidade no MHC de classe II comparadas às espécies de mamíferos terrestres.

1.8. OBJETIVOS

1.8.1. Objetivo Geral

Estimar a variabilidade genética em *T. inunguis* usando o éxon 2 de um locus *DQB* do complexo principal de histocompatibilidade.

1.8.2. Objetivos Específicos

- Descrever a variabilidade da região controle do mtDNA dos indivíduos de *T. inunguis* visando determinar sua variabilidade em um marcador neutro
- Descrever, através de sequenciamento do éxon 2 de alelos do locus *DQB* de um gene de MHC de classe II de *T. inunguis*;
- Analisar os padrões de substituição evolutiva nos sítios sinônimos e não sinônimos do éxon 2;
- Determinar a filogenia dos alelos e compará-la a outras espécies de mamífero

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAGEM

Foram coletadas 17 amostras de sangue de peixes-boi-da-Amazônia (*Trichechus inunguis*) provenientes do cativeiro das Faculdades Integradas do Tapajós – FIT, localizadas em Santarém. Os animais foram resgatados a partir de diversos pontos do Estado, ilustrados na figura 5 e detalhados na tabela 1. As amostras coletadas foram preservadas em EDTA a - 20 ° C até o momento da extração de DNA. De apenas nove amostras foi conseguido pelo menos uma sequência de *MHC-DQB*.

Tabela 2 - Lista da localização de coleta e sexo dos animais resgatados pela ZOOFIT utilizados no presente estudo. Em cinza, os animais dos quais pôde-se obter pelo menos uma sequência de *MHC-DQB*.

Número	Nome	Sexo	Local de resgate
1	Bolinha	Macho	Santarém
2	Chimanga	Fêmea	Alenquer
3	Iapará	Fêmea	Monte Alegre
4	Jarí	Fêmea	Santarém
5	Jaguararí	Macho	Santarém
6	Vitória	Fêmea	Não localizado
7	Araraú	Macho	Alenquer
8	Petro	Macho	Prainha
9	Tixa	Fêmea	Santarém
10	Marajó	Macho	Marajó
11	Pretinha	Fêmea	Monte Alegre
12	Hulck	Macho	Óbidos
13	João	Macho	Terra Santa
14	Sardinha	Macho	Marajó (Gurupá)
15	Guerreiro	Macho	Óbidos
16	Xis	Macho	Não localizado
17	Paloma	Fêmea	Não localizado



Figura 5 - Mapa com a localização em GPS do local onde cada animal foi resgatado no Estado do Pará.

2.2. MÉTODOS LABORATORIAIS

2.2.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi feita a partir de sangue total, sendo realizada com o kit de extração DNeasy Tissue & Blood (QIAGEN), seguindo as recomendações indicadas pelo fabricante. Os extraídos foram diluídos em água e armazenados novamente à -20°C até o momento da análise posterior.

2.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Para o isolamento e caracterização dos genes a técnica de PCR foi utilizada. As condições padrões para realização das reações foram adotadas conforme procedimento padrão, exceto pelas temperaturas de *annealing* que variam entre genes (Tabela 2). Como já testadas, as PCR foram realizadas com um volume final de 25 μl , contendo 2,5 μl de tampão de reação (10x), 0,8 μl de cada primer em concentração final de 0,5 μM na solução (Tabela 2), 0,5 μl de DNA, 1,0 μl de cloreto de magnésio (MgCl_2), 1,0 μl de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) e utilizando 0,5 μl de *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen Research) para realizar a amplificação dos segmentos desejados. A reação foi dissolvida em água até a quantidade final proposta. Os primers utilizados no isolamento dos fragmentos de D-loop e do éxon 2 do locus *DQB* de *Trichechus* sp. são mostrados na Tabela 3.

Tabela 2 - Condições de temperatura e ciclos a serem utilizadas nas PCR para o gene *DQB* e mtDNA.

Gene	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Annealing	Extensão	Nº de Ciclos	Extensão Final
<i>DQB</i>	94°C, 3 min	94°C, 1 min	60°C, 45 s	72°C, 1 min	40	72°C, 2 min
<i>mtDNA</i>	94°C, 3 min	94°C, 1 min	47°C, 45 s	72°C, 1 min	40	72°C, 2 min

Tabela 3 Primers utilizados nesse estudo com suas respectivas referências e sequências de nucleotídeos

Primer	Sequência 5'-3'	Posição	Referência
Trma – F	TCACCGCAGAGGATTTTCGTG	Éxon 2, 3	Autoria do grupo de pesquisa
Trma – R	CGACTCCTGGAGACTCAACC	Éxon 2, 3	Autoria do grupo de pesquisa
CR-5	TCACCATCAACACCCAAAGC	Região Controle (D-loop)	Cantanhede et al. 2005
CR-4	AGATGTCTTATTTAAGAGGAA	Região Controle (D-loop)	Cantanhede et al. 2005

2.2.3. Purificação dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose (contendo 50 ml de TEB 1x, 2% concentrado) adicionado de 2,5 µl do corante *GelRed* (Biotium®). Após a aplicação nos poços, o gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V durante trinta minutos. Em seguida, a banda desejada do produto amplificado foi visualizada sob luz ultravioleta e posteriormente cortada com lâmina estéril. Os fragmentos isolados foram, então, purificados utilizando kit de extração *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (PROMEGA), seguindo o próprio protocolo sugerido no *kit*. Após a obtenção do purificado das amostras, estimativas da concentração do produto amplificado foram realizadas por meio de espectrofotometria com o equipamento NanoDrop Lite (Thermo Scientific).

2.2.4. Sequenciamento dos produtos de PCR

O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado com o *kit* ABI PRISM™ *Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante, com leituras em sentido *forward* e *reverse*.

2.2.5. Purificação dos produtos da reação de sequenciamento

Os produtos das reações de sequenciamento foram purificados seguindo as colunas cromatográficas Micro Bio-Spin® P-30 Tris (Bio-Rad) também seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante.

2.2.6. Clonagem dos produtos da PCR de indivíduos heterozigotos

Quando a análise do cromatograma permitiu que se considerasse o indivíduo heterozigoto para o gene DQB, foi realizada a precipitação do produto purificado de PCR para eliminação de resíduos de sais e, então, posterior clonagem desse produto usando o kit pCR®II-TOPO® (Thermo Fisher Scientific) e todas as recomendações fornecidas pelo fabricante. Nas placas de cultivo de clones, foram selecionados 16 clones de cada amostra, totalizando 272 clones glicerolizados. A biblioteca foi mantida sob temperatura – 20° C até o momento da realização da MiniPrep, técnica que consiste em extrair o DNA dos plasmídeos outrora inseridos nas bactérias glicerolizadas. Após a MiniPrep, os fragmentos foram visualizados em gel de agarose à 2% adicionados de Brometo de Etídeo para a obtenção da fluorescência (Figura 6).

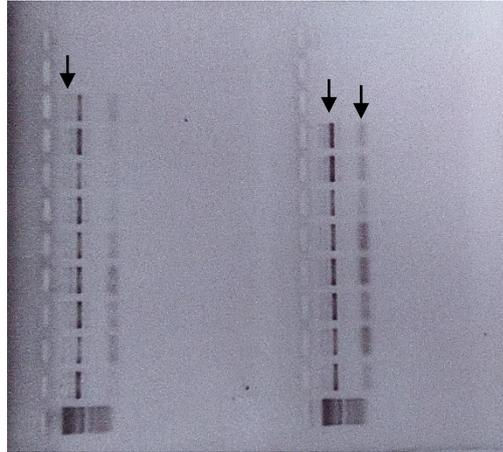


Figura 6 - Gel de agarose (2%) utilizando fluorescência por brometo de Etídeo. Na leitura feita da esquerda para a direita, a primeira seta mostra a banda mais fraca observada no gel indicando o DNA genômico da bactéria *Escherichia coli* usada para a clonagem, a segunda seta indica a banda mais intensa, onde observa-se material genético do plasmídeo inserido do fragmento desejado (Gene DQB), conforme indicado pela terceira seta, observamos a banda indicativa de RNA do plasmídeo. O ladder utilizado na leitura comparativa possui tamanho de 1 kb. As amostras estão distribuídas de 1 à 17.

2.3. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

2.3.1. Edição e alinhamento das sequências nucleotídicas

As sequências nucleotídicas obtidas do gene DQB e mtDNA foram editadas utilizando o programa Sequencher® versão 4.1. (Gene Codes Corporation©).

2.3.2. Análise estatística das sequências nucleotídicas e de aminoácidos

As análises estatísticas foram computadas no programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016, no prelo). Estimou-se a distância *pair-wise* pelo método Kimura 2-parâmetros. A significância estatística da análise foi calculada a partir de um teste *t* simples com número infinito de graus de liberdade, onde obteve-se o valor de Z.

2.3.3. Análise Filogenética

A reconstrução filogenética foi utilizada com o intuito de mostrar a relação que os alelos mantêm a partir das análises das sequências nucleotídicas. O método *neighbour-joining* foi adotado para tal, sob o auxílio do programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016, no prelo). Esse método parte do princípio que não há recombinação intra-alélica.

Uma análise filogenética que permite que a recombinação possa ser assumida pode ser conseguida com a reconstrução de redes filogenéticas. Para isso, utilizamos o programa SPLITSTREE4 (Huson & Bryant, 2006).

3. RESULTADOS

3.1. PADRÕES DE VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA

O alinhamento completo compreendeu um total de 134 sequências de D-loop, desses, 118 foram acessados a partir do banco de dados GenBank, dos quais 77 sequências pertencentes a *T. inunguis*, 35 de *T. manatus* e cinco a *T. senegalensis*. Optou-se por manter 490 pb para as análises a partir das sequências obtidas, em contraste com os dados disponíveis em Vianna et al. (2006), que usou um fragmento de comprimento de 410 pb, pois as terminações 3' e 5' excluídas também continham sítios polimórficos que poderiam ser usados para diferenciar os indivíduos. Duas sequências de animais encontrados no município de Monte Alegre - PA eram idênticas, bem como duas na Ilha de Marajó - PA.

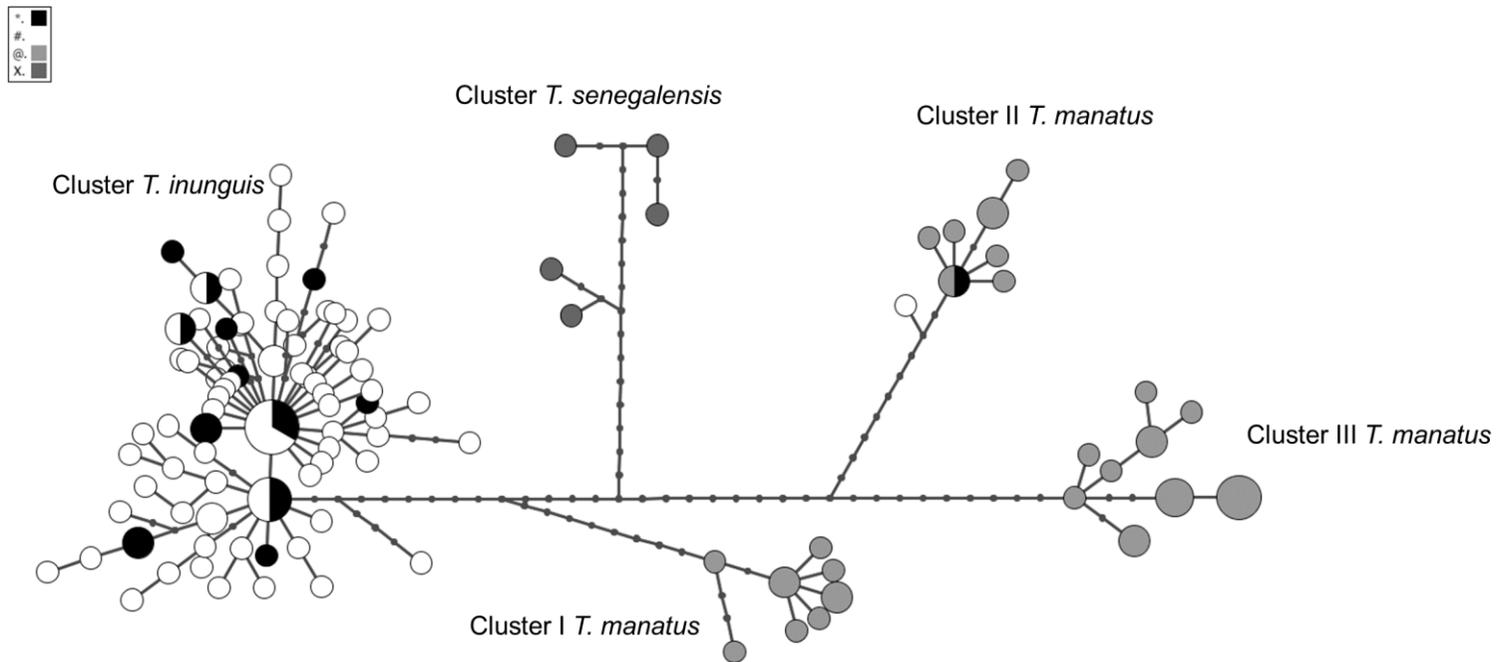


Figure 1 Baker et al. (2016)

Figura 7- Median-joining network (MJN) de todos os haplótipos D-loop de *T. inunguis*, *T. manatus* e *T. senegalensis*. Círculos escuros correspondem a haplótipos de *T. inunguis* obtidos no presente estudo; círculos brancos são D-loops encontradas no GenBank para *T. inunguis*; em cinza claro, haplótipos obtidos para *T. manatus*, formando três clusters distintos. Em cinza escuro, haplótipos de *T. senegalensis*. A área do círculo corresponde ao número de indivíduos que possui cada haplótipo.

Foram identificados 12 haplótipos típicos nas amostras de *T. inunguis* utilizadas neste trabalho. A reconstrução filogenética utilizando as sequências nucleotídicas para montagem da árvore MJN (Figura 7) ao longo dos haplótipos da região D-loop mostra que os haplótipos de *T. inunguis* do presente estudo agruparam com os haplótipos da mesma espécie obtidos da literatura, mostrando pouca variação, apesar da obtenção dos animais ter sido distribuída em diversos pontos diferentes no Estado do Pará. Também é observada a formação de três clusters entre os indivíduos de *T. manatus*, anteriormente descritos em Vianna et al. (2006).

A amostra identificada morfologicamente como *T. inunguis*, mas que possuía haplótipo de D-loop mais semelhante a *T. manatus* correspondeu a uma fêmea capturada na Ilha das Onças (apelidada de Paloma), arredores de Belém. Ela foi posteriormente liberada em local próximo de onde foi encontrada. Amostras de sangue adequadas para cariotipar esse espécime não foi coletado, assim como não conseguimos ainda obter dados sobre os seus alelos de MHC.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	94
	+ + +		+ + +	++	+	+ + +	+ + + +	+ +	++ ++ ++	
Trma-DQB*01	VQ	DKFLCYFTNG	TERVRLVYRD	IYNREEIVRF	DSDVGNFVAL	TPLGRPAAEY	WNSQKDILEE	YRAYVDTLCR	HNYRIEERFT	VQRR
Trma-DQB*02	..	G.....H.YA..	...M.EY...D...	.D...L...	K.....V..
Trma-DQB*03	..	G.....H.YA..	...EY...D...L...	K.....V..
Trin-DQB*01
Trin-DQB*02
Trin-DQB*03	..	Y.G.....E.YA..	...E...D...L...	N.....V..
Trin-DQB*04	..	Y.G.....E.YA..	...E...D...L...	H.....V..
Trin-DQB*05	..	G.G.....F.A.YA..	...EY...T...L...	H.....
Trin-DQB*06	..	G.G.....F.A.YA..	...EY...T...L...	H.....G...
Trin-DQB*07	..	S.G.....H.YA..	...EY...D...V..	VD.S..
Trin-DQB*08	..	H.N.G.....R.YA..	...EY...T...V..	VD.S..
Trin-DQB*09	..	Y.G.....F.A.HAH..	...EY...D...	R..E..V..
Trin-DQB*10	..	Y.G.....E.YYAH..	...E...	K R..E..V..
Trin-DQB*11	..	Y.G.....E.YYAH..	...E...	K R..E..V..
Trin-DQB*12YAH..	...E...	K R..E..V..
Trin-DQB*13	..	W.S.....F.A.YA..	...E...	K..V..V..	A.....
Loaf-DQB	A.	E.....E.YEH...D...	K.....S..
Oraf-DQB	F.	G.CR.F.I..KY.K.YM.V...	...DY.PV	.EV..RS...	.R...V..R	D..EL..V..	...Q..TFT.	FR.L
ELA-DQB	I.	L.G.....T.YW...	...EYR..	.EQ...D..D	.G...F..Q	T.....V..	...QV.AP..	W...
HLA-DQB	Y.	F.GM.....T.YYA..	...VYR.V	...P.D...EV..R	T..EL..V..	...QL.L.T.	L...
HLA-DQB1*0501	Y.	F.G.....G.T.HY...	...VYR.V	...Q...V...EV..G	A..S..RV..	...EVAY.GI	L...

Figura 8 - Sequência de aminoácidos do éxon 2 de todos os alelos Trma-DQB (*Trichechus manatus*), Trin-DQB (*T. inunguis*), Loaf-DQB (*Loxodonta africana*), Oraf-DQB (*Orycteropus afer*) ELA-DQB (*Equus* sp.) e HLA-DQB e HLA-DQB1 (*Homo sapiens*). Em destaque temos os alelos encontrados no presente estudo. Os pontos representam aminoácidos idênticos à primeira sequência. O sinal + equivale a PBS, segundo Brown et al. (1993).

Tabela 4 - Proporção de substituições sinônimas (d_S) e não-sinônimas (d_N), divergência nucleotídica e valores de diversidade nucleotídica para sequências do éxon 2 do MHC-DQB de *Trichechus inunguis* e *Trichechus manatus*. As análises são feitas considerando os alelos das espécies separadamente

Gene	N	$d \pm EP$	π	S	Total (270 pb)		PBR (72 pb)		Não-PBR (186 pb)	
					$d_N \pm EP$	$d_S \pm EP$	$d_N \pm EP$	$d_S \pm EP$	$d_N \pm EP$	$d_S \pm EP$
<i>Trma-DQB</i>	3	$0,037 \pm 0,010$	0,035	16	$0,051 \pm 0,015^{**}$	$0,000 \pm 0,000$	$0,106 \pm 0,041^{**}$	$0,000 \pm 0,000$	$0,030 \pm 0,014^*$	$0,000 \pm 0,000$
<i>Trin-DQB</i>	13	$0,057 \pm 0,009$	0,049	39	$0,073 \pm 0,018^{**}$	$0,014 \pm 0,006$	$0,214 \pm 0,067^{**}$	$0,031 \pm 0,018$	$0,024 \pm 0,010$	$0,009 \pm 0,007$

d = distâncias médias estimadas entre as sequências usando Kimura 2-parâmetros, EP = erro padrão; π = diversidade nucleotídica; S = sítios segregantes; PBR = região de ligação ao peptídeo; d_N e d_S média de substituições não-sinônimas e sinônimas, respectivamente, estimadas usando o método de Nei-Gojobori (Jukes-Cantor);. *Taxa d_N/d_S significativa ($P < 0.01$); **Taxa d_N/d_S significativa ($P < 0.001$)

As análises das proporções d_N/d_S entre *T. inunguis* e *T. manatus*, mostram evidência de seleção positiva, com o número de substituições não sinônimas mostrando-se mais alto, mesmo quando a sequência é vista como um todo (Tabela 4). Mesmo realizando a análise dos alelos de peixes-boi-da-Amazônia sem *Trin-DQB*01* e **02*, que parecem bem divergentes e próximos de *T. manatus*, ainda assim os valores de d_N permanecem altos. Os três alelos de peixe-boi marinho são provenientes da análise de dois indivíduos da espécie *T. manatus*; assim, não consideramos que este seja o número real de alelos dessa espécie.

Optamos por mostrar duas análises filogenéticas. A rede filogenética tem por princípio a possibilidade da recombinação alélica ou conversão gênica, o que não ocorre na árvore filogenética. Assim, podemos ver na rede filogenética (Figura 9) a presença de bordas paralelas ligando os alelos, evidência de recombinação ou conversão gênica durante a formação das sequências. O arranjo da rede parece mais na forma de estrela, sem que ramos longos individualizados sejam evidentes, mesmo nos alelos característicos de *T. manatus*.

A árvore filogenética (Figura 10), embora não acomode a recombinação ou conversão gênica como possibilidade, permite que sejam comparadas sequências de espécies mais distantemente relacionadas, como o elefante-da-savana africano (*Loxodonta africana*). Oryctéropo (*Orycteropus afer*, chamado em inglês de *aardwark*), cuja sequência de aminoácidos de DQB é mostrada na Figura 8, quando adicionado em ambas as análises filogenéticas mostrou ser um ramo muito divergente (Figuras 9 e 10), compatível com lócus diferentes (dados não mostrados).

0.01

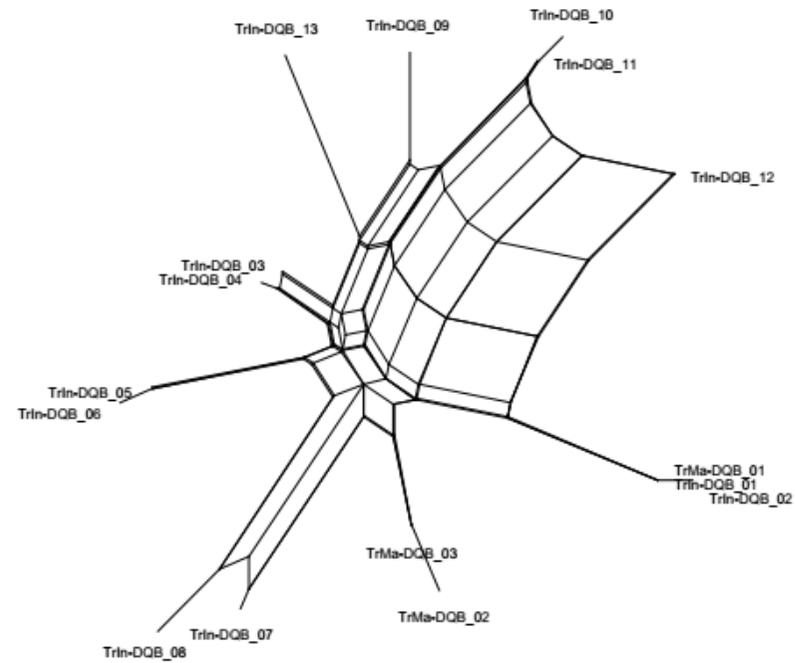


Figura 9 - Rede filogenética das sequências alélicas do éxon 2 de MHC-DQB de peixe-boi-da-Amazônia (*Trin-DQB*) e peixe-boi marinho (*TrMa-DQB*). A rede foi construída a partir do método Kimura 2-parâmetros com o programa Splits Tree.

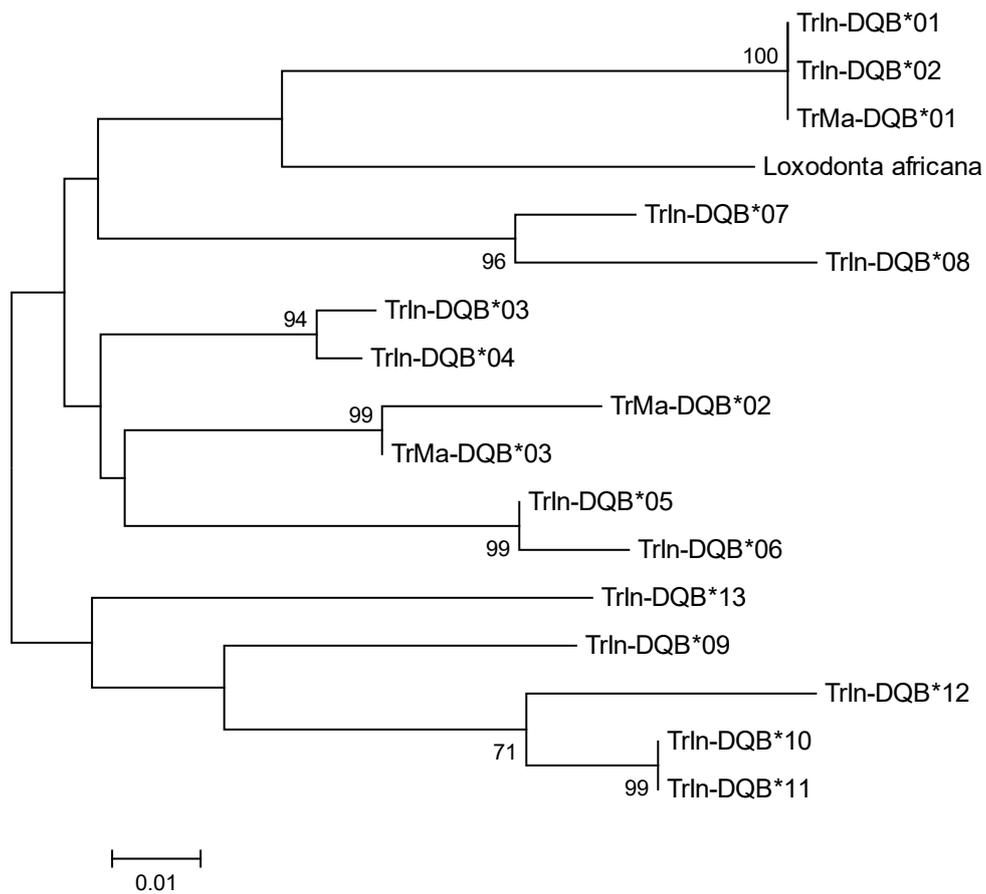


Figura 10 - Árvore filogenética não enraizada, obtida pelo método Neighbor-joining, das sequências do éxon 2 de MHC-DQB de *T. inunguis* (*TrIn-DQB*) e *T. manatus* (*TrMa-DQB*). A análise estatística foi feita a partir do método Kimura 2-parâmetros e a robustez da análise foi testada com 2000 pseudo-réplicas de *bootstrap*.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram descritos 13 alelos de um locus DQB do MHC de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*). Assinaturas de seleção positiva nos sítios de ligação ao antígeno são evidentes quando os alelos são comparados. Três alelos, descritos para o peixe-boi marinho da Flórida, mostram que há alelos semelhantes entre as duas espécies, o que pode ser, tanto evidência de polimorfismo transespecífico quanto a possibilidade de esse compartilhamento ser devido ao processo de hibridização que ocorre entre as espécies de peixe-boi marinho e da Amazônia.

Os peixes-boi da Amazônia utilizados neste estudo não haviam tido sequências de DNA mitocondrial previamente analisadas. No entanto, essas sequências devem ser determinadas por duas razões: uma estimativa inicial da variabilidade genética presente na população ou a presença de animais híbridos. Com uma exceção, os animais deste estudo tiveram sua sequência similar às já descritas como características da espécie *T. inunguis*, que no geral mostram pouca variação e uma árvore de haplótipos caracterizada por expansão populacional. Infelizmente, do espécime que poderia ser caracterizado como híbrido (Paloma), capturada e liberada na Ilha das Onças, por questões técnicas apenas um alelo pode ser sequenciado.

Os alelos de MHC-DQB descritos neste estudo mostraram taxas de substituição não-sinônimas mais altas na região PBR (Tabela 4), o que é evidência de seleção positiva nesses códons, cuja explicação mais comum seria a vantagem que indivíduos heterozigotos (Doherty & Zinkernagel 1975; Hughes & Nei 1988, 1989) ou seleção dependente de frequência ou vantagem de alelos raros (Slade & McCallum 1992), mas que em última instância elevaria o número de patógenos reconhecidos pelo sistema imune dos indivíduos, aumentando sua resistência a doenças infecciosas. Essa é uma característica que tem sido comumente observada nos organismos que tiveram alelos de MHC descritos, a ponto de em espécies onde essa variação não ocorre serem considerados em situação crítica com relação à sua sobrevivência (Miller et al, 2010). No caso dos mamíferos aquáticos que passam sua vida em tempo integral na água, os cetáceos são um grupo que apresenta estudos que permitem uma comparação com os sirênios. De fato, resultados variáveis, mas que apontam em alguns casos para um baixo

número de alelos de MHC, são observados em cetáceos (Zhang et al., 2016), ainda que uma redução na variabilidade do MHC não tenha sido comprovada como uma ameaça à sobrevivência de espécies de vertebrados (Radwan et al., 2010). Comparados aos peixes-boi desse estudo, podemos dizer que pelo menos para o locus DQB há evidência de variabilidade semelhante à encontrada em outros mamíferos terrestres, já que tivemos 12 alelos em nove indivíduos.

É importante ressaltar, no entanto, de que há evidências, nas próprias sequências de aminoácido quando comparamos os alelos entre si e no baixo número de substituições sinônimas, tanto em códons PBR quando em não-PBR, que a recombinação ou conversão gênica parece desempenhar papel importante na diversidade dos alelos encontrados em peixe-boi, o que tem sido demonstrado em outros organismos (Garrigan & Edwards, 1999; Martinsohn et al, 1999). Mesmo se compararmos as sequências presentes em peixe-boi marinho, embora três alelos apenas tenham sido descritos, que não há substituição sinônima entre eles. É difícil não especular que, pelo menos para esse último caso, nos peixes-boi marinhos da Flórida (Vianna et al., 2006), que possuem apenas um haplótipo de D-loop, a pressão pela manutenção de diversidade em MHC não possa ter levado a pressões seletivas que favorecessem a permanência de alelos diversificados, e que uma forma de “fabricar” esses alelos mais rapidamente não fosse por recombinação. Nos animais amazônicos, a recombinação parece ter sido importante, como pode ser visualizado também na rede filogenética.

A análise filogenética dos alelos DQB de peixe-boi da Amazônia mostram que todos são proximamente relacionados e que um dos alelos descritos para esta espécie é idêntico a outro descrito para o peixe-boi marinho da Flórida. Este resultado poderia ser resultado de polimorfismo transespecífico, também uma ocorrência comum em genes do MHC (Arden & Klein, 1982; Cruetera & Lacey, 2007), ou compartilhamento por hibridização (Vianna et al., 2006). De fato, a ocorrência de híbridos entre as duas espécies próximas à foz do Amazonas parece apontar para a hibridização como a melhor explicação para este fato, já que não há substituições sinônimas entre as sequências. No entanto, se essa hipótese for a verdadeira, ela encerra mais duas constatações. Primeiro de que haplótipos de MHC de peixes-boi da

Amazônia foram adquiridos a partir de peixes-boi marinhos e que pelo menos um deles é idêntico ao de um animal da Flórida, ou seja, em termos de alelos de MHC talvez as populações de peixes-boi marinho sejam menos diferenciadas entre si – ainda que isso deva ser testado pelo estudo de animais da América Central. Segundo, como o animal que possui esse alelo foi encontrado nas imediações de Santarém como um macho adulto, é provável que ele tenha ancestrais na foz do Amazonas, cuja mãe ou o pai poderia ser descendente de um indivíduo híbrido, e que talvez o deslocamento dos machos pelo Rio Amazonas possa se dar por distâncias relativamente longas – e mais alelos de MHC semelhante a alelos de animais marinhos possam ser encontrados em animais espalhados pela Bacia Amazônica.

Um caso de polimorfismo transespecífico evidente é encontrado com a presença de um alelo de elefante entre os de peixes-boi, ainda que sua sequência de aminoácidos não seja idêntica à de nenhum peixe-boi analisado até agora. Isso parece demonstrar a relação filogenética entre elefantes e peixes-boi, ambos afrotérios. O alelo *DQB* do afrotério *Orycteropus afer* mostrado na árvore filogenética, por outro lado, possui uma sequência tão divergente que provavelmente não se trata de um alelo de um gene homólogo ao sequenciado em peixes-boi, ou seja, seria um outro locus *DQB* bem mais divergente, ou mesmo pode se tratar de uma atribuição errada quando da montagem do genoma dessa espécie e pertencer a um outro gene de classe II.

A presença de alelos de D-Loop diferenciados por poucas mutações pontuais não permite uma ideia clara da diversidade genética desses animais, mas já demonstram uma forma de amostrar sua diversidade genética superior ao mtDNA. Assim, os alelos de MHC permitem uma melhor ideia da diversidade genética dos peixes-boi da Amazônia e também podem ser mais claramente associados a estados de ancestralidade comum, sem ser vistos como possíveis convergências, diferente, como é o caso dos microssatélites (Vianna et al., 2006).

Um mapeamento dos alelos de MHC dos peixes-boi da Amazônia poderia em princípio ajudar em distinguir subpopulações na Amazônia se elas

existirem, e contribuir para indicar áreas de reintrodução desses animais (Bonde et al., 2012; Marsden et al., 2013). Ademais, estudos com a variabilidade do MHC têm a clara vantagem de relacionar alelos específicos com resistência a patógenos ou indiretamente revelar se os ambientes, principalmente o de água doce e o marinho, diferem entre si na prevalência de determinados patógenos.

5 CONCLUSÕES

- Os peixes-boi-da-Amazônia estudados mostraram 13 alelos de *MHC-DQB* em nove indivíduos, representando variabilidade no MHC;
- Dois indivíduos de peixe-boi marinho analisados tiveram três alelos diferentes;
- Pelo menos um alelo idêntico foi compartilhado entre peixe-boi-da-Amazônia e peixe-boi marinho, o que pode ser evidência de polimorfismo transespecífico ou hibridização, a última delas podendo estar interferindo de forma positiva ou negativa para a conservação das espécies
- Houve evidência de seleção positiva para os alelos de ambas as espécies, mostrando que a seleção natural está mantendo os alelos vantajosos para a espécie
- Embora não compartilhando alelos idênticos, há semelhança entre um alelo de elefante africano-da-savana (*Loxodonta africana*) e alguns alelos de *MHC-DQB* de peixe-boi, evidenciando que os mesmos compartilham convergências evolutivas quanto ao seu sistema imune;
- A recombinação inter-alélica parece ter sido importante para a diversificação dos alelos de *MHC-DQB* de peixe-boi;
- Com os dados disponíveis, não foi possível associar variação na molécula de MHC à variação nos haplótipos de D-loop.

6 REFERÊNCIAS

- ABBAS A. K., LICHTMAN A. H., POBER J. S. (2000) Cellular and molecular immunology. *W.B. Saunders Company*, Philadelphia.
- ACEVEDO-WHITEHOUSE, K. & CUNNINGHAM, A. (2006). Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? **Trends in Ecology and Evolution** 21:433-438.
- AGUILAR, A., ROEMER, G., DEBENHAM, S., BINNS, M., GARCELON, D., & WAYNE, R. K. (2004). High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101(10), 3490-3494.
- AMILLS, M., JIMÉNEZ, N., JORDANA, J., RICCARDI, A., FERNANDEZ-ARIAS, A., GUIRAL, J., ... & SÁNCHEZ, A. (2004). Low diversity in the major histocompatibility complex class II DRB1 gene of the Spanish ibex, *Capra pyrenaica*. **Heredity**, 93(3), 266-272.
- ARDEN B, KLEIN J (1982) Biochemical comparison of major histocompatibility complex molecules from different subspecies of *Mus musculus*: evidence for trans-specific evolution of alleles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 79:2342–2346
- BECK S, TROWSDALE J (1999) Sequence organisation of the class II region of the human MHC. **Immunol Rev** 167:201–210
- BERNATCHEZ L, Landry C (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J Evol Biol* 16: 363–377.
- BERTA, A., SUMICH, J. L., & KOVACS, K. M. (2005). Marine mammals: evolutionary biology. *Academic Press*.
- BEST, R. C. (1982a). Seasonal Breeding in the Amazonian Manatee, *Trichechus inunguis* (Mammalia). **Biotropica**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.76-78. JSTOR. DOI: 10.2307/2387764.
- BEST, R.C. (1982b) Foods and feeding habits of wild and captive Sirenia. **Mammal Review**, 11: 3-29.
- BEST R. C. (1983) Apparent dry-season fasting in Amazonian manatees (Mammalia: Sirenia). **Biotropica**, 15: 76-78.
- BEST R. C. (1984). The aquatic mammals and reptiles of the Amazon. In: The Amazon limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin (ed. Sioli H), pp. 371-412.
- BOS D. H., DEWOODY J. A. (2005). Molecular characterization of major histocompatibility complex class II alleles in wild tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). **Immunogenetics** 57:775–781
- BONDE R.K., MCGUIRE P.M., HUNTER M.E. (2012) A review of the key genetic tools to assist imperiled species conservation: analyzing West Indian manatee populations. *Journal of Marine Animals and Their Ecology* 5: 8-19.
- BOSSART, G. D. (1999) The Florida Manatee: On the verge of extinction? *Journal Of The American Veterinary Medical Association* 214: 1178–1183
- BRADLEY J. L., WRIGHT S. D., MCGUIRE P. M. (1993) The Florida manatee: cytochrome b DNA sequence. **Marine Mammal Science**, 9, 197-202.
- BRILES, W. E., MCGIBBON, W. H., & IRWIN, M. R. (1950). On multiple alleles effecting cellular antigens in the chicken. **Genetics**, 35(6), 633.
- BROCK P. M., HALL A. J., GOODMAN S. J., CRUZ M., ACEVEDO-WHITEHOUSE K. (2013) Applying the tools of ecological immunology to conservation: a test case in the Galapagos sea lion. **Animal Conservation**, 16: 19-31.
- BROWN, J. H., JARDETZKY, T. S., GORGA, J. C., STERN, L. J., URBAN, R. G., STROMINGER, J. L., & WILEY, D. C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature-LONDON**, 364, 33-33.

- CANTANHEDE A.M., DA SILVA V.M., FARIAS I.P., HRBEK T., LAZZARINI S.M., ALVES-GOMES J. (2005) Phylogeography and population genetics of the endangered Amazonian manatee, *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia, Sirenia). **Molecular Ecology**, 14: 401-413.
- CUTRERA, A. P., LACEY, E. A. (2007) Trans-species polymorphism and evidence of selection on class II MHC loci in tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Immunogenetics* 59:937–948
- CURRIER, R. W., & STEELE, J. H. (2011). One Health—One Medicine: unifying human and animal medicine within an evolutionary paradigm. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1230(1), 4-11.
- DOMNING, D. P. (1981) Distribution and status of manatees *Trichechus* spp. near the mouth of the Amazon River, Brazil. *Biological Conservation*, v. 19, p. 85-97.
- DAUSSET, J. (1958). Iso-leuco-anticorps. **Acta haematologica**, 20(1-4), 156-166.
- DOHERTY P. C., ZINKERNAGEL R. M. (1975) Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. **Nature** 256:50–52
- DOMNING, D. P., HAYEK, L. (1986) Interspecific and intraspecific morphological variation in manatees (Sirenia: Trichechidae). **Marine Mammal Science**, 2, 87–141.
- EDWARDS S. V., HEDRICK P. W. (1998) Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. **Trends Ecol Evol** 13: 305–311.
- ENCALADA, S. E., LAHANAS, P. N., BJORNDAL, K. A., BOLTEN, A. B., MIYAMOTO, M. M., & BOWEN, B. W. (1996). Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. **Molecular Ecology**, 5(4), 473-483.
- FIGUEROA, F., GUTKNECHT, J., TICHY, H. & KLEIN, J. (1990) Class II MHC genes in rodent evolution. *Immunological Reviews* 113, 27-46.
- FRANK S. A. (2002) Immunology and evolution of infectious disease. Princeton University press, Princeton, **Oxford**.
- FLYNN, J. J. & NEDBAL, M. A. (1998) Phylogeny of the Carnivora (Mammalia): Congruence vs incompatibility among multiple data sets. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 9, 414–426.
- GARCIA-RODRIGUEZ A.I., BOWEN B.W., DOMNING D., MIGNUCCI-GIANNONI A., MARMONTEL M., MONTOYA-OSPINA A., MORALES-VELA B., RUDIN M., BONDE R.K., MCGUIRE P.M. (1998) Phylogeography of the West Indian manatee (*Trichechus manatus*): how many populations and how many taxa? **Molecular Ecology**, 7: 1137-1149.
- GARRIGAN, D. & Edwards, S. V. (1999) Polymorphism across an exon-intron boundary in an avian Mhc class II B gene. **Mol Biol Evol** 16:1599–1606
- GATESY, J. & O'LEARY, M. A. (2001) Deciphering whale origins with molecules and fossils. **Trends in Ecology & Evolution** 16, 562–570.
- GORER, P. A. (1936). The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *British journal of experimental pathology*, 17(1), 42.
- HATT, R. T.; LANG, H. (1934) A manatee collected by the American Museum Congo Expedition : with observations on the recent manatees. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 66, p. 533-566.
- HORTON, R., GIBSON, R., COGGILL, P., MIRETTI, M., ALLCOCK, R. J., ALMEIDA, J. ... BECK, S. (2008). Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: The MHC Haplotype Project. **Immunogenetics**, 60(1), 1–18. <http://doi.org/10.1007/s00251-007-0262-2>
- HUGHES, A. L. & NEI, M. (1988) Pattern of nucleotide substitution at MHC class I loci reveals overdominant selection. **Nature** 335:167–170

- HUGHES A.L. & NEI, M. (1989) Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 86: 958–962
- HUNTER M.E., AUIL-GOMEZ N.E., TUCKER K.P., BONDE R.K., POWELL J., MCGUIRE P.M. (2010) A low genetic variation and evidence of limited dispersal in the regionally important Belize manatee. **Animal Conservation**, 13: 592-602.
- HUNTER, M. E., MIGNUCCI-GIANNONI, A. A., TUCKER, K. P., KING, T. L., BONDE, R. K., GRAY, B. A., & MCGUIRE, P. M. (2012). Puerto Rico and Florida manatees represent genetically distinct groups. **Conservation Genetics**, 13(6), 1623-1635.
- HUSAR, S. L. (1977). The West Indian manatee (*Trichechus manatus*) (Vol. 7). US Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service.
- HUSAR S. L. (1978) *Trichechus manatus*. *Mammalian Species*, 93: 1-5.
- HUSON D.H. & BRYANT D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution** 23: 254-267.
- KENNEDY, SEAMUS (1998). Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Journal of comparative pathology*, 119(3), 201-225.
- KLEIN, J. (1986) Natural History of the Major Histocompatibility Complex. New York: John Wiley & Sons.
- KUBY, J. (1997) Immunology. 3rd. ed. W. H. Freeman and Company, New York.
- LAVERGNE, A., DOUZERY, E., STICHLER, T., CATZEFLIS, F. M. & SPRINGER, M. (1996) Interordinal mammalian relationships: evidence for paenungulate monophyly is provided by complete mitochondrial 12S rRNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 6, 245–258.
- LECHLER, R. & WARRENS, A. (2000) HLA in health and disease. Academic, 2000
- LOCHMILLER, R. L. (1996) Immunocompetence and animal population regulation. **Oikos** 76: 594–602.
- LUNA, F.O. (2001) Distribuição, status de conservação e aspectos tradicionais do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) no litoral norte do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 122p
- LUNA, F. O. (2013) Population genetics and conservation strategies for the West Indian manatee (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758) in Brazil. Recife, PE: Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco. Tese de Doutorado. 236p.
- LUNA F.O., BONDE R.K., ATTADEMO, F.L.N., SAUNDERS, J.W., MEIGS-FREIND G., PASSAVANTE, J.Z.O., HUNTER M.E. (2012) Phylogeographic implications for release of critically endangered manatee calves rescued in Northeast Brazil. *Aquatic Conservation: marine and freshwater ecosystems*.
- MARSDEN, C. D. et al. Pedigrees, MHC and microsatellites: an integrated approach for genetic management of captive African wild dogs (*Lycaon pictus*). **Conservation Genetics**, v.14, p. 171-183, 2013.
- MARTINSOHN, J. T. H., SOUSA, A. B., GUETHLEIN, L. A., HOWARD, J. C. (1999) The gene conversion hypothesis of MHC evolution: a review. **Immunogenetics** 50:168-200
- MCCLLENAGHAN LR JR, O'SHEA. TJ (1988) Genetic variability in the Florida manatee (*Trichechus manatus*). **Journal of Mammalogy**, 69, 481-488.
- MEYER, A. (2000). From donkeys and cows to whales. **Nature**, 406(6797) Book Reviews, 677–678. Retirado de: <http://dx.doi.org/10.1038/35021124>
- MILLER, H. C., ALLENDORF, F., DAUGHERTY C. H. (2010) Genetic diversity and differentiation at MHC genes in island populations of tuatara (*Sphenodon* spp.). **Molecular Ecology**. 19:3894–3908.

- MUNGUIA-VEGA, A., ESQUER-GARRIGOS, Y., ROJAS-BRACHO, L., VAZQUEZ-JUAREZ, R., CASTRO-PRIETO, A. & FLORES-RAMIREZ, S. (2007). Genetic drift vs. natural selection in a long-term small isolated population: major histocompatibility complex class II variation in the Gulf of California endemic porpoise (*Phocoena sinus*). **Molecular ecology**, 16(19), 4051-4065.
- MUSOLF, K., MEYER-LUCHT, Y., SOMMER, S. (2004). Evolution of MHC-DRB class II polymorphism in the genus *Apodemus* and a comparison of DRB sequences within the familie Muridae (Mammalia: Rodentia). **Immunogenetics** 56:420–426
- NOURISSON C., MORALES-VELA B., PADILLA-SALDÍVAR J., TUCKER K.P., CLARK A., OLIVERA-GÓMEZ L.D., BONDE R., MCGUIRE P. (2011) Evidence of two genetic clusters of manatees with low genetic diversity in Mexico and implications for their conservation. **Genetica**, 139: 833-842.
- O'BRIEN SJ, Evermann JF (1988) Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. **Trends Ecol Evol** 3: 254–259.
- OTTING N., DE GROOT N., DOXIADIS G., BONTROP R. (2002). Extensive Mhc-DQB variation in humans and non-human primate species. **Immunogenetics** 54(4):230–239
- PARHAM P, OHTA T (1996) Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* 272:67–74.
- PIERTNEY, S. B., & OLIVER, M. K. (2006). The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*, 96(1), 7-21.
- QUINN, T. W. (1992). The genetic legacy of Mother Goose—phylogeographic patterns of lesser snow goose *Chen caerulescens caerulescens* maternal lineages. **Molecular Ecology**, 1(2), 105-117.
- RADWAN, J., BIEDRZYCKA, A., BABIK, W. (2010) Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? **Biol Conserv.** 143:537–544.
- RATHBUN, G. B., REID, J. P., BONDE, R. K., POWELL, J. A. (1995) Reproduction in free-ranging West Indian Manatees (*Trichechus manatus*) In: Population Biology of the Florida Manatee (ed. T. J. O'Shea BBA, H. F. Percival), pp. 135-156. U. S. Dept. of the Interior, Information and Technology, National Biological Service, Washington, D. C.
- SCHULENBURG H., KURTZ J, MORET Y., SIVA-JOTHY M.T. (2009) Introduction. **Ecological Immunology**. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 364: 3-14.
- SIOLI, H. (1984) The Amazon and its main affluents hydrography, morphology of the river courses and river types. In: The Amazon. Limnology and landscape ecology (ed. Sioli H), pp. 127-165.
- SLADE, R. W. & MCCALLUM, H. I. (1992) Overdominant vs. frequency-dependent selection at MHC loci. **Genetics** 132:861–864
- SNELL, G. D. (1948). Methods for the study of histocompatibility genes. *Journal of genetics*, 49(2), 87-108.
- SOUSA, M. (2011). Análise da ocorrência de peixes-boi com base no conhecimento ecológico local e nos parâmetros ambientais na costa leste da Ilha de Marajó, Pará. Universidade Federal do Pará - Campus Bragança. Dissertação de mestrado.
- STEJNEGER, L. (1887). How the great northern sea-cow (*Rytina*) became exterminated. **American Naturalist**, 1047-1054.
- THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401: 921–923
- VIANNA J.A., BONDE R.K., CABALLERO S., GIRALDO J.P., LIMA R.P., CLARK A., MARMONTEL M., MORALES-VELA B., DE SOUZA M.J., PARR L., RODRÍGUEZ-LOPEZ M.A., MIGNUCCI-GIANNONI A.A., POWELL J.A., SANTOS F.R. (2006) Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implications for manatee conservation. **Molecular Ecology**, 15:433-447.

WALSH, C., & LUER, C. (2000). Manatee Immunology Research. State Of Florida Manatee Research Conducted By Mote Marine Laboratory, 38. Florida. Retrieved from <http://hdl.handle.net/2075/3064>

WEGNER K. M., KALBE M., RAUCH G., KURTZ J., SCHASCHL H., REUSCH T. B. H. (2006). Genetic variation in MHC class II expression and interactions with MHC sequence polymorphism in three-spined sticklebacks. **Molecular Ecology**, 15:1153–1164.

XU, S., JU, J., ZHOU, X., WANG, L., ZHOU, K., & YANG, G. (2012). Considerable MHC diversity suggests that the functional extinction of baiji is not related to population genetic collapse. **PloS one**, 7(1), e30423.

YUHKI N, O'BRIEN SJ (1990) DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. **Proc Natl Acad Sci USA** 87: 836–840.

ZHANG, X., LIN, W., ZHOU, R., GUI, D., YU, X., WU, Y. (2016) Low Major Histocompatibility Complex Class II Variation in the Endangered Indo-Pacific Humpback Dolphin (*Sousa chinensis*): Inferences about the Role of Balancing Selection. **Journal of Heredity**. doi: 10.1093/jhered/esv138.