

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Diversidade genética intrapopulacional e variabilidade de genes ligados a determinação do sexo: investigando um caso de reversão sexual em *Akodon montensis*

Sílvia Ramira Lopes Caldara

Vitória, ES
Fevereiro, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Diversidade genética intrapopulacional e variabilidade de genes ligados a determinação do sexo: investigando um caso de reversão sexual em *Akodon montensis*

Sílvia Ramira Lopes Caldara

Orientadora: Valéria Fagundes

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Animal.

Vitória, ES
Fevereiro, 2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

C145d Caldara, Sílvia Ramira Lopes, 1981-
Diversidade genética intrapopulacional e variabilidade de genes ligados a determinação do sexo : investigando um caso de reversão sexual em *Akodon montensis* / Sílvia Ramira Lopes Caldara. – 2014.
146 f. : il.

Orientador: Valéria Fagundes.
Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Genética de populações. 2. Akodon. 3. Diferenciação do sexo. 4. Cromossomos sexuais. 5. Sequenciamento de nucleotídeo. 6. Sexo – Causa e determinação. I. Fagundes, Valéria. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO E DOUTORADO EM BIOLOGIA ANIMAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Diversidade genética intrapopulacional e variabilidade de genes ligados a determinação do sexo: investigando um caso de reversão sexual em *Akodon montensis*"

AUTOR: **SÍLVIA RAMIRA LOPES CALDARA**
ORIENTADORA: Profa. Dra. VALÉRIA FAGUNDES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM BIOLOGIA ANIMAL, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL, pela comissão examinadora:

Dra. VALÉRIA FAGUNDES
Orientadora

Dr. YURI LUIZ REIS LEITE
Membro Interno

Dra. LEONORA PIRES COSTA
Membro Interno

Dra. YATIYO YASSUDA
Membro Externo

Dr. CESAR MARTINS
Membro Externo

DATA DA REALIZAÇÃO: Vitória, 26 de fevereiro de 2014.

Dedico esse trabalho a pessoa que além de mim mais se dedicou a ele.

Obrigada Vilacio por fazer parte dessa conquista e não me deixar desistir.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pela concessão de bolsa de doutorado e bolsa de estágio técnico e científico. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação (Capes/MEC), pelo recurso financeiro (PROAP) utilizado para a minha estadia em São Paulo.

Aos que doaram tecidos de *Akodon montensis* para a realização desse estudo: Alexandre Uarth Christoff (ULBRA), Leonora Pires Costa (UFES), Marcelo Passamani (UFLA), Guillermo D'Elia (Universidad Austral de Chile), Paulo S. D'Andrea (FIOCRUZ) e Cibele Bonvicino (INCA). Sem a colaboração de vocês a pesquisa ficaria muito mais difícil.

Ao Dr. Osmar Norberto de Souza, responsável pelo Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas - PUCRS, e ao seu aluno Luiz Fernando Saraiva Macedo Timmers, que aceitou a parceria e abraçou o projeto como se fosse de vocês, me ajudando com as análises quase cabalísticas das estruturas tridimensionais da proteína investigada. Com esse apoio foi possível ganharmos o prêmio de melhor trabalho de pós-graduação no 57º Congresso Brasileiro de Genética. Que essa parceria continue rendendo bons frutos.

A Dr^a. Yatiyo Yonenaga-Yassuda, responsável pelo Laboratório de Citogenética de Vertebrados – USP, que permitiu que eu usasse as dependências de seu laboratório para a realização da parte prática dessa tese. “Chefe”, obrigada por todo apoio financeiro e logístico. Obrigada também pelo carinho e preocupação em ir todos os dias ao laboratório saber como as minhas pesquisas andavam. A Dr^a Karen Ventura - Laboratório de Citogenética de Vertebrados que foi uma grande mestre. Obrigada por todo apoio, carinho, esclarecimento das dúvidas e ensinamentos da técnica de cultura celular e FISH.

Aos professores do PPGBAN por dividirem seus conhecimentos, aos funcionários Juliana Justino e Ariel Leça pela ajuda técnica e burocrática. Aos colegas da primeira turma de doutorado do PPGBAN que aceitaram a serem cobaias junto comigo e por me fazerem sentir cada dia mais no meio de cientistas importantes durante as discussões em sala.

A minha orientadora Valéria Fagundes por permitir que eu realizasse esse projeto tão bonito e por todas as lições que me ensinou durante essa jornada. Aos colegas do Laboratório de Genética Animal - LGA, em especial a Rosana Nunes, Cristina Nogueira, Victor Colombi e as minhas quase alunas Lorena Dinelli e Mariana Azevedo. A bibiu pela ajuda com a rede de

haplótipos e ao amigo Jeronimo do LAMAB que me socorreu com as identificações morfológicas. Com vocês pude exercer as mais diversas faces de minha personalidade. Obrigada por dividirem os risos, as reclamações, os campos e os termocicladores. Jamais esquecerei o que vivi aqui.

A Dr^a. Marcela Paes, professora do Instituto Federal do Espírito Santo, que me auxiliou com as análises de PCR em tempo real, e a Dr^a. Patrícia Fernandes que junto com o Laboratório Tomazzi permitiram que eu utiliza-se a infraestrutura de seus laboratórios.

As minhas amigas, Ana Carolina Pavan, Bárbara Costa e Daniela Rossoni. Meninas, obrigada pela amizade, pelo apoio e abrigo por tempo indeterminado. Compartilho com vocês essa vitória.

A minha mãe, meus irmãos e meus pais, por todo carinho e afeto, os quais foram indispensáveis para a concretização de mais um sonho. Mãe, sem você nada disso seria possível. Ao Vilacio, que me deu força e ânimo para continuar, que nunca me deixou desistir. Obrigada por puxar minha orelha, pela compreensão, carinho e por estar sempre do meu lado, nem sempre de corpo presente, mas sempre de coração e pensamento. “RO IME”.

E adiciono, faltando três dias para o depósito da tese, um agradecimento ao lindo bebê que cresce dentro de mim. Obrigada bebê, por ser bonzinho e permitir que a mamãe não enjoasse e nem dormisse tanto nessa reta final.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIACOES.....	14
RESUMO	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUÇÃO	4
I.1. O CASO DE REVERSÃO SEXUAL EM <i>AKODON MONTENSIS</i>	4
I.2. ENCONTRANDO O GENE DETERMINANTE DO SEXO.....	5
I. 3. MODO DE AÇÃO DOS GENES DA CASCATA DE EVENTOS DA DETERMINAÇÃO DO SEXO	7
I.4. O FENMENO DA REVERSÃO SEXUAL.....	9
I. 5. EVOLUÇÃO DOS GENES DA CADEIA DE DETERMINANTE DO SEXO.....	10
I. 6. REVERSÃO SEXUAL NO GÊNERO <i>AKODON</i>	11
I.7. INFLUÊNCIA DA HISTÓRIA DEMOGRÁFICA	14
I.8. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA ESTRUTURA DE UMA PROTEÍNA	16
II. OBJETIVOS E METAS.....	20
II.1. HIPÓTESES.....	20
II.2. METAS	21
III.6. MAPEAR SE AS FÊMEAS XY RELATADAS NO GÊNERO <i>AKODON</i> TEM ORIGEM COMUM.....	33
IV. RESULTADOS	35
V. DISCUSSÃO	62
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
VII. APÊNDICE.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das concentrações, do perfil e do tamanho do fragmento obtido na amplificação da região controle do DNA mitocondrial (D-loop) e dos genes Sry e Dax-1.

Tabela 2. Descrição das concentrações, do perfil e dos *primers* empregados na reação de amplificação por uso de PCR em tempo real.

Tabela 3. Número de indivíduos (n), de haplótipos (nH) e de sítios polimórficos por população (nSP), diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (dn), soma de desvios dos quadrados (SSD) índice de tempo de expansão (τ), valores dos testes *D* de Tajima e *F_s* de Fu de *Akodon montensis*.

Tabela 4. Valores de divergência genética interpopulacional (abaixo); número migrantes por geração entre as populações e Φ_{st} (acima).

Tabela 5. Valores de análise de Variância Molecular

Tabela 6. Estimativa do tempo decorrido (anos) desde a última expansão populacional de todas as umas das populações analisadas. Sendo $T_{exp} = \tau/2u$ e $u = \mu L$ (onde μ é a taxa de mutação por nucleotídeo por geração e L é o número de pares de base da sequência analisada)

Tabela 7. Número de indivíduos (N), de haplótipos (nH), diversidades haplotípica (Hd) e nucleotídica (dn) de Sry e Dax-1 exon 2.

Tabela 8. Valores de divergência genética interpopulacional (diagonal abaixo) e intrapopulacional (em negrito) entre machos, fêmeas XY e fêmeas XX dos genes Sry (diagonal abaixo) e Dax-1 (diagonal acima).

Tabela 9. Valores de divergência genética interespecífica (Sry - diagonal abaixo, e Dax-1 diagonal acima) e intraespecífica (Sry/ Dax-1 em negrito) entre 6 espécies do gênero *Akodon*. A.par (*A. paranaensis*) A.lind (*A. lindberghi*), A.mys (*A. mystax*), A.serr (*A. serrensis*), A.mon (*A. montensis*), A.curs (*A. cursor*).

Tabela 10. Numero de sequências (n), tamanho e número de haplótipos (nH) da sequência de DNA, de aminoácidos e da região HMG-box do gene Sry de *A. montensis*, *A. paranaensis*, *A. lindberghi*, *A. mystax*, *A. serrensis* e *A. cursor*.

Tabela 11. Lista de espécies tipo/motivo/mutação que leva a casos de fêmeas com reversão sexual e os autores que descobriram tal processo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. . Esquema ilustrativo sobre interação dos diversos genes envolvidos na cascata de determinação sexual (adaptado de MELO et al. 2005, EGGERS e SINCLAIR 2012). Setas contínuas indicam ativação, linhas com barras indicam bloqueio supressão. Para as siglas, veja lista de abreviações.

Figura 2. Mapa com as onze localidades dos 94 indivíduos de *A. montensis* empregados nesse estudo. Pontos: Minas Gerais (MG): 1- Belo Horizonte , 2 - Brumadinho, 3 – Luminárias; Rio de Janeiro (RJ): 4 – Nova Friburgo, 5 – Sumidouro; São Paulo (SP): 6 – Iguape; Mato Grosso do Sul (MS): 7- Dourados; Rio Grande do Sul (RS):8- Maquiné; Paraguai (PAR): 9 - Itapúa, 10 – Camindeyu; Paraná (PR): 11 - Iguçu.

Figura 3. Distribuição das diferenças nucleotídicas par-a-par entre os indivíduos de cada população (distribuição *mismatch*). Os valores do eixo X indicam o número de diferenças entre os haplótipos e o eixo Y a frequência dos haplótipos. 3.a SP; 3.b RS; 3.c MS; 3.d MG; 3.e PR; 3.f SP (sem as fêmeas XY); 3.g CAN; 3.h ITA; 3.i SP (somente fêmeas XY), 3.j (somente fêmeas XX), 3.k (somente machos). Linha contínua esperado e linha tracejada observado

Figura 4. Rede de haplótipos das amostras de *A. montensis* gerada pelo programa NETWORK. Em azul haplótipos da população PR, amarelo SP, cinza MG, rosa CAN, roxo ITA, prata RJ, verde RS e laranja MS. Vermelhos haplótipos não amostrados. Haplótipos mostrados com frequência relativa. Os números indicam os passos mutacionais.

Figura 5. Filogenia gerada Máxima Verossimilhança da região controle do DNA mitocondrial de *Akodon montensis*. Os valores nos nós representam 1000 replicações de bootstrap. A figura da esquerda associa a rede de haplótipos com a filogenia e MV.

Figura 6. Filogenia gerada Máxima Verossimilhança da região controle do DNA mitocondrial de *Akodon montensis*. Os valores nos nós representam 1000 replicações de bootstrap. A figura da esquerda associa a rede de haplótipos com a filogenia e MV.

Figura 7. Alinhamento múltiplo, realizado com Clustal W, das treze sequências modeladas e analisadas. A proteína Sry humana (Código PDB: 1J46) foi utilizada como molde para modelar as proteínas. Apenas a região HMG-box possui estrutura 3D no PDB. Esta região situa-se entre as posições 69 e 123 deste alinhamento múltiplo. As regiões NLS (N e C terminais) e a região putativa NES estão sublinhadas em verde. As α hélices estão delimitadas pelas caixas.

Figura 8. Estrutura terciária da proteína modelada para a região HMG-box do gene Sry associada a molécula de DNA. As hélices α estão coloridas em azul escuro, as alças estão coloridas em verde escuro, ambas representadas com o tipo *Cartoon*, e a dupla fita de DNA está representada com a superfície molecular colorida por tipo de átomos. A Imagem foi gerada com o programa PyMol (DeLano, 2002). A (cit 160 representante das amostras cit 161, cit200F, cit232F, cit234F, cit283, cit201, cit240, cta1560, cta1562), B (cit165), C (cit166F), D (cta1559), E (cta1563), F (cta1561), G (lga411 representante das amostras lga316, lga317, lga 18), H (lga418), I (ak1358 representante das amostras lga659, lga1327, lga1711, lga1704, lga1607, mp313, lga1456, lga1659, lga1647), J (lga 1724), K (lga1713), L (lga1387), M (fs0403 representante das amostras hgdb22, lga3915, lga1517), N (*A. boliviensis*), O (*A. azare*), P (*A. dolores*).

Figura 9. Resíduos de AA da porção $\alpha 1$ (a), $\alpha 2$ (c), $\alpha 3$ (d) que participam de pontes de hidrogênio com a dupla fita de DNA. A figura b evidencia uma mutação que altera a ligação com o DNA, sendo que para confecção dessa figura usou-se cit 160 e fs0403. Representação do tipo *Cartoon* da cadeia principal da região HMG-box. Os AA que participam das interações

com o DNA estão representados pelo modelo de palitos e coloridos pelo tipo dos átomos. A dupla fita de DNA está representada pelo modelo de palitos e colorida pelo tipo dos átomos (exceto pelo átomo de carbono que foi colorido em laranja para diferenciar dos átomos de carbono da proteína). A Imagem foi gerada com o programa PyMol (DeLano, 2002).

Figura 10. a. Curva de dissociação (*melting*) do produto de PCR em tempo real das análises de machos e fêmeas XY (25ng/μl com 20ul de reação PCR). Um único pico para uma única temperatura de *melting* foi obtida. b. plot de amplificação do gene Sry das amostras de machos, fêmeas e fêmeas XY. A curva ascendente representa o pico de amplificação de machos e de fêmeas XY com pico de expansão de 0,001 10,0) a partir do ciclo 22 , enquanto que nas fêmeas XX não houve pico de amplificação (picos entre os valores 0,01 e 0,0001). 11c. plot de amplificação do gene Sry das amostras de machos (vermelho e amarelo), e fêmeas XY (azul e verde). Pode-se notar os valores de Ct encontrados para as fêmeas XY estão dentro da variação encontrada para os machos.

Figura 11. a Curva de dissociação (*melting*) do produto de PCR em tempo real das análises de machos e fêmeas XY (25ng/μl com 20ul de reação PCR) de Dax-1. Múltiplos picos temperatura de *melting* foram obtidos, sugerindo formação de dímeros ou inespecificidade na reação. b. Plot de amplificação do gene Dax-1. Os valores de Ct ficaram muito elevados, sugerindo uma ineficiência dos *primers*

Figura 12. Mapeamento do caráter ancestral da presença e ausência de registro de fêmeas XY dentro do gênero *Akodon*. Os ramos brancos retratam a ausência de registro de fêmeas XY, e os pretos retratam a presença. Os valores nos nós indicam probabilidade a posteriori da presença do caráter

LISTA DE ABREVIACÕES

Genes

DAX1: *nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1.*

DGCR8: *DiGeorge syndrome critical region gene 8.*

F8: *coagulation factor VIII, procoagulant component.*

F9: *coagulation factor IX.*

Fgf9: *fibroblast growth factor 9.*

G6PD: *glucose-6-phosphate dehydrogenase.*

Gata4: *gata binding domain 4.*

GLA: *galactosidase, alpha.*

Nr5A1: *nuclear receptor subfamily 0 group A member 1.*

PLP: *proteolipid protein 1.*

RCP: *CGRP receptor component.*

Rspo1: *R-spondin 1.*

SF1: *splicing factor 1.*

SOX 3: *sex determining region Y-box 3.*

SOX9: *Sry-related HMG box 9.*

Sry, Sox 9, Dax 1, Sox 3, Sf 1, Zfy: ortólogos observados em outras espécies de mamíferos, exceto humanos.

SRY: *sexing-determining region on the Y chromosome.*

Wnt4: *Wingless-type MMTV integration site family, member 4.*

ZFY: *Zinc Finger Y-linked.*

Gerais

AA: aminoácidos.

AHC: hipoplasia congênita adrenal.

AMOVA: análise de variância molecular.

D-loop: região controle do DNA mitocondrial.

dn: diversidade nucleotídica.

DSS: região sensível a dosagem para reversão sexual.

FT: fatores de transcrição.

Hd: diversidade haplotípica.

HMG: *high mobility groups.*

Kb: Kilobase ou 10^3 pares de bases .

KRAB-O: KRAB (*Krüppel-associated box*) domain protein that lacks a zinc finger motif.

Mb: Megabase ou 10^6 pares de bases.

n: número de indivíduos.

nH: número de haplótipos.

nSP: número de sítios polimórficos por população.

ORF: *open reading frame.*

PCR: reação em cadeia pela polimerase.

SSD: soma de desvio dos quadrados.

TCS: *Phylogenetic network estimation using statistical parsimony.*

TDF: fator determinante para o desenvolvimento dos testículos.

Texp: tempo de expansão populacional em mil anos.

X*: cromossomo X com translocação inteira ou parcial do cromossomo Y.

τ : índice de tempo de expansão.

RESUMO

O primeiro caso de reversão sexual em *Akodon* foi relatado em 1967 e desde então há registro de casos de fêmeas XY em nove espécies do gênero. Na maioria dos casos não há consenso sobre o motivo/causa da reversão, mas para muitos autores essas fêmeas XY são resultantes de problemas no gene Sry. No caso de *A. montensis* o sugerido é que o cromossomo X teria um de seus genes participantes da cascata sexual alterado. Para essas espécies também se identificou a presença do gene Sry, porém a integridade da cópia identificada, o número de cópias e a funcionalidade da proteína do gene não havia sido testada. Outro dado importante é que só há registro de fêmeas XY em uma única população, Iguape SP, sendo necessário assim se investigar qual seria o diferencial nessa populacional que estivesse favorecendo o surgimento ou a manutenção dessas fêmeas. O presente estudo se propôs a investigar o papel dos genes ligados à determinação do sexo e dos processos que envolvem esses genes, tomando como base um organismo modelo como fêmeas XY de *Akodon montensis*, verificando a integridade/funcionalidade de alguns genes ligados ao sexo bem como seu número de cópias e estruturação genética e demográfica das populações de *A. montensis*, assim como verificar se historicamente os nove casos de reversão sexual no gênero *Akodon* possuem uma origem comum. Para tal, foram extraídos DNA de 94 indivíduos de *A. montensis* (incluindo fêmeas XY) e comparado com o DNA de pelo menos 6 espécies do gênero. Com esse DNA foram feitos estudos populacionais (como desvio de neutralidade, teste *mismatch*, análise de diversidade nucleotídica, haplotípica estimativa de tempo de expansão, Φ_{st} , Nm, análise filogenéticas) com uso da região controle do DNA mitocondrial. Também foi investigada a presença e integridade estrutural dos genes Dax-1 e Sry por meio de sequenciamento genético analisando-se diversidade genética entre diversas espécies. Em especial para o gene Sry investigou-se a estrutura primária da proteína e sua estrutura terciária, como uso de programas específicos para modelagem tridimensional. Também empregou-se técnicas de PCR em tempo real para se estimar o número de cópias desses genes no genoma de *A. montensis*. Sequências do gene citocromo b foram usadas para se inferir uma filogenia do gênero e por mapeamento de caráter filogenético mapeou-se a origem das fêmeas XY dentro de *Akodon*. Os resultados encontrados apontam que apenas população de Iguape apresenta sinais de expansão populacional recente, devido a possível gargalo populacional, que pode ter feito com que as fêmeas XY subissem de frequência nessa população. Além disso, demonstrou-se que essas

fêmeas surgiram a cerca de 15 mil anos atrás. A integridade do gene Sry foi confirmada por todas as metodologias empregadas, incluindo a modelagem tridimensional das proteínas, esse gene demonstrou-se espécie específico, mas não houve diferenças entre machos e fêmeas XY nesse gene para *A. montensis*. Por problemas com anelamento de iniciadores devido a falta de informações disponíveis na literatura, somente o exon2 de Dax-1 pode ser analisado. As análises feitas para esse gene também indicam que não há diferenças entre machos e fêmeas XY nessa espécie que possa ser a causa da reversão sexual. Como PCR em tempo real pode-se inferir que não há diferenças entre o número de cópias do gene Sry entre machos e fêmeas XY. A filogenia obtida corrobora filogenias anteriores propostas para o gênero *Akodon* e o mapeamento do caráter reversão sexual nessa filogenia indica que essa característica tem múltiplas origens dentro do gênero. Assim pode-se concluir que não são mutações exon 2 de Dax-1, ou alterações do gene Sry, ou em sua proteína que levam a reversão sexual, mas que outros genes da cascata da sexual devam ser determinantes para o caso de fêmeas XY em *A. montensis*.

ABSTRACT

The first case of sex reversal in *Akodon* was reported in 1967 and since then nine news cases were reported. Many authors believe that these XY females are the result of problems in the Sry gene. For sexual reversion in *A. montensis* it was suggested that maybe some gene that participates on sexual determinant events in X chromosome would be changed. In *A. montensis* Sry gene was detected but its structure, number of copies and functionality was not tested. A curious fact is that only one population (Iguape) has XY females record. Thus it is necessary to investigate what happened in this population the cause the origin or the maintenance of XY females in Iguape. The present study aimed to investigate the role of genes linked to sex determination in sexual reversion for *A. montensis*, verifying their integrity, copies number and functionality. We also studied demographic structure and phylogenetics patterns to verify bottle necks signals and if there is a common origin for sexual reversion in *Akodon*. We extracted DNA from 94 individuals from *A. montensis* and also used DNA for at least 6 species from *Akodon* genera. It was tested growth neutrality deviation, mismatch distribution, nucleotide and haplotype diversity, gene flow, number of migrants per generation using the control region of mitochondrial DNA. We also investigated the presence and structural integrity of Dax-1 and Sry. In Sry case we investigated the primary and tertiary protein structure using specific 3D modelling programs. Cytochrome b was employed to reconstruct *Akodon* phylogeny that were used to trace if XY sexual reversed females has one common origin. The results indicates that Iguape population shows signs for a recent population expansion due the possible bottleneck event. Furthermore, these XY females seems to be originated in this population over 15 hundred years. The integrity of Sry was demonstrated and this gene seems to be a species specific marker. There were no differences between Sry gene and protein from males and XY females. Due lack of information available in literature it was not possible to draw specific *primers* for Dax-1 amplification and only the exon2 could be analyzed. The analysis form exon 2 also indicated no differences between XY males and females in this species. Real-time PCR can be inferred that there is no difference between the number of copies of the Sry gene between males and females XY.A. The phylogeny tree obtained corroborates previous phylogenies proposed for the genus *Akodon* and mapping character sex reversal in this phylogeny indicates that this characteristic has multiple origins within the genera. So we concluded that it were not mutations on exon 2 of Dax- 1 or changes in the Sry gene, or a protein that lead to sex reversal and other genes from sexual cascade should be decisive for the case of XY females *A. montensis*

I. INTRODUÇÃO

I.1. O CASO DE REVERSÃO SEXUAL EM *AKODON MONTENSIS*

No ano de 2000, Fagundes e colaboradores relataram o primeiro e único caso de reversão sexual de fêmeas XY na espécie *Akodon montensis*. Nesse trabalho, os autores além das análises convencionais da citogenética, fizeram hibridação in situ fluorescente de uma sonda gerada por microdissecção do cromossomo Y de um macho normal em fêmeas XY e detectaram a translocação de um cromossomo Y inteiro ou parcial na região pericentromérica do cromossomo X das fêmeas XY, além da presença do cromossomo Y inteiro independente do X translocado (X*). Na ocasião, os autores confirmaram a presença do gene Sry nessas fêmeas por meio da detecção de um fragmento produto da amplificação in vitro pela reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Fagundes e colaboradores também analisaram cortes histológicos dos ovários, ovidutos e úteros das fêmeas X*Y e verificaram folículos primários em diferentes estágios de maturação. Dessa forma os autores sugeriram que essas fêmeas eram sexualmente maduras e férteis. Como as cinco fêmeas X*Y eram adultas e foram coletadas em períodos do ano distintos (de março a junho de 1994), foi sugerido que não se tratavam de indivíduos de uma única ninhada, o que sugeriu que a reversão sexual em *A. montensis* não se tratava de um evento único nessa espécie. Os autores sugeriram que o gene Sry (pelo menos a cópia do cromossomo Y independente) estaria intacto e funcional; que o evento de translocação entre os cromossomos X e Y poderia ter afetado algum gene ligado ao cromossomo X, que poderia atuar na cadeia de determinação sexual.

Ainda nesse trabalho os autores propuseram um modelo que explicasse a origem da reversão sexual de fêmeas XY em *A. montensis*. Para os autores a explicação mais provável é que a translocação entre os cromossomos X e Y deve ter ocorrido na linhagem de células germinativas de um macho XY normal, gerando gametas em mosaico, espermatozoides portadores de um cromossomo Y normal, outros portadores de cromossomo X normal e ainda espermatozoides portadores do cromossomo X translocado (t (X; Y)). O gameta contendo o cromossomo t(X; Y) pode ter fertilizado ovócitos normais originando proles femininas portadoras de cromossomos X normais e X t(X; Y). As fêmeas portadoras da translocação seriam doadoras de cromossomos X t(X; Y) para a próxima geração. Após o cruzamento de

fêmeas portadoras com machos normais, os indivíduos formados portadores de cromossomo X t (X; Y) e do Y normal se desenvolveriam em fêmeas ao invés de machos. Considerando as morfologias encontradas para os cromossomos X (acrocêntrico e subtelocêntrico) de e assumindo que a translocação t (X; Y) estava presente em todas as cinco fêmeas com reversão sexual XY investigadas, os autores propuseram que as cinco fêmeas XY de *A. montensis* surgiram de acasalamentos diferentes, sendo que o cromossomo Y dessas fêmeas seria herdado de um macho normal e a formas do cromossomo X com a translocação foram herdadas de fêmeas diferentes. Dessa forma, o cromossomo X_t (X; Y) deve ter ocorrido mais de uma vez nos machos da população de Iguape, São Paulo.

I.2. ENCONTRANDO O GENE DETERMINANTE DO SEXO

Na maioria dos mamíferos, incluindo seres humanos, os processos de determinação e diferenciação sexual estão intimamente ligados à presença do cromossomo Y (FORD et al. 1959, De MELLO et al. 2005). O principal evento da diferenciação sexual é a especialização das gônadas, que é desencadeada por uma cascata de eventos que coordenam a expressão de genes específicos, um dependente do outro. As demais diferenças entre os sexos são resultantes de ações hormonais coordenadas pelas próprias gônadas diferenciadas (JOST et al. 1979).

As estruturas embrionárias que dão origem às gônadas (cristas genitais) têm o potencial de se desenvolver tanto como ovário ou testículo e sob a influência de uma combinação de genes específicos determinam o caminho de desenvolvimento para um determinado tipo (CAPEL, 2000). No processo de formação das gônadas, vários distúrbios genéticos e fisiológicos do desenvolvimento do sexo podem ocorrer (EGGERS e SINCLAIR 2012), de modo que o desenvolvimento dos ovários e dos testículos segue caminhos específicos que parecem ser antagônicos, sob a atuação de vários genes em uma cascata de determinação do sexo.

A busca por um gene que explicasse o mecanismo de determinação sexual em mamíferos durou cerca de 30 anos e, embora conhecido atualmente, os mecanismos genéticos da determinação sexual são complexos e pouco compreendidos (PALMER et al. 1989).

O gene *Zinc Finger Y-linked*, ou ZFY, foi o primeiro gene proclamado como fator determinante de testículos, codificando uma proteína do tipo “dedo de zinco”, localizado no cromossomo Y e que parece atuar como fator de transcrição, e era exclusivo de machos (PAGE et al. 1987). Porém, bem cedo essa proposta começou a perder força ao se descobrir que o gene

ZFY estava localizado no autossomo 1 e 7 em marsupiais (*Macropus eugenii*) tanto em machos como em fêmeas (SINCLAIR et al. 1988), sugerindo que esse gene não tenha o papel de determinador do testículo.

Um estudo posterior que contribuiu para a derrocada do ZFY foi publicado em 1989 por Palmer e colaboradores, no qual descrevem a ocorrência de 14 homens que não possuíam qualquer cópia do cromossomo Y ou do gene ZFY, mas somente dois cromossomos X, e mesmo assim apresentavam os testículos normais (PALMER et al. 1989). Nesse estudo, os cromossomos sexuais de homens XX e mulheres XY foram analisados por mapeamento de deleção e verificou-se que a região onde o fator determinador testicular se encontraria seria próximo à região pseudoautossômica do cromossomo Y normal.

Com base nesse trabalho, Sinclair e colaboradores (1990) apresentaram um estudo de mapeamento de sequências específicas no braço curto do cromossomo Y de humanos portadores de alterações estruturais nesse cromossomo (homens XX e mulheres XY). Nesse estudo os autores usaram técnicas de *Southern blotting* e hibridação de uma sonda de cromossomo Y em várias espécies de mamíferos (humanos, chimpanzés, coelhos, porcos, cavalos, cabras, tigres) e descobriram que havia uma região de homologia em todos os cromossomos analisados. Ainda nesse estudo, os autores com uso de mapeamento restritivo e meiótico, identificaram uma região de 35 kilobases (kb), adjacente à região pseudoautossômica, que contém um gene funcional que codifica uma proteína com domínio do tipo *high mobility group* (HMG) e apontaram esse novo gene encontrado como o candidato a fator de determinador testicular, sendo assim chamado de *sexing-determining region on the Y chromosome*, ou SRY.

Uma cópia homóloga do gene SRY humano (Sry) foi encontrada em ratos (KOOPMAN 1995) e em pelo menos 50 espécies de Eutéria incluindo primatas, cetáceos, roedores, equinos, bovinos e suínos (NAGAI 2001, GRAVES 2002, NISHIDA et al. 2003). Esses achados reforçaram a proposta de Sinclair (1990) de que o gene responsável pela determinação do sexo em mamíferos seria o SRY, ligado ao cromossomo Y, iniciando um ciclo com vários estudos com o propósito de entender o modo e o tempo de ação desse gene no desenvolvimento do testículo.

I. 3. MODO DE AÇÃO DOS GENES DA CASCATA DE EVENTOS DA DETERMINAÇÃO DO SEXO

O gene SRY atinge o nível máximo de expressão em torno da 6ª semana de desenvolvimento fetal humano, coincidindo com o início da diferenciação das gônadas em testículos (GUBBAY et al. 1990).

Berta et al. (1990) comprovaram o papel biológico do SRY na determinação testicular. Os autores investigaram casos de reversão sexual com fêmeas XY em humanos e ao analisarem a sequência do gene SRY nessas fêmeas XY identificaram uma mutação do tipo transição (de guanina para adenina) que alterava o aminoácido metionina da posição para isoleucina, levando a uma alteração do sítio de ligação da proteína do gene SRY com a molécula de DNA. Berta et al. (1990) atribuíram essa mutação como responsável pela reversão sexual, confirmando a importância desse gene na determinação do sexo.

Estudos posteriores já apontam que o controle da gonadogênese em mamíferos (mais especificamente em humanos) é um processo muito complexo, podendo haver um número indefinido de genes autossômicos ou ligados ao X que atuam antes e depois da diferenciação da gônada em testículo (MACLAUGHLIN e DONAHOE 2004). Meeks et al. (2003) demonstraram que o gene *Dax-1* (*dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*) seria efetivamente necessário para a diferenciação testicular, pois se observou o desenvolvimento de fêmeas em camundongos XY com o gene *Dax-1* inativado.

Sutou et al. (2001) estudaram o rato de espinho japonês (*Tokudaia*) e encontraram que machos de *T. osimensis* não apresentam o cromossomo Y, tendo somente um cromossomo X (machos XO) e propuseram um modelo de determinação sexual independente de Sry, no qual genes ligados ao cromossomo X estariam envolvidos em um novo mecanismo de determinação sexual, destacando a necessidade do mapeamento do cromossomo X.

Em um estudo recente, Eggers e Sinclair (2012) revisaram o conhecimento atual sobre o desenvolvimento das gônadas de humanos e camundongos e como alterações nessa complexa rede de desenvolvimento de gônadas poderiam resultar em desordens do desenvolvimento do sexo. Além disso, os autores também discutiram sobre os genes que atuam diretamente no desenvolvimento das gônadas de embriões de camundongos e afirmaram que a expressão do gene Sry em camundongos machos XY seria caracterizada por períodos intercalados de alta e baixa síntese, atingindo o pico máximo no 10º dia embrionário. Os autores afirmaram também

que em humanos machos XY a expressão do gene SRY é progressiva e contínua, atingindo o pico máximo de expressão na 6ª semana. Observaram também que tanto em humanos como em camundongos a expressão do gene Sry regula/ativa a expressão do gene *Sry-related HMG box 9* (Sox9).

Em camundongos, o Sox9 estimula a síntese da proteína codificada pelo gene autossômico *Fibroblast growth factor 9* (Fgf9), que conjuntamente num mecanismo de *feedback* positivo, ativam a supressão do gene autossômico *Wingless-type MMTV integration site family member 4* (Wnt4), inibindo os ductos Mülllerianos a se diferenciarem em ovários, e estimulando o desenvolvimento do testículo (Figura 1).

Em fêmeas XX, com a ausência do gene Sry, os genes Sox9 e Fgf9 não são ativados, e os genes Rspo1 (R-spondin 1), com função similar a Wnt4, e o próprio gene Wnt4 são expressos em altos níveis. Seus produtos vão estabilizar a proteína citoplasmática β -catenina, que é enviada ao núcleo e se liga a fatores de transcrição (FT) iniciando a transcrição de outros genes alvos. Wnt4 e β -catenina inibem o *feedback* positivo de Sox9 e Fgf9, permitindo assim que o caminho para desenvolvimento de ovário seja mantido (MAATOUK et al. 2008, SUTTON et al. 2011).

Eggers e Sinclair (2012) também discutiram sobre os genes que atuam na biopotencialidade das gônadas, como o Nr5A1 (*Nuclear receptor subfamily 0 group A member 1*), que apresenta um papel importante no desenvolvimento das gônadas e das adrenais. Esse gene, ao ser expresso, ativa o gene Sry. Embriões machos de ratos que não expressam o gene Nr5A1 não iniciam a diferenciação do sexo, promovendo uma completa reversão sexual de machos XY em fêmeas. Esses autores também discutiram o papel de genes envolvidos no mecanismo de determinação de testículos como Gata4 (*Gata binding domain 4*), que expresso na gônada biopotente regula a expressão de uma série de genes como o Sox9, que tem um elevado nível de expressão após a expressão de Sry, o que sugere que o gene Sox9 seja um alvo direto ou indireto da proteína do gene Sry.

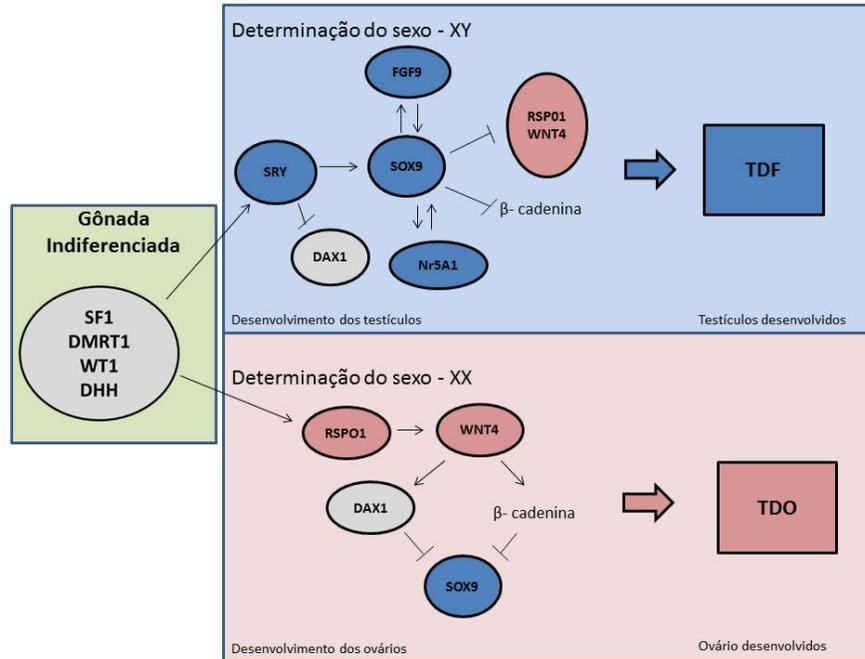


Figura 1. Esquema ilustrativo sobre interação dos diversos genes envolvidos na cascata de determinação sexual em mamíferos (adaptado de MELO et al. 2005, EGGERS e SINCLAIR 2012). Setas contínuas indicam ativação, linhas com barras indicam bloqueio supressão. Para as siglas, veja lista de abreviações.

I.4. O FENÔMENO DA REVERSÃO SEXUAL

O fenômeno da reversão sexual foi registrado em vários grupos de mamíferos, tendo sido relatado em populações naturais de primatas (FREDGA 1983), humanos (MCELREAVY et al. 1993) e de roedores (BURGOS et al. 1988, HOEKSTRA e EDWARDS 2000, BIANCHI 2002), estando geralmente vinculado a mutações do Sry (MCELREAVY et al. 1993).

Pesquisas recentes apontam que o nível de expressão de Sry é crítico para a determinação sexual e que é altamente sensível à expressão de outros genes envolvidos na cascata de eventos da determinação do sexo, tanto autossômicos (Sox9) quanto ligados a cromossomo X (Dax-1 e Sox3) (WALLIS et al. 2008). Entretanto, existem outros genes associados à cascata de determinação sexual que também levam à reversão do sexo.

Em humanos, duplicações de SOX9 levaram ao desenvolvimento de fêmeas XX com testículos (EGGERS e SINCLAIR 2012), enquanto deleções de 1,5 Mb, por exemplo, podem resultar em indivíduos com cariótipo 46, XY com fenótipo feminino completo (POP et al. 2004). Em ratos, o processo é contrário, quando há perda de uma cópia de SOX9 em fêmeas XX ocorre reversão sexual com formação de machos (EGGERS e SINCLAIR 2012).

Outro registro de gene envolvido em casos de reversão sexual é o DAX-1. Duplicações nesse gene em humanos geram indivíduos XY com fenótipo de fêmeas. Entretanto, machos que possuem o gene DAX-1 inativado por mutações provocadas experimentalmente também apresentam reversão sexual. Isso indica que DAX-1 pode atuar tanto contra como a favor do desenvolvimento testicular (EGGERS e SINCLAIR 2012).

Além do conhecimento básico de interesse científico, a determinação do sexo em mamíferos também é de interesse biomédico. Em humanos, aproximadamente uma em cada 1.000 crianças apresentam anomalias genitais ou em suas gônadas (POLANI 1981). Além disso, muitos dos conhecidos genes envolvidos na determinação do sexual também estão envolvidos em processos patológicos como a tumorigênese adrenal primária e têm papel essencial no desenvolvimento normal dos órgãos e gônadas.

Alguns pesquisadores usam a reversão sexual em ratos como um modelo para o estudo de determinação sexual em diversos mamíferos. O desenvolvimento de modelos em ratos pode ajudar a explicar a reversão sexual em humanos, como a reversão XY do sexo feminino e hermafroditas XY, que carregam um gene SRY aparentemente normal.

I. 5. EVOLUÇÃO DOS GENES DA CADEIA DE DETERMINANTE DO SEXO SRY E DAX-1

Acredita-se que o gene Sry tenha divergido de uma cópia ancestral do gene autossômico Sox3 (FOSTER e GRAVES 1999). Em marsupiais, a reversão sexual gerando fêmeas XY já foi associada a um truncamento do gene ancestral Sox3 (SÜDBECK et al. 1996, FOSTER e GRAVES 1999).

Foster e Graves (1994) verificaram uma grande semelhança entre a região do domínio HMG dos genes Sry e Sox3 e sugeriram que o gene Sry seria um alelo novo na determinação de machos e comum apenas aos placentários, originado por uma mutação no gene Sox3 há cerca de 166-148 milhões de anos atrás (m.a.a.). Segundo Graves (1995), marsupiais e eutérios divergiram entre si há 130-150 m.a.a. Um mapeamento comparativo do cromossomo X e dos genes associados a esse cromossomo entre eutérios, marsupiais e monotremados, indicou que os genes localizados no braço longo, bem como a região pericentromérica do cromossomo X de humanos que inclui oito genes (GLA, PLP, F8, F9, RCP, P3, GDX, G6PD), estão localizados no cromossomo X de todos os mamíferos (WATSON et al. 1990). Segundo Pask et al. (1997) essa região conservada, equivalente ao pequeno cromossomo X de marsupiais, foi indicada como sendo a mínima região do cromossomo X e seria correspondente ao cromossomo X ancestral a todos os mamíferos. Por outro lado, a porção do braço curto do cromossomo X

humano foi mapeada como autossômica em marsupiais e monotremados, o que implicaria que esta região teria sido recentemente adicionada à linhagem de eutérios.

No estudo de Pask et al. (1997) essa região recentemente adicionada foi mapeada no cromossomo 5 da espécie de marsupial *Macropus eugenii*. Segundo esses autores, esse achado sugere que o gene Dax-1 seria originalmente autossômico e teria sido adicionado ao cromossomo X de eutérios a 80-130 m.a.a. e que provavelmente esse gene também teria sido autossômico no ancestral de mamíferos, descartando a possibilidade de que o gene Dax-1 fosse um vestígio de um mecanismo de determinação sexual por compensação de dose controlada por algum gene ligado ao cromossomo X no potencial ancestral de mamíferos.

Wallis e colaboradores (2008) afirmaram que a origem do gene Sry coincide com a estimativa da divergência entre monotremados e placentários e corroboraram a ideia de que o surgimento desse alelo poderia estar relacionado com a separação dos mamíferos nessas subclasses. Sato et al. (2010) usaram ferramentas de bioinformática e compararam dados de proteína e regiões não traduzidas do gene Sry e concluíram que provavelmente o gene Sry surgiu de uma fusão da região HMG de Sox3 com um outro gene ligado ao cromossomo X, o DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region, gene 8*).

I. 6. REVERSÃO SEXUAL NO GÊNERO *AKODON*

O primeiro caso de reversão sexual dentro do gênero foi relatado por Bianchi e Contreras (1967) e revelou que foram encontradas fêmeas de *A. azarae* da Argentina cujo cariótipo apresentava um par de cromossomos sexuais com morfologia e padrão de heterocromatina indistinguíveis dos encontrados em machos (BIANCHI e CONTRERAS 1967, BIANCHI et al. 1968). Desde então, uma série de relatos de reversão sexual foram descritos na literatura.

A reversão sexual gerando fêmeas XY já foi descrita para nove espécies do gênero *Akodon*: *A. azarae*, *A. boliviensis*, *A. kofordi*, *A. mollis*, *A. montensis*, *A. puer*, *A. subfuscus*, *A. torques* e *A. varius* (BIANCHI e CONTRERAS, 1967, BIANCHI et al. 1971, 1993; LIZARRALDE et al. 1982, LOBATO et al. 1982, VITULLO et al. 1986, FAGUNDES et al. 2000, HOEKSTRA e EDWARDS 2000).

Em *A. azarae*, o cromossomo X possui um centrômero subterminal e o cromossomo Y possui um centrômero terminal, sendo que o braço longo do cromossomo Y possui mesmo tamanho e morfologia do braço curto do cromossomo X (BIANCHI et al. 2002). Bianchi e

Contreras (1967) ao analisarem dez fêmeas de *A. azarae* identificaram seis fêmeas com cromossomos sexuais semelhantes ao encontrados em machos XY da mesma espécie. Ao analisarem a composição de heterocromática dos cromossomos sexuais das fêmeas com cariótipo semelhante a machos XY, concluíram que elas possuíam cariótipo com um cromossomo acrocêntrico médio X normal, e outro cromossomo X com deleção no braço longo, que foi chamado pelos autores de “x”, um cromossomo acrocêntrico pequeno. Os autores propuseram que se tratava de um caso extremo de compensação de dose na qual o cromossomos “x”, além da deleção no braço longo, também teriam sofrido a inativação do braço curto (BIANCHI e CONTRERAS 1967).

Lobato et al. (1982) investigaram casos de reversão sexual em *A. mollis* coletadas no Equador e identificaram fêmeas com cariótipo indistinguíveis dos machos da espécie, apresentando como par sexual um cromossomo X acrocêntrico médio e outro cromossomo semelhante ao cromossomo Y, um acrocêntrico pequeno. Os autores, fazendo comparações entre cromossomos sexuais corados por banda C e G, das fêmeas XX normais, machos XY e as fêmeas com cariótipo semelhante ao dos machos, concluíram por homologia que as essas fêmeas tinham um cromossomo Y verdadeiro em seu cariótipo, ou seja, apresentavam par sexual heteromórfico com um cromossomo X e um cromossomo Y. Assim, nesse estudo, os autores concluíram que em *A. mollis*, o caso de reversão sexual de fêmeas, não se tratava de uma deleção no cromossomo “x” com um mecanismo de compensação de dosagem, mas sim de um cromossomo Y. Vale destacar que a morfologia dos cromossomos “x” e Y não diferem em tamanho.

A presença de um cromossomo Y nas fêmeas com reversão sexual no gênero foi corroborado por Bianchi et al. (1992) quando foram encontradas múltiplas cópias do gene *Zfy* (*Y-linked zinc finger gene*) até então conhecido como gene exclusivo do cromossomo Y nos machos, e nas fêmeas variantes (XY) e não em fêmeas normais XX.

Para a maioria dos pesquisadores esse evento de reversão sexual é resultado de uma mutação no cromossomo Y, causando a inabilidade funcional da determinação sexual masculina (LIZARRALDE et al. 1982, VITULLO et al. 1986, BIANCHI et al. 1993; ESPINOSA e VITULLO 1996). Mais precisamente, muitos autores atribuem reversão sexual em fêmeas XY a uma mutação que impede a expressão correta do gene *Sry* (BIANCHI 2002, HOEKSTRA e EDWARDS 2000, HOEKSTRA e HOEKSTRA 2001).

Em contrapartida, dois casos de reversão sexual em *Akodon* sugerem alterações ou mutações ligadas ao cromossomo X. Ortiz e colaboradores (1998) analisaram 83 indivíduos da província de Córdoba na Argentina, dos quais 32 eram fêmeas com o par sexual heteromórfico, possuindo cariótipo XY. Nesse mesmo trabalho os autores observaram três padrões de distribuição da heterocromatina no cromossomo X em *A. azarae* e sugeriram que devido a uma deleção da heterocromatina presente somente nos cromossomos X de fêmeas XY, essa mutação seria o fator desencadeador da reversão sexual. Em 2009, Ortiz e colaboradores capturam em Córdoba na Argentina, outros 50 indivíduos de *A. azarae* e os cruzaram em laboratório com 16 cruzamentos por duas gerações. Desses cruzamentos foram estudados padrões de bandeamento C que confirmaram o que havia sido proposto em 1998, à existência de três padrões de distribuição de heterocromatina no cromossomo X. Dessa forma, Ortiz e colaboradores (2009) concluíram que sempre o filhote macho oriundo do cruzamento de fêmeas XY com machos normais herdavam o cromossomo X de seus pais e o cromossomo Y de suas mães. De acordo com os autores, esse resultado confirma a hipótese de que a causa da reversão sexual de fêmeas XY em *A. azarae* está em uma mutação no cromossomo X, descartando assim que uma mutação no cromossomo Y seria a causa principal do fenômeno de reversão sexual em questão.

Outro estudo com *A. montensis* desenvolvido por Fagundes et al. (2000) utilizaram a hibridação in situ fluorescente com uma sonda Y-específica e identificaram uma mutação que envolvia a fusão de um cromossomo Y inteiro ou parcial na região proximal do cromossomo X, além das fêmeas XY carregarem outro cromossomo Y normal independente da espécie. Os autores ao observarem as duas cópias do cromossomo Y no cariótipo dessas fêmeas (uma cópia isolada e outra fundida no cromossomo X acrocêntrico) e após confirmação de amplificação por PCR sugerem que o gene Sry esteja presente e intacto e propuseram que o mecanismo da reversão sexual envolveria outros genes de uma cascata de eventos, nos quais genes possivelmente ligados ao cromossomo X teriam sido afetados pela quebra cromossômica decorrente do rearranjo no cromossomo X. Entretanto, até aquele momento, em nenhum dos estudos foi investigada a integridade de estrutura ou função do gene Sry.

Mais recentemente, Sanchez et al. (2010) compararam a estrutura primária do gene Sry e da proteína relacionada e não verificaram diferenças significativas entre machos e fêmeas com reversão sexual de *A. azarae* e *A. boliviensis*. Foram relatadas algumas alterações na sequência de aminoácidos da proteína, mas não houve um estudo da estabilidade química da molécula.

O caso de reversão sexual em fêmeas XY de *Akodon montensis* pode servir como modelo para se entender outros casos de reversão sexual de mamíferos que persistem nas populações bem como elucidar questões sobre o papel dos genes ligados a determinação sexual.

I.7. INFLUÊNCIA DA HISTÓRIA DEMOGRÁFICA

Segundo Schwartz et al. (2010) inúmeros fatores bióticos e abióticos podem atuar sobre parâmetros demográficos que determinam e influenciam o tamanho populacional e suas flutuações. Apesar de se saber bastante sobre influência temporal e de fatores abióticos sobre a variação demográfica de populações, os efeitos de variações genéticas dentro de populações são pouco conhecidos. Entender a variação genética populacional é importante, pois a interação entre parâmetros demográficos e fatores genéticos permite se investigar taxas e riscos de extinção e flutuações genéticas temporais em populações naturais.

Para Myers (2000) muitos organismos estão entrando em estágios iniciais de extinção tendo como única causa desse processo, a ocupação de áreas naturais pela espécie humana. Além disso, a perda e a fragmentação do habitat podem levar a redução do fluxo gênico em populações pequenas e fragmentadas, que acabam ficando isoladas entre si. Como consequência desse isolamento, ocorre um declínio da diversidade genética e até mesmo perda total dessa diversidade pelo aumento de endocruzamento dentro dos fragmentos

A perda da diversidade genética e o aumento do endocruzamento reduzem a capacidade de reprodução bem como a sobrevivência de muitas espécies selvagens (FRANHKAM et al. 2010)

De acordo com Battista (2001) a fragmentação do habitat pode ser uma das causas principais da perda de diversidade biológica, e reduzir não somente o número total da área geográfica da ocorrência de uma espécie, bem como causar um isolamento entre populações que anteriormente mantinham fluxo gênico, alterando assim suas trajetórias evolutivas e até mesmo seu tempo de vida. Em curto prazo, os efeitos da fragmentação, levam a perda da heterozigotidade, o que pode causar diminuição do valor adaptativo e diminuir a viabilidade das populações remanescentes. Em longo prazo, a redução na riqueza de alelos limita a capacidade das espécies de responderem a mudanças nas pressões seletivas (FRANHKAM et al. 2010).

A fragmentação leva um efeito tão severo que muitas populações alteram até mesmo seu equilíbrio de razão sexual. Mudanças na razão sexual comumente estão associadas a fatores ecológicos e pode ser afetada por ações antrópicas e por redução do tamanho populacional (FRANKHAM et al. 2010), redução que pode ser causada pela fragmentação do habitat. Fisher (1930) já havia postulado que a seleção natural favorece a produção de indivíduos do sexo que por um motivo qualquer tenha se tornado mais raro, tendendo sempre a restabelecer a razão sexual de 1:1. Existem relatos de fêmeas que seguiram uma tendência de desviar a razão sexual de sua prole para fêmeas quando não se encontravam em condições ambientais favoráveis (TRIVERS e WILLARD 1973), e que com a atuação da seleção natural durante a história evolutiva, as espécies com desequilíbrio da razão sexual tenderiam a restabelecer esse equilíbrio privilegiando o sexo menos abundante.

A alteração da razão sexual devido à fragmentação do habitat e a falta de recursos também foi identificada em populações de *Micoreus demerarae* num estudo de populações desse marsupial em fragmentos da Mata Atlântica (FERNANDEZ et al. 2003).

Uma tendência a desvio da razão sexual da prole também foi proposta para uma população de *A. montensis* do município de Iguape no estado de São Paulo. Nessa população, Fagundes et al. (2000) identificaram cinco fêmeas XY e predisseram um modelo de reprodução dessas fêmeas XY com machos normais no qual fêmeas XY geram uma prole com desvio da razão sexual, tendo dois filhotes fêmeas para um filhote macho, aumentando assim o número de fêmeas na população.

Há evidências de que fêmeas XY férteis de *A. azarae* (BIANCHI 2002), *A. boliviensis* (HOEKSTRA e HOEKSTRA 2001) e *Microtus mandarinus* (ZHU et al. 2003) estão sendo mantidas na população. Segundo Hoekstra e Hoekstra (2001), por modelos matemáticos sugerem que a ação conjunta de seleção natural e segregação meiótica seria suficientes para explicar a manutenção de 10% de fêmeas XY em *A. azarae*.

Tanto Fagundes et al. (2000) quanto Hoekstra (2003) sugerem em seus estudos que a razão sexual da prole de *A. montensis* em Iguape (Brasil) e *A. azarae* (Buenos Aires – Argentina) e *A. boliviensis* (Puno – Peru), respectivamente, apresentam prole alterada, com geração de duas fêmeas para um macho. Os autores afirmaram que outros estudos precisam ser feitos para verificar se existem outras forças evolutivas que atuam na manutenção das fêmeas XY em alta frequência em outras espécies do gênero *Akodon*. O motivo pelo qual essas fêmeas XY são

mantidas na população e o porquê é registrado somente em algumas populações ainda não foi elucidado.

Padrões contemporâneos de diversidade genética e distribuição geográfica de um organismo refletem um legado histórico como, por exemplo, a fragmentação ocorrida no Pleistoceno e as mudanças demográficas pelas quais essa população passou (expansão de área geográfica e populacional e evento de gargalo) associadas a fatores recentes (fragmentação associada a fatores antrópicos e isolamento). (ALDENHOVEN et al. 2010)

Técnicas de biologia molecular, com uso de marcadores genéticos com diferentes modos de herança e taxas evolutivas, têm sido amplamente empregadas para se inferir padrões de dispersão, fluxo gênico e na identificação de migrantes em populações geneticamente estruturadas (PRUGNOLLE e DE MEEÛS 2002). Marcadores moleculares estão sendo empregados para se inferir sobre importantes eventos demográficos como eventos de gargalo populacional e taxas de migrantes (CORNUET e LUIKART 1996) O crescimento do uso de ferramentas genéticas pode levar a um avanço no conhecimento sobre comportamentos de dispersão e fluxo gênico em mamíferos, bem como ajudar na conservação de populações que ocupam áreas fragmentadas (ESTES-ZUMPF et al., 2014).

Um dos fatores que influenciam parâmetros demográficos de uma população são os processos de fragmentação do habitat, que pode ser devido à ação antrópica ou variações na composição vegetal que ocorrem naturalmente. A fragmentação por ação antrópica do bioma Mata Atlântica (local onde ocorre *A. montensis*) tende a comprometer a diversidade biológica deste ambiente, pois muitas de suas espécies endêmicas estão ameaçadas de extinção devido à destruição de seus habitats originais e pelo isolamento espacial resultante deste processo (BERGALLO et al. 2000).

Esse tipo de fragmentação também atinge o Cerrado, outro bioma de ocorrência de *A. montensis*. O Cerrado é considerado a maior, mais rica e provavelmente a mais ameaçada região de savanas tropicais do mundo (SILVA e BATES 2002) sendo um dos biomas que mais sofreu com a ação antrópica. Nos últimos 25 anos, o Cerrado vem sofrendo ação direta da expansão da agricultura.

I.8. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA ESTRUTURA DE UMA PROTEÍNA

Até recentemente a diversidade de moléculas foi estimada baseada exclusivamente na sequência do DNA (genômica). Porém, alterações no código genético não necessariamente

estão associadas com alteração de função de uma proteína. A ciência mais recentemente em ascensão, a proteômica, caracteriza o conjunto de proteínas de um organismo baseada na estrutura tridimensional da proteína e dos sítios de ligação com outros fatores associados a sua funcionalidade. Mesmo a modelagem tridimensional com pouca resolução pode ser útil para a biologia porque alguns aspectos da função proteica, por vezes, só podem ser previstos a partir das características de um modelo (MÁRTI-RENOM et al. 2000).

Outra notável característica da modelagem tridimensional é que segundo Márti-Renom et al. (2000), as estruturas 3D de proteínas de uma família são mais conservadas do que as suas sequências. Márti-Renom e colaboradores (2000) afirmam que o potencial dos projetos de sequenciamento do genoma somente serão completamente concluídos quando as funções das proteínas atribuídas ao genoma forem compreendidas. Ainda de acordo com esses autores, a modelagem comparativa irá desempenhar um importante papel na integração de informações sequência genômica com bancos de dados decorrentes de genômica funcional e estrutural.

Na busca de marcadores moleculares que ajudem no tratamento e diagnóstico de várias doenças humanas, diversos estudos têm investigado alterações nos genes, seus transcritos e produtos proteicos. No estudo com animais, as investigações proteômicas se restringem a produção e parasitologia (STRZEZEK et al. 2005) que, de certa forma, envolvem diretamente questões humanas.

Análises de estrutura tridimensional de proteínas em espécies animais sem interesse comercial não estão disponíveis em bancos de dados mundiais de estrutura macromolecular proteica. Entretanto, é sabido que se é possível transpor os conhecimentos de fisiologia animal para a humana (FAGUNDES e TAHA 2004). O modelo animal é usado virtualmente em vários campos da pesquisa biológica nos dias de hoje, inclusive quando se trata de casos de reversão sexual.

Segundo Bianchi (2002) é possível que os mecanismos de reversão sexual no gênero *Akodon* possam ser comuns a outros mamíferos elucidando sobre o papel dos genes envolvidos na cascata de determinação sexual. Dessa forma o desenvolvimento de modelos em ratos pode ajudar a explicar a reversão sexual em humanos, como a reversão XY do sexo feminino e hermafroditas XY que carregam um gene SRY aparentemente normal (ALBRECHT e EICHER, 1997).

Independente do modelo, a identificação das proteínas afetadas por mutações ou transgenias pode fornecer valiosas informações sobre os processos bioquímicos que são alterados no

metabolismo desses indivíduos, derivados tanto dos efeitos pleiotrópicos quanto dos decorrentes das perturbações genéticas propriamente ditas (GSTAIGER e AEBERSOLD 2009).

Desde a sua descoberta o gene Sry é tido como o principal fator determinante do sexo masculino. O gene Sry é um gene de um único exon (GRAVES 2002), sem a presença de introns, que codifica uma região de aproximadamente 80 aminoácidos que foi associada a um domínio HMG-box, devido à homologia dessa região com as proteínas de alta mobilidade que atuam como fatores que influenciam a arquitetura da cromatina (GRAVES 2001).

Por meio da região HMG-box, o Sry se liga diretamente a molécula de DNA (KOOPTMAN 1995), promovendo, possivelmente, associação com elementos regulatórios e formando um complexo que controla a atividade de outros genes (GRAVES 2002). É encontrado de forma ortóloga em todos os cromossomos Y de mamíferos eutério e metatérios com algumas exceções, por exemplo, em lemingues (JUST et al. 1995) e roedores do Japão do gênero *Tokudaia* (JUST et al. 1995).

O gene SRY pertence à família de genes SOX, formada por mais de 20 genes extremamente conservados em todas as espécies animais (GRAVES 2002), que apresentam função de ativadores e repressores de processos transcrição. Entretanto, mesmo já se conhecendo o gene Sry por 20 anos, detalhes do sítio de interação gênica com outros fatores como o Sfl, que é primordial na biopotencialidade das gônadas, ainda são desconhecidos.

Alguns estudos já apontam que o controle da gonadogênese em humanos é um processo muito complexo, podendo haver um número indefinido de genes autossômicos ou ligados ao X que atuam antes e depois na determinação testicular (MACLAUGHLIN e DONAHOE 2004) e não somente o gene Sry. Sutou et al. (2001) sugeriram que dois genes ligados ao X parecem atuar na determinação sexual. Recentemente, demonstrou-se que DAX-1 é efetivamente necessário para a diferenciação testicular, pois se observa a reversão sexual em camundongos XY com DAX-1 inativado (MEEKS et al. 2003).

O gene DAX-1 está localizado na região Xp21.3 do cromossomo X de humanos, região dosagem-sensível crítica à reversão sexual e hipoplasia adrenal congênita, e codifica um membro órfão incomum da superfamília de receptores hormonais nucleares (CALLIARI et al. 2007), desempenhando um papel importante no desenvolvimento da glândula supra renal e do sistema reprodutor humano (ZANARIA et al. 1994).

Em humanos, DAX-1 codifica uma proteína com 470 aminoácidos, com repetições N terminais ao invés do domínio de ligação com a molécula de DNA dedo de zinco, que é comum a todos os outros membros da superfamília de receptores nucleares (SUZUKI et al. 2002). Além disso, parece atuar como supressor contra Sf1 (atua na bi potencialidade das gônadas) (CRAWFORD et al. 1998).

O gene DAX-1 foi isolado pela primeira vez num estudo de humanos com hipoplasia adrenal congênita ligada ao cromossomo X (ZANARIA et al. 1994). Sua expressão é detectada no 10,5º dia do desenvolvimento do embrião, na crista urogenital primordial (SWAIN et al. 1996) e de forma subsequente aparece no hipotálamo, córtex das adrenais e nas gônadas (SWAIN et al. 1996, ZANARIA et al., 1994). Homens com mutações nesse gene apresentam hipofunção das adrenais no nascimento e deficiência de gonadotrofina na puberdade e a duplicação desse gene leva a uma reversão sexual macho-fêmea (FRANHKAM et al. 2010). A expressão deficiente de Dax-1 em camundongos machos causaram infertilidade e uma diminuição dos testículos (YU et al., 1998) afirmaram que altos níveis de expressão de Dax-1, devido a um elevado número de cópias, e o gene Sry intacto, resultou fêmeas XY no roedor transgênico do gênero *Poschiavinus*.

II. OBJETIVOS E METAS

Diante desse cenário, o presente estudo se propôs a adicionar informações para a melhor compreensão do mecanismo de reversão sexual de *A. montensis*. Nesse sentido, investigar o papel dos genes ligados à determinação do sexo e dos processos que envolvem esses genes, tomando como base um organismo modelo como fêmeas XY de *Akodon montensis*, verificando a integridade/funcionalidade de alguns genes ligados ao sexo bem como seu número de cópias e estruturação genética e demográfica das populações de *A. montensis*, assim como verificar se historicamente os nove casos de reversão sexual no gênero *Akodon* possuem uma origem comum. Assim, foram propostas algumas hipóteses a serem testadas:

II.1. HIPÓTESES

- A) "As fêmeas XY de *Akodon montensis* ocorrem em populações com traços de desvios demográficos", com a predição de que a população de Iguape de *A. montensis* com fêmeas XY exibe traços de ocorrência de gargalo populacional seguido de expansão abrupta, comparado a outras populações da espécie.
- B) "A reversão sexual em *A. montensis* não é produto de ausência e ou deficiência do gene Sry", com a seguinte predição: o gene Sry está presente e íntegro em fêmeas X*Y
- C) "A reversão sexual em *A. montensis* é devido a problemas na estrutura ou função de um gene ligado ao cromossomo X que atua na cascata de eventos de determinação do sexo, o gene Dax-1", com a seguinte predição: o gene Dax-1 está presente e alterado em fêmeas X*Y.
- D) "Em *A. montensis*, o número de cópias do gene Sry é duplicado, corroborando a proposta prévia de que há duplicata do gene SRY, uma intacta no cromossomo Y e outra no cromossomo X" com a predição de que machos apresentam uma cópia do gene Sry e as fêmeas XY apresentam mais de uma cópia.
- E) "A origem da reversão sexual no gênero *Akodon* não é única, uma vez há propostas de diferentes alterações em cromossomos X e Y promovendo a reversão sexual em *Akodon*", com a predição de que o mapeamento desse caráter evolutivo mostrará uma maior probabilidade de origens múltiplas.

II.2. METAS

- A) Verificar os níveis de diversidade genética intrapopulacional, se a população de *Akodon montensis* onde ocorrem as fêmeas XY apresenta sinais de gargalo populacional seguido de expansão abrupta e estimar o período de origem das fêmeas XY na população de Iguape.
- B) Verificar a presença e integridade estrutural do gene Sry e Dax-1 em machos, fêmeas e fêmeas XY de *Akodon montensis* e comparar a diversidade de sequências intraespecífica com a de outras espécies do gênero *Akodon*.
- C) Analisar a estrutura funcional (HMG-box) e não funcional das proteínas originadas pelas sequências do gene Sry de fêmeas XY e machos.
- D) Verificar o número de cópias dos genes Sry e Dax-1 presentes no genoma de machos, fêmeas e fêmeas XY de *A. montensis*.
- E) Mapear se as fêmeas XY relatadas no gênero *Akodon* tem origem comum.

III. METODOLOGIA

III.1. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de fígado ou músculo submetidas ao protocolo de extração total segundo Bruford et al. (1992). A qualidade e a quantidade de DNA obtido foi analisada depois submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e comparado com marcador molecular Low Ladder Mass (Invitrogen, Inc.) O extrato também foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.).

III.2. VERIFICAR OS NÍVEIS DE DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL, SE A POPULAÇÃO DE *AKODON MONTENSIS* ONDE OCORREM AS FÊMEAS XY APRESENTA SINAIS DE GARGALO POPULACIONAL SEGUIDO DE EXPANSÃO ABRUPTA E ESTIMAR O PERÍODO DE ORIGEM DAS FÊMEAS XY NA POPULAÇÃO DE IGUAPE

III.2.1. AMOSTRA

A amostra consiste de 94 indivíduos de *A. montensis* coletados em onze localidades (Figura 2, Apêndice 1), sendo duas no Paraguai (Itapúa, n=6 e Camindeyu, n=5) e seis no Brasil (São Paulo, SP (Iguape), n=31, sendo 5 fêmeas XY; Rio Grande do Sul, RS (Maquiné), n=16; Mato Grosso do Sul, MS (Dourados), n=8; Paraná, PR (Iguaçu), n=5; Minas Gerais (Luminárias, Belo Horizonte e Brumadinho), MG, n=14 e Rio de Janeiro, RJ (Sumidouro e Nova Friburgo), n=10).

Os tecidos provenientes de SP, RS e MG foram coletados pelo Laboratório de Genética Animal (LGA) local onde foram feitos a maior parte dos experimentos desse trabalho. Os tecidos do Paraguai foram doados pelo professor Dr. Guillermo D'Elia, os provenientes do MS e PR foram doados pela coleção de tecidos da Universidade Federal do Espírito Santo, quem tem curadora a professora Dra. Leonora Pires Costa. As amostras oriundas do RJ foram emprestadas pela Coleção de Tecidos e Suspensão da Fundação Oswaldo Cruz, que tem como curadora a Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino.

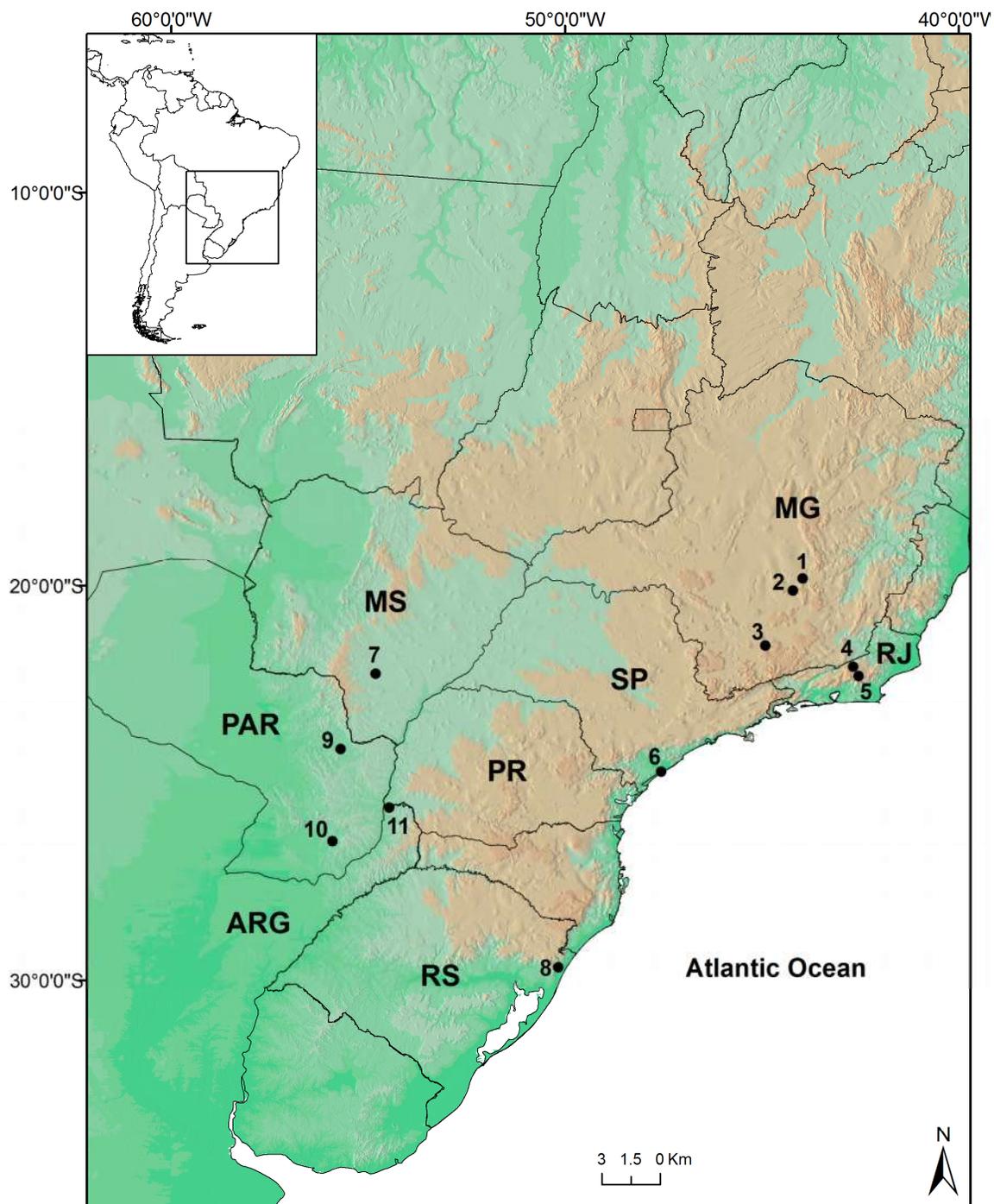


Figura 2. Mapa com as onze localidades dos 94 indivíduos de *A. montensis* empregados nesse estudo. Pontos: Minas Gerais (MG): 1- Belo Horizonte , 2 - Brumadinho, 3 – Luminárias; Rio de Janeiro (RJ): 4 – Nova Friburgo, 5 – Sumidouro; São Paulo (SP): 6 – Iguape; Mato Grosso do Sul (MS): 7- Dourados; Rio Grande do Sul (RS):8- Maquiné; Paraguai (PAR): 9 - Itapúa, 10 – Camindeyu; Paraná (PR): 11 - Iguazu.

III.2.2. AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

A amplificação do fragmento de 1300 pb da região controle do DNA mitocondrial (D-loop) foi realizada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se os *primers* 12S1 e C2 (HOEKSTRA e EDWARDS 2000), em volume total de 25µL, contendo 50 ng de DNA, 3.0 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTPs, 0.5 µM de cada primer, 0.3 unidades de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 1x de solução tampão. A temperatura de anelamento utilizada foi de 53°C e os demais parâmetros seguiram o protocolo padrão (HOEKSTRA e EDWARDS 2000). O tamanho do fragmento dos produtos de PCR foi verificado por gel de agarose 2% baseando-se no marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen, Inc.). Os produtos de PCR foram purificados através de método enzimático de ExoSap (WERLE et al. 1994), e quantificados utilizando eletroforese em gel de agarose 2% e marcador molecular Low Ladder Mass (Invitrogen, Inc.).

Os produtos de PCR foram sequenciados utilizando-se os mesmos *primers* empregados na PCR em um sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems) nos dois sentidos.

III.2.3. ESTATÍSTICAS

O programa MEGA 4.0 (TAMURA et al. 2007) foi utilizado para alinhar as sequências de DNA quanto para se calcular a divergência gênica entre as sequências. O alinhamento das sequências foi realizado manualmente, concomitante à correção das sequências. A análise de similaridade da região alvo foi realizada no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Para a verificação do grau de saturação das bases nucleotídicas dentro das sequências de DNA estudadas foi usado o programa DAMBE de Xia e Xie (2001). Os haplótipos foram estimados pelo programa DnaSP (ROZAS et al. 2003).

Análises interpopulacionais foram feitas utilizando os algoritmos implementados no pacote estatístico do programa ARLEQUIN 3.1. (EXCOFFIER et al. 2005). A diferenciação genética entre as populações foi avaliada a partir dos cálculos de diferença par-a-par entre as sequências (estatística- Φ), utilizando-se o modelo de Kimura 2-parâmetros, sem correção de gama e testada com 10.000 permutações no programa MEGA 4.0 (TAMURA et al. 2007). O número de migrantes por geração (Nm) para cada par de populações foi estimado assumindo

que a taxa de mutação foi insignificante através da fórmula $Nm = (1 - \Phi_{st}) / 2\Phi_{st}$, para genomas haploides (SLATKIN e MADDISON 1989). A análise hierárquica da variação genética entre e dentro dos grupos de populações foi feita a partir da análise de variância molecular (AMOVA), utilizando-se índices de fixação para se avaliar a proporção de variação dentro das populações e entre as populações. O teste de Mantel foi realizado para avaliar a correlação entre divergência genética e distância geográfica.

Os parâmetros intrapopulacionais também foram calculados no ARLEQUIN versão 3.1: número de haplótipos, frequência dos haplótipos, diversidade haplotípica (H_d) e diversidade nucleotídica (d_n) dentro de cada população. Os dados foram considerados significativos quando os valores de P foram inferiores a 0,05 ($P < 0,05$).

A história demográfica das populações (ROGERS e HARPENDING 1992; HARPENDING et al. 1998) foi analisada a partir de dados da distribuição *mismatch*, calculada no programa ARLEQUIN versão 3.1 (EXCOFFIER et al. 2005). A soma do desvio dos quadrados (SSD) foi utilizada para verificar o desvio entre as curvas observada e esperada da distribuição de *mismatch* dentro do modelo de expansão populacional. Em relação aos padrões de curva dos gráficos de *mismatch*, quando unimodais indicam expansão populacional e quando multimodais indicam que a população se encontra em equilíbrio (ROGERS e HARPENDING 1992). O tempo relativo desde a expansão de cada população foi calculado usando-se $T_{exp} = \tau / 2u$, τ é fornecido pelo programa ARLEQUIN como fator de estimativa de tempo de expansão, u é o número de substituições por geração na região estudada. O valor de u foi obtido pela fórmula $u = \mu L$, onde μ é a taxa de mutação por nucleotídeo por geração e L é o número de pares de base da sequência analisada. Para o cálculo do tempo passado desde a expansão foi utilizada a taxa descrita por Prager et al. (1993) de $20\% \times 10^6$ anos para a região controle de *Mus musculus*. Foram realizados também os testes de neutralidade D de Tajima (TAJIMA 1989) e F de Fu (FU 1997), os quais sugerem ocorrência de expansão populacional recente quando observados valores negativos de significância (FU 1997, SCHNEIDER e EXCOFFIER 1999) usando o programa DNAsp 5.0.

Para estabelecer a relação hierárquica entre os haplótipos foi feita uma rede de haplótipos, por parcimônia estatística através do programa TCS (CLEMENT et al. 1993), que gera um cladograma intraespecífico. Esse programa retira as sequências redundantes e constrói o cladograma conectando os clados separados por uma única diferença. No caso de dois haplótipos diferirem em uma ou mais bases, o programa TCS assume um haplótipo

intermediário “virtual”, que representa haplótipo hipotético (inexistente ou não amostrado). Com o mesmo propósito foi feita uma rede de haplótipos utilizando o programa NETWORK 4.1 (ROHL 2000; <http://www.fluxus-engineering.com>), baseada na implementação do algoritmo *median-joining*, o qual gera uma árvore (*minimum spanning tree*) e adiciona os intermediários ausentes usando o algoritmo de máxima parcimônia de Farris (BANDELT, FORSTER e ROHL 1999).

Com o intuito de se analisar o arranjo filogenético entre os haplótipos investigados foram empregados análises de Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (MV). Para IB foi utilizado o programa MrBayes v.3.1.2 (HUELSENBECK e RONQUIST 2001) com 30.000.000 de gerações, As análises de MV foram realizadas pela plataforma online PhyML testados por 1000 replicações de *bootstrap*. Os modelos de substituição nucleotídica apropriados para os métodos de MV e IB, foram determinados a partir do programa jModelTest 0.1 (POSADA 2008). Amostras provenientes do GenBank, uma amostra de *A. boliviensis* (acesso AF296262.1) e uma de *A. azarae* (acesso AF296260.1) foram usadas como grupo externo.

A fim de se verificar a dinâmica das fêmeas XY dentro da população de Iguape e se estimar a origem dessas fêmeas na população em questão, bem como se ela interfere nos resultados encontrados para a dinâmica demográfica os testes de distribuição *mismatch*, a soma do desvio dos quadrados (SSD) bem como testes de neutralidade D de Tajima e F de Fu, foram refeitas simulando-se três cenários distintos considerando-se para essa população: machos e fêmeas XX (cenário 1); somente fêmeas XY (cenário 2) e somente fêmeas normais (cenário 3), como feito em Hoekstra (2003) e somente machos (cenário 4). Também foi gerado um arranjo filogenético por agrupamento de vizinhos e ML para se verificar a relação entre os haplótipos de região controle do DNA mitocondrial de fêmeas XX e XY. Nessas análises foram empregadas somente fêmeas XX e fêmeas XY, com 15 amostras de SP (dessas, cinco são fêmeas XY), quatro amostras de MS, duas de PR e seis amostras do RS. Foi utilizada uma sequência de *Akodon boliviensis* (Genebank acesso AF296262.1.) como grupo externo. Se houver um único haplótipo ancestral de uma fêmea XY que estiver se espalhado para a população, as fêmeas XY provavelmente estarão espalhadas por toda a árvore gerada. E se as fêmeas XY tiverem uma origem relativamente recente, é esperado que a árvore tivesse ramos relativamente curtos com pouca estrutura interior. Também foi calculado a data estimada em que ocorreu o aparecimento da primeira fêmea XY na população de Iguape. Para isso foi-se

empregado à média de diferença par-a-par (em porcentagem) entre os haplótipos das fêmeas XY usando a taxa evolutiva sugerida por Prager et al. (1993).

III.3. VERIFICAR A PRESENÇA E INTEGRIDADE ESTRUTURAL DO GENE SRY E DAX-1 EM MACHOS, FÊMEAS E FÊMEAS XY DE *AKODON MONTENSIS* E COMPARAR A DIVERSIDADE DE SEQUÊNCIAS INTRAESPECÍFICA COM A DE OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO *AKODON*

III.3.1. AMOSTRA

A primeira etapa dessa meta consistiu em se verificar se além dos machos e fêmeas XY haveria alguma fêmea de *A. montensis* de qualquer outra população que seria positiva para amplificação do gene Sry. Sendo assim, foi feita amplificação por PCR do gene Sry de 94 indivíduos de *A. montensis* disponíveis para esse estudo. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose e observou-se que somente machos e as cinco fêmeas XY (exclusiva de Iguape) amplificaram. Nenhuma das fêmeas empregadas teve amplificação positiva, isso demonstra que de todas as populações amostradas, somente a população de Iguape apresenta fêmeas XY.

Para análise da estrutura do gene Sry, foram utilizados DNAs de 76 indivíduos, sendo 20 de *Akodon montensis*, 28 indivíduos de *Akodon cursor*, 10 indivíduos de *A. lindberghi*, três de *A. paranaensis*, cinco de *A. mystax*, 10 de *A. serrensis*. Para a análise da estrutura do gene Dax-1 foram utilizados DNA de 25 indivíduos de *Akodon montensis*, três de *A. cursor*, cinco de *A. lindberghi* e um de *A. paranaenses* (Apêndice 1).

Na amostra de *A. montensis*, tanto para o gene Sry como Dax-1, cinco indivíduos são fêmeas XY, sendo que todas as amostras mencionadas nesse tópico são provenientes do LGA.

III.3.2. AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Foram amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) fragmentos de 733 pares de base (pb), que incluem todo o gene Sry (576 pb) e a região flanqueadora 5' com 73 pb e a região 3' com 84 pb.

Para a amplificação do gene Dax-1 foram desenhados quatro *primers* específicos, dois para o exon 1 e seis *primers* para o exon dois. Esses iniciadores foram desenhados a partir da sequência completa do genoma de *Mus musculus*, disponível no *Mouse Genome Informatics* (numero de acesso MGI OTTMUSG00000017945) e no Genbank de *Homo sapiens* (número de

acesso 223972646), utilizando-se o programa GENE RUNNER v.301 (Hastings Software, Inc., Hastings, NY). Para o exon 1 ainda foi testado outro par de *primers*, descrito por Calliari et al (2007) A reação de PCR para a amplificação de Dax-1 foi realizada em volume total de 25µL com o perfil e *primers* descritos na tabela 1.

Após a amplificação, os tamanhos dos fragmentos e a purificação dos produtos de PCR seguiram o protocolo descrito no item III.2.2. Os produtos de PCR foram sequenciados utilizando-se os mesmos *primers* empregados na PCR em um sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado nas duas direções para se ter maior confiabilidade da sequência.

A conferência dos eletroferogramas gerados no sequenciamento do produto de PCR bem como o alinhamento dos mesmos seguiram a metodologia padrão do laboratório, descritos no item III.2. A análise de similaridade com o gene Sry e Dax-1 foi realizada no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta BLASTN 2.2.2 com os parâmetros pré-determinados (ALTSCHUL et al. 1997) utilizando para comparação a sequência de *A. boliviensis* (número de acesso FN547815), *A. azarae* (número de acesso FN547812) e *A. dolores* (número de acesso FN547818) (para o gene Sry) e *Mus musculus* (número de acesso NM007430.4) para o gene Dax-1.

Tabela 1. Descrição das concentrações, do perfil e do tamanho do fragmento obtido na amplificação da região controle do DNA mitocondrial (D-loop) e dos genes Sry e Dax-1.

Gene/região	D-loop	Sry	Dax-1
Tamanho fragmento	1500 pb	832pb	
primer forward	12S ¹	SRY-AK-F3 ²	IF ³ DAX – E1F ⁴ DAX1-E2F ⁵
primer reverse	C2 ¹	SRY-AK-R1 ²	IR ³ DAX-E1R ⁶ DAX1-E2R ⁷
Perfil da PCR			
Temperatura annealing	53°C	53°C	62°C
Número de ciclos	35	30	33
Reação de PCR			
Volume total	25	25	25
MgCl ₂ (mM)	3.0 mM	3.0 mM	3.0 mM
Taq Platinum (Invitrogen)	0.3ul	0.3ul	0.3ul
Quantidade de DNA	50ng	50ng	50ng

¹Hoekstra E Edwards (2000); ²Sanchez et al. (2010); ³Calliari et al. (2007); ⁴DAX-E1F: 5'GCTGCTCTGTGGCCTGGGG 3' (presente estudo); ⁵DAX1-E2F 5'GCCTGCAGTGCCTGAAAT 3' (presente estudo); ⁶DAX-E1R 5' GGTCTCCYGCCGCTGGTGG 3' (presente estudo); ⁷DAX1-E2R 5'CARCCAGTATGGAGCAGAGGG 3' (presente estudo)

III.3.3. ESTATÍSTICAS

As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al. 2007), programa que também foi empregado para se calcular a divergência genética entre as sequências. A análise de similaridade da região alvo foi realizada no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Para a verificação do grau de saturação das bases nucleotídicas dentro das sequências de DNA estudadas foi usado o programa DAMBE de Xia e Xie (2001).

Parâmetros haplotípicos foram calculados no DnaSP versão 4.5: número de haplótipos, frequência dos haplótipos, diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (dn) dentro de cada espécie. Os dados foram considerados significativos quando os valores de P foram inferiores a 0,05 ($P < 0,05$).

III.4. ANALISAR A ESTRUTURA FUNCIONAL (HMG-BOX) E NÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS ORIGINADAS PELAS SEQUÊNCIAS DO GENE SRY DE FÊMEAS XY E MACHOS

III.4.1. AMOSTRA

Para realizar as modelagens dos domínios de ligação da proteína Sry ao DNA das sequências de aminoácidos observadas, foram usadas sequências de DNA de 76 indivíduos, sendo 20 de *Akodon montensis*, 28 indivíduos de *Akodon cursor*, 10 indivíduos de *A. lindberghi*, três de *A. paranaensis*, cinco de *A. mystax*, 10 de *A. serrensis* (Apêndice 1) e três amostras, uma de *A. azarae* (GenBank – acesso FN547812.1), uma de *A. boliviensis* (GenBank – acesso FN547815.1) e uma de *A. dolores* (GenBank – acesso FN547818.1) provenientes do Genbank. Não se foi possível isolar a estrutura primária do gene Dax-1 devido ao fato de só se ter conseguido isolar o exon 2 desse gene.

III.4.2. TRADUÇÃO DO DNA EM PROTEÍNA E MODELAGEM DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA

Depois de alinhadas as sequências de nucleotídeos foram analisadas no programa DnaSP versão 4.5 a fim de se descobrir quais eram os haplótipos das sequências existentes. Uma sequência representante de cada haplótipo foi escolhida para as análises de modelagem. Para se traduzir a sequência de aminoácidos da proteína foi empregado o programa EXPASY

na plataforma SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*). O alinhamento múltiplo dos aminoácidos foi feito pelo ClustalW no PBIL (*Pole Bioinformatics Lyonnais Network*). De posse da sequência primária outra análise em buscas de homologia entre as sequências foi realizada, e somente as sequências de aminoácidos que diferenciaram entre si foram modeladas.

Foi adotada a abordagem de modelagem molecular por homologia implementada no programa MODELLER 9 v7 (SALI e BLUNDELL 1993). Dos fragmentos obtidos do gene Sry (ver item III.2.2), foi gerado o modelo 3D da porção HMG-box da proteína que participa de interações com a dupla fita do DNA baseada na porção HMG-box da proteína SRY (Código de acesso PDB1J46 e PDB1J47) de humano usada como molde e no pressuposto de que para sequências acima de 80 aminoácidos, um grau de identidade superior a 25% indica que as estruturas tridimensionais são semelhantes, desde que apresentem também similaridades funcionais (SANTOS 2002). Os domínios HMG-box são macromoléculas que se associam ao DNA, que também foi modelado passando pelas mesmas etapas de avaliações que as proteínas.

Foram gerados modelos para cada sequência da proteína Sry de cada espécie. A modelagem por homologia é baseada na comparação de padrões estruturais conservados em proteínas com estruturas primárias similares. Nestes casos a homologia entre proteínas pode estar relacionada a estruturas e funções similares que foram conservadas evolutivamente. A comparação de modelos tridimensionais obtidos por modelagem molecular com a estrutura obtida por cristalografia de raios X tem indicado uma significativa confiabilidade nos modelos gerados (HILLISCH et al. 2004).

As estruturas geradas foram otimizadas para se aproximar de forma confiável de uma estrutura estável real, encontrando-se o mínimo de energia mais próximo em relação à geometria de partida (SANT'ANNA 2002), empregando mecânica molecular para calcular a energia do sistema, ignorando a presença dos elétrons (CARVALHO et al. 2003). Os modelos gerados nesse estudo foram submetidos a uma avaliação de energia (pontuação DOPE), implementada no programa MODELLER 9v7 para a seleção das melhores estruturas. Além da avaliação de energia, a confiabilidade da estrutura gerada também deve ser testada. Segundo Santos (2002), a distribuição dos ângulos torcionais phi (Φ) e psi (Ψ) da cadeia principal são indicadores da qualidade estereoquímica da proteína.

Os ângulos phi (Φ) e psi (Ψ) referem-se a rotações de duas unidades rígidas dos peptídeos em torno do carbono alfa ($C\alpha$), sendo Φ , o ângulo de torção da ligação $C\alpha$ -N e Ψ o ângulo de torção resultante da ligação $C\alpha$ -CO (carbono da carbonila) (BRANDEN e TOOZE

1991). A maioria das combinações entre os ângulos de torção são favoráveis devido à ocorrência de colisões estéricas entre átomos não ligados em diferentes cadeias ou dentro de um mesmo resíduo (e.g. grupamento R). O gráfico de Ramachandran é uma ferramenta que mostra a distribuição das combinações entre todos os ângulos Φ e Ψ que uma proteína pode apresentar. Caso a proteína apresente resíduos de aminoácidos com problemas estereoquímicos, estes estão em regiões desfavoráveis no gráfico. Assim, para a análise dos modelos gerados nesse estudo foram gerados os gráficos de Ramachandran para analisar o enovelamento e qualidade estereo-química, por meio do programa PROCHECK (LASKOWSKI et al. 1993).

A análise da interação proteína-DNA foi realizada com o programa LIGPLOT (WALLACE et al. 1995) visando obter indícios sobre o modo de associação destas macromoléculas e a influência das mutações presentes nas sequências na interação com o DNA. As figuras foram geradas com o programa PYMOL (DELANO 2002).

III.5. VERIFICAR O NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES SRY E DAX-1 PRESENTES EM MACHOS, FÊMEAS E FÊMEAS XY DE *AKODON MONTENSIS*.

III.5.1. AMOSTRA

Foram utilizados o DNA de 10 machos, cinco fêmeas e cinco fêmeas X*Y de *Akodon montensis* o gene Sry e ainda mais cinco fêmeas XX para o gene Dax-1 (Apêndice 1).

III.5.2. EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

Extração com kit. Todo o RNA do produto da extração de DNA foi retirado utilizando-se RNase (100 mg/ml), por 1 hora a 60°C. Posteriormente, a quantidade de DNA da amostra foi verificada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.).

A análise do número de cópias foi realizado pela técnica de qRT-PCR (expressão relativa) com o equipamento 7.300 *Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). O perfil de cada reação está descrito na tabela 2. Todos os *primers* empregados foram desenhados pelo presente estudo, utilizando-se o programa utilizando-se o programa GENE RUNNER v.301 (Hastings Software, Inc., Hastings, NY). Utilizou-se o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) como sistema de detecção

do DNA. As reações de amplificação foram realizadas com dois pares de *primers*, um par para cada um dos dois genes alvo Sry e Dax-1.

As seguintes condições foram empregadas na reação: etapa 1 (10 minutos a 95°C – 1 ciclo) para ativação da DNA polimerase; etapa 2 (15 segundos a 95°C / 1 minuto a 60°C – 50 ciclos) para anelamentos dos primers e extensão dos transcritos. A etapa 3 (15 segundos a 95°C / 30 segundos a 30°C / 15 segundos a 95°C – 1 ciclo) foi adicionada para a obtenção da curva de dissociação, a fim de confirmar a amplificação específica das reações.

O número de ciclos requeridos para o sinal de fluorescência ultrapassar limiar (Cycle threshold – Ct), bem como a curva de dissociação (melting curve) para a verificação da especificidade da reação, ausência de contaminação e ausência de dímeros de primers foram analisados pelo programa *StepOne Software* (Applied biosystems versão 2.1). Considerando que em mamíferos só há uma cópia de Dax-1 em machos, esse gene foi usado como gene de referência para estimar o número de cópias do gene Sry .

A eficiência de cada primer foi testada pelo método de diluição seriada. O valor da eficiência foi calculado pela seguinte fórmula: $E = \{10^{(-1/a)}\}$, onde *a* é o valor *slope* entre cada concentração conhecida de DNA utilizada na curva padrão (*primer* com eficiência de 100% apresentam *slope* de -3,22). Valores de eficiência entre 90 e 110% foram considerados, utilizando-se a seguinte fórmula para o cálculo da expressão relativa, $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT = \{(CT_{tratado} - CT_{controle}) - (CT_{tratado-referencia} - CT_{controle-referencia})\}$.

Os experimentos foram realizados em triplicatas. As análises quantitativas dos produtos do PCR foram feitas utilizando-se o programa Genescan 672 (PE Applied-Biosystems) e comparando-se o pico gerado pelo DNA controle com o pico gerado para as outras amostras.

Tabela 2. Descrição das concentrações, do perfil e dos *primers* empregados na reação de amplificação por uso de PCR em tempo real.

Gene/região	Sry	sequência do primer	Exon 2 do Dax-1	sequência do primer
Tamanho fragmento	100 pb		100 pb	
primer forward	SryRTF	5'GCCTTACAGCCACAGAA TATC3'	Dax2RTF	5'GCCTGCAGTGCGT3'
primer reverse	SryRTR	5'GCCCATCTATGCCCTT3'	Dax2RTR	5'CTGATCTGGTACTC TCTCTG3'
Perfil da PCR				
Temperatura annealing	60°C		60°C	
Número de ciclos	40		40	
Reação de PCR				
Volume total	20ul		20ul	
SYBR GREEN	10ul		10ul	
Primer F/R (10uM)	0.26/0.39ul		0.3ul	
Quantidade de DNA	50ng		50ng	

III.6. MAPEAR SE AS FÊMEAS XY RELATADAS NO GÊNERO *AKODON* TEM ORIGEM COMUM

III.6.1. AMOSTRA

Das sequências de 31 espécies do gênero *Akodon* utilizadas para gerar uma filogenia, cinco (*A. montensis*, *A. mystax*, *A. cursor*, *A. paranaensis* e *A. lindberghi*) são amostras do LGA. As demais foram obtidas no Genbank (Apêndice 4). Foram escolhidas uma sequência de cada espécie que possuem sua classificação taxonômica confirmada recentemente (ALVARATO-SERRANO e D'ELIA 2013, BRAUN et al. 2010, SMITH e PATTON 2007) para que não houvesse dúvida quanto à filogenia empregada. Totalizando-se 33 sequências do gene mitocondrial citocromo b (801 pb), 31 de *Akodon* e duas de *Necromys*.

III.6.2. ESTATÍSTICAS

Para se entender como pode ter ocorrido à evolução das fêmeas XY dentro do gênero *Akodon* foi gerada uma árvore filogenética a partir de análise de Máxima Verossimilhança gerada no programa MEGA 5.05 (TAMURA et al. 2011). O melhor modelo de substituição nucleotídica para MV e IB, foi determinado a partir do programa jModelTest 0.1 (POSADA 2008). A topologia encontrada foi inserida no programa Mesquite versão 2.75, desenvolvido por Maddison e Maddison (1992).

Para mapear a ocorrência de fêmea XY nas espécies analisadas, o caráter registro de ocorrência (1) e ausência do registro (0) foi codificado numa matriz binária (WIENS, 1999). Nessa matriz também foi registrado a hipótese apontada para a explicação da reversão sexual de cada espécie. A matriz foi inserida no programa Mesquite versão 2.75. Nesse programa foi estabelecida uma relação entre a topologia de resultante da MV e a matriz binária. O modelo de probabilidade adotado para o mapeamento foi o “one parameter Markov k-state” (LEWIS 2001), pois considera a mesma probabilidade de mudança entre os estados de caracteres. A partir deste modelo, foram calculadas as probabilidades para cada possível estado ancestral (PEA) para o caráter analisado.

IV. RESULTADOS

IV.1. VERIFICAR SE A POPULAÇÃO DE *AKODON MONTENSIS* ONDE OCORREM AS FÊMEAS XY APRESENTA SINAIS DE GARGALO POPULACIONAL SEGUIDO DE EXPANSÃO ABRUPTA E ESTIMAR O PERÍODO DE ORIGEM DAS FÊMEAS XY NA POPULAÇÃO DE IGUAPE.

IV.1.1. ANÁLISES INTRA E INTERPOPULACIONAIS

A análise de 1300 pb da região D-loop de 94 indivíduos de *A. montensis* revelou 325 sítios variáveis, definindo 79 haplótipos (Tabela 3), com frequência das bases igual a A=30,7%, C=25,2%, G=13,9% e T=30,2%. Não houve saturação nas sequências amostradas. A diversidade haplotípica global foi alta ($h=0,9904$) e a diversidade nucleotídica global também foi alta ($dn=0,02201$). Cada um dos 79 haplótipos se mostrou população-específico, não sendo compartilhado entre as populações. Para todas as populações, os índices de diversidade haplotípica foram altos, variando de $h=0,8$ a 1,0.

A divergência genética interpopulacional foi elevada, variando de 0,7% entre Itapúa (ITA-PR) x Iguazu (PR) a 3,2% entre Maquiné (RS) x Luminárias/ Belo Horizonte (MG) (Tabela 4). A divergência genética intrapopulacional foi baixa variando de 0,3% para Iguazu (PR), 0,4% para Sumidouro/Nova Friburgo (RJ), 0,7% para Iguape (SP), 0,8% para Itapúa (ITA), 1,0 % para Camindeyu (CAM-PR) 1,3% para Dourados (MS) inverter, 2,1% para a Luminárias/Belo Horizonte (MG) e 2,2% para Maquiné (RS).

A análise da divergência interpopulacional mostrou valores de Φ_{st} significativos para todas as populações, com alta divergência, Φ_{st} variando de 0,03 nas populações de ITA e CAN a 0,977 RJ e PR. Os valores de número de migrantes (N_m) confirmam os achados de Φ_{st} , mostrando valores inferiores a 1 (Tabela 3), indicando fluxo gênico restrito entre as populações, exceto entre as populações do Paraguai (CAN e ITA).

As análises de variância molecular demonstraram que a maior porcentagem de variação está entre as populações (91,22%) do que dentro das populações (8,77%), confirmando a diferenciação entre as populações indicando uma estruturação geográfica entre elas (Tabela 5).

O teste de Mantel foi não significativo ($p= 0,1666$), assim não se pode estabelecer relação entre a distância genética entre as populações com a distância geográfica.

IV.1.2. TESTANDO A EXPANSÃO DA POPULAÇÃO DE IGUAPE/SP

O valor SSD (Tabela 3) da distribuição de mismatch foi não significativo para todas as populações, exceto para PR indicando que o modo pelo qual as populações expandiram segue um padrão segundo a curva de distribuição de mismatch esperada, e não a observada (Figura 3). As populações RS, MS e MG mostraram sinais de equilíbrio populacional, com os respectivos valores de τ de 33,6; 77,2 e 18,2 (Tabela 3). A população PR foi a única que apresentou um desvio significativo do teste da soma dos desvios dos quadrados (SSD) da distribuição mismatch, com apresentação da curva observada em formato bimodal (Figura 3.e), indicando que esta população encontra-se em equilíbrio demográfico, com valor de $\tau=9,4$ (Tabela 3).

A população de Iguape/SP (Figura 3.a) apresentou curva de distribuição esperada unimodal, o que indica que essa população mostra sinais de expansão populacional ($\tau=2,6$; Tabela 3).

As estatísticas de D de Tajima e Fs de Fu tentam relacionar os dados observados com a teoria neutra de evolução molecular. Tanto os valores de D de Tajima, quanto o F de Fu (Tabela 3) foram não significativos para as populações de RS, MG, MS e PR, mas significativos para a população de SP, com valores negativos, indicando expansão populacional.

O tempo decorrido desde a última expansão calculado para cada população, segundo $T_{exp}=\tau/2u$, sendo o valor de $u = \mu L$ (onde μ é a taxa de mutação por nucleotídeo por geração e L é o número de pares de base da sequência analisada) mostrou em geral sinais de expansão muito antiga para todas as populações, acima de 12,5 mil anos (Tabela 6). A população de Iguape/SP, por outro lado, mostrou um período de expansão recente, datado de 4,8 mil anos

Tabela 3. Número de indivíduos (n), de haplótipos (nH) e de sítios polimórficos por população (nSP), diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (dn), soma de desvios dos quadrados (SSD) índice de tempo de expansão (τ), valores dos testes D de Tajima e Fs de Fu de *Akodon montensis*.

Populações	Map ¹	N	nH	nSP	Hd	dn	SSD* (P-valor)	τ	D (P-valor)	Fs (P-valor)
São Paulo (SP), total	0	31	24	107	0.9398	0.00800	0.00214 (0.970)	2.6	-2.4908 (p<0.01)	-3.90856 (p<0.02)
São Paulo SP, excluindo fêmeas XY	-	26	20	113	0.9354	0.01105	0.00255 (0.970)	3.7	-1.87369 (p<0.01)	-3.37114 (p<0.02)
São Paulo SP, somente fêmeas XY	-	5	5	12	1.0000	0.00440	0.06739 (0.470)	1.65	-1.21472 (p>0.01)	-1.10765 (p>0.01)
São Paulo SP, somente fêmeas XX	-	10	10	109	1.0000	0.02561	0.02097 (0.790)	9.18	-1.61907 (p>0.05)	-1,71329 (p>0.10)
São Paulo SP, somente machos		16	12	53	0.9167	0.00635	0.02409 (0.640)	6.58	-2.33080 (p<0.01)	-3,33934 (p<0.02)
Minas Gerais (MG)	1,2,3	14	12	113	0.9780	0.02055	0.02126 (0.600)	6.5	-1.28507 (p>0.10)	-1.85990 (p>0.10)
Mato Grosso do Sul (MS)	4	8	7	131	0.9643	0.01392	0.04516 (0.190)	77.2	-1.25482 (p>0.10)	-1.01355 (p>0.10)
Paraná (PR)	5	5	3	12	0.8000	0.00544	0.20915 (0.000)	9.4	0.65175 (p>0.10)	2.942 (p>0.10)
Rio Grande do Sul (RS)	6	16	15	138	0.9917	0.02327	0.2141 (0.320)	33.6	-0.97624 (p>0.10)	-2.1730 (p>0.10)
Rio de Janeiro (RJ)	7	10	9	23	0.9780	0.00776	0.03075 (0.470)	10.6	0.51979 (p>0.10)	-2.22868 (p>0.10)
Canindeyú (CAN)	8	5	5	31	1.0000	0.01159	0.07330 (0.340)	9.3	-0.24137 (p>0.10)	0.12722 (p>0.10)
Itapúa (ITA)	9	6	6	26	1.0000	0.00811	0.03186 (0.870)	11.4	-0.73130 (p>0.10)	-0.94672 (p>0.10)
Total		94								

¹ veja localização no mapa (Figura 2). Em negrito valores significativos de p.

Tabela 4. Valores de divergência genética interpopulacional (abaixo); número migrantes por geração entre as populações e Φ_{st} (acima).

	RS	SP	MS	PR	MG	RJ	CAN	ITA
RS		0.473/ 0.513	0.816/ 0.380	0.034/ 0.937	0.039/ 0.926	0.031/ 0.940	0.036/ 0.931	0.034/ 0.936
SP	0.026		0.982/ 0.337	0.019/ 0.963	0.026/ 0.950	0.018/ 0.964	0.020/ 0.960	0.019/ 0.962
MS	0.029	0.017		0.051/ 0.906	0.050/ 0.908	0.043/ 0.921	0.056/ 0.898	0.050/ 0.908
PR	0.024	0.010	0.011		0.033/ 0.938	0.018/ 0.977	0.015/ 0.969	0.013/ 0.975
MG	0.032	0.022	0.026	0.021		0.475/ 0.513	0.874/ 0.363	0.803/ 0.383
RJ	0.027	0.023	0.029	0.019	0.028		0.275/ 0.644	0.220/ 0.694
CAN	0.027	0.014	0.013	0.008	0.024	0.021		12.588/ 0.03
ITA	0.026	0.013	0.012	0.007	0.025	0.021	0.009	

Valores de Φ_{st} Em negrito. Todos os p-valores foram < 0.05 para todas as populações do Brasil, exceto entre as populações do Paraguai (CAN e ITA).

Tabela 5. Valores de análise de Variância Molecular

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variância
Entre as populações	2912.502	108.75259	91.22
Dentro das populações	881.331	10.46546	8.78
Total	9223.297	119.21805	

$F_{ST} 0.91222$ $p=0.00000$

Tabela 6. Estimativa do tempo decorrido (anos) desde a última expansão populacional de todas as umas das populações analisadas. Sendo $T_{exp} = \tau/2u$ e $u = \mu L$ (onde μ é a taxa de mutação por nucleotídeo por geração e L é o número de pares de base da sequência analisada).

Populações	Tempo decorrido (em anos) desde a última expansão
RS	64.615,3
SP	4.800,0
MS	148.461,5
PR	18.076,9
MG	12.500,0
RJ	20.384,0
CAN	17.884,0
ITA	21.923,0

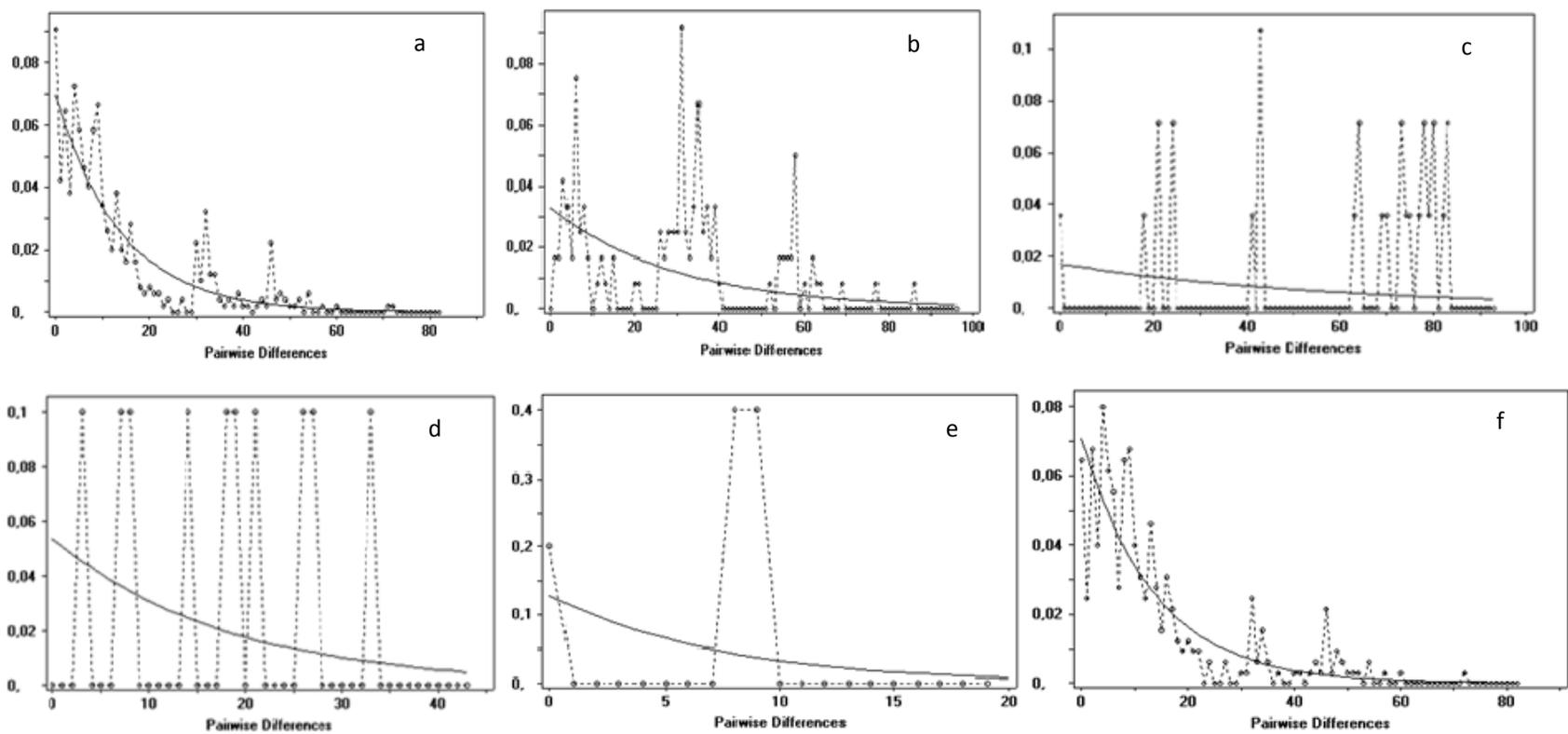


Figura 3. Distribuição das diferenças nucleotídicas par-a-par entre os indivíduos de cada população (distribuição *mismatch*). Os valores do eixo X indicam o número de diferenças entre os haplótipos e o eixo Y a frequência dos haplótipos. 3.a SP; 3.b RS; 3.c MS; 3.d MG; 3.e PR; 3.f SP (sem as fêmeas XY); 3.g CAN; 3.h ITA; 3.i SP (somente fêmeas XY), 3.j (somente fêmeas XX), 3.k (somente machos). Linha contínua esperado e linha tracejada observado (continua).

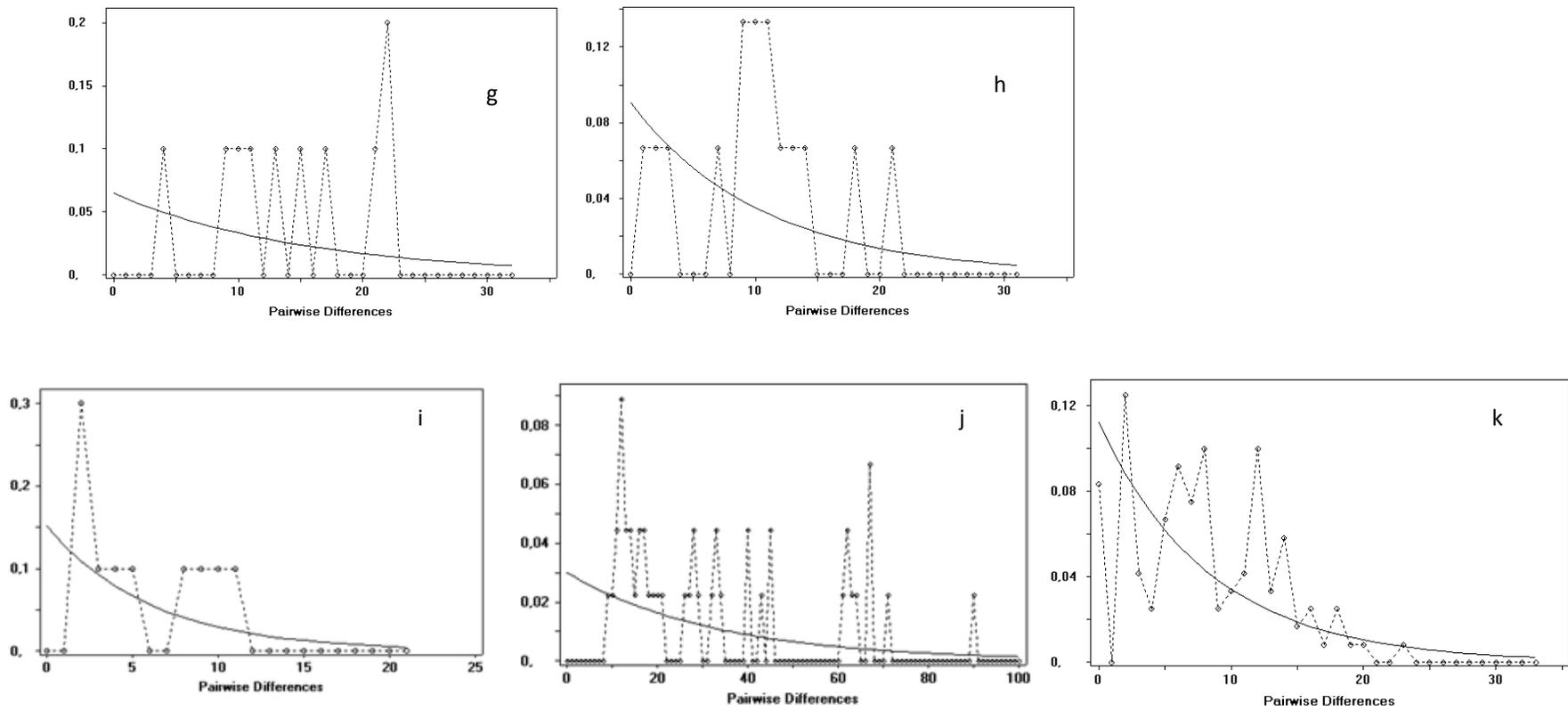


Figura 3.(continuação). Distribuição das diferenças nucleotídicas par-a-par entre os indivíduos de cada população (distribuição *mismatch*). Os valores do eixo X indicam o número de diferenças entre os haplótipos e o eixo Y a frequência dos haplótipos. 3.a SP; 3.b RS; 3.c MS; 3.d MG; 3.e PR; 3.f SP (sem as fêmeas XY); 3.g CAN; 3.h ITA; 3.i SP (somente fêmeas XY), 3.j (somente fêmeas XX), 3.k (somente machos). Linha contínua esperado e linha tracejada observado.

IV.1.3. RELAÇÃO HIERÁRQUICA DOS HAPLÓTIPOS

Os altos índices de diversidade nucleotídica impediram que os clados gerados pelo TCS fossem conectados pelo algoritmo de parcimônia estatística implementado pelo software, gerando, assim, várias redes que não puderam ser conectadas (dados não mostrados), mesmo quando o índice de confiança foi reduzido a 90%. A rede de haplótipos gerada pelo NETWORK (Figura 4) não mostrou estruturação geográfica das populações, mas mostrou agrupamentos de populações, como por exemplo um grupo com várias populações de São Paulo, outro grupo Brasil – Paraguai (BP) formado por populações de Dourados (MS) Iguazu (PR) no Brasil e Camindeyu (CAN) e Itapúa (ITA) no Paraguai, um grupo norte composto pelas amostras de Luminárias/Belo Horizonte (MG) um quarto grupo, sul-sudeste, que engloba as amostras de Maquiné (RS) e Sumidouro/Nova Friburgo (RJ).

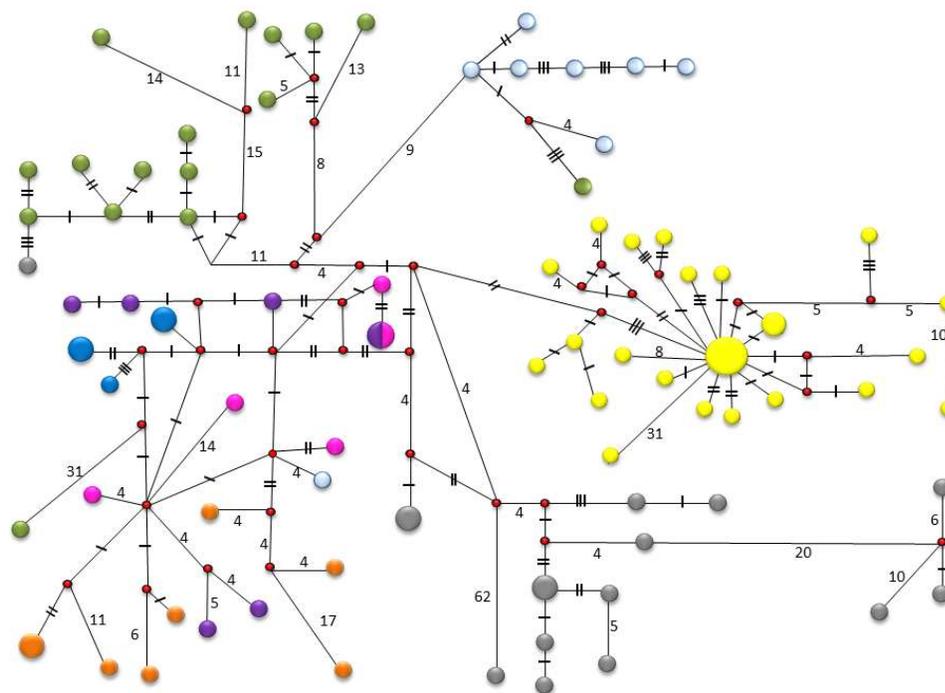


Figura 4. Rede de haplótipos das amostras de *A. montensis* gerada pelo programa NETWORK. Em azul haplótipos da população PR, amarelo SP, cinza MG, rosa CAN, roxo ITA, prata RJ, verde RS e laranja MS. Vermelhos haplótipos não amostrados. Haplótipos mostrados com frequência relativa. Os números indicam os passos mutacionais.

As topologias das árvores filogenéticas bayesianas (Figura 4) foram similar à topologia encontrada MV. O modelo evolutivo determinado pelo programa MODELTEST 3.06 para IB foi HKY + G, sendo $G=0.48$. Para MV foi TNG + G, sendo $G=1.07$. A monofilia foi confirmada, entretanto com baixa resolução do relacionamento entre as populações, muito embora os poucos agrupamentos isolados coincidam com aqueles evidenciados na rede de haplótipos.

IV1.4. TESTANDO SE O SINAL DA EXPANSÃO POPULACIONAL DE IGUAPE ESTÁ ASSOCIADO A PRESENÇA DAS FÊMEAS XY

As análises de diversidade haplotípica, nucleotídica, distribuição *mismatch*, soma dos desvios dos quadrados e testes de desvio de neutralidade para a população de Iguape/SP foram refeitas simulando-se quatro cenários distintos considerando-se para essa população: população com machos e fêmeas XX (cenário 1); população somente com fêmeas XY (cenário 2), população somente com fêmeas normais (cenário 3), e população somente com machos (cenário 4).

Para o cenário 1 os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica se mantiveram altos (Tabela 4). O número de *singletons* ou sítios de nucleotídeos que se diferem em uma única sequência foi alto neste cenário (*84 singletons*). Esse número de manteve elevado, mesmo com perturbações aleatória (retiradas de haplótipos desse grupo). O que indica que não é uma única sequência (caso de algum imigrante na população) que é responsável pelo excesso de *singletons*. O teste de *mismatch* e SSD foram não significativos, e curva esperada unimodal indicou sinal de expansão populacional (Figura 3.f), apresentado assim, um resultado semelhante ao encontrado na análise da população com todos os indivíduos. Nesse cenário os valores de D de Tajima e F_s de Fu também foram negativos e significativos, semelhantes ao resultado encontrado para a análise da população com todos os indivíduos.

Para o cenário 2 os valores de diversidade haplotípica alta, mas uma diversidade nucleotídica baixa ($dn < 0,05$). Com 11 *singletons*. Nesse segundo cenário o teste de *mismatch* e SSD foram não significativos e a curva esperada apresentou-se de forma unimodal, indicando sinal de expansão populacional (Figura 3.i). Esse sinal de expansão populacional indicado pelo teste de *mismatch* não foi apontado pelos testes de D de Tajima e F_s de Fu, onde apesar de se apresentarem com valores negativos, os mesmos não foram significativos como no cenário 1 e no teste com a população completa.

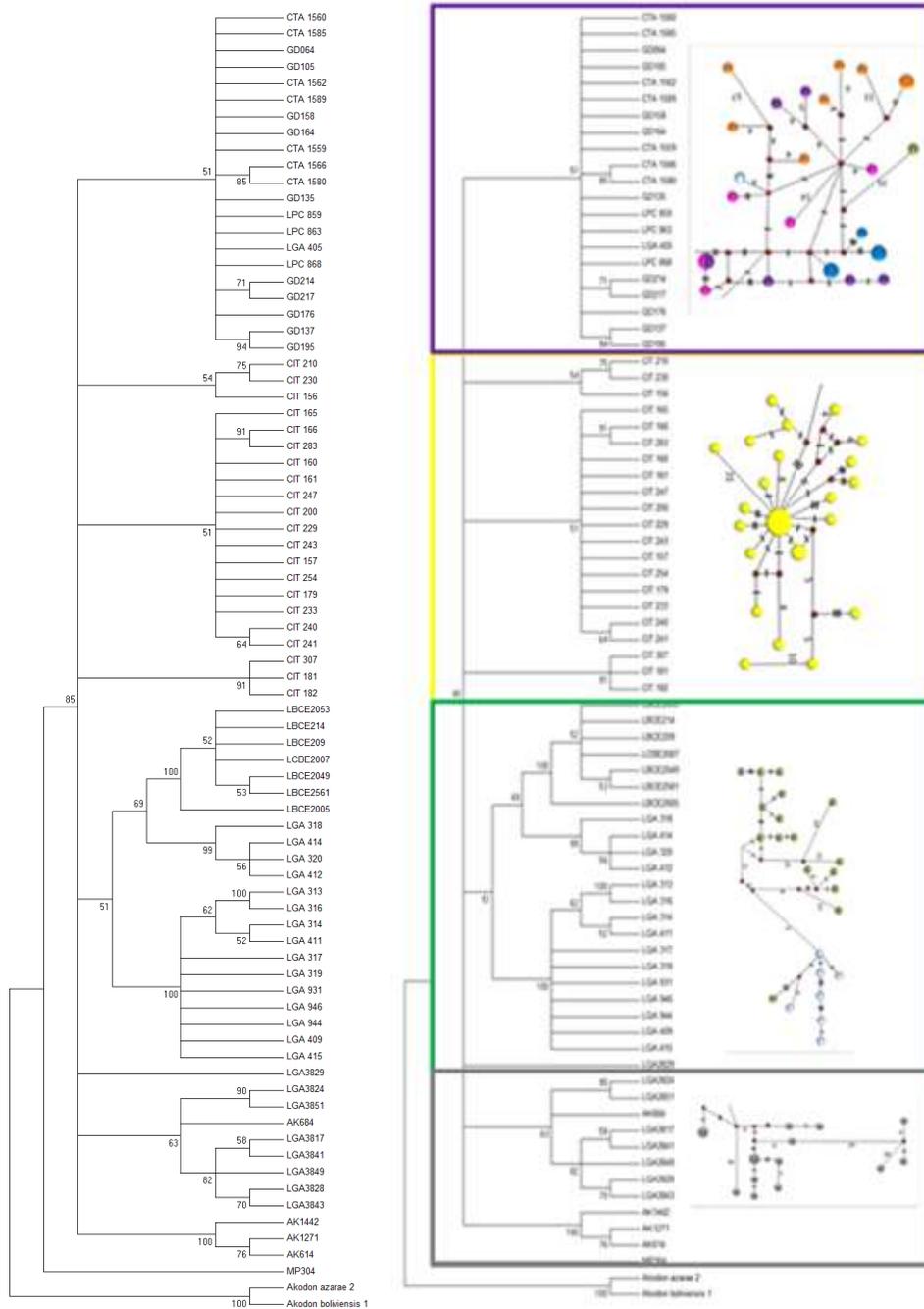


Figura 5. Filogenia gerada Máxima Verossimilhança da região controle do DNA mitocondrial de *Akodon montensis*. Os valores nos nós representam 1000 replicações de bootstrap. A figura da esquerda associa a rede de haplótipos com a filogenia e MV.

No terceiro cenário, onde foram considerados somente as fêmeas XX, os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica se mantiveram altos (Tabela 4), o teste de *mismatch* e SSD foram não significativos e a curva esperada apresentou-se de forma unimodal (Figura 3.j) semelhante aos outros cenários. Nesse cenário, o conjunto de haplótipos apresentou 63 *singletons*. Os *D* de Tajima e *F_s* de Fu foram negativos, mas não significativos, resultado semelhante ao encontrado para o cenário 2.

O cenário 4, que considerou apenas machos, os valores de diversidade haplotípica manteve-se alto mas o de diversidade nucleotídica foi baixo (Tabela 4). O teste de *mismatch* e SSD foram não significativos e a curva esperada apresentou-se de forma unimodal (Figura 3.k) semelhante aos outros cenários. Nesse cenário, o conjunto de haplótipos apresentou 48 *singletons*. Os *D* de Tajima e *F_s* de Fu foram negativos, e significativos, resultado semelhante ao encontrado para o cenário 1.

Para todos os cenários o teste de *mismatch* aponta sinal de expansão. Entretanto, somente quando se considerando machos e fêmeas XX juntos e machos de forma isolada, é que *D* Tajima e *F_s* de Fu corroboram o sinal de expansão de forma abrupta. O excesso de *singletons* pode ser observado no cenário 1, 3 e 4, e não no cenário 2 (somente fêmeas XY). Dessa forma fica claro que não são as fêmeas XY que causam o sinal de desvio de neutralidade, e que elas não geram um falso positivo para o sinal de expansão abrupta para a população de Iguape.

IV1.5. ESTIMANDO O TEMPO DE SURGIMENTO DE FÊMEAS XY NA POPULAÇÃO DE IGUAPE

Segundo Hoekstra (2003) as fêmeas XY ao se cruzarem geram mais filhotes fêmeas do que machos, assim, o surgimento dessas fêmeas na população tende a apagar as formas variantes do DNA mitocondrial existentes enquanto que o haplótipo das fêmeas XY se dissemina pela população. Sendo assim é possível se estimar por relógio molecular o tempo de surgimento dos haplótipos exclusivos das fêmeas XY na população. Assim, para se estimar o tempo de surgimento dos haplótipos exclusivos das fêmeas XY na população utiliza-se a variação nucleotídica das sequências do DNA mitocondrial da região controle dessas fêmeas.

Para isso empregou-se a média de diferença par-a-par (em porcentagem) entre os haplótipos das fêmeas XY (0,3%) e a taxa evolutiva sugerida por Prager et al. (1993) de 20% por milhões de anos, resultando na data estimada para o aparecimento da primeira fêmea XY na população de Iguape de cerca de 15,000 anos.

O arranjo filogenético por agrupamento de vizinhos (NJ) e MV para se verificar a relação entre os haplótipos de região controle do DNA mitocondrial de fêmeas XX e XY mostraram com ramificações relativamente curtas, formando na maioria dos casos politomias basais com outras fêmeas XX. O melhor modelo evolutivo encontrado para a análise de ML foi HKY + G, com valor de gama de 0,63. Tanto na topologia de NJ e MV (Figura 6).

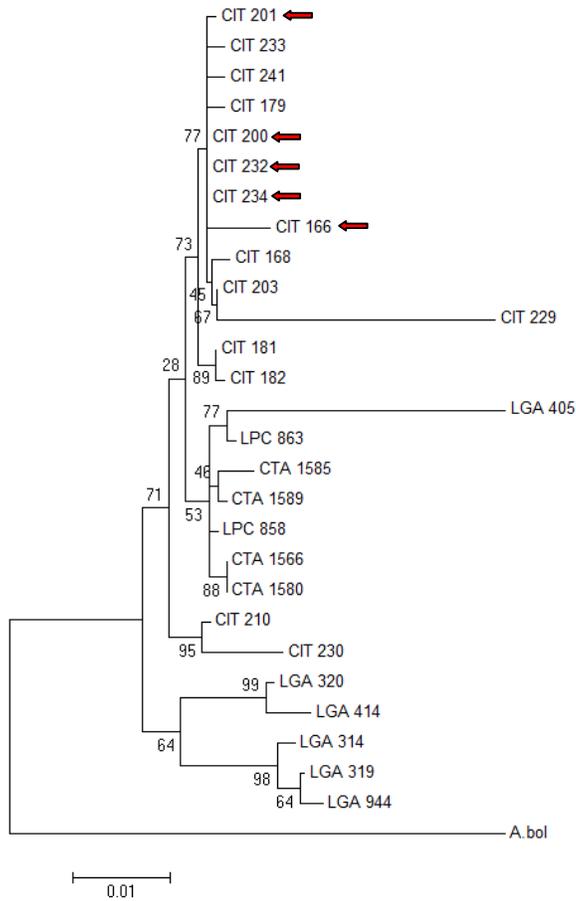


Figura 6. Filogenia por ML da região controle do DNA mitocondrial de seqüências de *A. montensis*. As OTUs indicadas por setas são referentes as fêmeas XY. As demais OTUs são referentes as fêmeas XX. Foi utilizado *A. boliviensis* como grupo externo. Os valores de bootstrap (500 replicações) estão amostrados nos nós da topologia

IV.2. VERIFICAR A PRESENÇA E INTEGRIDADE ESTRUTURAL DO GENE SRY E DAX-1 EM MACHOS, FÊMEAS E FÊMEAS XY DE *AKODON MONTENSIS* E COMPARAR A DIVERSIDADE DE SEQUÊNCIAS INTRAESPECÍFICA COM A DE OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO *AKODON*

IV.2.1. PRESENÇA E INTEGRIDADE DO SRY

Em todos os indivíduos de *A. montensis* analisados para o gene Sry verificou-se a presença do gene, com formação de um fragmento com 733 pb, no qual está incluído todo o gene Sry e a região flanqueadora 5' com 73 pb e a região 3' com 84 pb. *A. cursor* apresentou o menor fragmento com 706 pb. *A. paranaensis* e *A. serrensis* 819 pb; *A. mystax* 820 pb; *A. lindberghi* 822 pb.

Ao se comparar a sequência de bases do Sry verifica-se que a existência de sítios específicos, por exemplo, uma transversão de timina para guanina na posição 162 exclusiva de *A. lindberghi*, transição de adenina e guanina na posição 376 que é compartilhada por *A. montensis* e *A. cursor* e duas transversões (posição 394 – A/C, e posição 435 - C/G) para *A. cursor*. Dois trechos de deleção que distinguem *A. montensis* e *A. cursor* das demais espécies e entre si. O trecho de está entre as posições 615 e 703, com 88 pb. A deleção detectada em *A. cursor* é maior, com 110pb, iniciando na posição 596 e terminando na 706 (Apêndice 2).

O quadro de leitura (ORF) também foi variável. *A. boliviensis*, *A. azarae*, *A. dolores*, *A. lindberghi*, *A. serrensis*, *A. mystax* com 533 nucleotídeos (nt), *A. montensis* com 586 nt e *A. cursor* com 564 nt. Para todas as espécies o de início ATG e códon de parada TAA (exceto *A. azarae* TAG) Também foram encontradas regiões de microssatélites (TC)_n (Apêndice 2) iniciadas na mesma posição (44) para todas as espécies analisadas, porém com tamanhos diferenciados. *A. boliviensis* (TC)₅, *A. azarae*, *A. dolores*, *A. lindberghi*, *A. montensis*, *A. cursor*, *A. serrensis*, *A. mystax* com (TC)₆ e *A. paranaensis* com (TC)₉.

IV.2.2. DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA – SRY

Não houve compartilhamento de haplótipos do Sry entre as espécies analisadas, embora se verifique, em alguns casos, compartilhamento interpopulacional.

Dos 20 indivíduos de *A. montensis* foram obtidos 18 haplótipos (S19-S36), sendo um deles (S35) compartilhado entre três indivíduos de Maquiné/RS. Não houve compartilhamento de haplótipos entre machos e fêmeas XY, com alto valor de diversidade haplotípica (Tabela 7).

Dos 28 exemplares de *Akodon cursor*, observou-se cinco haplótipos (S37-S41), sendo um deles (S38) compartilhado por indivíduos da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Apêndice 1). Três exemplares de *Akodon mystax* apresentaram três haplótipos (S9, S11-S12), três indivíduos de *A. paranaensis* dois haplótipos (S4-S5), 10 indivíduos de *A. lindberghi* três haplótipos (S6-S8) e 12 indivíduos de *A. serrensis* com sete haplótipos (S10, S13-S18).

As divergências genéticas interpopulacional do gene Sry de *A. montensis* (Tabela 8), variaram de 2% (SP x RS) a 4,7% (RS x MS), enquanto que a divergência intrapopulacional variou de 0,7% (RS) a 4,7% (MS). A maior contribuição da diversidade genética foi dos haplótipos dos machos, uma vez que a variação genética entre machos e fêmeas XY foi de 2,3%, somente entre as fêmeas XY foi 1% e somente entre os machos foi 3,2%.

Entre as seis espécies de *Akodon* verificou-se baixa divergência entre *A. paranaensis* e *A. lindberghi* (1,2%), chegando a alta divergência *A. montensis* e *A. serrensis* (7,2%). A diversidade genética intraespecífica maior foi de 3,0% para *A. serrensis* e a menor de 0,1% em *A. lindberghi* e *A. cursor* (Tabela 9).

IV.2.3.PRESENÇA E INTEGRIDADE - DAX-1

Durante dois anos, foi tentando isolar por meio de PCR o exon 1 de Dax-1. Foram desenhados dois pares de *primers* e também foi tentado se amplificar esse gene usando *primers* descritos na literatura. No entanto, mesmo se variando concentrações de todos os reagentes, e das amostras, os perfis do PCR, sempre eram amplificadas múltiplas cópias desse exon. Isso evidencia que provavelmente existem pseudogenes de Dax-1 no genoma de *A. montensis*. Devido a essa inespecificidade do PCR não se foi possível isolar esse exon. Entretanto o exon 2 foi isolado com sucesso usando-se os *primers* desenhados nesse trabalho.

Ao se analisar os indivíduos de *A. montensis* a sequência de nucleotídeos de Dax-1, do exon 2, obteve-se fragmentos de 429 pares de base (pb), *A. lindberghi* 425 pb, *A. paranaensis*, *A. cursor* apresentou um fragmento de 424 pb, que por comparação por homologia com o *Mus musculus* incluem todo o exon 2 do gene Dax-1.

IV.2.4.DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA – DAX-1

Das 23 amostras de *A. montensis* foram obtidos 18 haplótipos (Tabela 7), sem compartilhamento de haplótipos entre amostras de localidades geográficas distintas. Na população do RS ocorreu um haplótipo comum (Dx17) entre um macho e uma fêmea, e na população de SP houve compartilhamento de haplótipo (Dx9) entre uma fêmea XX e uma fêmea XY. Não houve compartilhamento de haplótipos entre machos e fêmeas XY. *Akodon cursor* e *A. lindberghi*, apresentaram dois haplótipos cada.

As sequências analisadas de Dax1-exon2 apresentaram uma pequena divergência genética entre si, evidenciando conservação dentro desse exon. *A. montensis* se diferenciou das demais espécies pela inserção de uma guanina na posição 12 e *A. cursor* por uma transição de timina para guanina na posição 69 (Apêndice 3).

Houve sítios compartilhados entre grupo de espécies, como na posição 66, uma timina entre *A. montensis* e *A. cursor* e nessa mesma posição uma transição para citosina em *A. lindberghi* e *A. cursor* (Apêndice 3). Quando foram agrupadas as amostras de *A. montensis* por populações (Tabela 7) as divergências genéticas foram baixas variando de 1,1% (entre as populações de SP e RS) a 1,9% (entre SP e MS). Os valores de divergência genética intrapopulacional foram baixos variando de 0,7% (RS) a 1,1% (SP e MS). Considerando todas as populações, a variação genética entre machos e fêmeas XY foi de 1,2% e de machos e fêmeas XX foi 1,3%. Entre as fêmeas XX e fêmeas XY a divergência foi de 0,7%.

A divergência genética entre as espécies atingiu um mínimo de 0,4% entre *A. paranaensis* e *A. lindberghi* e um máximo de 2,6% entre *A. montensis* e *A. lindberghi*. A maior diversidade genética intraespecífica foi de 1,5% para *A. montensis* e 0,2% em *A. cursor* (Tabela 9).

Tabela 7. Número de indivíduos (N), de haplótipos (nH), diversidades haplotípica (Hd) e nucleotídica (dn) de Sry e Dax-1 exon 2.

Espécie	Amostra	Local ¹	n	nH	Haplótipos	Hd	Dn
Sry							
<i>A. montensis</i>	Total		20	18	S19-S36	0.9842	0.01919
	fêmeas XY	SP	5	5	S22-S25, S27	1.000	0.00712
	machos XY	SP/MS/RS	15	13		0.9714	0.02234
<i>A. paranaensis</i>	machos XY	MS/MG	3	2	S4-S5	0.6667	0.00713
<i>A. lindberghi</i>	machos XY	ES	10	3	S6-S8	0.3778	0.00101
<i>A. mystax</i>	machos XY	ES	3	3	S10-S11-S12	1.000	0.01515
<i>A. serrensis</i>	machos XY	ES/MG	12	7	S9, S13-S18	0.8667	0.01910
<i>A. cursor</i>	machos XY	BA/ES/RJ	28	5	S37-S41	0.2698	0.00268
Dax-1							
<i>A. montensis</i>	Total		23	18	Dx1-Dx18	0.9758	0.01603
	fêmeas XY	SP	5	4	Dx5, Dx7- Dx9	0.9000	0.00993
	machos XY	SP/MS/RS	12	10	Dx1, Dx4, Dx10, Dx11- Dx17	0.9697	0.01876
	fêmeas XX	SP	5	5	Dx2, Dx3, Dx6, Dx9, Dx17	1.0000	0.00852
<i>A. paranaensis</i>	machos XY	MS/MG	1	1	Dx22	1.0000	
<i>A. lindberghi</i>	machos XY	ES	5	2	Dx21, Dx23	0.4000	0.00476
<i>A. cursor</i>	machos XY	BA/ES/RJ	3	2	Dx19, Dx20	0.6667	0.00315

¹SP=São Paulo, MS=Mato Grosso do Sul, RS=Rio Grande do Sul, BA=Bahia, ES=Espírito Santo, RJ=Rio de Janeiro, MG=Minas Gerais

Tabela 8. Valores de divergência genética interpopulacional (diagonal abaixo) e intrapopulacional (em negrito) entre machos, fêmeas XY e fêmeas XX dos genes Sry (diagonal abaixo) e Dax-1 (diagonal acima).

	RS ¹ (n=5)	SP ² (N=20)	MS ³ (N=5)	Machos ² (N=15)	Machos totais (N=30)	Fêmeas ⁴ XY (N=5)	Fêmeas ⁴ XX (N=3)
RS	0.007/0.007	0.011	0.015	-	-	0.008	0.009
SP	0.021	0.011/0.011	0.019	-	-	-	-
MS	0.047	0.039	0.047/0.011	-	-	0.016	0.017
Machos	-	-	-	0.032/0.019	-	0.008	0.012
Machos totais	-	-	-	-	-	0.012	0.013
Fêmeas XY	0.019	-	0.025	0.008	0.023	0.010/0.010	0.007
Fêmeas XX*	-	-	-	-	-	-	0.008

¹Maquiné, Rio Grande do Sul; ²Iguape, São Paulo; ³Dourados, Mato Grosso do Sul. ⁴Todas as fêmeas são de Iguape, SP.

*somente para Dax-1

Tabela 9. Valores de divergência genética interespecífica (Sry - diagonal abaixo, e Dax-1 diagonal acima) e intraespecífica (Sry/ Dax-1 em negrito) entre 6 espécies do gênero *Akodon*. *A.par* (*A. paranaensis*) *A.lind* (*A. lindberghi*), *A.mys* (*A. mystax*), *A.serr* (*A. serrensis*), *A.mon* (*A. montensis*), *A.curs* (*A. cursor*).

	<i>A.par</i>	<i>A.lind</i>	<i>A.mys</i>	<i>A.serr</i>	<i>A.mon</i>	<i>A.curs</i>
<i>A.par</i>	0.006	0.004			0.021	0.013
<i>A.lind</i>	0.012	0.001/0.004			0.026	0.018
<i>A.mys</i>	0.027	0.028	0.018			
<i>A.serr</i>	0.034	0.046	0.019	0.030		
<i>A.mon</i>	0.042	0.047	0.058	0.072	0.020/0.015	0.020
<i>A.curs</i>	0.033	0.038	0.053	0.063	0.030	0.001/0.002

IV. 3. ANALISAR A ESTRUTURA FUNCIONAL (HMG BOX) E NÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS ORIGINADAS PELAS SEQUÊNCIAS DO GENE SRY DE FÊMEAS XY E MACHOS DE *A. MONTENSIS*

IV.3.1 TRADUÇÃO DO DNA EM PROTEÍNA E MODELAGEM DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA

As sequências do gene Sry de nove espécies de *Akodon* analisadas, seis novas do presente estudo (*A. montensis*, *A. cursor*, *A. lindberghi*, *A. mystax*, *A. paranaensis*, *A. serrensis*) e três obtidas do GenBank (*A. azare*, *A. boliviensis*, *A. dolores*), totalizando 79 indivíduos, compartilharam as regiões de microssatélites (TC)_n, as regiões N- e C- terminais e o sinal nuclear de exportação (NES). As regiões N-terminal KRP-RRK, C-terminal RRAK e o NES putativo (EISKQLGC-QWKS�) foram idênticas em todas as espécies. Uma porção de blocos repetitivos de resíduos de glutamina, também conhecido como "domínio rico em Q" (Zhao e Koopman, 2011) foi compartilhada entre todas as espécies, exceto *A. cursor* (Figura 7).

A sequência de DNA de cada um dos 41 haplótipos espécie-específicos dos 79 indivíduos foi convertida em sequência de aminoácidos (estrutura primária da proteína), respeitando-se o códon de início ATG e mostrou similaridades na estrutura primária da proteína, indicando que, embora distintas na sequência de DNA, a maioria das mutações que geraram os haplótipos representavam mutações neutras e não alteravam a sequência de aminoácidos.

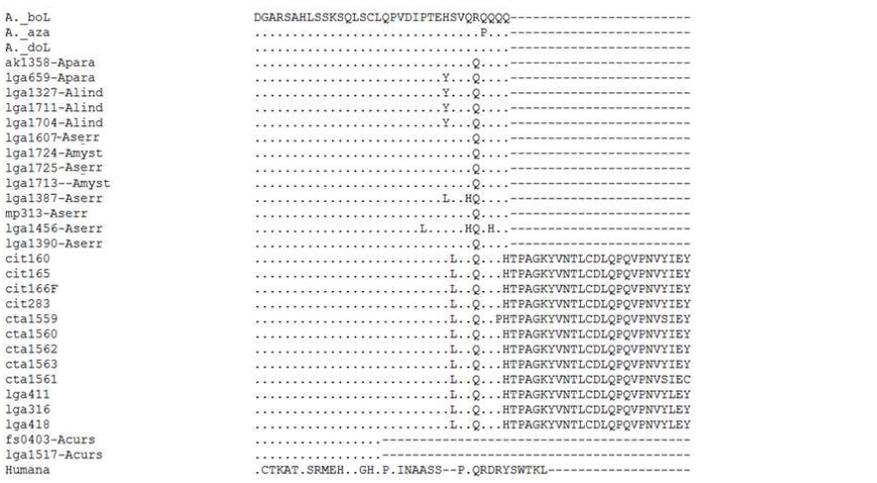
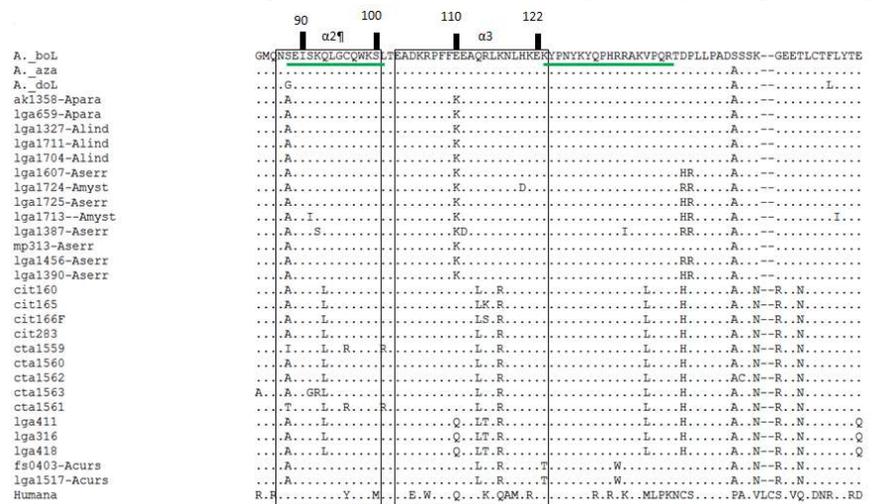
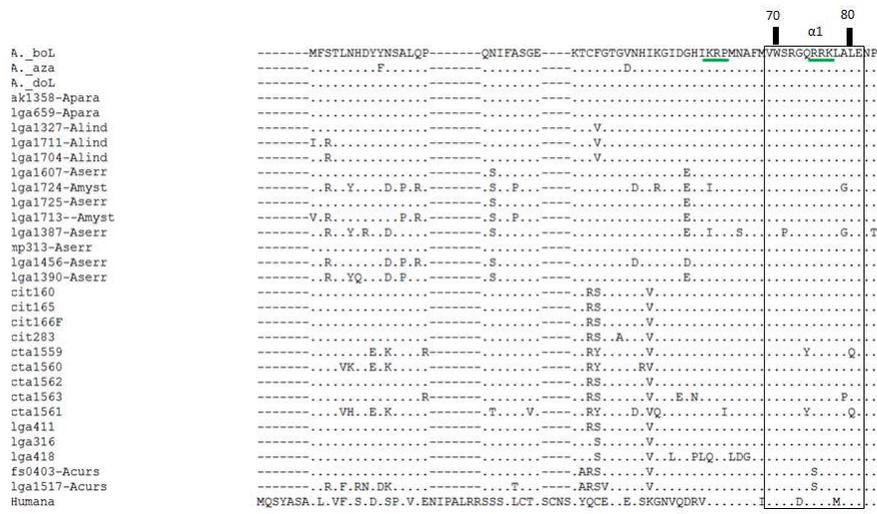


Figura 7. Alinhamento múltiplo, realizado com Clustal W, das treze seqüências modeladas e analisadas. A proteína Sry humana (Código PDB: 1J46) foi utilizada como molde para modelar as proteínas. Apenas a região HMG-box possui estrutura 3D no PDB. Esta região situa-se entre as posições 69 e 123 deste alinhamento múltiplo. As regiões NLS (N e C terminais) e a região putativa NES estão sublinhadas em verde. As α hélices estão delimitadas pelas caixas.

Obteve-se 30 sequências de aminoácidos distintas (S_a1-S_a30, Tabela 10), com 54 mutações (33 fora e 21 dentro do domínio HMG-box), sendo uma de *A. azarae*, *A. boliviensis* e *A. dolores*, duas de *A. paranaenses* e de *A. cursor*, três de *A. lindberghi*, quatro de *A. mystax* e de *A. serrensis* e 12 de *A. montensis*. Houve compartilhamento de um haplótipos (S_a17) entre machos e fêmeas XY de *A. montensis*, de um haplótipo (S_a17) entre e um indivíduo de *A. cursor* (cit 159), sabidamente híbrido, com linhagem paterna de *A. montensis*.

A sequência de aminoácidos do gene Sry de *A. paranaensis*, *A. lindberghi*, *A. mystax*, *A. serrensis* possuem o mesmo tamanho (180 resíduos), enquanto *A. montensis* (204 resíduos) e *A. cursor* (163 resíduos) mostraram diferenças em tamanho devido à presença de códons de parada TAG mais tardio e mais prematuro, respectivamente.

Ao se analisar somente a região HMG-box (84 resíduos), encontrou-se 16 formas distintas (S_h1-S_h16, Tabela 10). Oito das 16 são de *A. montensis*, com compartilhamento de haplótipos entre machos e fêmeas XY e entre machos de SP e MS. A região HMG-box de *A. montensis* mostrou-se a região mais conservada. Das oito sequências restantes, uma (S_h5) é compartilhada entre *A. paranaensis*, *A. lindberghi*, *A. mystax*, *A. serrensis* e as demais são exclusivas de *A. mystax* (S_h6, S_h7), *A. serrensis* (S_h8), *A. cursor* (S_h16), *A. boliviensis* (S_h1), *A. azare* (S_h2) e *A. dolores* (S_h3).

Para as análises de modelagem da estrutura tridimensional da proteína do Sry utilizou-se somente as 16 sequências de aminoácidos distintas da região HMG-box, que gerou 16 modelos distintos na análise por homologia do domínio HMG-box de humanos (Figura 8).

Todos os modelos de todas as espécies analisadas apresentam a estrutura terciária conservada formada por três hélices do tipo alfa (α): α 1, que se inicia no resíduo valina na posição 51 e termina no resíduo glutamina na posição 63 (Val51-Glu63), α 2 (Asn69-Ser82) e α 3 (Glu85-Lys105) (Figura 7).

Os resíduos de aminoácidos que participam de ligações de hidrogênio com o DNA estão localizados nas hélices α 1, α 2, α 3 (Figura 7). Comparando as sequências das proteínas Sry pode-se observar algumas peculiaridades quanto aos resíduos que participam de interações com a dupla-fita.

Tabela 10. Numero de seqüências (n), tamanho e número de haplótipos (nH) da seqüência de DNA, de aminoácidos e da região HMG-box do gene Sry de *A. montensis*, *A. paranaensis*, *A. lindberghi*, *A. mystax*, *A. serrensis* e *A. cursor*.

Espécie	Amostra	Seqüência de DNA				Seqüência de Aminoácidos							
		Gene total				Gene Total				Região HMG-box			
		n	Tamanho (pb)	nH	Haplótipo	n	Tamanho (AA)	nH	Haplótipo	n	Tamanho (AA)	nH	Haplótipo
<i>A. montensis</i>	Total	20	733	18	S19-S6	18	204	12	S _a 17-S _a 28	12	84	7	S _h 9-S _h 15
	fêmeas XY	5	733	5	S22-S25, S27	5	204	3	S _a 17, S _a 19,	2	84	2	S _h 9, S _h 11
	machos	15	733	13	S19-S21, S26, S28-S36	13	204	11	S _a 17, S _a 18, S _a 20-S _a 28	10	84	6	S _h 9, S _h 10, S _h 12-S _h 15
<i>A. paranaensis</i>	machos	3	819	2	S4-S5	2	180	2	As4-As5	2	84	1	S _h 4
<i>A. lindberghi</i>	machos	10	822	3	S6-S8	3	180	3	S _a 6-S _a 8	3	84	1	S _h 5
<i>A. mystax</i>	machos	5	820	4	S9-S12	4	180	4	S _a 9-S _a 12	4	84	3	S _h 5-S _h 7
<i>A. serrensis</i>	machos	10	819	7	S9, S13-S18	7	180	6	S _a 9, S _a 10, S _a 13-S _a 16	4	84	2	S _h 5, S _h 8
<i>A. cursor</i>	machos	28	706	5	S37-S41	5	163	3	S _a 17, S _a 29-S _a 30	2	84	1	S _h 16

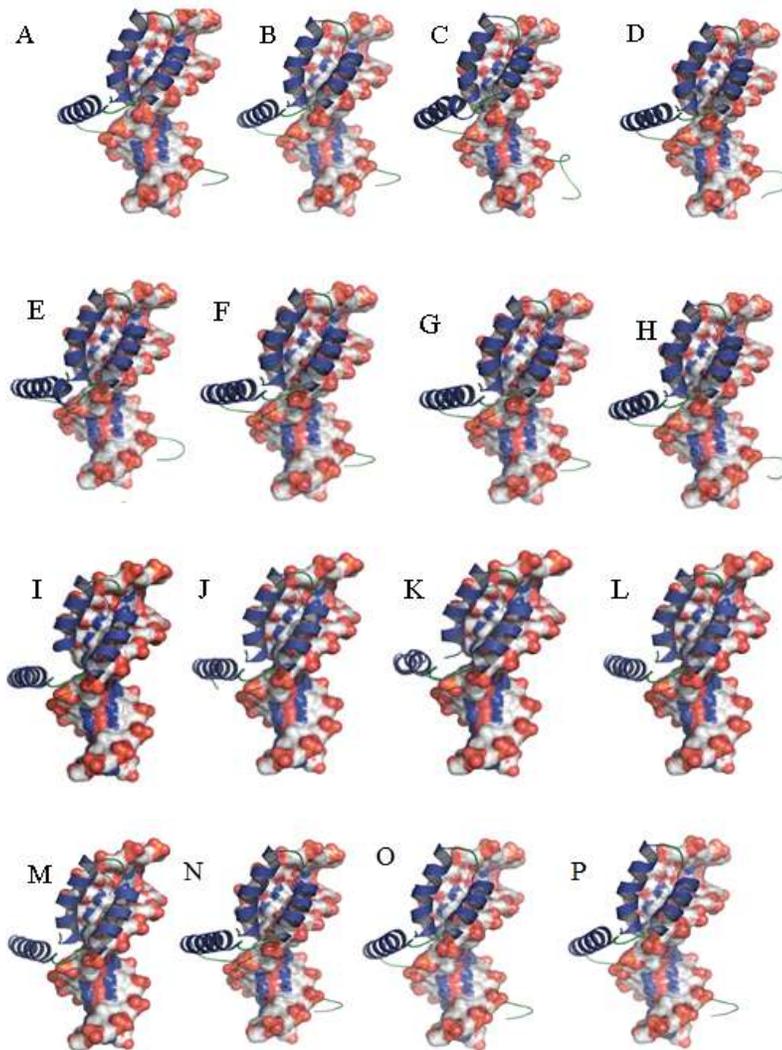


Figura 8. Estrutura terciária da proteína modelada para a região HMG-box do gene *Sry* associada a molécula de DNA. As hélices α estão coloridas em azul escuro, as alças estão coloridas em verde escuro, ambas representadas com o tipo *Cartoon*, e a dupla fita de DNA está representada com a superfície molecular colorida por tipo de átomos. A Imagem foi gerada com o programa PyMol (DeLano, 2002). A (cit 160 representante das amostras cit 161, cit200F, cit232F, cit234F, cit283, cit201, cit240, cta1560, cta1562), B (cit165), C (cit166F), D (cta1559), E (cta1563), F (cta1561), G (lga411 representante das amostras lga316, lga317, lga 18), H (lga418), I (ak1358 representante das amostras lga659, lga1327, lga1711, lga1704, lga1607, mp313, lga1456, lga1659, lga1647), J (lga 1724), K (lga1713), L (lga1387), M (fs0403 representante das amostras hgdb22, lga3915, lga1517), N (*A. boliviensis*), O (*A. azare*), P (*A. dolores*).

Na $\alpha 1$ verificou-se interações com o DNA em duas posições, Arg54 e Arg57 (Figura 9.a). Esses sítios foram comuns a todas as espécies, incluindo fêmeas XY e machos de *A. montensis*. Apenas uma isoforma encontrada em *A. cursor* (fs0403) apresentou uma alteração do aminoácido, com o sítio Arg54 alterado de arginina para serina, que não interagiu com a molécula de DNA (Figura 9.b).

Na região da $\alpha 2$ identificou-se três resíduos que interagem com o DNA (Asn69, Ser73 e Trp80, Figura 9.c) em todas as espécies e fêmeas XY e machos de *A. montensis*. Três alterações nas posições Ala70Ile, Cys78Arg e Lys74Arg foram observadas em três machos de *A. montensis* de MS, porém esses resíduos não participam de interações com o DNA. Uma quarta alteração (Ser73Gly) em um desses machos afeta a interação da proteína com o DNA.

Por último, na região $\alpha 3$ observou-se que os resíduos Lys88 e Arg99 (Figura 9.d) são responsáveis pela interação da hélice $\alpha 3$ com o DNA em todas as espécies, incluindo machos e fêmeas XY de *A. montensis*, exceto pela sequência de um macho (lga411) de *A. montensis* de RS, que apresentou uma mutação envolvendo Arg99Thr que parece afetar a interação com a molécula de DNA já Thr não interage com a molécula de DNA. Nessa hélice também se notou que a sequência de fêmea XY (cit166) apresentou uma alteração de Arg para K, onde não há alteração do sítio de ligação da proteína com o DNA.

Considerando as alterações de aminoácidos observadas em machos e fêmeas XY e o padrão de interferência na interação com o DNA promovida pela alteração sugerimos que nenhuma das alterações encontradas nas fêmeas XY estão relacionadas diretamente com o processo de reversão sexual de fêmeas XY, já que não há um padrão específico das fêmeas XY que se destaque dos machos de *A. montensis*.

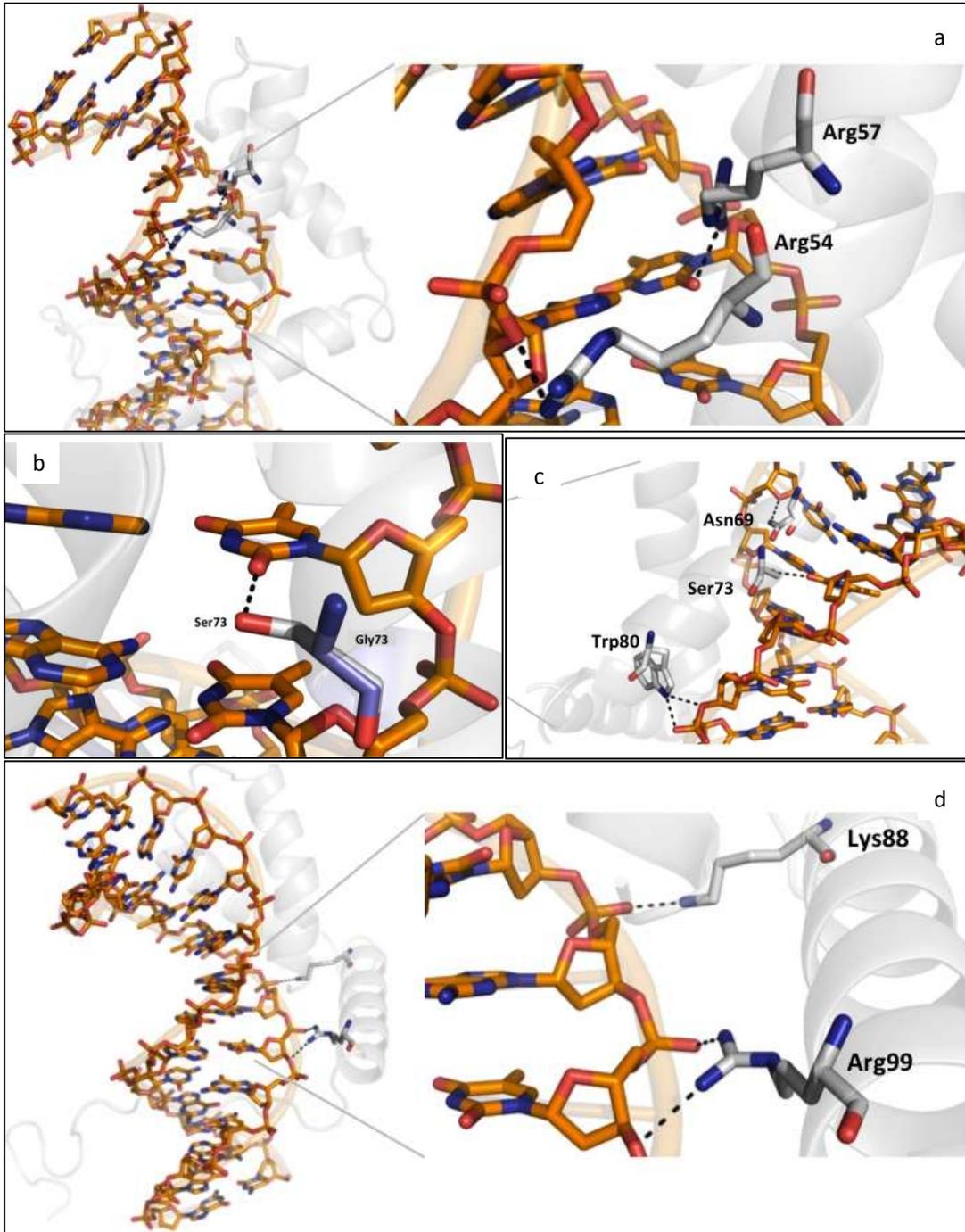


Figura 9. Resíduos de AA da porção $\alpha 1$ (a), $\alpha 2$ (c), $\alpha 3$ (d) que participam de pontes de hidrogênio com a dupla fita de DNA. A figura b evidencia uma mutação que altera a ligação com o DNA, sendo que para confecção dessa figura usou-se cit 160 e fs0403 . Representação do tipo *Cartoon* da cadeia principal da região HMG-box. Os AA que participam das interações com o DNA estão representados pelo modelo de palitos e coloridos pelo tipo dos átomos. A dupla fita de DNA está representada pelo modelo de palitos e colorida pelo tipo dos átomos (exceto pelo átomo de carbono que foi colorido em laranja para diferenciar dos átomos de carbono da proteína). A Imagem foi gerada com o programa PyMol (DeLano, 2002).

IV.4. VERIFICAR O NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES SRY E DAX-1 PRESENTES EM MACHOS, FÊMEAS E FÊMEAS XY DE *AKODON MONTENSIS*.

O valor encontrado para a curva de temperatura de *melting* não variou entre os 10 machos e cinco fêmeas XY de *A. montensis* indicando assim pequena variabilidade entre o gene Sry nessas amostras (Figura 10a).

Não houve amplificação para as fêmeas XX (Figura 10b), que foram utilizadas como controle negativo. Verifica-se que o padrão de amplificação das fêmeas XY corresponde ao observado para os machos (Figura 10c).

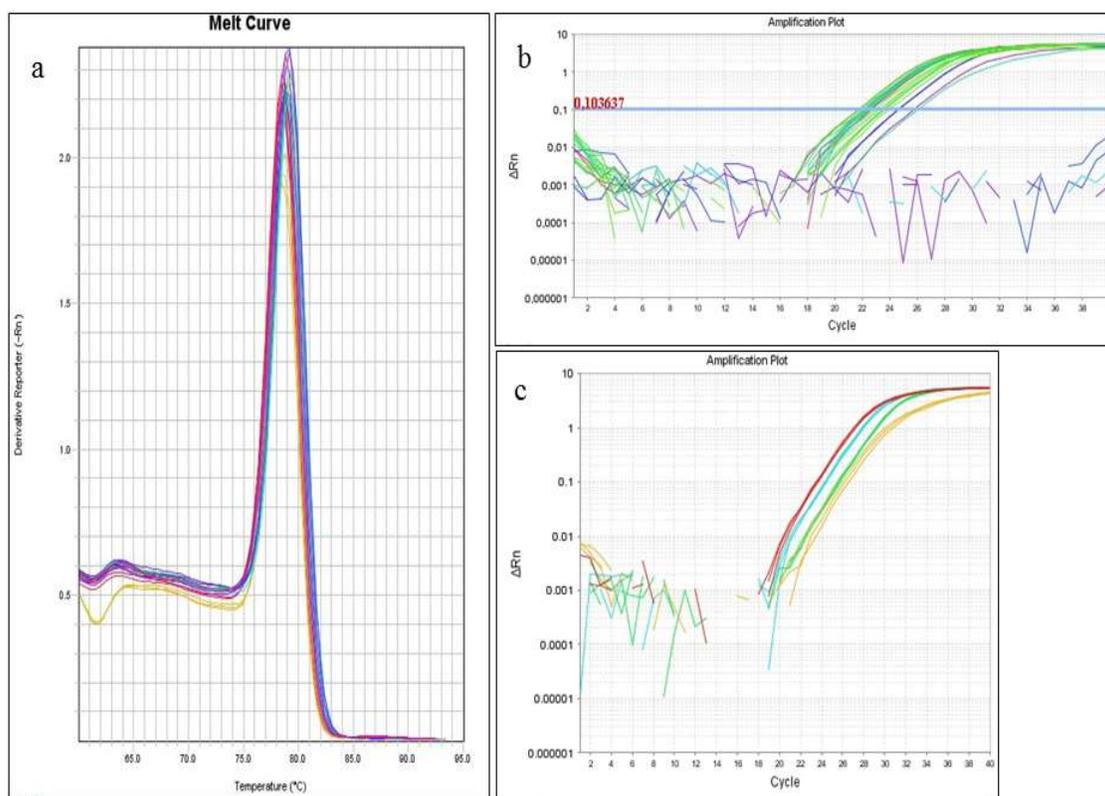


Figura 10. 1. Curva de dissociação (*melting*) do produto de PCR em tempo real das análises de machos e fêmeas XY (25ng/μl com 20ul de reação PCR). Um único pico para uma única temperatura de *melting* foi obtida. b plot de amplificação do gene Sry das amostras de machos, fêmeas e fêmeas XY. A curva ascendente representa o pico de amplificação de machos e de fêmeas XY com pico de expansão de 0,001 10,0) a partir do ciclo 22 , enquanto que nas fêmeas XX não houve pico de amplificação (picos entre os valores 0,01 e 0,0001). 11c.plot de amplificação do gene Sry das amostras de machos (vermelho e amarelo), e fêmeas XY (azul e verde). Pode-se notar os valores de Ct encontrados para as fêmeas XY estão dentro da variação encontrada para os machos.

Não foi possível definir o número de cópias do gene Sry, pois se utilizou como referência a quantidade de amplificação do gene Dax-1, que é um gene de cópia única, porém os com curva de dissociação com vários picos (Figura 11a) e valores de eficiência acima de 3000, fora do desejado entre a faixa de 90 a 110 (Figura 11b). Isso evidencia que o par de *primers* empregados para essa análise provavelmente estava anelando no DNA de forma inespecífica gerando dímeros. Com isso não se foi possível estimar em valores absolutos quantas cópias há do gene Sry em *A. montensis*.

Muito embora não tenha sido possível calcular o numero de cópias do Sry pelo qRT-PCR, é possível afirmar que há machos com o mesmo número de cópias do gene que as fêmeas XY. Na figura 11 c, observou-se que os valores de Ct de machos variaram, e que a variação encontrada para as fêmeas XY encontra-se entre a variação dos machos. Assim, não há evidências para afirmar, até o momento, que o numero de copias das fêmeas XY é maior do que machos. É necessário utilizar outro par de primers de gene de cópia única.

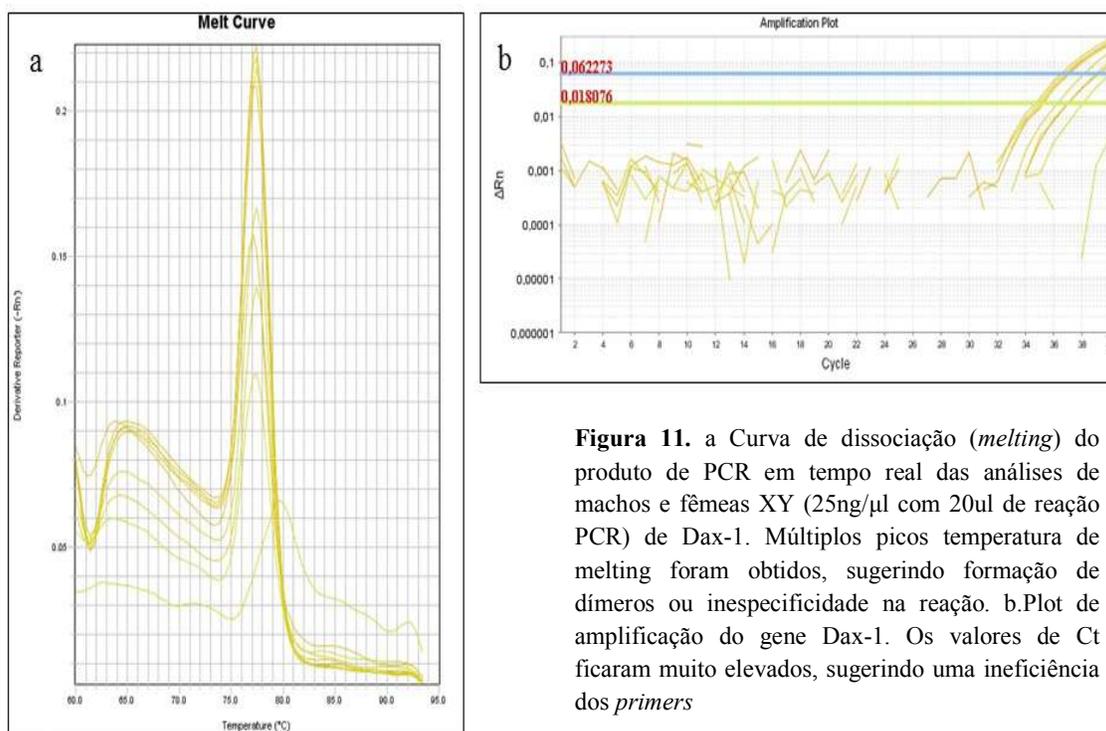


Figura 11. a Curva de dissociação (*melting*) do produto de PCR em tempo real das análises de machos e fêmeas XY (25ng/μl com 20ul de reação PCR) de Dax-1. Múltiplos picos temperatura de melting foram obtidos, sugerindo formação de dímeros ou inespecificidade na reação. b.Plot de amplificação do gene Dax-1. Os valores de Ct ficaram muito elevados, sugerindo uma ineficiência dos *primers*

IV.5. MAPEAMENTO DE PRESENÇA DE FÊMEAS XY EM AKODON COMO CARÁTER FILOGENÉTICO

Para mapear o caráter “presença de fêmeas XY” foi gerada a filogenia de 31 espécies de *Akodon* usando o método da MV. O melhor modelo de substituição nucleotídica foi HKY+I+G, sendo I=0,58 e G=2,03. A filogenia recuperada retomou os agrupamentos definidos por Smith e Patton (2007): varius (*A. iniscatus*, *A. dayi*, *A. toba*, *A. dolores*, *A. molinae*), boliviensis (*A. kofordi*, *A. fumeus*, *A. juniensis*, *A. boliviensis*, *A. spegazzini*, *A. subfuscus*, *A. lutescens*, *A. viridescens*), cursor (*A. cursor*, *A. montensis*, *A. reigi*, *A. mystax*, *A. paranaensis*, *A. lindberghi*) e aerosus (*A. aerosus*, *A. affinis*, *A. mollis*, *A. orophilus*, *A. budini*, *A. siberiae*, *A. mimus*, *A. albiventer* e *A. varius*).

Verificaram-se algumas distinções na composição dos grupos em relação aos propostos por Smith e Patton (2007): a espécie *A. viridescens*, descrita por Braun et al. (2010) foi incluída no grupo boliviensis. Outra diferença foi a inclusão de *A. lindberghi* no grupo cursor e a localização de *A. varius* (não utilizada nos estudos de Smith e Patton) dentro do grupo aerosus.

O resultado do mapeamento gerado no Mesquite por MV e parcimônia aponta que o caráter “presença de fêmeas XY” surgiu mais de uma vez dentro do gênero *Akodon* (Figura 12). As nove espécies onde há registro de casos de reversão sexual (*A. azarae*, *A. boliviensis*, *A. kofordi*, *A. mollis*, *A. montensis*, *A. puer*, *A. subfuscus*, *A. torques* e *A. varius*) pertencem a linhagens distintas.

Embora o caráter estivesse amplamente distribuído nos grupos, a análise de cada grupo permitiu verificar que nem todas as espécies ou linhagens menores dentro de cada grupo possuem fêmeas XY, e que esse caráter se concentra em algumas espécies/linhagens específicas. Dos quatro grupos de espécies, somente o grupo varius não apresentou o caráter. Vale destacar que a espécie *A. varius* não foi recuperada dentro desse grupo varius. No grupo boliviensis se concentra o maior número de casos de fêmeas XY, com quatro espécies (*A. boliviensis*, *A. lutescens*, *A. subfuscus*, *A. kofordi*), em cursor apenas *A. montensis* possui registro de ocorrência e no grupo aerosus ocorrem duas espécies (*A. varius*, *A. torques*).

Para fazer uma análise mais detalhada do tipo/motivo/mutação proposta para a determinação de cada caso de reversão sexual (Tabela 11) indicamos os motivos propostos pelos autores originais para a determinação da reversão sexual na árvore obtida.

Tabela 11. Lista de espécies tipo/motivo/mutação que leva a casos de fêmeas com reversão sexual e os autores que descobriram tal processo.

Espécie	Tipo/Motivo/Mutação	Autor
<i>A. azarae</i>	XY* Sry	Bianchi e Contreras 1967
<i>A. azarae</i>	X*Y (X ₁ ,X ₂ ,X ₃) Sry ⁺	Ortiz et al. 2009/ Sanchez et al. 2010
<i>A. boliviensis</i>	XY* Sry ⁻	Bianchi et al., 1971
<i>A. boliviensis</i>	XY* Sry ⁺	Sanchez et al. 2010
<i>A. varius</i>	XY* Sry ⁻	Bianchi et al. 1971
<i>A. mollis</i>	X*Y	Lobato et al. 1982
<i>A. lutescens</i>	X*Y	Vitullo et al. 1986
<i>A. montensis</i>	t (X*Y) Sry ⁺	Fagundes et al. 2000
<i>A. subfuscus</i>	XY* Sry ⁻	Hoekstra e Edwards 2000
<i>A. torques</i>	XY* Sry ⁻	Hoekstra e Edwards 2000
<i>A. kofordi</i>	XY* Sry ⁻	Hoekstra e Edwards 2000

Os casos nos quais se atribui uma mutação ou problemas na expressão do gene Sry como responsável pela reversão sexual (*A. varius*, *A. subfuscus*, *A. torques*, *A. kofordi*) estão distribuídos em dois dos quatro grupos de espécies, grupo boliviensis e aerosus. As propostas que preveem alterações no cromossomo X, com possível inalteração do gene Sry, estão presentes em três grupos: boliviensis (*A. lutescens*), cursor (*A. montensis*), aerosus (*A. mollis*).

No caso de *A. azarae* atribui-se mutação no X e preservação do Sry (Ortiz et al. 2009; Sanchez et al. 2010) ou preservação de genes do X e defeito no Sry (Bianchi et al. 2002).

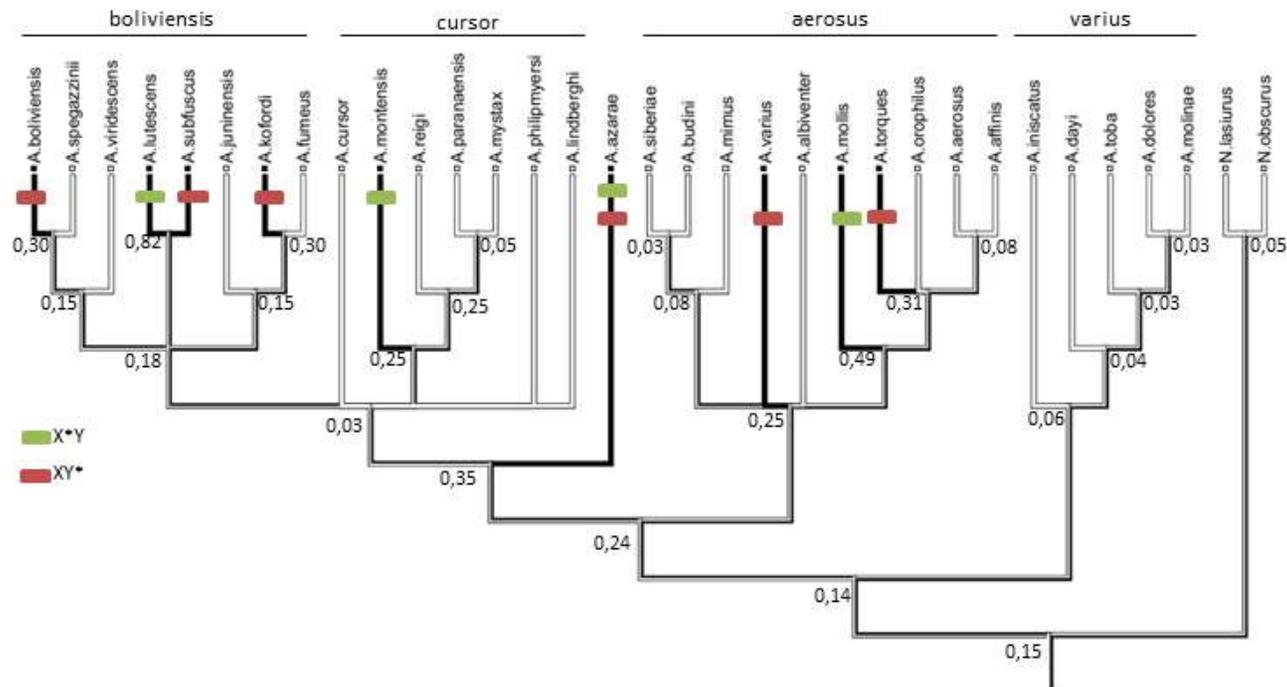


Figura 12. Mapeamento do caráter ancestral da presença e ausência de registro de fêmeas XY dentro do gênero *Akodon*. Os ramos brancos retratam a ausência de registro de fêmeas XY, e os pretos retratam a presença. Os valores nos nós indicam probabilidade a posteriori da presença do caráter XY.

V. DISCUSSÃO

V.1. ANÁLISES INTRA E INTERPOPULACIONAIS EM *AKODON MONTENSIS*

Os dados mais recentes de genética de populações de *A. montensis* são de Valdez e D'Elia (2013) que incluíram 86 sequências do gene mitocondrial *cit b* da Argentina, Paraguai e Brasil. Nesse estudo, embora tenha muitas localidades, o número de indivíduos por localidade foi inferior a cinco em alguns casos, impossibilitando uma análise intra e interpopulacional mais ampla. A utilização do DNA mitocondrial é ampla devido à facilidade de manipulação e isolamento, por seu elevado número de cópias por células, herança uniparental e taxa de mutação relativamente rápida (MEYER et al. 1999, FREELAND 2005).

Entre os genes mitocondriais, além do *cit b*, a região hipervariável ou D-loop é a que mais acumula mutações, apresentando taxas evolutivas entre duas e cinco vezes mais rápidas que genes que codificam proteínas (MEYER et al. 1999). Por ser apontada como uma região não codificante, possibilita avaliar a variabilidade genética de populações com menor influência do processo de seleção natural. Acredita-se que essa região apresenta maior sensibilidade às alterações genéticas recentes, sendo mais eficiente em identificar variabilidade genética entre populações de uma espécie (SACCONI 1994).

Os dados de divergência genética interpopulacional com o D-loop em *Akodon montensis* indicam valores que variam de 1,1% para SP e PR a até 3,2% para RS e MG. Esta espécie tem ampla distribuição ocorrendo do Paraguai, Argentina e Brasil, tendo Paraguarí no Paraguai como localidade tipo. No Brasil, se distribui pelos estados de Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul, e em vegetação de galeria no leste de Minas Gerais e Goiás (WILSON e REEDER 2005). As amostras analisadas no presente estudo abrangem duas localidades no Paraguai e de cinco estados em território brasileiro, que representam 70% dos estados de ocorrência da espécie no Brasil (WILSON e REEDER 2005) e englobam dois tipos de biomas brasileiros, Mata Atlântica e Cerrado (IBGE 2004).

Baker e Bradley (2006) haviam proposto que distância genética de 2% seria típica de uma variação interpopulacional e que valores acima de 5% indicariam espécies distintas ou crípticas, baseando-se em estudos com o gene *citb* de diversos gêneros de roedores e morcegos. Os valores de divergência genética de *Akodon montensis* não ultrapassaram os limites sugeridos por Baker e Bradley (2006), mas foram maiores que 2%.

Uma característica marcante em *A. montensis* é ser uma espécie com pouca vagilidade (Jordão et al. 2010), influenciando na capacidade de dispersão de um indivíduo e, conseqüentemente na estruturação genética por causa do isolamento por distância. As populações mais próximas entre si tendem a ser geneticamente mais similares do que entre as populações mais distantes. Porém, padrões distintos, segundo pode indicar que os processos demográficos não estão limitados ao padrão de dispersão da espécie.

Num cenário de equilíbrio entre mutações, migrações e deriva genética, e para espécies com movimentos limitados de dispersão é esperado que a diferenciação genética aumentasse com a distância geográfica (SLATKIN 1987). Entretanto, nossos achados mostram pelo teste de Mantel ($R=0.8955$ e $p=0.1666$) que a variação genética não está relacionada com a variação da distância geográfica entre as populações. A maior distância genética (3,2%) foi verificada entre as populações de MG e RS, que distam entre si 1588 km, enquanto que a distância entre MG e Itapúa (Paraguai) foi 2,5% com distância geográfica de 1716 km. O valor de Φ_{st} foi maior entre as populações de SP e PR, separadas por 276 km quando comparada com SP e MS, separados por 1.106 km.

Os valores de Φ_{st} entre todas as populações foi elevado (acima de 0,25) (FREELAND 2005) e o número de migrantes por geração, bem reduzido. No presente estudo, nenhuma das populações brasileiras estudadas apresenta mais que 1 migrante por geração. Somados aos valores de Φ_{st} e AMOVA, confirma-se um cenário de estruturação geográfica e isolamento populacional, que não corresponde, como sugerido por Valdez e D'Elia (2013) a um padrão de isolamento por distância.

Slatkin (1987) sugeriu que um número de migrantes por geração entre as populações igual a um seria suficiente para sobrepor os efeitos da deriva genética. Entretanto, estudos mais recentes (MILLS e ALLENDORF 1996, VUCETICH e

WAITE 2000) sugeriram que um número de migrantes maior que um é necessário para a manutenção da diversidade gênica dentro da população e que o um número de migrantes entre 3 e 10 é o ideal para a manutenção da coesão entre as populações, o que favoreceria a manutenção da diversidade gênica. Por outro lado a migração homogeneiza as frequências alélicas entre populações e determina os efeitos relativos da seleção e deriva genética. O fluxo gênico entre populações impede a fixação de adaptação local, impedindo assim o processo de especiação (BARTON e HEWITT 1985). Entretanto, como sugerido pelos mesmos autores, o fluxo gênico introduz novos polimorfismos nas populações, aumenta o tamanho efetivo da população e aumenta a variabilidade genética permitindo que a seleção atue.

Segundo Avise (2009) para populações com pouca capacidade de dispersão, além da distância geográfica, barreiras físicas como rios e montanhas podem aumentar o efeito da vagilidade limitada e promover estruturação populacional. Algumas dessas barreiras podem ser semipermeáveis e permitir algum fluxo gênico, outras, entretanto, podem bloquear por completo o fluxo gênico por um longo período de tempo. Riviéri-Dobgny et al. (2011) afirmaram que para animais de hábito de vida montanhoso (que é o caso de *A. montensis*), áreas de terras baixas podem constituir barreiras efetivas ao fluxo gênico. Esse tipo de fragmentação do habitat tem sido destacado como fator primário da estruturação genética em populações de animais selvagens (WILCOVE et al. 1996).

V.2. TESTANDO A EXPANSÃO DA POPULAÇÃO DE IGUAPE/SP

Análises de estruturação, história demográfica e características genéticas populacionais podem fornecer informações sobre processos que levaram aos padrões observados de variação genética entre grupos (EMERSON et al. 2001). Por exemplo, comparações entre índices de diversidades haplotípicas e nucleotídicas podem indicar alguns eventos demográficos pelos quais uma população sofreu (MARTÍNEZ et al. 2006).

Dentre as populações ou grupo de populações de *A. montensis* destacam-se a macro-estruturação de um grupo formado pelas amostras de Iguape/São Paulo (SP), outro grupo formado por amostras do Paraná (PR), Mato Grosso do Sul (MS) e Paraguai (BP), um grupo norte composto pelas amostras de Minas Gerais (MG) e um quarto

grupo, sul-sudeste, que engloba as amostras do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro. Somente os grupos de SP, BP e MG foram recuperados por Valdez e D'Elia (2013).

Nossos dados revelaram elevados valores de diversidade haplotípica e nucleotídica. As populações de RS, MS, MG, PR, CAN e ITA se apresentam com estabilidade populacional, corroborando os dados obtidos nas análises de diversidade haplotípica. Entretanto, para a população SP os dados de distribuição *mismatch* apontam expansão populacional recente, confirmados pelos valores de diversidade haplotípica elevados ($H_d > 0.5$) e diversidade nucleotídica baixos ($d_n < 0.005$).

Segundo Grant e Bowel (1998) populações com valores elevados de diversidade haplotípica ($H_d > 0,5$) e nucleotídica ($d_n > 0,005$), como observado para as demais populações exceto SP, passaram por evento de gargalo populacional seguido de rápido crescimento demográfico, enquanto que populações com valores elevados de diversidade haplotípica e baixos de diversidade nucleotídica podem representar populações com estabilidade populacional e longa história evolutiva, ou ainda podem ter tido contato secundário com outras linhagens.

Ainda, nas análises das somas dos desvios dos quadrados (SSD) foram comparados os valores entre o observado e o esperado para testar a hipótese de uma expansão gradual, como proposto por Schneider e Excoffier (2000). Essa análise assume valores maiores para as distribuições multimodais, comumente encontrados em uma população fixa, o que foi encontrado para as populações RS, MS, MG e PR. Para a população de SP, o valor de SSD não foi significativo, com uma distribuição unimodal, aceitando assim a hipótese de expansão populacional recente e abrupta. Esses dados são confirmados com os resultados dos testes de neutralidade D Tajima e F de Fu, que foram negativos apenas para a população de SP.

Quando uma mutação ocorre em uma linhagem ancestral, ela aparece como um sítio polimórfico que separa a amostra em dois grupos: um que apresenta o nucleotídeo ancestral e outro com o nucleotídeo mutante. No caso de crescimento exponencial, será observado um excesso de sítios mutantes que aparecem em apenas uma sequência, ou seja, estão na frequência $1/n$ em uma amostra de n sequências (WAKELEY e HEY 1997). Tais sítios, denominados *singletons* (polimorfismos raros na amostra), apesar de serem exclusivos de um ou poucos indivíduos, são considerados polimorfismos. Valores não diferentes de zero nessa estatística significam aderência à neutralidade.

Os valores negativos significativamente diferentes de zero indicam uma prevalência de *singletons* sugerindo que essas populações vivenciaram um crescimento populacional intenso e relativamente recente em sua história, como observado na população de SP. Esses valores negativos e diferentes de zero também podem significar seleção positiva ou efeito carona. Um sinal de crescimento populacional exponencial para um determinado grupo é evidência de que este ampliou seus limites de distribuição em um tempo recente, como postulam diversas teorias biogeográficas.

Os dados do tempo decorrido desde a expansão também corroboram que as populações de MS, RS, MG, PR, CAN e ITA estão em equilíbrio há mais tempo, tendo se expandido entre 148 e 12 mil anos. A população de SP, diferentemente das demais, mostra um sinal de expansão mais recente, com 4,8 mil anos.

As datas de início de expansão das populações de MS e RS marcam a transição Pleistoceno/Holoceno (GLASSER et al. 2008). Essas datas se sobrepõem ao último máximo glacial e também a um período seco na América do Sul (AB'SABER 2000). Para a populações de SP a data de expansão é menor que 10 mil anos, período correspondente à última glaciação (BEHLING e LICHTER 1997).

De acordo com Haffer (1969) e Vanzolini e Willians (1970) as variações climáticas que ocorreram durante o Pleistoceno causaram a fragmentação das florestas, formando refúgios separados por outros tipos de vegetação como savanas, floresta seca, florestas de lianas e outros tipos intermediários de vegetação de climas sazonalmente secos, que podem ter funcionado como efetivas barreiras para a dispersão de plantas e animais de floresta úmida sendo que esse isolamento teria promovido a especiação (HAFFER e PRANCE 2002).

Carnaval e Moritz (2008) analisando dados paleobotânicos, dados de genética molecular de lagartos e mamíferos e simulações de modelagem climática, afirmaram que existiram florestas no interior do Brasil onde hoje se encontra o bioma Cerrado, e que no sul da Mata Atlântica, abaixo do Rio Doce, deve ter ocorrido uma instabilidade do habitat florestal, indicando que deve ter ocorrido para essa região, uma contração florestal, com expansão de áreas abertas. Esses autores sugeriram a formação de um longo refúgio na Bahia, outro em Pernambuco, além de uma provável existência de uma região florestara instável em São Paulo. Entretanto, os mesmos autores não analisaram

áreas com diferentes gradientes altitudinais que podem ter influenciado na ausência de áreas florestadas mais ao sul da Mata Atlântica.

Esses mesmos autores, citam outros trabalhos, como de Graziontin et al. (2006) com *Bothrops leucurus* e Cabanne et al. (2007) com *Xyphorhynchus fuscus* que também demonstraram variações demográficas consistentes com fragmentação florestal do Pleistoceno em resposta as variações climáticas do Quaternário. Behling e Lichte (1997) propuseram que durante esse período houve contração das florestas e formação de pastagens, o que pode ter impedido a migração dessas populações. Ao final desse período, ocorreu a expansão das florestas (BEHLING e LICHTTE 1997) possibilitando a expansão demográfica das populações analisadas no presente estudo.

Pela diferenciação acentuada das amostras da população de MG podemos sugerir que o grupo norte, corresponda a uma linhagem que tenha sobrevivido à fragmentação da Mata Atlântica num refúgio da Bahia. Essas evidências já foram levantadas por Valdez e D'Elia (2013) usando uma amostra mais reduzida. As amostras de SP foram as que mostraram maior coesão e distinção entre as demais linhagens, e essa diferenciação genética acentuada pode ser resultado de efeitos do refúgio São Paulo. Tanto o refúgio da Bahia quanto a possibilidade de refúgio em São Paulo corroboram os pressupostos de Carnal e Moritz (2008).

Os demais achados indicaram um compartilhamento histórico ou contato secundário recente entre as amostras do RJ e RS. Porém os valores elevados de Φ_{st} e reduzido de número de migrantes para esse par de espécies não apoiam a ideia de contato secundário recente, dando apoio à proposta de Valdez e D'Elia (2013) de existência de um refúgio Rio Grande do Sul (RGS), adicionada à ela uma ampliação envolvendo o RJ. Os próprios autores afirmaram que não saberiam informar sobre abrangência desse refúgio, que em seu trabalho limitou-se a amostras do RS. Evidências de conexão entre RS e RJ já foram verificadas em análises populacionais de outra espécie de Akodontineo com ocorrência em áreas de altitude, *Thaptomys nigrita* (Colombi, 2014 comunicação pessoal).

O refúgio RGS não foi sugerido por Carnaval e Moritz (2008), pois esses autores não utilizaram amostras fora das latitudes meridionais da Floresta Atlântica, visto que defendem que as estratégias de modelagem podem não ser precisas para as áreas montanhosas devido à topografia complexa e possível influência adicional de entrada de

água através da chuva orográfica. No entanto, estudos filogeográficos recentes de espécies de altitude mais tolerantes a baixas temperaturas e de organismos com capacidade de dispersão de baixa (ALVAREZ- PRESAS et al. 2011) também sugerem a persistência de refúgios na porção sul da Floresta Atlântica.

Sinais de gargalo seguido de expansão populacional restringe-se à Iguape/SP

Nossa hipótese é de que somente a população de Iguape, onde há o registro de fêmeas XY para *A. montensis*, apresentaria sinais de gargalo populacional seguido de expansão abrupta. Os dados apontados nesse estudo indicam que apenas a população de Iguape (SP) apresentou fêmeas com presença do gene Sry entre todas as populações conhecidas. A população de Iguape também foi a única que apresentou sinais de expansão populacional recente. Essas evidências apoiam a hipótese inicial de que as fêmeas XY estariam em maior frequência nas populações com traços de desvios demográficos.

O registro da ocorrência de fêmeas XY para *A. montensis* foi feito por Fagundes et al. (2000) onde encontraram essas fêmeas em fases distintas da vida. Por mapeamento físico do cromossomo Y no cariótipo puderam concluir que havia um cromossomo Y normal e um cromossomo X com todo ou parte de um cromossomo Y translocado na região proximal do X, sugerindo que essa alteração no cromossomo X (X*) seria a causa de alteração em genes ligados à determinação do sexo no cromossomo X e consequentemente da reversão sexual. Além disso, propuseram que as fêmeas XY de *A. montensis* produziram proles na razão de duas fêmeas para um macho. Hoekstra e Hoekstra (2001) também propuseram um desvio meiótico favorecendo a produção de fêmeas XY em *A. azarae*. Diferentemente do que foi proposto por Fagundes et al. (2000) esses autores acreditam que o erro está o cromossomo Y (Y*) e não no X. O desvio meiótico estaria favorecendo uma segregação preferencial do Y*, aumentando o número de indivíduos XY*, resultando em fêmeas XY*. Esse possível desequilíbrio se torna mais evidente quando a população passou por algum evento demográfico extremo, como um gargalo populacional.

O município de Iguape encontra-se na região costeira de São Paulo. Devido ao processo histórico de ocupação, essas áreas sofreram pressões antrópicas desde a

colonização. A riqueza e diversidade da Floresta Atlântica paulista tem sido amplamente discutida (LEITÃO FILHO 1982 e 1994, MANTOVANI 1998) e apontada com grande diversidade e endemismo (JOLY et al. 1991). Segundo o Consórcio Mata Atlântica (1992) as áreas de planícies litorâneas estão entre as mais descaracterizadas do estado de São Paulo, em função da intensa ação antrópica.

O processo de fragmentação de habitats tem levado à formação de pequenas populações, que são mais suscetíveis à extinção por processos de aleatoriedade demográfica, ou seja, as variações ao acaso nos parâmetros demográficos. Fernandez et al. (2003) ao analisarem o marsupial *Micoureus demerarae* em fragmentos da Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro de 1995 a 2000 observaram o deslocamento e variações demográficas das populações, sexo, idade e estado reprodutivo de cada indivíduo coletado. Utilizaram o teste de Wilcoxon (ZAR 1999) para testar se havia um viés significativo da razão sexual. Observaram um desvio na razão sexual, com um aumento de fêmeas nos períodos mais críticos para a população, com um aumento da fragmentação do habitat e a falta de disponibilidade de recursos. A fragmentação de habitat, quer por ação antrópica quer por ação de processos climáticos, podem de forma aleatória, por pressão seletiva ou por efeito fundador, promover o aumento relativo do número de fêmeas com reversão sexual XY em *Akodon montensis* da população de SP.

Com os parâmetros populacionais de desvio de neutralidade, distribuição *mismacth* e ao calcularmos o tempo de T_{exp} da população de Iguape (SP) em cenários distintos podemos perceber que os traços de expansão populacional estão sempre confirmados, independente da análise. Analisando os valores de estimativa de tempo de expansão, pode-se concluir que aparentemente o grupo representado pelas fêmeas XY representa uma linhagem mais recente dentro da população de Iguape (T_{exp} fêmeas XY=3.173,00 e T_{exp} fêmeas XX=17.653,8 anos). Utilizando-se da taxa evolutiva de região D-loop, também se estima que as fêmeas XY, além de estarem se expandindo há menos tempo, possuem uma origem com cerca de 15 mil anos na população de Iguape. Espinosa e Virtulo (1996) afirmaram que os Akodontinae têm em média três gerações de ninhadas por ano e atingem a puberdade por volta dos três meses de vida. Sendo assim, pode-se estimar que se passaram 45×10^3 gerações desde o surgimento dessas fêmeas XY na população de Iguape.

Esse dado é o oposto encontrado por Hoekstra (2003). Segundo a autora, ao analisar parâmetros populacionais de desvio de neutralidade para populações de *A.*

boliviensis e ao se retirar as fêmeas XY das análises, os teste de neutralidade não foram significativos para F_s de F_u e D de Tajima, alterando quando as fêmeas estão incluídas na análise. De forma similar, as populações de *A. azarae* amostradas com fêmeas XY não apresentaram desvio para neutralidade, indicando que as fêmeas XY dessas populações apresentam uma origem antiga. Usando a mesma taxa evolutiva, Hoekstra (2003) concluiu que a primeira fêmea XY surgiu há 37.000 anos em *A. boliviensis* e a 23.550 em *A. azarae*. Resultado diferente do que foi encontrado no presente estudo para *A. montensis* que sugere que as fêmeas XY apresentam uma origem mais recente.

A análise de estimativa de origem das fêmeas XY, tanto em *A. montensis* (presente estudo) quanto os de *A. azarae* e *A. boliviensis* (Hoekstra 2003) baseada na taxa mutacional da região D-loop assume que todos os haplótipos amostrados, para cada espécie, descendem de um único DNA mitocondrial de fêmea XY. Entretanto, a introdução de novos haplótipos e ou haplótipos divergentes nas populações envolvidas, como por migrantes, ou até mesmo o surgimento de fêmeas XY por múltiplas vezes dentro das espécies, pode alterar essas estimativas. Caso isso tenha acontecido, a data estimada pode estar sendo subestimada.

Nos resultados de filogenia aqui apontados (Figura 6) para se investigar a origem das fêmeas XY em Iguape pode-se notar uma filogenia em estrela. Filogenias em estrela são observadas quando há um acúmulo de divergência genética maior que o esperado para populações em estado de estabilidade populacional, indicando assim uma expansão populacional recente (SLATKIN e HUDSON 1981). Segundo Hoekstra (2003) seria de se esperar que caso as fêmeas XY tivessem uma origem recente na população, a distribuição dos polimorfismos e uma filogenia em estrela seriam observados.

A origem mais recente de fêmeas XY no grupo cursor pode também explicar porque somente *A. montensis* e somente uma população apresenta fêmeas XY nesse grupo. Destaca-se que a origem das fêmeas XY (cerca de 15 mil anos) foi anterior ao ultimo gargalo populacional (cerca de 5 mil anos), associada a um potencial desvio da razão sexual favorecendo fêmeas proposto por Fagundes et al. (2000), favorecendo ao surgimento e a manutenção dessas fêmeas nessa população.

V.3. PRESENÇA, INTEGRIDADE E DIVERSIDADE DO GENE SRY EM *AKODON*

Nossos dados indicam a presença e integridade do gene Sry em todas as espécies do gênero *Akodon* aqui investigadas. Apesar dos valores de divergência genética não serem elevados, não houve compartilhamento de haplótipos do gene entre espécies distintas. Por ser um gene nuclear, de cópia única, não sofrendo recombinação genética por estar no cromossomo Y, e diferentemente dos genes mitocondriais por ter origem paterna, os resultados encontrados nos levam a sugerir que esse gene possa ser empregado como marcador espécie-específico em estudos futuros.

Essas divergência genéticas não tão elevadas foram ainda maiores dos que as reportadas em estudos com *A. azare*, *A. boliviensis* e *A. dolores* (SANCHEZ et al. 2010). A baixa divergência genética observada nesse estudo pode ser devido ao fato da amostragem utilizada ser baixa ($n < 5$) e restrita a uma localidade (Córdoba, Argentina). É de se esperar que amostras de uma mesma região tenha maior fluxo gênico entre si, apresentando assim, maior similaridade genética.

Os valores de divergência genética encontrados para o gene Sry quando se comparou machos e fêmeas XY foi inferior ao encontrado entre os machos, indicando que a fonte de variabilidade desse gene em *A. montensis* não decorre somente da presença das fêmeas XY.

O gene Sry mostrou uma característica específica para *A. montensis* uma deleção de 88 pb e em *A. cursor* com 110 pb. Essas deleções encontram-se fora da região HMG-box, assim como a maioria das alterações (33 de 54 mutações) entre *A. montensis*. Quando se analisado somente a região HMG-box nota-se um compartilhamento de haplótipos entre espécies distintas, demonstrando assim que esse domínio é mais conservado entre as espécies, mesmo quando se comparando com humanos, sendo provavelmente a região mais importante. Essas deleções mencionadas parecem não ter relação com as fêmeas XY, já que em *A. montensis* é comum a machos e fêmeas e em *A. cursor* não há registro de casos de reversão sexual.

Vários autores já haviam descrito que a região HMG-box atuaria como domínio funcional desse gene, sendo suficiente para desencadear o processo de determinação sexual que leva ao sexo masculino (Sekido e Lovell-Badge 2009, Graves 2001).

Berta et al. (1990) sequenciaram o gene SRY em fêmeas XY e haviam identificado uma mutação que alterava um dos sítios de ligação do gene (uma mudança

de metionina para isoleucina). Atribuíram essa mutação como responsável pela reversão sexual, confirmando a importância desse gene na determinação do sexo. O próprio Sanchez et al (2010) investigando sequências de Sry de *A. azarae* identificou mutações em uma das sequências das fêmeas XY, mas o autor não soube dizer se essa mutação poderia estar influenciando na efetividade da proteína.

No caso de *A. montensis* nenhuma das alterações observadas no gene SRY foram exclusivas de fêmeas XY, não podendo ser atribuídas ao processo de reversão sexual.

V.4. PRESENÇA, INTEGRIDADE E DIVERSIDADE DO GENE DAX-1 EM *AKODON*

Os dados aqui demonstrados para a integridade e presença do gene Dax-1 são inéditos na literatura para casos de roedores neotropicais e um dos poucos para mamíferos. No GenBank existem somente algumas sequências disponíveis para *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, todas feitas por *shotgun* ou por cDNA, nenhum por sequenciamento direto. A maioria das informações disponíveis sobre Dax-1 se referem a análises com humanos (ZANARIA et al. 1994, GUO et al. 1996, HABIBY et al. 1996, NAKAE et al. 1996, CALLIARI et al. 2007) e apesar de já se terem alguns estudos investigando sobre a sua função e interação molecular, bem como os níveis de expressão do gene em camundongos (WANG et al. 2001, MEEKS et al. 2003), a estrutura do gene ainda é pouco esclarecida.

Entretanto a análise da sequência de nucleotídeos desse gene se faz necessária, visto que mutações de Dax-1 em humanos resultam em anormalidade funcionais das cristas esteroidogênicas assim como fenótipos de hipoplasia congênita adrenal e hipogonadismo hipogonadotrófico (ZANARIA et al. 1994, GUO et al. 1995, HABIBY et al. 1996, MCCABE 2000).

Em *Akodon* observamos que a sequência do exon 2 de Dax-1 teve tamanho similar (429 pb) a *Mus musculus* e maior do que em humanos (245 pb) (GUO et al. 1996). Comparando as sequências de machos e fêmeas XY de *A. montensis* observou-se que o exon 2 é bastante conservado e que existem sequências similares, mas não idênticas. Também não houve um compartilhamento entre fêmeas XX e fêmeas XY, e apenas duas fêmeas XY compartilharam haplótipos entre si. Além disso, o exon 2 de Dax-1 apresentou um baixo valor de divergência genética entre os machos, fêmeas XY

e fêmeas XX, confirmando assim a conservação desse exon dentro das amostras analisadas.

Essa semelhança de sequência aconteceu também entre espécies distintas como *A. paranaensis* e *A. lindberghi* que chegaram a compartilhar haplótipos entre si. Mesmo com essa semelhança ocorreram algumas pequenas peculiaridades como uma inserção de Guanina na posição 12 exclusiva de *A. montensis* (comum entre machos, fêmeas e fêmeas XY) e uma transição de Timina para Citosina na posição 69 em *A. cursor*.

Mesmo com baixa divergência genética a sequência de nucleotídeos desse gene precisa ser investigada. Pois mutações descritas para Dax-1 em humanos alteram o domínio carboxi-terminal de sua proteína e parecem afetar sua capacidade repressora de transcrição. E a maioria dos casos de humanos com hipoplasia congênita adrenal (AHC) apresentavam mutações em Dax-1 que geraram códons de paradas prematuros levando a formação de uma proteína truncada (CALLIARI et al. 2007).

Em outros casos em humanos, segundo Seminara et al. (1999) mutações nesse gene resultavam em vários fenótipos como infertilidade masculina, reversão sexual e atraso na puberdade. Essa relação íntima do gene Dax-1 com determinação sexual também foi sugerida por Fagundes et al. (2000) e Ortiz et al. (2009). Ambos sugeriram que o papel do cromossomo X na determinação sexual é mais relevante do que usualmente se imagina, e que especificamente o gene Dax-1 poderia estar relacionado com os casos de reversão sexual com fêmeas XY em *A. montensis* e *A. azarae*, respectivamente.

Uma série de outros estudos relatam casos de determinação sexual independente do cromossomo Y e do gene Sry, como por exemplo casos de fêmeas XO e machos XY em *Microtus oregoni* (FREDGA, 1983), fêmeas e machos com cariótipos idênticos, sendo ambos XO, no caso de *Tokudaia osimensis* e *Tokudaia tokunoshimensis* (SOULLIER et al. 1998; SUTOU et al. 2001; ARAKAWA et al. 2002), em *Ellobius lutescens* (JUST et al. 1995) e ainda casos de machos e fêmeas XX em outras duas espécies de *Ellobius*, *E. tancrei* e *E. talpinus* (JUST et al. 1995).

No caso específico de *Tokudaia*, vários autores propuseram que um sistema XO/XO surgiu para guiar a determinação sexual (HONDA et al. 1977, 1978; KOBAYASHI et al. 2007), no qual o gene Sry localizado no cromossomo Y teria sido completamente perdido (SUTOU et al. 2001). Kuroiwa et al. (2011) sugeriram que a

ausência do Sry em *T. osimensis* e *T. tokunoshimensis* indicaria que um novo mecanismo determinante do sexo deve ter surgido. No mesmo trabalho os autores apontam o gene CBX2 como candidato a fator determinante do sexo.

Mesmo com evidências da importância do gene Dax-1 na determinação sexual e sua possível relação com os casos de reversão do sexo, os dados obtidos com o exon 2 nos permite apenas afirmar que não seria uma mutação na sequência do exon 2 de Dax-1 a responsável pela reversão sexual em fêmeas XY de *A. montensis*. Como o gene Dax-1 é composto por dois exons, para se investigar a funcionalidade de sua proteína, e se há alguma mutação que torne as sequências de machos e fêmeas XY divergentes entre si, a ponto de ser o motivo da reversão sexual, há a necessidade de estudos futuros com o sequenciamento do exon 1.

V.5. HMG-BOX E PORÇÃO NÃO FUNCIONAL DO POLIPEPTÍDIO DO SRY EM *A. MONTENSIS*

Estrutura HMG

Um dos maiores desafios na atualidade é, a partir de uma sequência de DNA comumente obtida em trabalhos de biologia molecular, identificar variações na sequência de DNA e conseguir atribuir a essas variações um valor na funcionalidade da proteína (GIBAS e JAMBECK 2001). Um dos métodos mais tradicionais seria comparar as sequências por similaridade de bases e convertê-las em sequências de aminoácidos.

Na era da proteômica, entender a funcionalidade supera a etapa de converter DNA em aminoácidos. Pois permite se compreender como a estrutura tridimensional de uma proteína interage com o DNA alvo, e a partir disso, avaliar o potencial de uma alteração de base na sequência do gene.

No gene Sry essa interação é feita a partir do domínio HMG-box que, no presente estudo, se demonstrou bastante conservado entre as espécies, sem grandes mutações entre as espécies e com o compartilhamento de haplótipo entre algumas, incluindo machos e fêmeas XY de *A. montensis*. Os dados dessa região mostraram que as variações observadas não foram exclusivas de sexo ou espécie.

Mesmo com essas semelhanças algumas variações foram encontradas dentro da região HMG-box, sendo necessária uma maior investigação. Alguns autores atribuíram casos de fêmeas XY na espécie humana a mutações dentro da região HMG-box do gene SRY (Hawkins et al. 1992, Affara et al. 1993). Os autores ainda afirmaram que ao se comparar a sequência de Sry dos pais com as filhas afetadas, não se observou nenhuma dessas mutações, sugerindo então, que essas alterações teriam surgido somente no gene Sry das filhas.

Além de algumas poucas mutações dentro do HMG-box observou-se mutações fora dessa região que precisavam ser investigadas, visto que novos estudos demonstram que as regiões fora do domínio HMG-box, como as regiões C- e N-terminais e o domínio Q, também são importantes para a expressão desse gene.

Zhao e Koopman (2012) revisaram diversos artigos que investigaram mutações nas regiões fora dos domínios HMG-box, como as regiões C-N terminais e as regiões ricas em Q (encontradas no presente estudo) (DOMENICE et al. 1998, SINCLAIR 1997, SHAHID et al. 2004) e concluíram que mutações nos domínios fora do HMG-box podem afetar a determinação sexual em machos ou até mesmo causar disgenese das gônadas.

Todas as espécies de *Akodon* analisadas, assim como em humanos, apresentaram essas regiões altamente conservadas, exceto *A. cursor* (presente estudo) que assim como *Mus musculus* (BOWLES et al. 1999), possuem um domínio Q reduzido.

Como o gene Sry é um fator de transcrição, a localização nuclear definida pela presença das caudas C- e N-terminal é essencial para atuação da sua proteína (UNDERWOOD et al. 2009). Sua localização é facilitada por regiões de localização nuclear (NLS), regiões de aminoácidos compostas principalmente de resíduos R e K que flanqueiam a região HMG-box e apresentam função e forma independente dessa região.

No presente estudo, considerando as mutações encontradas dentro e fora da região HMG-box, um macho de *A. montensis* (cit 161) e uma fêmea XY (cit 200) apresentaram a mesma sequência de aminoácidos, dentro e fora da região HMG-box, não havendo assim, diferenças entre essas regiões para machos e fêmeas XY de *A. montensis*. Apesar de algumas diferenças de aminoácidos, todas as sequências de aminoácidos encontradas para as proteínas de Sry dos 20 exemplares analisados de *A. montensis* sugerem que a funcionalidade da proteína deve ter sido mantida, com

interações normais das α hélices com a molécula de DNA. Não houve distinção de um padrão entre machos e fêmeas XY tanto nas regiões N (nNLS calmodulina) e C (cNLS importina- β) terminais quanto nos blocos repetitivos de resíduos de glutamina.

Para *A. montensis* e as demais espécies analisadas, bem como *A. boliviensis*, *A. azarae* e *A. dolores* analisados por Sanchez et al. (2010), a região N (nNLS) apresentou-se de forma descontínua formada por dois módulos de aminoácidos em machos e em fêmeas XY. Sudbeck e Scherer (1997) confirmaram que o nNLS, bipartido ou não, possui papel fundamental para o desenvolvimento dos testículos.

A região C-terminal (HKEKYPNYKYQPHRRAKVPQR) encontrada tanto para machos e fêmeas XY de *A. montensis* (presente estudo) e para *A. boliviensis*, *A. azarae* e *A. dolores* (SANCHEZ et al. 2010) atua tanto quanto como um grampo cinético, conduzindo a proteína de Sry que foi traduzida no citoplasma de volta para o núcleo, como também parece desempenhar um papel fundamental na duração da modulação do complexo formado entre a proteína do gene Sry e a molécula de DNA (PHILLIPS et al. 2006).

Segundo Underwood et al. (2009) na maioria das espécies de roedores a região C-terminal está dividida em duas partes, uma região rica em poliglutamina (domínio Q) e um domínio de ativação que atua como ponte ligando o domínio Q ao HMG-box. Afirmam também que para mamíferos não roedores apenas parte da região C-terminal do gene Sry permanece ligada diretamente ao HMG-box sendo o domínio Q é pouco conservado. Nossos dados mostram *A. cursor* apresentou uma redução drástica do domínio Q, diferindo de todas as outras espécies amostradas.

Em camundongos foi demonstrado que o domínio rico em Q é fundamental para o desenvolvimento dos testículos e atua como facilitador de interações entre proteínas com os moduladores de transcrição (MILLER et al. 1995). Em humanos, apesar de não haver o domínio rico em Q, a região C-terminal ligada a HMG-box é que seria a ponte entre domínio Q ao HMG-box, atuando tanto quanto na ativação da transcrição por interação com a proteína ST1 (segundo POULAT et al. 1997) como na repressão da transcrição de outras proteínas como KRAB-O (OH et al. 2006).

Ao se analisar a estrutura tridimensional da proteína de Sry, por modelagem a região HMG-box, as três regiões de α -hélices da proteína de Sry de *A. montensis* foram conservadas em todas as espécies analisadas. A existência de três regiões de α -hélice

também foi identificada por Werner et al. (1995) que analisaram a proteína Sry em humanos. De acordo com esses autores as três α hélices interagem entre si formando uma estrutura semelhante a um triângulo torcido. Essa estrutura triangular ocorre devido a interação da porção N-terminal da α hélice 1 com a região C-terminal da $\alpha 3$. Essas estruturas também foram identificadas para as espécies analisadas no presente estudo. Dessa forma, $\alpha 1$ e $\alpha 3$ formariam o corpo do triângulo e $\alpha 2$ a base. Essa conformação do domínio HMG-box facilita a interação com a molécula de DNA, e induz uma curvatura espécie-específica, classificando assim Sry como um fator de transcrição arquetípico.

A $\alpha 2$ parece interagir com a curvatura menor da molécula de DNA e as α hélices 1 e 3 atuam como suporte que comprime a molécula de DNA induzindo sua curvatura e alteração de sua angulação (UNDERWOOD 2009).

Com base nessas informações, mesmo as alterações encontradas nas proteínas tridimensionais entre machos e fêmeas XY de *A. montensis*, não alteram os sítios de ligação entre a proteína e o DNA alvo, nem entre as α hélices. Dessa forma é possível se afirmar que não é uma alteração na proteína do gene Sry a causa de reversão sexual em fêmeas XY em *A. montensis*.

Mecanismos de determinação do sexo

Para muitos autores, casos de reversão sexual em espécies do gênero *Akodon* são resultantes de mutações no cromossomo Y que causaram alguma inabilidade funcional na determinação do sexo masculino (LIZARRALDE et al. 1982, VITULLO et al. 1986, BIANCHI et al. 1993, ESPINOSA e VITULLO 1996). Entretanto alguns autores já propuseram novos mecanismos de determinação sexual independentes do gene Sry.

Ortiz et al. (1998) estudando cromossomo X de *A. azarae* identificou que o cromossomo X nessa espécie corresponde a 8% do tamanho do haplótipo das fêmeas, sendo que 38% desses cromossomos correspondem a bandas de heterocromatina. Através de técnicas de bandeamento C esses autores identificaram três padrões de distribuição de heterocromatina para os cromossomos X. Observaram ainda que sempre o cromossomo X dos machos pertencia aos que eles chamaram de X_1 , enquanto o cromossomo X das fêmeas XY sempre era do tipo X_2 ou X_3 , e as fêmeas XX sempre possuíam pelo menos um X do tipo X_1 . Dessa forma esses autores atribuíram que alguma mutação no cromossomo X levou ao surgimento de outros dois tipos

cromossomos X, e que essa mutação nesses cromossomos X é que seria responsável pela reversão sexual na espécie em questão.

Ortiz et al. (2009) analisaram 50 animais selvagens da espécie *A. azarae* e 95 indivíduos dessa mesma espécie oriundos de gerações F1 e F2 de 16 cruzamentos em laboratório. Com essas análises puderam corroborar o que haviam encontrado em 1998, uma correlação entre os três tipos de cromossomo X e os casos de reversão sexual de fêmeas XY. Observando os cruzamentos e as transmissões dos tipos dos cromossomos X para as filhas, os mesmos autores, concluíram que as fêmeas com reversão sexual XY receberam o cromossomo X₂ ou X₃ alterado de suas mães e o cromossomo Y de seus pais, descartando assim uma mutação no cromossomo Y como causa primordial de fêmeas com reversão sexual XY para *A. azarae*.

Fagundes et al. (2000) ao investigarem 51 indivíduos de *A. montensis* de Iguape/SP descobriram ocorrência de cinco fêmeas com reversão sexual e par sexual do tipo XY. Os autores utilizaram de técnicas de hibridação *in situ* fluorescente, tendo como sonda o cromossomo Y de um macho normal, e verificaram que as fêmeas XY possuíam um cromossomo Y normal e um cromossomo X com uma porção ou até mesmo um cromossomo Y inteiro translocado. Esses mesmos autores, por técnicas de reação em cadeia da polimerase, amplificaram e confirmaram a presença do gene Sry nessas fêmeas XY. Identificaram ainda que essas fêmeas não tinham alterações morfológicas e sua genitália externa e por análises histológicas dos ovários de duas fêmeas XY afirmaram que essas fêmeas tinham múltiplos folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, com características típicas de fêmeas sexualmente maduras. Por esses e outros resultados, Fagundes et al. (2000) concluíram que uma translocação (X; Y) pode ter afetado um gene ligado ao cromossomo X que participa da determinação sexual, bloqueando assim a organogênese testicular nessas fêmeas XY de *A. montensis*.

Todos os dados observados de diversidade genética, sequência de aminoácidos que compõem a proteína do gene Sry, tanto em sua estrutura primária como terciária, bem como se analisando a proteína como um todo e não somente a região HMG-box, foram encontrados machos e fêmeas XY que apresentam exatamente a mesma proteína para o gene Sry. Esses dados corroboram o predito por Sanchez et al. (2010) que ao analisar o gene Sry de *A. boliviensis*, *A. azarae* e *A. dolores* concluíram que na maioria

dos casos a sequência encontrada era exatamente a mesma entre machos e fêmeas XY nas espécies *A. boliviensis* e *A. azarae*.

Como dito anteriormente todos os dados encontrados no presente estudo permitem concluir que não é uma mutação da estrutura genética e ou proteica do gene Sry que causa a reversão sexual em *Akodon montensis*.

Assim, é necessário se investigar outras proteínas e outros genes envolvidos na determinação sexual. Importante analisar outros fatores que mudam a conformação da molécula de DNA, que atuam na interação da proteína do Sry que podem influenciar a transcrição de genes alvos (PONTIGGIA et al. 1994, PHILLIPS et al. 2006) e possíveis outros genes envolvidos na cascata como proposto por Fagundes e colaboradores em 2000.

V 6. VERIFICAR O NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES SRY E DAX-1 PRESENTES NO GENOMA DE MACHOS, FÊMEAS E FÊMEAS XY DE *A. MONTENSIS*.

Para o gene Sry já foram encontradas múltiplas cópias em uma série de espécies de roedores (NAGAMINE 1994, BULLEJOS et al. 1999), mas em nenhum desses trabalhos foi possível determinar qual das cópias era funcional e se havia algum mecanismo de compensação de dosagem envolvido.

Um exemplo disso foi o estudo realizado por Bianchi et al. (1993) que identificaram de 3-6 cópias do gene Sry em *A. azarae* usando técnicas de *Southern blot* com sondas de Zfy. Os autores compararam o padrão de digestão com a hibridação da sonda de Zfy para inferir quantas cópias existiam. Os autores concluíram que existiam de 8-10 cópias do gene Zfy e de 3-6 cópias do gene Sry em *A. azarae*. Um dos problemas da técnica empregada é que além de demandar grandes quantidades de DNA em alta qualidade, a técnica é laboriosa e requer maior tempo em laboratório e possui resolução limitada (BEL et al. 2011). Além disso há dificuldade de se estimar o número de cópias, pois a digestão do DNA com enzimas de restrição podem gerar fragmentos de tamanhos variados não por número de cópias distintas do gene, mas por polimorfismos ou mutações populacionais ou espécie específicas.

Em nossas análises foi empregada uma técnica mais precisa para a detecção do número de cópias, o uso do PCR em tempo real. Esse tipo de amplificação apresenta muitas vantagens incluindo a não manipulação pós-amplificação (diminuindo assim o risco de contaminação), é mais rápido, a quantidade de DNA necessária é menor e possui maior acuracidade na quantificação (HOEBECK et al 2007). A curva de *melting* encontrada evidencia a similaridade entre o gene Sry de machos e fêmeas XY, mesmo quando se é empregado machos de populações diferentes do que as das fêmeas XY, demonstrando além da eficiência dos *primers* desenhados pelo presente estudo, conservação do gene Sry.

Podemos afirmar essa similaridade na sequência, pois, quando se tem variação genética na região central do produto amplificado ocorre oscilações na curva de *melting* produzindo mudanças nos picos de fluorescência e isso não foi observado para o gene Sry. Além disso, se há ocorrência de polimorfismos na sequência de nucleotídeos complementares aos *primers*, os valores de Ct (*Thresold cycle value*) são maiores do que o esperado devido a um anelamento inespecífico nos ciclos iniciais que gera um atraso no aumento exponencial da fluorescência (BEL et al. 2011), fato que não foi observado para o gene Sry.

A eficiência da curva de *melting* e do *plot* de amplificação não foram eficientes no gene Dax-1. Nesse caso ocorreram múltiplos picos de fluorescência indicando assim que os *primers* empregados possuem um anelamento inespecífico. Com isso não se foi possível usar o gene Dax-1 como referencia para se comparar com o gene Sry. Dessa forma, apenas uma comparação relativa do número de Ct entre machos e fêmeas XY pode ser investigada. Como dito nos resultados, os machos de *A. montensis*, de uma mesma população apresentaram valores de Ct diferentes. Isso indica que o número de cópias do gene Sry em machos varia. O mesmo intervalo de variação foi encontrado nas fêmeas XY. Assim, considerando que na reação em tempo real o perfil de amplificação é exponencial e proporcional ao número de cópia do DNA alvo, mesmo sem poder afirmar qual o valor absoluto do número de cópias de Sry em machos e fêmeas XY, é possível sugerir que não há diferença no número de cópias entre os sexos.

Se confirmado, esses achados discordam da proposta de Fagundes et al. (2000) de que as fêmeas XY carregassem mais de uma cópia desse gene em relação aos machos. Estudos adicionais são necessários para confirmar essa proposta.

A dificuldade de quantificação do número de cópias do gene Dax-1 foi devido à ausência de iniciadores de transcrição específico do gene Dax-1 para o gênero *Akodon* ou outro gênero irmão descritos na literatura. Os iniciadores desenvolvidos no presente estudo foram baseados em sequências de *Mus musculus* e não foram suficientemente específicos para amplificar o exon 1. Isso foi evidente pelas oscilações dos picos encontrados na curva de *melting* da curva de eficiência desses *primers*. Essas oscilações indicam que muitas outras cópias do gene de Dax-1 foram amplificadas concomitantemente. Há a possibilidade de algumas dessas cópias serem, inclusive, pseudogenes. A existência de múltiplas cópias de Dax-1 em humanos já foi relatada. Zanaria et al. (1994) estudando duplicações na região Xp22. 2→p21.2 em humanos e apontaram DAX-1 como gene sensível a dosagem como fator de reversão sexual.

Segundo Bardoni et al. (1994) duplicações de 160 kb na região sensitiva a dosagem para reversão sexual (DSS) no cromossomo X de humanos, onde Dax-1 está contido, resulta em mulheres com genótipo XY. Swain et al. (1998) ao estudarem camundongo *Poschiavinus* transgênico para Dax-1 que possuem múltiplas cópias do gene com superexpressão, apresentaram fêmeas XY, mesmo essas fêmeas tendo seu gene Sry intacto. Domenice et al. (2010) investigando humanos com AHC concluíram que duplicação de Dax-1 é a causa da disgenese das gônadas em pacientes com reversão sexual XY.

No caso de *A. montensis* todos os indivíduos testados mostraram múltiplas cópias do exon 1 do gene Dax-1, inclusive fêmeas normais, indicando que provavelmente trata-se de um problema metodológico. Dessa forma, se faz necessário uma confecção de novos iniciadores de Dax-1 na tentativa de se descobrir quantas cópias desse gene há em machos, fêmeas e fêmeas XY em *A. montensis*, a fim de se averiguar se assim como em *Poschiavinus* múltiplas cópias desse gene poderiam ser responsáveis pela reversão sexual em fêmeas XY.

V.7. IDENTIFICANDO A ORIGEM COMUM DA REVERSÃO SEXUAL NO GÊNERO *AKODON*

A história da tribo Akodontini começou a ser escrita em 1871, quando o pesquisador Felix de Azara descreveu “Rat Cinqüême”. Desde então o debate sobre a taxonomia e sistemática sobre essa tribo e suas subfamílias não parou. Musser e Carleton (2005) afirmaram que os debates sobre taxonomia e sistemática de

Sigmodontinae já passam de um século e em especial na tribo Akodontini que corresponde a 25% de todas as espécies de Sigmodontine. Grande parte dos problemas de sistemática dentro dessa tribo recai sobre o gênero *Akodon* (JAYAT et al. 2010), havendo com estudos filogenéticos, por exemplo, a elevação de novo gênero (Herzhkovitz 1998) de *Thaptomys*, que antes era considerado uma espécie de *Akodon*, descrição de uma nova tribo Abrotrichini, que engloba algumas espécies do gênero (D'ELIA et al. 2007) e a evidencia de que a espécie *A. serrensis* não pertence a esse gênero (D'ELIA 2003, SMITH e PATTON 2007).

Devido a todos esses problemas sistemáticos, somente empregamos nas análises as amostras do gene mitocondrial citocromo b das espécies de *Akodon* que não possuem questionamentos quanto sua validade taxonômica (ALVARADO- SERRANO e D'ELIA 2013). Além disso, algumas espécies recém descritas como *A. oenus* (BRAUN et al. 2000) e *A. aliquantulus* (DÍAZ et al. 1999) não possuem a sequência do gene citocromo b disponível para acesso público no GenBank.

A filogenia obtida com 31 espécies do gênero *Akodon* (Figura 12) corrobora na maioria dos casos os agrupamentos proposto por Smith e Patton (2007) e evidenciados por Braun et al. (2010). O grupo *varius* inicialmente proposto por Myers (1989) incluía espécies dos Andes e áreas de baixadas da Bolívia, Paraguai e Argentina. Myers (1989) delimitou o grupo *varius* baseado em similaridades morfológicas entre os táxons e sua aparente contígua distribuição geográfica. A espécie *A. varius* não foi analisada por Smith e Patton (2007).

O agrupamento entre *A. iniscatus*, *A. dayi*, *A. toba*, *A. dolores*, *A. molinae* foi mantido no presente estudo. Entretanto ao analisarmos a sequência do gene em questão de *A. varius* essa espécie não se agrupou com o grupo que leva o seu nome. Dessa forma, assim como Smith e Patton (2007), questiona-se o conceito de grupo *varius* baseado em similaridades morfológicas e se realmente a espécie *A. varius* pertence a esse grupo. Assim, demanda-se nominar o grupo com outro nome, como grupo *iniscatus*, a espécie mais basal do grupo. No presente estudo empregou-se uma única sequência de DNA mitocondrial de um banco de dados, a qual se baseia em confiança na identificação da espécie pelo coletor e na sequência depositada. Uma possibilidade é de que tenha havido algum erro na identificação da amostra e que ela não corresponda a *A. varius*, entretanto, há a possibilidade de a espécie *A. varius* não se agrupe dentro deste grupo.

O outro grupo encontrado, *boliviensis*, agrupou todas as espécies sugeridas por Smith e Patton (2007) com a inclusão de *A. viridences* (BRAUN et al. 2010). As espécies inicialmente propostas para o grupo possuem distribuição geográfica desde o Peru central, Bolívia e sul da Argentina. *A. viridences* tem como localidade tipo San Luis, Argentina, tendo sua distribuição geográfica limitada a porções sudeste da Montanha de Córdoba, em ecorregião de savana (BRAUN et al. 2010). Sua descrição foi baseada em dados morfológicos de 40 espécimes e na comparação de sequências do gene mitocondrial citocromo b de seis indivíduos da nova espécie com outras espécies do gênero. Tanto os dados de divergência genética quanto os dados morfológicos corroboraram a validação da nova espécie. As análises filogenéticas feitas no trabalho de Braun et al. (2010) já haviam apontado *A. viridences* como grupo irmão de *A. boliviensis* e *A. spegazzini*, fato que pode ser confirmado pelo presente estudo.

O grupo cursor foi inicialmente reconhecido por Rieger et al. (1995) e foi corroborado por Smith e Patton (2007). Nesse trabalho os autores incluíram nesse grupo seis espécies que ocorrem desde a floresta da costa brasileira, Paraguai, Uruguai e Argentina, mas afirmaram que o grupo tinha pouca sustentação filogenética, sendo mantido somente nas análises de máxima parcimônia com pesos iguais entre transição e transversão e com baixos valores de *bootstrap*. Ao realizarem análises filogenéticas por máxima parcimônia, mas com pesos diferentes, ocorria a inclusão de *A. lindberghi* e a formação de uma politomia do grupo cursor com o grupo *boliviensis*. Com a análise bayesiana ocuparia uma posição basal em relação a esse grupo. Os mesmos autores sugeriram que a validação desse grupo necessitaria de maiores investigações.

Geise et al. (2001) usando sequências do citocromo b haviam mencionado a possibilidade de inclusão de *A. lindberghi* no grupo cursor. No presente estudo, a filogenia encontrada apoia a inclusão de *A. lindberghi* dentro do grupo, bem como a de *A. philipmeyersi*, sendo duas espécies irmãs entre si. Essa relação entre *A. lindberghi* e *A. philipmeyersi* já havia sido proposta por Pardiñas et al. (2005). Sendo assim, sugere-se que *A. philipmeyersi* sejam incluídas no grupo cursor.

O grupo *aerosus*, além de incluir todas as espécies sugeridas por Smith e Patton (2007), incluiu *A. mimus* (THOMAS 1901) e *A. varius*. Essas espécies habitam a parte alta de florestas tropicais do sudeste e oeste da encosta dos Andes, sudeste da Bolívia, Colômbia e Peru. *A. mimus* também ocorre na parte superior na encosta leste dos Andes, do sudeste do Peru ao leste central da Bolívia (MUSSER e CARLETON 2005). Sua

posição dentro do gênero *Akodon* foi confirmada por Smith e Patton (2007) e numa análise de agrupamento de vizinhos *A. mimus* se mostrou de forma basal a *A. mollis*, *A. aerous*, *A. orophilus* e *A. siberiae*, já evidenciando assim a relação encontrada no presente estudo.

A única espécie que se manteve fora de qualquer agrupamento foi *A. azarae*, já observado previamente por Smith e Patton (2007). *A. azarae* é uma espécie amplamente distribuída na parte nordeste e central da Argentina, sudeste do Paraguai, Uruguai e sudeste do Brasil. No trabalho de Smith e Patton (2007) essa espécie apresentou relação com o grupo boliviensis e cursor nas análises de máxima parcimônia e Bayesiana. No presente estudo, essa espécie se posicionou mais próxima do grupo cursor. Mas como sugerido por Smith e Patton (2007), novas análises com a inclusão de outras espécies do gênero podem esclarecer o posicionamento filogenético de *A. azarae*.

Bull e Bulmer (1981) havia predito que se o mecanismo de determinação do sexo for muito conservado, o caráter teria surgido uma única vez, em uma única fêmea XY ancestral. Por outro lado, se a determinação sexual do gênero *Akodon* fosse mais variável, as fêmeas XY poderiam ter evoluído de forma independente dentro das linhagens.

Com essas premissas, Hoekstra e Edwards (2000) testaram por mapeamento filogenético se as fêmeas XY possuíam ou não mais de uma origem. Utilizaram 16 espécies de *Akodon*, das quais 8 espécies possuíam registro de fêmeas XY. As árvores filogenéticas encontradas por Hoekstra e Edwards (2000) mostraram que as espécies onde há ocorrência de fêmeas XY não formam um clado monofilético. Os autores concluíram que a filogenia gerada não foi capaz de identificar qual hipótese seria verdadeira, de origem única ou origens múltiplas, seja pelo método de DELTRAN (sugeriu origem múltiplas) ou pelo método ACCTRAN (única origem).

Esses dados prévios são concordantes com nossos achados utilizando 31 espécies de *Akodon*, das quais nove possuem registro de fêmeas XY (Figura 12), todas conhecidas na literatura. Não foi encontrado monofilia entre espécies onde há ocorrência dessa reversão sexual. Isso já pode ser encarado como uma evidência de que essa característica não descende de um ancestral comum entre as nove espécies com fêmeas XY.

O mapeamento baseado numa filogenia de máxima verossimilhança foi testado por máxima parcimônia e máxima verossimilhança. Nossa análise sugere pelos dois métodos empregados que as fêmeas XY teriam surgido pelo menos seis vezes independentes dentro do gênero. Nossos dados concordam com Hoekstra e Edwards (2000).

Ao se comparar a divergência genética e os haplótipos do gene Sry por inteiro de nove espécies do gênero *Akodon*, e não somente a região HMG-box, observa-se que o gene Sry apresenta-se como um marcador espécie-específico. Sendo assim, é de se esperar que as espécies onde ocorra reversão sexual, tenham uma variante específica, dando uma falsa impressão que um novo cromossomo Y tenha surgido para cada uma das espécies com fêmeas XY, como sugerido por Hoekstra e Edwards (2000). Parece natural que encontremos genes SRY distintos para cada espécie, não necessariamente essa divergência ser a responsável pela reversão sexual, pois diferentes cromossomos Y ou genes SRY também surgiram para machos normais.

Assim, nossos achados apontam que tenham ocorrido múltiplas origens de casos de reversão sexual, como mostrou o mapeamento desse caráter sobre a filogenia do gênero *Akodon*, mas não por alterações no gene Sry, ou no cromossomo Y, mas principalmente pelos diversos mecanismos descritos como causa da reversão sexual para as espécies afetadas. De qualquer modo, não há um consenso para os motivos da reversão sexual no gênero e até mesmo dentro de algumas espécies (Ortiz et al. 1998, Fagundes et al. 2000, Hoekstra e Edwards 2000).

Existem registros de casos de reversão sexual em vários grupos de mamíferos (BURGOS et al. 1988, HOEKSTRA e EDWARDS 2000, BIANCHI 2002). Entretanto para a grande parte dos animais afetados a reversão sexual é prejudicial. Em humanos, fêmeas XY são inférteis e apresentam disgenese gonadal, também chamada de síndrome de Swyers (MCELREAVEY et al. 1993). Essas fêmeas possuem estruturas Mullerianas normais, mas atrofia dos ovários que resulta em amenorreia primária e infertilidade. Já em *Mus musculus* as fêmeas XY são sub-férteis tendo ninhadas reduzidas ou nenhuma ninhada (EICHER et al. 1982). Por isso um dos questionamentos que persiste é como essas fêmeas XY poderiam surgir repetidamente no gênero *Akodon* e se manter nas populações. Fagundes et al. (2000) identificaram que fêmeas XY eram férteis e propuseram um mecanismo em que essas fêmeas XY geram uma prole com desvio da razão sexual, tendo dois filhotes fêmeas para um filhote macho, aumentando assim o

número de fêmeas na população. Hoekstra e Hoekstra (2001) por modelos matemáticos sugeriram, que a ação conjunta de seleção natural e segregação meiótica seriam suficientes para explicar a manutenção de 10% de fêmeas XY em *A. azarae*. Os autores também demonstraram que as fêmeas XY produzem mais filhotes do que fêmeas XX quando se comparado o mesmo tempo de vida, deixando mais descendentes. Dessa forma, deixando mais filhotes e produzindo mais fêmeas, essas fêmeas acabam subindo de frequência na população e estão sendo mantidas nas espécies do gênero *Akodon*.

VI. CONCLUSÃO

Desde quando o primeiro caso de reversão sexual foi descoberto por Bianchi e Contreras (1967) muito se debateu sobre os motivos, manutenção e origem das fêmeas XY nas espécies afetadas. Desde então, uma série de mecanismos de determinação sexual foram sendo elucidados, envolvendo principalmente gene da cascata determinante do sexo mais comumente associados a doenças. É razoável propor que os mecanismos de reversão sexual em *Akodon* possam ser comuns a outros mamíferos (Bianchi 2002) e que características de reversão sexual de *A. montensis* possam servir de modelo para estudo da determinação sexual em outros mamíferos (Fagundes et al. 2000).

O presente estudo adiciona informações que podem ajudar na compreensão do mecanismo de reversão sexual de *A. montensis*. Uma das hipóteses levantadas foi que as fêmeas XY de *Akodon montensis* ocorrem em populações com traços de desvios demográficos. Essa hipótese foi corroborada, demonstrando que dentre todas as populações investigadas somente Iguape encontra-se com desvio de neutralidade e sinal de gargalo populacional. Como vários autores mencionados no texto, as fêmeas XY tendem a desviar a razão sexual de sua prole para fêmeas, fazendo que com que o genótipo fêmeas XY se dissemine mais pela população. Pressupostos ecológicos defendem que esse desvio tende a ocorrer em populações com sinais de estresse de habitat e possível gargalo populacional. Essas características somadas se tornam as fêmeas XY mais frequentes na população. No presente estudo também pode-se estimar a origem dessas fêmeas XY na população de Iguape, que curiosamente, antecede seu período de expansão abrupta.

Outro ponto do trabalho retratou genes envolvidos na cascata da determinação sexual. O gene Sry, tido como fator determinante do sexo masculino foi estudado de diversas formas, e em todas as análises ele se demonstrou presente, íntegro e funcional. Fagundes et al. (2000) já haviam previsto que pelo menos uma cópia do Sry estivesse presente nas fêmeas XY, e que ela estaria ativa e funcional, embora não tivesse testado a funcionalidade e integridade do gene. Nosso estudo confirma a integridade em tamanho, composição, estrutura tridimensional (dado inédito) e interação da proteína com o DNA alvo, além de demonstrar que o número de cópias desse gene não é diferente entre machos e fêmeas XY. Sendo um gene de um fator de transcrição a evidência da integridade das interações com o DNA alvo (promotor do gene *sox 9*) é essencial para

acreditar que o gene não tem deficiência e outro fator deve ser o responsável pela reversão sexual nessa espécie. As isoformas obtidas para *A. montensis* não diferem entre machos e fêmeas XY. Nas demais espécies de *Akodon* com ocorrência no Brasil, a diversidade de haplótipos do Sry foi similarmente alta e não revelou um padrão diferencial para as fêmeas XY. A maioria dos casos relatados de reversão sexual em *Akodon* indica que o Sry é o fator que determina a reversão sexual. Em *A. montensis* trazemos evidência de que o gene está intacto.

Dax-1, gene envolvido na cascata da determinação sexual em mamíferos também foi investigado, sendo esse trabalho, pioneiro no uso de sequenciamento direto para se obter informações sobre esse gene em roedores neotropicais. Fagundes et al. (2000) e Ortiz et al. (2009) haviam sugerido que possíveis alterações nesse gene poderiam ser responsáveis na reversão sexual de *Akodon*. Devido a falta de dados disponíveis na literatura, só se foi possível por uso de *primers* (desenhados pelo presente estudo) sequenciar o exon 2 desse gene. Por análise de diversidade genética e haplotípica de seis espécies do gênero, identificou-se uma alta similaridade de sequências, demonstrando que esse exon é bastante conservado. Isso nos leva a concluir que não há mutações, inclusive compartilhadas entre machos, fêmeas e fêmeas XY nesse exon que possam ser responsáveis pela reversão sexual em *A. montensis*. Entretanto, destacamos a necessidade de se persistir na investigação do gene por inteiro, com inclusão do exon 1 e um estudo da funcionalidade de sua proteína.

Como há registros de ocorrência de fêmeas XY para nove espécies de *Akodon*, foi investigado se a origem da reversão sexual no gênero *Akodon* seria comum a essas espécies. A maioria dos casos de reversão sexual foi descrita por autores distintos, e em grande parte dos casos, cada autor atribuiu um motivo/causa distinta para a reversão. Esse fato já era um possível indício de que talvez as origens seriam diferentes. Mas ainda se fazia a necessidade da conexão de uma filogenia robusta do gênero com o mapeamento do caráter reversão sexual, a fim de entender a relação entre a história evolutiva do grupo e o surgimento desse caráter. Com dados de citocromo b foi possível montar uma filogenia condizente com os dados na literatura (Smith e Patton 2007) e se fazer o mapeamento estimando a probabilidade em cada nó da filogenia do ancestral entre as espécies apresentar ou não essa característica. Esse resultado sugere múltiplas origens, corroborando um mapeamento inicial feito por Hoekstra e Edwards (2000).

Por fim, podemos afirmar que todos os dados aqui abordados refletem peculiaridades sobre populações, machos e fêmeas XY em *A. montensis* que podem ajudar a esclarecer como essas fêmeas XY se mantêm na população e se elas interferem na dinâmica populacional. Notou-se também que não são mutações, ou problemas na proteína do gene Sry, como sugerido por vários autores (Bianchi et al. 2002, Hoekstra 2003) que são responsáveis pela reversão sexual nessa espécie. Ainda não se pode descartar que mutações em Dax-1 possam ser responsáveis pela reversão sexual já que somente conseguiu-se investigar um dos seus exons. Porém pode-se afirmar que não são mutações no exon 2 desse gene que são responsáveis pela formação de fêmeas XY.

É importante salientar que a cascata de determinação do sexo envolve a ação de vários genes, sendo que um interage diretamente com o outro. Assim, novos estudos abordando o exon 1 de Dax-1 e investigando os demais genes envolvidos, como Sox 9 que é autossômico, são necessários para se esclarecer ainda mais como o processo de reversão sexual em fêmeas XY de *A. montensis* ocorre.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'saber, A.N. 2000. Spaces Occupied by the Expansion of Dry Climates in South America During the Quaternary Ice Ages. *Revista do Instituto Geológico São Paulo* 21: 71-78.
- Albrecht, K.H. e Eicher, E.M. 1997. DNA sequence analysis of Sry alleles (subgenus *Mus*) implicates misregulation as the cause of C57BL/6J Y^{POS} sex reversal and defines the SRY functional unit. *Genetics*. 147:1267-1277.
- Aldenhoven J. T., Miller M. A., Corneli P. S., Shapiro M. D., 2010. Phylogeography of ninespine sticklebacks (*Pungitius pungitius*) in North America: glacial refugia and the origins of adaptive traits. *Mol. Ecol.* 19: 4061–4076.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, 25, 3389-3402.
- Alvarado-Serrano, D. F., D'Elía, G. 2013. A new genus for the Andean mice *Akodon latebricola* and *A. bogotensis* (Rodentia: Sigmodontinae). *Journal of Mammalogy*, 94(5):995-1015.
- Alvarez-Presas, M., Carbayo, F., Rozas, J., Riutort, M. 2011. Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Journal of Evolutionary Biology*. 24:887–896.
- Arakawa, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Sutou, S., Suzuki, H. 2002. X-chromosomal localization of mammalian Y-linked genes in two XO species of the Ryukyu spiny rat. *Cytogenet Genome Res* 99: 303 – 309.
- Atlantic Forest. *Mol. Ecol.* 15:3969-3982.
- Avise, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36, 3-15
- Baker, R., Bradley, R. 2006. Speciation in mammals and the Genetic Species Concept. *Journal of Mammalogy* 87:643–662.
- Bandelt, H.J, Forster, P., Rohl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16 (1): 37-48.

- Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S. 1994. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 7:497–501.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:113-148.
- Behling, H., Lichte, M., 1997. Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical Southeastern Brazil. *Quaternary Research* 48 (3): 348– 358.
- Bergallo, H. G., Rocha, C. F. D., Alves, M. A. S, Sluys, M. V. (orgs.). 2000. A fauna ameaçada de extinção do Estado do Rio de Janeiro. Ed. Uerj e FAPERJ, Rio de Janeiro. 166p.
- Berta, P., Hawkins, J. R., Sinclair, A. H., Taylor, A., Griffiths, B. L. , Goodfellow, P. N. e Fellous, M. 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348, 448–450.
- Bianchi, N. e Contreras, J. 1967. The chromosomes of the field mouse *Akodon azarae* (Cricetidae, Rodentia) with special reference to sex chromosome anomalies. *Cytogenetics* 6: 306–313.
- Bianchi, N., Reig, O., Molina, O., Dulout, F. 1971. Cytogenetics of South American akodont rodents (Cricetidae) I. A progress report of Argentinian and Venezuelan forms. *Evolution* 25: 724–736.
- Bianchi, N.O. 2002. *Akodon* sex reversed females: the never-ending story. *Cytogenetic Genome Research*. 96: 60–65.
- Bianchi, N.O., Bianchi, M.S., Bailliet, G., de la Chapelle, A. 1993. Characterization and sequencing of the sex determining region Y gene (Sry) in *Akodon* (Cricetidae) species with sex re-versed females. *Chromosoma* 102: 389–395.
- Bianchi, N.O., Bianchi, M.S., Pamilo, P., Vidal-Rioja, L., de la Chapelle, A. 1992. Evolution of zinc finger-X genes in Oryzomyne-Akodontine rodents (Cricetidae). *J molec Evol* 34:54–61.
- Bianchi, N.O., Dulout, F.N., Contreras, J. 1968. Sex chromosome replication and sex chromatin in *Akodon azarae* (Rodentia Cricetidae). *Theor appl Genet* 38:343–347

- Branden, C., Tooze, J. 1991. Introduction to protein structure, Garland Publishing,
- Braun, F. T., Duarte, L. D., Hartz, M. 2010. Seed Removal patterns by vertebrates in different successional stages of Araucaria forest advancing over southern Brazilian grasslands. *Community Ecology* 11:35–40.
- Braun, J., Mares, M.A., Brandis, S. C., Vandenbussche, R. 2010. New species of Akodon (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) from central Argentina. *Journal of Mammalogy*,91(2):387–400
- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., Burke, T. 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. Em: Hoelzel AR ed. *Molecular genetics analyses of populations. A practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 225-269.
- Bull, J.J., Bulmer, M.G: 1981. Evolution of XY females in mammals. *Heredity* 47: 347-360 .
- Bullejos, M., Sánchez, A., Burgos, M., Hera, C., Jiménez, R., Díaz de la Guardia, R: 1997. Multiple, polymorphic copies of SRY in both males and females of the vole *Microtus cabreræ*. *Cytogenet. Cell Genet* 79: 167–171.
- Burgos, M., Jimenez, R. e Diaz de la Guardia, R. 1988. XY females in *Microtus cabreræ* (Rodentia, Microtinae): a case of possibly Y-linked sex reversal. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 49:275-277.
- Cabanne, G.S., Santos, F.R., Miyaki, C.Y. 2007 Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendro-colaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*. 91:73–84.
- Calliari, L.E.P., Longui, C., Rocha, M.N., Faria, C.D.C., Kochi, C., Melo, M.R., Monte O. 2007. A novel mutation in DAX1 gene causing different phenotypes in three siblings with adrenal hypoplasia congenital. *Genetics and Molecular Research*. 6 (2): 277-283
- Capel, B. 2000. The battle of the sexes. *Mech Dev* 92:89–103.
- Carnaval, A.C., Moritz,C. 2008. Historical climate modelling predicts patters of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*. 35:1187–1201
- Carvalho, I., Borges, A.D.L., Bernardes, L.S.C.2003. Medicinal Chemistry and Molecular Modeling: An Integration To Teach Drug Structure–Activity Relationship

- and the Molecular Basis of Drug Action. *J. Chem. Educ.* 82(4):588-96.
- Clement, M., Posada D., Crandall K.A. 1993. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
- Consórcio Mata Atlântica. 1992. Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Plano de Ação. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Cornuet, J.M., Luikart, G., 1997 Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*.144:2001-2014.
- Crawford, P.A, Dorn, C., Sadovsky, Y., Milbrandt, J. 1998. Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol* 18: 2949 – 2956.
- De Mello, M.P., Assumpção, J.G, HACKEL, C. 2005. Genes envolvidos na determinação e diferenciação do sexo. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.49 no. 1 São Paulo
- DeLano, W.L. 2002. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA, (2002) [<http://www.pymol.org>].
- Díaz, M.M., Barquez, R.M., Braun, J.K., Mares, M.A. 1999.[A new species of *Akodon* \(Muridae: Sigmodontinae\) from northwestern Argentina](#) (subscription required). *Journal of Mammalogy* 80(3):786–798.
- Domenice, S., Correa, R.V., Costa, E.M.F., Nishi, M.Y., Vilain, E., Arnhold, I.J.P., Mendoca, B.B. 2004. Mutations in the SRY, DAX1, SF1 and WNT4 genes in Brazilian sex-reversed patients. *Braz J Med Biol Res* 37(1): 145-150.
- Eggers, S. e Sinclair, A. 2012. Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosome Res.* 20:215–238.
- Eicher, E M., Washburn, L. L., Whitney, J. B. Morrow, K. E. 1982. *Mus poschiavinus* Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science* 217, 535-537.
- Emerson, B.C., Paradis, E., Thebaud, C. 2001. Revealing demographic histories species using DNA sequence data. *Trends in Ecology & Evolution* 16:707-716.

- Espinosa, M. B. e Vitullo, A. D. 1996. Ofspring sex-ratio and reproductive performance in heterogametic females of the South American field mouse *Akodon azarae* . *Hereditas* 124 : 57-62.
- Estes-Zumpf, W.A., Zumpf, S.E., Rachlow, J.L., Adams, J.R., Waits, L.P. 2010. Genetic
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Fagundes, D.J., Taha, M.O. 2004. Modelo Animal de Doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirurgica Brasileira*. v19. n1.
- Fagundes, V., Christoff, A.U., Scalzi-Martin, J., Hozier, J., Moreira-Filho, C.A. e Yonenaga-Yassuda, Y. 2000. X;Y translocation revealed by chromosome microdissection and Fish in fertile XY females in the Brazilian rodent *Akodon montensis*. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 88:124-129.
- Fernandez, F.A.S., Barros, C.S. e Sandino, M. 2003. Razões sexuais desviadas em populações da cuíca *Micoureus demerarae* em fragmentos de Mata Atlântica. *Natureza & Conservação* 1: 21-27.
- Fisher, R. A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press. Oxford
- Ford, C.E., Jones, K.W., Polani, P.E. 1959. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner syndrome). *Lancet*, I: 711-713.
- Foster, J. W. e Graves, J. A. M. 1999. An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: Implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proceedings of the National Academy Sciences. USA* .91:1927–1931.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2010. *Introduction to Conservation Genetics*. New York. Cambridge University Press. 529p.
- Fredga, K. 1983. Aberrant sex chromosome mechanisms in mammals: evolutionary aspects. *Differentiation*. 23: 23-30.
- Freeland, J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 388p
- Freeland, J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 388p.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

- Geise, L., Smith, M. F., Patton, J.L. 2001. Diversification in the genus *Akodon* (rodentia: Sigmodontinae) in southeastern South America: Mitochondrial DNA sequence analysis. *Journal of Mammalogy* 82:92-101.
- Gibas, C., Jambeck, P. 2001. Desenvolvendo bioinformática: ferramentas de
- Glasser, N.F., Jansson, K.N., Harrison, S., Kleman, J. 2007. The glacial geomorphology and Pleistocene history of South America between 381S and 561S. *Quaternary Science Reviews* 27: 365–390.
- Grant, W.S., Bowen, B.W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Genetics*. 89:415-426.
- Graves, J.A. 2002. Evolution of the testis-determining gene—the rise and fall of SRY. *Novartis Found Symp* 244:86–97, discussion 97–101, 203–106, 253–107.
- Graves, J.M. 1995. The origin and the function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes – an evolving understanding. *BioEssays* 17: 311-20.
- Graziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigaray, S., Bonatto, S.L. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian
- Gstaiger, M., Aebersold, R. 2009. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nat Rev Genet* 10(9):617-27.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A. e Munsterberg, A. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*. 346:245-50.
- Guo, W., Burris, T.P., Zhang, Y.H., Huang, B.L., Mason, J., Copeland, K.C., Skupfer, S.R., Pagon, R.A., McCabe, E.R.B. 1996. Genomic sequence of the DAX1 gene: an orphan nuclear receptor responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2481–2486.
- Guo, W., Mason, J.S., Stone, C.G., Jr, Morgan, S.A., Madu, S.I., Baldini, A., Lindsay, E.A., Biesecker, L.G., Copeland, K.C., Horlick, M.N.B., Pettigrew, A.L., Zanaria, E., McCabe, E.R.B. 1995. Diagnosis of X-linked adrenal hypoplasia congenita by mutation analysis of the DAX1 gene. *JAMA* 274:324–330

- Habiby, R.L., Boepple, P., Nachtigall, L., Sluss, P.M., Crowley, W.F. Jr., Jameson, J.L. 1996. Adrenal hypoplasia congenita with hypogonadotropic hypogonadism: evidence that DAX-1 mutations lead to combined hypothalamic and pituitary defects in gonadotropin production. *J Clin Invest* 98:1055–1062.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165, 131-137.
- Haffer, J., Prance, G.T. 2002. Impulsos Climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria do Refúgios da diferenciação biótica. São Paulo, Estudos Avançados, 16 (46), 175-206.
- Harpending, H., Batzer, M., Gurven, M., Jorde, L., Rogers, A., Sherry, S. 1998. Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 95: 1961–1967
- Hershkovitz, P. 1998. Report on some sigmodontinae rodents collected in southeastern Brazil with descriptions of a new genus and six new species. *Bonner Zoolische Beiträge* 47:193-256.
- Hershkovitz, P. 1998. Report on some sigmodontinae rodents collected in southeastern Brazil with descriptions of a new genus and six new species. *Bonner Zoolische Beiträge* 47:193-256.
- Hillisch, A.; Pineda, L.,F.; Hilgenfeld, R. 2004. Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discovery Today*. v. 09, p. 659-669.
- Hoebbeck, J., Frank, S., Vandesompele, J. 2007. Real-Time Quantitative PCR as an Alternative to Southern Blot or Fluorescence In Situ Hybridization for Detection of Gene Copy Number Changes. *Methods in Molecular Biology*. 53:205-226.
- Hoekstra H.E. 2003. Unequal Transmission of Mitochondrial Haplotypes in Natural
- Hoekstra H.E., Hoekstra, J.M. 2001. An unusual sex-determination system in South America field mice (Genus: *Akodon*): The role of mutation, selection, and meiotic drive in maintaining XY females. *Evolution* 55: 190-197.
- Hoekstra, H.E. 2003. Unequal Transmission of Mitochondrial Haplotypes in Natural
- Hoekstra, H.E. e Edwards, S.V. 2000. Multiple origins of XY female mice (genus *Akodon*): phylogenetic and chromosomal evidence. *Proceedings of Royal Society of London*. 267: 1825-1831.

- Honda, T., Suzuki, H., Itoh, M. 1977. An unusual sex chromosome constitution found in the Amami spinous country-rat, *Tokudaia osimensis osimensis*. Jpn J Genet 52:247–249 .
- Honda, T., Suzuki, H., Itoh, M., Hayashi, K. 1978. Karyotypical differences of the Amami spinous country-rats, *Tokudaia osimensis osimensis* obtained from two neighbouring islands. Jpn J Genet 53:297–299.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. 2001. MR. BAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17: 754–755.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2004. Mapa de Biomas e de Vegetação. Disponível http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052_004_biomass.
- Jayat, J. P., Ortiz, P.E., Salazar-Bravo, J. Pardiñas, U.F.J., D’Elia, G. 2010. The *Akodon Boliviensis* species Group (Rodentia:Cricetidae: Sigmodontinae) in Argentina: species limits and distribution, with the description of a new entity. Zootaxa. 2409:1–61.
- Joly, C.A., Leitão Filho, H.F., SILVA, S.M. 1991. O patrimônio florístico - The floristic heritage. Em Mata Atlântica - atlantic rain forest (G.I. Câmara, coord.). Ed. Index Ltda. e Fundação S.O.S. Mata Atlântica, São Paulo.
- Jordão, J.C., Ramos, F.N., da Silva, V.X. 2010. Demographic parameters of *Akodon montensis* (Mammalia: Rodentia) in an Atlantic Forest remnant of Southeastern Brazil. Mammalia 74: 395–400.
- Jost, A., Vigier, B., Prepin, J., Perchellet, J.P. 1973. Studies on sex differentiation in mammals. Rec. Prag. Horm. Res. 29: 1-41.
- Just, W., Rau, W., Vogel, W., Akhverdian, M., Fredga, K. 1995. Absence of SRY in species of the vole *Ellobius*. Nat Genet 11:117–118..
- Kobayashi, T., Yamada, F., Hashimoto, T. 2007. Exceptional minute sex-specific region in the X0 mammal, Ryukyu spiny rat. Chromosome Res 15:175–187.
- Koopman, P. 1995. The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammals. Reprod. Fertil. Dev. 7: 713–22.

- Kuroiwa, A., Handa, S., Nishiyama, C. 2011. Additional copies of CBX2 in the genomes of males of mammals lacking SRY, the Amami spiny rat (*Tokudaia osimensis*) and the Tokunoshima spiny rat (*Tokudaia tokunoshimensis*). *Chromosome Res* 19:635–644.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal Applied Crystallography*, 26, 283-291.
- Leitão Filho, H.F. 1982. Aspectos taxonômicos das florestas do estado de São Paulo. *Silvicultura em São Paulo* 16A:197-206.
- Leitão Filho, H.F. 1994. Diversity of arboreal species in atlantic rain forest. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 66 (1):91-96.
- Lewis, P.O. 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology*, 50:913-925
- Lizarralde, M., Bianchi, N. e Merani, M. 1982. Cytogenetics in South American akodont rodents (Cricetidae) VII. Origin of sex chromosome polymorphism in *Akodon azarae*. *Cytologia* 47: 183–193.
- Lobato, L., Cantos, G., Araujo, B., Bianchi, N. e Merani, M. 1982. Cytogenetics of South American akodont rodents (Cricetidae) VIII. *Akodon mollis*: a species with XY female and B-chromosomes. *Genetica* 57: 199–205.
- Maatouk, D.M., DiNapoli, L., Alvers A., Taketo, M.M. e Capel, B. 2008. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum. Mol. Genet.* 17:2949-2955.
- MacLaughlin, D.T. e Donahoe, P.K. 2004. Mechanisms of disease: Sex determination and differentiation. *The New England Journal of Medicine*.350:367-78.
- Maddison, W. P., Maddison, D.R. 2009. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.72 <http://mesquiteproject.org>
- Mantovani, W. 1998. Dinâmica da Floresta Pluvial Atlântica. Em Watanabe S. coord. *Anais do IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros* 2:1-20. ACIESP, São Paulo.

- Martínez, P., González, E.G., Castilho, R., Zardoya, R. 2006. Genetic diversity and historical demography of Atlantic bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Molecular Phylogenetic and Evolution* 39:404-416.
- Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F., Sali, A. 2000. Comparative Protein Structure Modelling Genes and Genome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* 29:291-325.
- McCabe, E.R.B. 2000. Adrenal hypoplasias and aplasias. Em: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B (eds): *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. (McGraw-Hill, New York).
- McElreavey, K., Vilain, E., Cotinot, C., Payen, E., Fellous, M. 1993. Control of sex determination in animals. *Eur. J. Biochem.* 218:769-783.
- Meeks, J.J., Weiss, J. e Jameson, J.L. 2003. Dax-1 is required for testis determination. *Nature Genetetics.* 34:32-3.
- Meeks, J.J., Weiss, J., Jameson, J.L. 2003. Dax-1 is required for testis determination, *Nat. Genet.* 34: 32–33.
- Meyer, S., Weiss, G., von Haeseler, A. 1999. Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics.* 152:(3)
- Miller, K.E., Lundrigan, B.L., Tucker, P.K. 1995. Length variation of CAG repeats in Sry across populations of *Mus domesticus*. *Mamm Genome* 6: 206-08.
- Mills, L.S., Allendorf, F.W. 1996. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology* 10:1509-1518.
- molec Evol 34:54–61.
- Musser, G.G., Carleton, M.D. 2005. "Superfamily Muroidea". Em Wilson DE, Reeder DM eds *Mammal Species of the World, Third Edition*. The Johns Hopkins University Press. Pp. 894-1531.
- Myers, N., R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G.B.A., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- Nagai, K. 2001. Molecular evolution of Sry and Sox gene. *Gene.* 270: 161-169.

- Nagamine, C.M. 1994. The testis-determining gene, SRY, exists in multiple copies in Old World rodents. *Genet Res Camb* 64:151–159
- Nakae, J., Tajima, T., Kusuda, S., Kohda, N. 1996. Truncation at the C-terminus of the DAX-1 protein impairs its biological actions in patients with X-linked adrenal hypoplasia congenita. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*81: 3680-3685
- Nishida, S., Pastene, L.A., Goto, M., Koike, H. 2003. SRY gene structure and phylogeny in the cetacean species. *Mammal Study*. 28: 57–66.
- Oh, H.J., Lau, Y.F. 2006. KRAB: a partner for SRY action on chromatin. *Mol Cell Endocrinol* 247: 47-52.
- Ortiz, M., Dalmaso, G., Dezi, R., Pinna-Senn, E. e Lisanti, J.A. 1998. AC-band polymorphism of the X chromosome in *Akodon azarae* (Rodentia, Cricetidae). *Cytologia* 63: 365–369.
- Ortiz, M.A., Pina-Senn, E., Dalmaso, G. e Lisanti, J.A. 2009. Chromosomal aspects and inheritance of the XY female condition in *Akodon azarae* (Rodentia, Sigmodontinae). *Mammalian Biology*. 74: 125-129.
- Page, D. C., Mosher, R., Simpson, E. M., Fisher, E. M., Mardon, G., Pollack, J., McGillivray, B., de la Chapelle, A. e Brown, L. 1987. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell*. 51: 1091–1104.
- Palmer, M., Sinclair, A. B., P, Ellis, N., Goodfellow, P., Abbas, N. e Fellous, M. 1989. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 342: 937–939.
- Palmer, M.S., Sinclair, A. H., Berta, P., Ellis, N.A., Goodfellow, P. N., Abbas N. E., Fellous, M. 1989. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining fator. *Nature* 342, 937 – 939
- Pardiñas, U. F. J., D’Elia, G., Cirignoli, A.S., Suarez, P. 2005. A new species of *Akodon* (Rodentia, Cricetidae) from the northern campos grasslands of Argentina. *Journal of Mammalogy* 86:462–474.
- Pask, A., Toder, R., Wilcox, S.A., Camerino, G., Graves, J.A.M. 1997 The candidate sex reversing DAX-1 gene is autosomal in marsupials: implication for the evolution of sex determination in mammals. *Genomics* 41:422–426

- Phillips, N.B., Jancso-Radek, A., Ittah, V., Singh, R., Chan, G. 2006. SRY and human sex determination: the basic tail of the HMG box functions as a kinetic clamp to augment DNA bending. *J Mol Biol* 358: 172-92.
- Polani, P. E. 1981. Abnormal sex development in man. Em: Mechanisms of sex differentiation in animals and man .Austin, C. R. e Edwards, R. G., eds. Academic Press. London. pp. 465-547.
- Pontiggia, A., Rimini, R., Harley, V.R., Goodfellow, P.N., Lovell-Badge, R., Bianchi, M.E. 1994. Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *Embo J* 13: 6115-24.
- Pop, R., Conz, C., Lindenberg, K. S. 2004. Screening of the 1 Mb SOX9 5' control region by array CGH identifies a large deletion in a case of campomelic dysplasia with XY sex reversal. *J Med Genet.* 41: e47.
- Posada D, Crandall K. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Poulat, F., Barbara, P.S., Desclozeaux, M., Soullier, S., Moniot, B. 1997 The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J Biol Chem* 272: 7167-72.
- Prager, E.M., Sage, R.D., Gyllensten, U., Thomas, W.K., Hubner, R., Jones, C.S., Noble, L. 1993. Mitochondrial DNA sequence diversity and the colonization of Scandinavia by house mice from East Holstein. *Biological Journal of the Linnean Society* 50:85–122.
- Prugnolle F, de Meeûs., T. 2002 Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Heredity*, 88, 161–165.
- Rieger, T.T., Langguth, A., Weimer, T. 1995. Allozymic characterization evolutionary relationships in the Brazilian *Akodon cursor* species group (Rodentia: Cricetidae). *Biochemical Genetics.* 283-295.
- Riviéri-Dobigny, t. Herbreteau, V., Khamsavatg, K. Douangbouhpha, B., Morand, S., Michaux, J.R., Hugot, J.P. 2011. Preliminary assessment of the genetic population sutructure of the enigmatic species *Laonastes aenigmus* (Rodntia: Diatomyidae). *J Mammal.* 92:620-628

- Rogers, A.J., Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology Evolution* 9: 552–569.
- Rohl, A. 2000. Network: Phylogenetic Network Analysis, v.3.1.1.1 Fluxus Technology, Ltd: Germany.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R, 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
- Saccone, C. 1994. The evolution of mitochondrial DNA. *Current Opinion in Genetic and Development* 4, 891-895.
- Sali, A., Blundell, T.L. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*. 234, 779-815.
- Sanchez, A., Marchal, J. A., Romero-Fernández, I., Pinna-Senn, E., Ortiz, M. I., Bella, J.L. e Lisanti, J. A. 2010. No differences in the SRY gene between males and XY females in Akodon (Rodentia, Cricetidae). *Sexual Development*. 1-7.
- Sant’anna, C.M.R. 2002. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos. (Recomendações da IUPAC para 1997), *Quim. Nova*. 25(3):505-12
- Santos, A.C.S. 2002. Estudo Semi-Empírico da Interação de 20-hidroxicidisona e seus agonistas sintéticos com modelos de homologia de receptores de ecdisteroide (EcR). 2002. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Sato, Y., Shink, T., Sakamoto, K., Ewis, A.A. e Nakahori, Y. 2010. The male-determining gene SRY is a hybrid of DGCR8 and SOX3, and is regulated by the transcription factor CP2. *Mol Cell Biochem*. 337(1-2):267-75.
- Schneider, S., Excoffier, L. 1999. Estimation of demographic parameters from distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1072-1089.
- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. 2000. Arlequin ver 2.000: A Software for Population Genetic Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Schwartz, E., Fachinello, J.C, Barbieri, R.L., Da Silva, J.B. 2010. Avaliação De Populações de *Butia Capitata* De Santa Vitória Do Palmar. *Rev. Bras. Frutic.*,

Jaboticabal - SP, v. 32, n. 3, p.736-745.

Sekido R, Lovell-Badge, R: 2009. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet* 25: 19 – 29

Seminara, S.B., Achermann, J.C., Genel, M., Jameson, J.L. 1999. X-linked adrenal hypoplasia congenita: a mutation in DAX1 expands the phenotypic spectrum in males and females. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*84: 4501-4509.

seus Agonistas Sintéticos com Modelos de Homologia de Receptores de

Shahid, M., Dhillon, V.S., Jain, N. 2004. Two new novel point mutations localized upstream and downstream of the HMG box region of the SRY gene in three Indian 46, XY females with sex reversal and gonadal tumor formation. *Mol Hum Reprod* 10:521–526.

Silva, J.M.C., Bates, J.M.. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience* 52: 225-233.

Sinclair, A. H., Foster, J. W., Spender, J. A., Page, D. C., Palmer, M., Goodfellow, P. N. e Graves, J. A. M. 1988. Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature* 336,780–783.

Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N. 1990. A gene from the human sex-determining region encode a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 346(6281):240-4.

Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.

Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.

Slatkin, M., Hudson, R.R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.

Slatkin, M., Maddison, W.P.1989. A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics* 123(3):603–613.

Smith, M. F., Andj. L. Patton. 2007. Molecular phylogenetics and diversification of South American grass mice, genus *Akodon*. Pp.827–858 in *The quintessential naturalist:*

honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson (D. A. Kelt, E. P. Lessa, J. Salazar-Bravo, and J. L. Patton, eds.). University of California Publications in Zoology 134:1–981. A new genus for the Andean mice *Akodon latebricola* and *A. bogotensis* (Rodentia: Muridae). *University of California Publications in Zoology* 134:1–981.

Smith, M.F., Patton, J.L. 1993. The diversification of South American rodents: evidence from mitochondrial sequence data for the Akodontini tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50:149-177.

Soullier, S., Hanni, C., Catzeflis, F., Berta, P., Laudet, V. 1998. Male sex determination in the spiny rat *Tokudaia osimensis* (Rodentia: Muridae) is not Sry dependent. *Mamm Genome* 9: 590 – 592.

Strzezek, J., Wysocki, P., Kordan, W., Kuklinska, M. 2005. Proteomics of boar seminal plasma current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reproductive Biology*, v. 5, n. 3, p.279-290.

Südbeck, P., Schmitz, M. L., Baeuerle, P. A. e Scherer, G. 1996. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nature Genetics*. 13: 230–232.

Sutou, S., Mitsui, Y. e Tsuchiya, K. 2001. Sex determination without the Y chromosome in two Japanese rodents *Tokudaia osimensis osimensis* and *Tokudaia osimensis spp.* *Mamm. Genome* 12: 17–21.

Sutton, E., Hughes, J., White, S., Sekido, R., Tan, J., Arboleda, V., et al. 2011. Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest*. 121(1):328–341.

Suzuki, T., Mizusaki, H., Kawabe, K., Kasahara, M., Yoshioka, H., Morohashi, K. 2002. Concerted regulation of gonad differentiation by transcription factors and growth factors. *The Genetics and Biology of Sex Determination: Novartis Foundation Symposium* 244: 68-75.

Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P., Camerino, G., Lovell-Badge, R. 1998. Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391:761–767.

Swain, A., Zanaria, E., Hacker, A., Lovell-Badge, R., Camerino, G, 1996. Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nat Genet* 12:404–409 .

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596–1599
- Trivers, R.L. e Willard, D.E. 1973. Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science*. 179: 90-91
- Underwood, A.C., Turner, M.E., Ely, D.L., Milsted, A. 2009. Differential intracellular localization of Sry proteins expressed in *Rattus norvegicus*. *FASEB J* 1039.2 (2009).
- Vanzolini, P.E., Williams, E.E. 1970. South America anoles, the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysophelis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia, São Paulo*, 19, 291-298.
- Vitullo, A. D., Merani, M. S., Reig, O. A., Kajon, A. E., Scaglia, O., Espinosa, M. B. e Perrezapata, A. 1986. Cytogenetics of South American akodont rodents (Cricetidae): new karyotypes and chromosomal banding patterns of Argentinian and Uruguayan forms. *J. Mamm.* 67: 69-80.
- Vucetich, J.A. e Waite, T.A. 2000. Is one-migrant-per-generation sufficient for the genetic management of fluctuating population? *Animal Conservation* 3: 261-266.
- Wakeley, J., Hey, J. 1997. Estimating ancestral population parameters. *Genetics* 145:847–55.
- Wallace, A.C., Laskowski, R.A., Thornton, J.M. 1995. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering*, 8, 127-134.
- Wallis, M.C., Waters, P.D. e Graves, J.A.M. 2008. Sex determination in mammals—Before and after from the evolution of SRY. *Cellular and Molecular Life Science*. 65:3138-3195.
- Wang, Z.J., JeVs, B., Ito, M., Achermann, J.C., Yu, R.N., Hales, D.B., Jameson, J.L. 2001. Aromatase (Cyp19) expression is up-regulated by targeted disruption of Dax1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7988–7993.
- Waters, P.D., Wallis, M.C., Graves, J.A.M. 2007. Mammalian sex — origin and evolution of the Y chromosome and SRY. *Semin Cell Dev Biol* 18(3): 389–400.
- Watson, J.M., Spencer, J.A., Riggs, A.D., Graves, J.A. 1990. The X chromosome of monotremes shares a highly conserved region with the eutherian and marsupial X

chromosomes despite the absence of X chromosome inactivation. *Proc Ntl Acad Scie U.S.A.* 87(18):7125–7129.

Weiss, J., Meeks, J.J., Hurley, L., Raverot, G., Frassetto, A. e Jameson, J.L. 2003. Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol Cell Biol.* 23(22):8084–8091.

Werle, E., Schneider, C., Renner, M., Volker, M., Fiehn, W. 1994. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research* 22:4354-4355.

Werner, M.H., Huth, J.R., Gronenborn, A.M., Clore, G.M.1995. Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. *Cell* 81: 705-14.

Wilcove, D.S., McLellan, C.H., Dobson, A.P. 1986. Habitat fragmentation in the temperature zone . In Soulé ME (ed.) *Conservation Biology*, Sinauer, Sunderlandad, MA, pp. 237-56.

Wilson, D.E., e Reeder, D.M. (editors).2005. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Third edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. Two volumes. 2, p.142.

Xia, X., Xie, Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92:371-373.

Zanaria, E., Muscatelli ,F., Bardoni, B., Strom, T.M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A.P., McCabe, E.R.B., Meitinger, T., Monaco, A.P., Sassone-Corsi, P., Camerino, P. 1994. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenital. *Nature.* 372: 635-641.

Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T.M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A.P., McCabe, E.R.B., Meitinger, T., Monaco, A.P., Sassone-Corsi, P., Camerino, G. 1994. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372:635–641.

Zar JH. 1999. *Biostatistical analysis*. 4. ed. Prentice Hall. Upper Saddle River.

Zhao, L., Koopman, P. 2012. SRY protein function in sex determination: thinking outside the box. *Chromosome Res* 20:153–162.

Zhu, B.C., Gao, H., Wang, H., Gao, J. e Zhang, Y.2003. The origin of the genetical diversity of *Microtus mandarinus* chromosomes. *Hereditas*. 139:90–95.

VII. APÊNDICE

Apêndice 1. Lista das espécies, amostras, localidades (município, estado e coordenada geográfica) e genes empregados no estudo.

Espécie	Amostra	Localidade (Município/ Estado/Coordenda Geográfica)	Genes
<i>A. montensis</i>	cit 156	Iguape /SP/ 24°43'S; 47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 157	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cit 158	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 160	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Sry
<i>A. montensis</i>	cit 161	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cit 164	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cit 165	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Sry
<i>A. montensis</i>	cit 166	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cit 168	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 179	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cit 181	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cit 182	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 200	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cit 201	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cit 203	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Dax-1

<i>A. montensis</i>	cit 210	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 229	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 230	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 231	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cit 232	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cit 233	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cit 234	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cit 240	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop, Sry
<i>A. montensis</i>	cit 241	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 243	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 247	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 254	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 282	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 286	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 307	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cit 308	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cta 1559	Dourados/MS/ 22°13'15"S54°48'21"W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cta 1560	Dourados/MS/ 22°13'15"S54°48'21"W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cta 1561	Dourados/MS/ 22°13'15"S54°48'21"W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cta 1562	Dourados/MS/ 22°13'15"S54°48'21"W	D-loop, Sry, Dax-1

<i>A. montensis</i>	cta 1563	Dourados/MS/ 22°13'15"S54°48'21"W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	cta 1566	Dourados/MS/ 22°13'15"S54°48'21"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cta 1580	Dourados/MS/ 22°13'15"S54°48'21"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cta 1585	Dourados/MS/ 22°13'15"S54°48'21"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	cta 1589	Dourados/MS/ 22°13'15"S54°48'21"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lpc 870	Iguaçu/PR/ 25°37'40"S54°27'42"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lpc 859	Iguaçu/PR/ 25°37'40"S54°27'42"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lpc 863	Iguaçu/PR/ 25°37'40"S54°27'42"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lpc 858	Iguaçu/PR/ 25°37'40"S54°27'42"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lpc 868	Iguaçu/PR/ 25°37'40"S54°27'42"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 313	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 314	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 316	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	lga 317	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 318	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	lga 319	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 320	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 405	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 409	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 411	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	lga 412	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop

<i>A. montensis</i>	lga 414	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 415	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 418	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop, Sry, Dax-1
<i>A. montensis</i>	lga 931	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 944	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 946	Maquiné/RS/ 29°40'60S50°10'60W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 3817	Luminárias/MG/ 21°30'39"S44°54'10"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 3822	Luminárias/MG/ 21°30'39"S44°54'10"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 3824	Luminárias/MG/ 21°30'39"S44°54'10"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 3828	Luminárias/MG/ 21°30'39"S44°54'10"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 3829	Luminárias/MG/ 21°30'39"S44°54'10"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 3841	Luminárias/MG/ 21°30'39"S44°54'10"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 3843	Luminárias/MG/ 21°30'39"S44°54'10"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 3848	Luminárias/MG/ 21°30'39"S44°54'10"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 3849	Luminárias/MG/ 21°30'39"S44°54'10"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lga 3851	Luminárias/MG/ 21°30'39"S44°54'10"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	mp 304	Brumadinho/MG/ 20°7'6"S44°12'4"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	ak 1271	Belo Horizonte/MG/ 19°48'57"S43°57'15"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	ak 1442	Belo Horizonte/MG/ 19°48'57"S43°57'15"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	gd 105	Chupa Pou/CAN/24°09.456'S55°42.366'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	gd 120	Chupa Pou/CAN/24°09.456'S55°42.366'W	D-loop

<i>A. montensis</i>	gd 137	Chupa Pou/CAN/24°09.456'S55°42.366'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	gd 195	San Isidro/ITA/26°29.284'S55°53.803'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	gd 135	Chupa Pou/CAN/24°09.456'S55°42.366'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	gd 064	Chupa Pou/CAN/24°09.456'S55°42.366'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	gd 158	San Isidro/ITA/26°29.284'S55°53.803'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	gd 164	San Isidro/ITA/26°29.284'S55°53.803'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	gd 176	San Isidro/ITA/26°29.284'S55°53.803'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	gd 214	San Isidro/ITA/26°29.284'S55°53.803'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	gd217	San Isidro/ITA/26°29.284'S55°53.803'W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lbce 2005	Nova Fribrugo/RJ/22°16'55"S42°31'52"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lbce 2047	Nova Fribrugo/RJ/22°16'55"S42°31'52"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lbce 2049	Nova Fribrugo/RJ/22°16'55"S42°31'52"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lbce2053	Nova Fribrugo/RJ/22°16'55"S42°31'52"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lbce 2529	Sumidouro/RJ/22°02'59"S42°40'29"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lbce 2524	Sumidouro/RJ/22°02'59"S42°40'29"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lbce 2561	Sumidouro/RJ/22°02'59"S42°40'29"W	D-loop
<i>A. montensis</i>	lbce 2007	Nova Fribrugo/RJ/22°16'55"S42°31'52"W	D-loop
<i>A. paranaensis</i>	ak1358	Brumadinho/MG/ 20°7'6"S44°12'4"W	Sry
<i>A. paranaensis</i>	ak1360	Brumadinho/MG/ 20°7'6"S44°12'4"W	Sry, Dax-1
<i>A. paranaensis</i>	lga 659	Bodoquena /MS/ 20°35'S56°30"W	Sry
<i>A. lindberghi</i>	lga 1327	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry

<i>A. lindberghi</i>	lga 1330	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry
<i>A. lindberghi</i>	lga 1617	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry
<i>A. lindberghi</i>	lga 1621	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Dax-1
<i>A. lindberghi</i>	lga 1686	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry
<i>A. lindberghi</i>	lga 1704	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Dax-1
<i>A. lindberghi</i>	lga 1740	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Dax-1
<i>A. lindberghi</i>	lga 1748	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry
<i>A. lindberghi</i>	lga 1451	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry
<i>A. lindberghi</i>	lga 1711	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry, Dax-1
<i>A. lindberghi</i>	lga 1715	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry
<i>A. lindberghi</i>	lga 1716	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry, Dax-1
<i>A. mystax</i>	lga 1724	Dores do Rio Preto/ES/20°27'25,9"S 41°48'30,4"W	Sry
<i>A. mystax</i>	lga 1706	Dores do Rio Preto/ES/20°27'25,9"S 41°48'30,4"W	Sry
<i>A. mystax</i>	lga 1713	Dores do Rio Preto/ES/20°27'25,9"S 41°48'30,4"W	Sry
<i>A. serrensis</i>	lga1607	Dores do Rio Preto/ES/20°27'25,9"S 41°48'30,4"W	Sry
<i>A. serrensis</i>	lga1725	Dores do Rio Preto/ES/20°27'25,9"S 41°48'30,4"W	Sry
<i>A. serrensis</i>	lga 1387	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry
<i>A. serrensis</i>	mp 313	Minduri/MG/21°40'55"S44°36'14"W	Sry
<i>A. serrensis</i>	lga 1411	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry
<i>A. serrensis</i>	lga 1457	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry
<i>A. serrensis</i>	lga 1456	Dores do Rio Preto/ES/20°28'48,6"S41°49'45,8"W	Sry

<i>A. serrensis</i>	lga 1659	Dores do Rio Preto/ES/20°27'25,9"S 41°48'30,4"W	Sry
<i>A. serrensis</i>	lga 1324	Dores do Rio Preto/ES/20°27'25,9"S 41°48'30,4"W	Sry
<i>A. serrensis</i>	lga 1390	Dores do Rio Preto/ES/20°27'25,9"S 41°48'30,4"W	Sry
<i>A. serrensis</i>	lga 1392	Dores do Rio Preto/ES/20°27'25,9"S 41°48'30,4"W	Sry
<i>A. serrensis</i>	lga 1647	Dores do Rio Preto/ES/20°27'25,9"S 41°48'30,4"W	Sry
<i>A. cursor</i>	cit 159	Juquitiba/SP/23°55'55"S47°04'04W	Sry
<i>A. cursor</i>	hgdb 22	Itatiaia/RJ/22°29'29"S44°33'33W	Sry
<i>A. cursor</i>	cit 219	Iguaape /SP/ 24°43'S47°33'W	Sry
<i>A. cursor</i>	lga 3915	-	Sry
<i>A. cursor</i>	fs 1640	Guapimirim/RJ/22°32'13"S42°58'55"W	Sry
<i>A. cursor</i>	lga 1121	Governador Lindenberg/ES/19°16'S 40°28'W	Sry, Dax-1
<i>A. cursor</i>	lga 325	Cariacica/ES/ 20°16'S 40°25'W	Sry
<i>A. cursor</i>	rm 205	Una/BA/15°18'S39°04'W	Sry
<i>A. cursor</i>	lga 50	Santa Teresa/ES/ 19°57'S 40°32'W	Sry
<i>A. cursor</i>	fs 0609	Guapimirim/RJ/22°32'13"S42°58'55"W	Sry
<i>A. cursor</i>	cit 135	Picinguaba/SP/-	Sry
<i>A. cursor</i>	lga 327	Cariacica/ES/ 20°16'S 40°25'W	Sry
<i>A. cursor</i>	cit 259	Iguaape /SP/ 24°43'S47°33'W	Sry
<i>A. cursor</i>	lga 934	Castelo/ES/ 20°36'S 41°12'W	Sry
<i>A. cursor</i>	cit 930	Una/BA/15°18'S39°04'W	Sry
<i>A. cursor</i>	lga 1202	Ibitirama/ES/ 20°29'50"S 41°43'49"W	Sry

<i>A. cursor</i>	cit 288	Iguape /SP/ 24°43'S47°33'W	Sry
<i>A. cursor</i>	fs 0403	Guapimirim/RJ/22°32'13"S42°58'55"W	Sry, Dax-1
<i>A. cursor</i>	ceg 70	Pinheiral/RJ/22°30'46"S44°00'02W	Sry
<i>A. cursor</i>	cit 929	Una/BA/15°18'S39°04'W	Sry
<i>A. cursor</i>	cit 786	Una/BA/15°18'S39°04'W	Sry
<i>A. cursor</i>	cit 306	Cananéia/SP/25°00'54"S47°53'37"W	Sry
<i>A. cursor</i>	cit 931	Una/BA/15°18'S39°04'W	Sry
<i>A. cursor</i>	lga 1517	Águia Branca/ES/ 18°52'29"S 40°48'50"W	Sry
<i>A. cursor</i>	hgb 59	Resende/RJ/22°22'S44°33'W	Sry
<i>A. cursor</i>	lga 960	Domingos Martins/ES/ 20°22'S 40°40'w	Sry
<i>A. cursor</i>	aac 06	Angra dos Reis/RJ/22°53'S44°23'W	Sry
<i>A. cursor</i>	cit 134	Ubatuba/SP/23°26'02"S45°04'15"W	Sry
<i>A. cursor</i>	rm 98	Una/BA/15°18'S39°04'W	Dax-1

Apêndice 2. Alinhamento da sequência do gene Sry em oito espécies do gênero *Akodon*. Em verde região de microssatélites, em amarelo códon de inicialização, em vermelho região HMG, em azul códon de parada e em lilás possível sinal de poliadenilação

A._boL	CCTCCTGTTCCCCACATTTAGTTTCCTTCTCTCACTCCC-	TCTCTCTCTCT	-----	GGTTATAATTTATCCA
A._azaT.....			CT-----
A._dolC.....			CT-----
ak1358-Apara	----.CCCGATT.ACAT.....			CT-----
ak1360-Apara	-----C.GTT.CA.....			CTCTCTCT
lga659-Apara	-----CCGATG..G..G..A..G.....			CTCTCTCT
lga1327-Alind	-----TG.T...A.TTA.AGT.....			CTCTCTCT
lga1330-Alind	-----ATA..AGTTCA.....A.....			CTCTCTCT
lga1617-Alind	-----ATA..AGTTCA.....A.....			CTCTCTCT
lga1686-Alind	-----CAAGAATACAC.GC...CT.C.GCTCT.....	A.....		CTCTCTCT...G...G...
lga1748-Alind	-----TG.T...A.TTA.AGT.....			CTCTCTCT
lga1451-Alind	-----TACAGTT.TAC.....			CTCTCTCT
lga1711-Alind	-----T.CTGG...AC..A.....G.....			CTCTCTCT...G...
lga1715-Alind	-----GAATG..CGTGAAGT.CA.T.G.A.....A...G...C...			CCTCGCTCT...G...
lga1716-Alind	-----CCAGTT.....			CTCTCTCT...G.G...
lga1704-Alind	----T.AAA.GTT.TA.....			GCT-----
lga1607-Amyst	----.ACA.ATT..CGT.....	C.....		CT-----
lga1724-Amyst	----.CCGGAT..ACGG.C.....A.....A.....GC...G...G...			CT-----TG...
lga1706-Amyst	---.T.TACATGA...GA.....	C.....		CT-----
lga1725-Amyst	---.CCGGTT...CGG.....	C.....		CT-----T...
lga1713--Amyst	---.CA.GTTT..CGG...TC.....	C.....		CT-----TG...
lga1387-Aserr	---.TGTCCAGAATCAGA.....	C.....		CT-----
mp313-Aserr	---.T.ACCGGAT.....	C.....		CT-----
lga1411-Aserr	---.CACGTTT..CGT.....	C.....		CT-----
lga1457-Aserr	--CGTGAGAGTTT...GA...AT.....	C.....		CT-----
lga1456-Aserr	--ATG.AATGAT.T.GC...A..TA...A.....	C.....		CT-----TG...
lga1659-Aserr	---.CCCAGAT..CG.....	C.....		CT-----T...
lga1324-Aserr	--C.T.CACGAT.AC GG.....	C.....		CT-----
lga1390-Aserr	---.CCCCTTTT.C.GA.CTA.....	C.....		CT-----T...
lga1392-Aserr	---.TGTCCAGAATCAGA.....	C.....		CT-----
lga1647-Aserr	---.CC...GATCACGA.TTAG.T...A.....	C.....		CT-----
cit160	A.....C.....			CT-----G...
cit161	A.....G.....G...G.....			CT-----G...
cit165	A.....G...G...C.....			CT-----G...
cit166F	A.....G...G.....			CT-----G...
cit200F	A.....			CT-----G...
cit232F	A.....A.....			CT-----G...
cit234F	A.....			CT-----G...
cit283	T.....			CT-----G...
cit201F	T.....A..G.....			CT-----G...
cit240	.G.....			CT-----G...
cta1559	...C.....A...A.T...TT...TG...			CT-----G...T.G
cta1560	...T.....A...AA.T...GT.A.T.T-CC...			CT-----G...G...T...
cta1562	...C.....A.T.....			CT-----G...
cta1563	...C.....A.C.....			CT-----G...
cta1561	...T.....A.T...T...T.T-C.....			CT-----A.G...
lga411			CT-----G...
lga316A.....			CT-----G...
lga418A.....			CT-----G...
lga317A.....			CT-----G...
lga318A.....			CT-----G...
cit159-Acurs	----.CCACGTTT.....			CT-----G...
hgbdb22-Acurs	---.ATCC.GTT..A.....			CT-----G...
cit219-Acurs	TA...AT.C.GTATCA.....T.....			CT-----G...
lga3915-Acurs	----.C.CGTA.AA..T.CAC...C.....C.....			CT-----G...
fs1640-Acurs	----.C..GATT.A.AT.C...A.A.....			CT-----G...
lga1121-Acurs	---.A.TGA.GTTTCA.....			CT-----G...
lga325-Acurs	----.CCCGTT..AC.....			CT-----G...
rm205-Acurs	----.CCGGGTT...T.C...CTA..TCTCT.....			CT-----G...
lga50-Acurs	..AGG.ACAGTTT.....			CT-----G...
fs0609-Acurs	-----CCCGGTTTCAC.....			CT-----G...
cit135-Acurs	-----CCGT.T..AC.....			CT-----G...
lga327-Acurs	----.CCCGTTT.T.A.....			CT-----G...
cit259-Acurs	----.CCGGGTAT.CATA.GT..A.....			CT-----G...
lga934-Acurs	GGGGGCA.CAGAAGCAGA.GT..CCAG.GTATCT.....			CT-----G...
cit930-Acurs	---.GG.GGA.GATCA.....T.....			CT-----G...
lga1202-Acurs	----.CGCGATT.....			CT-----G...
cit288-Acurs	----.CCAGGAT...AG.....			CT-----G...
fs0403-Acurs	----.CCCGGTT.....			CT-----G...
ceg70-Acurs	--CAT.CCCGATT.TA.....			CT-----G...
cit929-Acurs	----.CCAGTAT.C.....			CT-----G...
cit786-Acurs	----.CCGGTTT.T.AC.....			CT-----G...
cit306-Acurs	---.T.TCCTGTTTCAC.....			CT-----G...
cit931-Acurs	----.CG.AT..A.TTA.AGT.....			CT-----G...
lga1517-Acurs	---.A.TGA.GTTTCA.....			CT-----G...
hgb59-Acurs	--GAAGTCC.GTT..AC.....T.....			CT-----G...
lga960-Acurs	----.CCC.GAAT.....			CT-----G...
aac06-Acurs	----.CACGGTTT.C.....			CT-----G...
cit134-Acurs	..C.AAAACAGAT.CA.....			CT-----G...

```

A._boL      C TATG TCAGCACATTGAATCATGACTATAATTCAGCCTTACAGCCACAGAATATCTTCGCCTCTGGAGAAAAGA
A._aza      .....T.....
A._doL      .....
ak1358-Apara .....C.....
ak1360-Apara .....C.....
lga659-Apara .....
lga1327-Alind .....
lga1330-Alind .....
lga1617-Alind .....
lga1686-Alind .....
lga1748-Alind .....
lga1451-Alind .....
lga1711-Alind .....C.T.A.....
lga1715-Alind .....
lga1716-Alind .....
lga1704-Alind .....A.....
lga1607-Amyst .....G.....
lga1724-Amyst .....G.....C.....T.....G.....C.....G.....G.....C.....
lga1706-Amyst .....G.....
lga1725-Amyst .....G.....G.....
lga1713--Amyst .....G.....C.....T.....CG.....G.....CC.....G.....G.....C.....
lga1387-Aserr .....G.....C.....C.....T.....CG.....G.....
mp313-Aserr .....
lga1411-Aserr .....G.....
lga1457-Aserr .....G.....
lga1456-Aserr .....C.....G.....C.....G.....G.....
lga1659-Aserr .....G.....G.....
lga1324-Aserr .....G.....
lga1390-Aserr .....C.....T.....A.....G.....C.....G.....
lga1392-Aserr .....G.....
lga1647-Aserr .....G.....
cit160      .....
cit161      .....
cit165      .....
cit166F     .....
cit200F     .....
cit232F     .....
cit234F     .....
cit283      .....
cit201F     .....
cit240      .....
cta1559     GA.....C.....G.A.....A.....A.G.....
cta1560     AA.....TG.....G.....C.....G.A.....A.c.....a.....c.....
cta1562     .....C.....
cta1563     .....G.....
cta1561     AA.....TG.....C.....C.....G.A.....A.....C.....T.....
lga411      .....
lga316      .....C.....
lga418      .....
lga317      .....C.....
lga318      .....C.....
cit159-Acurs .....
hgbdb22-Acurs .....T.....G
cit219-Acurs .....T.....G
lga3915-Acurs .....T.....G
fs1640-Acurs .....T.....G
lga1121-Acurs .....T.....G
lga325-Acurs .....T.....G
rm205-Acurs .....T.....G
lga50-Acurs .....T.....G
fs0609-Acurs .....T.....G
cit135-Acurs .....T.....G
lga327-Acurs .....T.....G
cit259-Acurs .....T.....G
lga934-Acurs .....T.....G
cit930-Acurs .....T.....G
lga1202-Acurs .....T.....G
cit288-Acurs .....T.....G
fs0403-Acurs .....T.....G
ceg70-Acurs .....T.....G
cit929-Acurs .....T.....G
cit786-Acurs .....T.....G
cit306-Acurs .....T.....G
cit931-Acurs .....T.....G
lga1517-Acurs .....A.....C.....G.A.....G.....G.....A.....G
hgb59-Acurs .....T.....G
lga960-Acurs .....T.....G
aac06-Acurs .....T.....G
cit134-Acurs .....T.....G

```

```

A._boL      CATGCTTTGGGACTGGCGTCAATCATATAAAGGGCATAGATGGGCACATCAAACGCCCATGAATGCATTTATGGTGT
A._aza      .....A.....C.....
A._doL      .....
ak1358-Apara .....
ak1360-Apara .....
lga659-Apara .....
lga1327-Alind .....G.....C.....
lga1330-Alind .....G.....C.....
lga1617-Alind .....G.....C.....
lga1686-Alind .....G.....C.....
lga1748-Alind .....G.....C.....
lga1451-Alind .....G.....C.....
lga1711-Alind .....G.....C.....
lga1715-Alind .....G.....C.....
lga1716-Alind .....G.....C.....
lga1704-Alind .....G.....C.....
lga1607-Amyst .....
lga1724-Amyst .....G.....G.....G.....A.....
lga1706-Amyst .....A.....T.....
lga1725-Amyst .....A.....
lga1713--Amyst .....G.....A.....
lga1387-Aserr .....G.....A.....A.....T.....G.....
mp313-Aserr .....
lga1411-Aserr .....A.....
lga1457-Aserr .....A.....
lga1456-Aserr .....G.....AT.....G.....
lga1659-Aserr .....A.....
lga1324-Aserr .....A.....
lga1390-Aserr .....A.....
lga1392-Aserr .....A.....
lga1647-Aserr .....A.....
cit160      .....C...C.....G.....
cit161      .....C...C.....G.....
cit165      .....C...C.....G.....
cit166F     .....C...C.....G.....
cit200F     .....C...C.....G.....
cit232F     .....C...C.....G.....
cit234F     .....C...C.....G.....
cit283      .....C...C.....C.....G.....
cit201F     .....C...C.....G.....
cit240      .....C...C.....G.....
cta1559     .....C.A.A.....G.....C.....
cta1560     .....C...A.....G.G.....
cta1562     .....C...C.....G.....
cta1563     .....C...C.....G.....G...A.....
cta1561     .....C.A.A.....G...G...C.....AT.....
lga411      .....C...C.....G.....
lga316      .....C...C.....G.....
hgbdb22-Acurs .....C...C.....G.....
cit219-Acurs .....C...C.....G.....
lga3915-Acurs .....C...C.....G.....
fs1640-Acurs .....C...C.....G.....
lga1121-Acurs .....C...C.....G.....
lga325-Acurs .....C...C.....G.....
rm205-Acurs .....C...C.....G.....
lga50-Acurs .....C...C.....G.....
fs0609-Acurs .....C...C.....G.....
cit135-Acurs .....C...C.....G.....
lga327-Acurs .....C...C.....G.....
cit259-Acurs .....C...C.....G.....
lga934-Acurs .....C...C.....G.....
cit930-Acurs .....C...C.....G.....
lga1202-Acurs .....C...C.....G.....
cit288-Acurs .....C...C.....G.....
fs0403-Acurs .....TC...C.....G.....
ceg70-Acurs .....C...C.....G.....
cit929-Acurs .....C...C.....G.....
cit786-Acurs .....C...C.....G.....
cit306-Acurs .....C...C.....G.....
cit931-Acurs .....C...C.....G.....
lga1517-Acurs .....GC...C...TA.....G.....
hgb59-Acurs .....C...C.....G.....
lga960-Acurs .....C...C.....G.....
aac06-Acurs .....C...C.....G.....
cit134-Acurs .....C...C.....G.....

```

```

GGTCTCGTGGTCAGAGGCCAAGTTGGCTCTGGAGAATCCCGGCATGCAAAATTCTGAGATCAGCAAGCAACTGGGAT
A._boL ..... GGC.....
A._aza ..... G.C.....
A._doL ..... G.C.....
ak1358-Apara ..... G.C.....
ak1360-Apara ..... G.C.....
lga659-Apara ..... G.C.....
lga1327-Alind ..... G.C.....
lga1330-Alind ..... G.C.....
lga1617-Alind ..... G.C.....
lga1686-Alind ..... G.C.....
lga1748-Alind ..... G.C.....
lga1451-Alind ..... G.C.....
lga1711-Alind ..... G.C.....
lga1715-Alind ..... G.C.....
lga1716-Alind ..... G.C.....
lga1704-Alind ..... G.C.....
lga1607-Amyst ..... G.C.....
lga1724-Amyst ..... G..... G.C.....
lga1706-Amyst ..... G.C.....
lga1725-Amyst ..... G.C.....
lga1713--Amyst ..... G.C..... A..... T.....
lga1387-Aserr ..... G.C..... C..... G..... A..... TC.....
mp313-Aserr ..... G.C.....
lga1411-Aserr ..... G.C.....
lga1457-Aserr ..... G.C.....
lga1456-Aserr ..... G.C..... A.....
lga1659-Aserr ..... G.C.....
lga1324-Aserr ..... G.C.....
lga1390-Aserr ..... G.C.....
lga1392-Aserr ..... G.C.....
lga1647-Aserr ..... G.C.....
cit160 ..... CG.C..... T.....
cit161 ..... CG.C..... T.....
cit165 ..... CG.C..... T.....
cit166F ..... CG.C..... A..... T.....
cit200F ..... CG.C..... T.....
cit232F ..... CG.C..... T.....
cit234F ..... CG.C..... T.....
cit283 ..... CG.C..... T.....
cit201F ..... CG.C..... T.....
cit240 ..... CG.C..... T.....
cta1559 ..... T.T..... A..... CATC..... T..... C
cta1560 ..... CG.C..... T.....
cta1562 ..... CG.C..... T.....
cta1563 ..... CG.C..... C..... C..... G..... G..... T.....
cta1561 ..... T.T..... A..... CA.C..... T..... C
lga411 ..... CG.C..... T.....
lga316 ..... CG.C..... T.....
lga418 ..... CG.C..... T.....
lga317 ..... CG.C..... T.....
lga318 ..... CG.C..... T.....
cit159-Acurs ..... CG.C..... T.....
hgdb22-Acurs ..... T..... CG.C.....
cit219-Acurs ..... T..... CG.C.....
lga3915-Acurs ..... T..... CG.C.....
fs1640-Acurs ..... T..... CG.C.....
lga1121-Acurs ..... T..... CG.C.....
lga325-Acurs ..... T..... CG.C.....
rm205-Acurs ..... T..... CG.C.....
lga50-Acurs ..... T..... CG.C.....
fs0609-Acurs ..... T..... CG.C.....
cit135-Acurs ..... T..... CG.C.....
lga327-Acurs ..... T..... CG.C.....
cit259-Acurs ..... T..... CG.C.....
lga934-Acurs ..... T..... CG.C.....
cit930-Acurs ..... T..... CG.C.....
lga1202-Acurs ..... T..... CG.C.....
cit288-Acurs ..... T..... CG.C.....
fs0403-Acurs ..... T..... CG.C.....
ceg70-Acurs ..... T..... CG.C.....
cit929-Acurs ..... T..... CG.C.....
cit786-Acurs ..... T..... CG.C.....
cit306-Acurs ..... T..... CG.C.....
cit931-Acurs ..... T..... CG.C.....
lga1517-Acurs ..... T..... CG.C.....
hgb59-Acurs ..... T..... CG.C.....
lga960-Acurs ..... T..... CG.C.....
aac06-Acurs ..... T..... CG.C.....
cit134-Acurs ..... T..... CG.C.....

```

A._boL	GCCAGTGGAA	AAGCCTTACAGAAGCTGACAAAAGGCCATTTTCGAAGAGGCACAGAGACTGAAGAATCTACACAAAG	
A._aza			
A._doL			
ak1358-Apara		A.	
ak1360-Apara		A.	
lga659-Apara		A.	
lga1327-Alind		A.	
lga1330-Alind		A.	
lga1617-Alind		A.	
lga1686-Alind		A.	
lga1748-Alind		A.	
lga1451-Alind		A.	
lga1711-Alind		A.	
lga1715-Alind		A.	
lga1716-Alind		A.	
lga1704-Alind		A.	
lga1607-Amyst	G.	A.	
lga1724-Amyst	G.	A.	G.
lga1706-Amyst	G.	A.	
lga1725-Amyst	G.	A.	
lga1713-Amyst	G.	A.	
lga1387-Aserr	G.	T. A. T. G.	
mp313-Aserr		A.	
lga1411-Aserr	G.	A.	
lga1457-Aserr	G.	A.	
lga1456-Aserr	G.	A.	
lga1659-Aserr	G.	A.	
lga1324-Aserr	G.	A.	
lga1390-Aserr	G.	A.	
lga1392-Aserr	G.	A.	
lga1647-Aserr	G.	A.	
cit160			T. G.
cit161		T. C. T.	G.
cit165		T. A.	G.
cit166F		T. C.	G.
cit200F		T.	G.
cit232F		T.	G.
cit234F		T.	G.
cit283		T.	G.
cit201F		T.	G.
cit240		T.	G.
cta1559	G.	T.	G.
cta1560		T.	G.
cta1562		T.	G.
cta1563		T.	G.
cta1561	G.	T.	G.
lga411		T. C.	G.
lga316		C. T. C.	G.
lga418		C. T. C.	G.
lga317		C. T. C.	G.
lga318		C. T. C.	G.
cit159-Acurs		T.	G.
hgdb22-Acurs		T.	G.
cit219-Acurs		T.	G.
lga3915-Acurs		T.	G.
fs1640-Acurs		T.	G.
lga1121-Acurs		T.	G.
lga325-Acurs		T.	G.
rm205-Acurs		T.	G.
lga50-Acurs		T.	G.
fs0609-Acurs		T.	G.
cit135-Acurs		T.	G.
lga327-Acurs		T.	G.
cit259-Acurs		T.	G.
lga934-Acurs		T.	G.
cit930-Acurs		T.	G.
lga1202-Acurs		T.	G.
cit288-Acurs		T.	G.
fs0403-Acurs		T.	G.
ceg70-Acurs		T.	G.
cit929-Acurs		T.	G.
cit786-Acurs		T.	G.
cit306-Acurs		T.	G.
cit931-Acurs		T.	G.
lga1517-Acurs		T.	G.
hgb59-Acurs		T.	G.
lga960-Acurs		T.	G.
aac06-Acurs		T.	G.
cit134-Acurs		T.	G.

A._boL	AGAAATATCCAAACTATAAGTATCAACCTCACCGGAGAGCTAAAGTGCCACAGAGGACTGACCCTTTGCTGCCTGCAG
A._aza	
A._doLA.....
ak1358-Apara
ak1360-Apara
lga659-Apara
lga1327-Alind
lga1330-Alind
lga1617-Alind
lga1686-Alind
lga1748-Alind
lga1451-Alind
lga1711-Alind
lga1715-Alind
lga1716-Alind
lga1704-Alind
lga1607-AmystC..G.
lga1724-AmystCG..G.
lga1706-AmystC..G.
lga1725-AmystC..G.
lga1713--AmystC..G.
lga1387-AserrT.....CG..G.
mp313-Aserr
lga1411-AserrC..G.
lga1457-AserrC..G.
lga1456-AserrCG..G.
lga1659-AserrC..G.
lga1324-AserrC..G.
lga1390-AserrC..G.
lga1392-AserrC..G.
lga1647-AserrC..G.
cit160	...G.....C.T.....C.
cit161	...G.....C.T.....C.
cit165	...G.....C.T.....C.
cit166F	...G.....C.T.....C.
cit200F	...G.....C.T.....C.
cit232F	...G.....C.T.....C.
cit234F	...G.....C.T.....C.
cit283	...G.....C.T.....C.
cit201F	...G.....C.T.....C.
cit240	...G.....C.T.....C.
cta1559	...G.....C.T.....C.
cta1560	...G.....C.T.....C.
cta1562	...G.....C.T.....C.
cta1563	...G.....C.T.....C.
cta1561	...G.....C.T.....C.
lga411	...G.....C.T.....C.
lga316	...G.....C.T.....C.
lga418	...G.....C.T.....C.
lga317	...G.....C.T.....C.
lga318	...G.....C.T.....C.
cit159-Acurs	...G.....C.T.....C.
hgbdb22-Acurs	...CG.....T.....
cit219-Acurs	...CG.....T.....
lga3915-Acurs	...CG.....T.....
fs1640-Acurs	...CG.....T.....
lga1121-Acurs	...CG.....T.....
lga325-Acurs	...CG.....T.....
rm205-Acurs	...CG.....T.....
lga50-Acurs	...CG.....T.....
fs0609-Acurs	...CG.....T.....
cit135-Acurs	...CG.....T.....
lga327-Acurs	...CG.....T.....
cit259-Acurs	...CG.....T.....
lga934-Acurs	...CG.....T.....
cit930-Acurs	...CG.....T.....
lga1202-Acurs	...CG.....T.....
cit288-Acurs	...CG.....T.....
fs0403-Acurs	...CG.....T.....
ceg70-Acurs	...CG.....T.....
cit929-Acurs	...CG.....T.....
cit786-Acurs	...CG.....T.....
cit306-Acurs	...CG.....T.....
cit931-Acurs	...CG.....T.....
lga1517-Acurs	...CG.....T.....
hgb59-Acurs	...CG.....T.....
lga960-Acurs	...CG.....T.....
aac06-Acurs	...CG.....T.....
cit134-Acurs	...CG.....T.....

```

A._boL      ATTCTCTTCAAAGGGGAAGAAACCCTGTGCACATTCTATACACAGAGGACGGGGCTAGGTCTGCCCATTTGTCGT
A._aza      .G.....
A._doL      .G.....
ak1358-Apara .G.....T.....A.....A.....
ak1360-Apara .G.....T.....A.....
lga659-Apara .G.....T.....
lga1327-Alind .G.....T.....G.....
lga1330-Alind .G.....T.....G.....
lga1617-Alind .G.....T.....G.....
lga1686-Alind .G.....T.....G.....
lga1748-Alind .G.....T.....G.....
lga1451-Alind .G.....T.....G.....
lga1711-Alind .G.....T.....G.....
lga1715-Alind .G.....T.....G.....
lga1716-Alind .G.....T.....G.....
lga1704-Alind .G.....T.....G.....
lga1607-Amyst .G.....T.....
lga1724-Amyst .G.....T.....
lga1706-Amyst .G.....T.....
lga1725-Amyst .G.....T.....
lga1713--Amyst .G.....T.....A.....
lga1387-Aserr .G.....T.....
mp313-Aserr .G.....T.....A.....
lga1411-Aserr .G.....T.....
lga1457-Aserr .G.....T.....
lga1456-Aserr .G.....T.....
lga1659-Aserr .G.....T.....
lga1324-Aserr .G.....T.....
lga1390-Aserr .G.....T.....
lga1392-Aserr .G.....T.....
lga1647-Aserr .G.....T.....
cit160      .G.....CC.....AT.....A.....
cit161      .G.....CC.....AT.....A.....
cit165      .G.....CC.....AT.....A.....
cit166F     .G.....CC.....AT.....A.....
cit200F     .G.....CC.....AT.....A.....
cit232F     .G.....CC.....AT.....A.....
cit234F     .G.....CC.....AT.....A.....
cit283      .G.....CC.....AT.....A.....
cit201F     .G.....CC.....AT.....A.....
cit240      .G.....CC.....AT.....A.....
cta1559     .G.....CC.....AT.....A.....
cta1560     .G.....CC.....AT.....A.....
cta1562     .G.....G.....CC.....AT.....A.....
cta1563     .G.....CC.....AT.....A.....
cta1561     .G.....CC.....AT.....A.....
lga411      .G.....CC.....AT.....C.A.....
lga316      .G.....CC.....AT.....C.A.....
lga418      .G.....CC.....AT.....C.A.....
lga317      .G.....CC.....AT.....C.A.....
lga318      .G.....CC.....AT.....C.A.....
cit159-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
hgbdb22-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
cit219-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
lga3915-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
fs1640-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
lga1121-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
lga325-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
rm205-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
lga50-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
fs0609-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
cit135-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
lga327-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
cit259-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
lga934-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
cit930-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
lga1202-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
cit288-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
fs0403-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
ceg70-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
cit929-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
cit786-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
cit306-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
cit931-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
lga1517-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
hgb59-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
lga960-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
aac06-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....
cit134-Acurs .G.....CC.....AT.....A.....

```

A._boL	CCAAGACCCAGCTAAGCTGTTTACAGCCTGTGGACATTCCA	ACTGAGCACTCGGTACAGCGGCAGCAGCAATAGC		
A._aza			C	A
A._doL				A
ak1358-Apara	T	G		A
ak1360-Apara	T	G		A
lga659-Apara			T	A
lga1327-Alind			T	A
lga1330-Alind			T	A
lga1617-Alind			T	A
lga1686-Alind			T	A
lga1748-Alind			T	A
lga1451-Alind			T	A
lga1711-Alind			T	A
lga1715-Alind			T	A
lga1716-Alind			T	A
lga1704-Alind			T	A
lga1607-Amyst				A
lga1724-Amyst				A
lga1706-Amyst				A
lga1725-Amyst				A
lga1713--Amyst				A
lga1387-Aserr			T	A
mp313-Aserr	T	G		A
lga1411-Aserr				A
lga1457-Aserr				A
lga1456-Aserr			T	A
lga1659-Aserr				A
lga1324-Aserr				A
lga1390-Aserr				A
lga1392-Aserr				A
lga1647-Aserr				A
cit160			CT	A
cit161			CT	A
cit165			CT	A
cit166F			CT	A
cit200F			CT	A
cit232F			CT	A
cit234F			CT	A
cit283			CT	A
cit201F			CT	A
cit240			CT	A
cta1559			CT	A
cta1560			CT	A
cta1562			CT	A
cta1563			CT	A
cta1561			CT	A
lga411			CT	A
lga316			CT	A
lga418			CT	A
lga317			CT	A
lga318			CT	A
cit159-Acurs			CT	A
hgdb22-Acurs	T			
cit219-Acurs	T			
lga3915-Acurs	T			
fs1640-Acurs	T			
lga1121-Acurs	T			
lga325-Acurs	T			
rm205-Acurs	T			
lga50-Acurs	T			
fs0609-Acurs	T			
cit135-Acurs	T			
lga327-Acurs	T			
cit259-Acurs	T			
lga934-Acurs	T			
cit930-Acurs	T			
lga1202-Acurs	T			
cit288-Acurs	T			
fs0403-Acurs	T			
ceg70-Acurs	T			
cit929-Acurs	T			
cit786-Acurs	T			
cit306-Acurs	T			
cit931-Acurs	T			
lga1517-Acurs	T			
hgb59-Acurs	T			
lga960-Acurs	T			
aac06-Acurs	T			
cit134-Acurs	T			

A._boL	AATTTAGCACCAACTGACTTCACCCAGTGAACACAGAGCATAGCAGCAGTGCCTCAGCAAACCACGGGGCAGTGCAT
A._aza	.C
A._doL	T
ak1358-Apara	T.A
ak1360-Apara	T.A
lga659-Apara	T
lga1327-Alind	T
lga1330-Alind	T
lga1617-Alind	T
lga1686-Alind	T
lga1748-Alind	T
lga1451-Alind	T
lga1711-Alind	T
lga1715-Alind	T
lga1716-Alind	T
lga1704-Alind	T
lga1607-Amyst	T.C
lga1724-Amyst	T.C
lga1706-Amyst	T.C
lga1725-Amyst	T.C
lga1713--Amyst	T
lga1387-Aserr	T.C
mp313-Aserr	T.A
lga1411-Aserr	T.C
lga1457-Aserr	T.C
lga1456-Aserr	T
lga1659-Aserr	T.C
lga1324-Aserr	T.C
lga1390-Aserr	T.C
lga1392-Aserr	T.C
lga1647-Aserr	T.C
cit160	-----
cit161	-----
cit165	-----
cit166F	-----
cit200F	-----
cit232F	-----
cit234F	-----
cit283	-----
cit201F	-----
cit240	-----
cta1559	-----
cta1560	-----
cta1562	-----
cta1563	-----
cta1561	-----
lga411	-----
lga316	-----
lga418	-----
lga317	-----
lga318	-----
cit159-Acurs	-----
hgbdb22-Acurs	-----
cit219-Acurs	-----
lga3915-Acurs	-----
fs1640-Acurs	-----
lga1121-Acurs	-----
lga325-Acurs	-----
rm205-Acurs	-----
lga50-Acurs	-----
fs0609-Acurs	-----
cit135-Acurs	-----
lga327-Acurs	-----
cit259-Acurs	-----
lga934-Acurs	-----
cit930-Acurs	-----
lga1202-Acurs	-----
cit288-Acurs	-----
fs0403-Acurs	-----
ceg70-Acurs	-----
cit929-Acurs	-----
cit786-Acurs	-----
cit306-Acurs	-----
cit931-Acurs	-----
lga1517-Acurs	-----
hgb59-Acurs	-----
lga960-Acurs	-----
aac06-Acurs	-----
cit134-Acurs	-----


```

A._boL      GTTTCATTGAATACTGAGTTTCCTCCTC(AAA|TAAA)TTCTATTGAGTTCAAAAATGAGG
A._aza      -----T-----C-----
A._dol      -----T-----C-----
ak1358-Apara -----T-----
ak1360-Apara -----T-----
lga659-Apara -----C-----T-----
lga1327-Alind -----C-----T-----
lga1330-Alind -----C-----T-----
lga1617-Alind -----C-----T-----
lga1686-Alind -----C-----T-----
lga1748-Alind -----C-----T-----
lga1451-Alind -----C-----T-----
lga1711-Alind -----C-----T-----
lga1715-Alind -----C-----T-----
lga1716-Alind -----T-----
lga1704-Alind -----C-----T-----
lga1607-Amyst -----C-----T-----A-----
lga1724-Amyst -----C-----T-----G-----A-----
lga1706-Amyst -----C-----T-----A-----
lga1725-Amyst -----C-----T-----A-----A-----
lga1713-Amyst -----C-----T-----T-----A-----T-----
lga1387-Aserr -----C-----T-----C-----GA-----
mp313-Aserr -----T-----
lga1411-Aserr -----T-----A-----
lga1457-Aserr -----C-----T-----A-----
lga1456-Aserr -----C-----T-----A-----G-----C-----A-----T-----A-----
lga1659-Aserr -----C-----T-----A-----
lga1324-Aserr -----T-----C-----C-----A-----A-----GA-----
lga1390-Aserr -----C-----T-----C-----A-----
lga1392-Aserr -----C-----T-----A-----
lga1647-Aserr -----C-----T-----A-----
cit160      -----T-----T-----T-----A-----
cit161      -----T-----T-----T-----CT-----
cit165      -----T-----T-----T-----G-----TT-----
cit166F     -----T-----T-----T-----CT-----
cit200F     -----T-----T-----T-----TT-----
cit232F     -----G-----T-----T-----A-----C-----
cit234F     -----C-----A-----T-----T-----A-----G-----
cit283      -----T-----T-----T-----G-----
cit201F     -----T-----T-----T-----A-----G-----
cit240      -----G-----A-----T-----T-----A-----G-----
cta1559     -----T-----T-----A-----
cta1560     -----T-----T-----A-----
cta1562     -----T-----T-----T-----
cta1563     -----T-----T-----T-----
cta1561     -----A-----G-----T-----T-----
lga411      -----C-----T-----T-----T-----G-----
lga316      -----C-----T-----T-----T-----G-----
lga418      -----C-----T-----T-----T-----G-----
lga317      -----C-----T-----T-----T-----G-----
lga318      -----C-----T-----T-----T-----G-----
cit159-Acurs -----T-----T-----T-----
hgbdb22-Acurs -----T-----
cit219-Acurs -----T-----
lga3915-Acurs -----T-----
fs1640-Acurs -----T-----
lga1121-Acurs -----T-----
lga325-Acurs -----T-----
rm205-Acurs -----T-----
lga50-Acurs -----T-----
fs0609-Acurs -----T-----
cit135-Acurs -----T-----
lga327-Acurs -----T-----
cit259-Acurs -----T-----
lga934-Acurs -----T-----
cit930-Acurs -----T-----
lga1202-Acurs -----T-----
cit288-Acurs -----T-----
fs0403-Acurs -----T-----
ceg70-Acurs -----T-----
cit929-Acurs -----T-----
cit786-Acurs -----T-----
cit306-Acurs -----T-----
cit931-Acurs -----T-----
lga1517-Acurs -----T-----
hgb59-Acurs -----T-----
lga960-Acurs -----T-----
aac06-Acurs -----T-----
cit134-Acurs -----T-----

```

Apêndice 3. Alinhamento da sequência do exon 2 do gene Dax-1 em quatro espécies do gênero *Akodon*. Em verde inserção de guanina exclusiva para *A. montensis*. Em amarelo compartilhamento de timina entre *A. montensis*, *A. cursor*, *A. paranaenses* e *A. lindberghi*. Em vermelho bases nitrogenadas exclusivas de *A. paranaenses* e *A. lindberghi*. Azul bases nitrogenadas exclusivos de *A. cursor*. Em laranja haplótipo DX9 compartilhado entre fêmea XY (cit 166) e fêmea. Em rosa haplótipo DX17 compartilhado entre fêmea e macho.

CIT157	TGC CTG CAG TGG	GCG GAA ATA CAT CCA GAG CCT TCA ATG GAG AAC CCA CCG ATT CCT CAC TGA TTA CAT CAG GAT GAT
CIT231	...	CGCTA GA. ... G.
CIT179	...	CGC ... A.A GA. ... G.
CIT203	...	CGC ... A.A GA. ... G.
CIT200	...	CGC T. ... A.A GA. ... G.
CIT233	...	CGC T. ... A.A GA. ... G.
CIT232	...	CGC T. ... A.A GA. ... G.
CIT166	...	CGC T. ... A.A GA. ... G.
CIT234	...	CGC T. ... A.A GA. ... G.
CIT181	...	CGT ... A.A GA. ... G.
CIT161T ... A.A GA. ... G.
CIT201GT ... A.A GA. ... G.
CIT164	... A.. .CT .C	-GC ... A.A GA. ... G.
CTA1559	...	CGC T. ... C T.TTA G. ... G.
CTA1560	...	CGC T. ... C T.TTA G. ... G.
CTA1561	...	CGC T. ... A.A GA. ... G.
CTA1562	...	CGC T. ... A.A GA. ... G.
CTA1563	...	CGC T. ... A.A GA. ... G.
LGA316	...	CGC T. ... A.A GA. ... G.
LGA317	...	CGT ... A.A GA. ... G.
LGA318	...	CGC T. ... A.A GA. ... G.
LGA418	...	CGC T. ... A.A GA. ... G.
LGA411	...	CGC T. ... A.A GA. ... G.
FS0403-Acur	...	CGTG. ... A.A GA. ... G.
LGA1121-Acur	...	CGT ... A.A GA. ... G.
LGA1621-Alind	...	CGT ... A.A GA. ... GC.
AK1360-Apara	...	CGT ... A.A GA. ... GC.
LGA1740-Apara	...	CGT ... A.A GA. ... GC.
LGA1716-Alind	...	CGT ... A.A GA. ... GC.
LGA1704-Alind	...	CGT ... A.A GA. ... GC.
LGA1711-Alind	...	CGT ... A.A GA. ... GC.
RM98-Acur	...	CGT ... A.A GA. ... G.

CIT157	GGC	AAT	GCA	AAA	ACC	CCT	CTG	CCC	C-T	TAC	TGG	GTT	GAA	-
CIT231	T--	---	---	---	---	---	-
CIT179	T..	.-.T.-	-
CIT203	---	---	---	---	---	-
CIT200	---	---	---	---	---	-
CIT233	AA.	A--	-
CIT232	---	---	---	---	---	-
CIT166T.	.A.	A--	...	-
CIT234	AT.	AC.-	...	-
CIT181C.	A..-	-
CIT161T.	.A--	...	-
CIT201	---	---	---	---	---	-
CIT164	---	---	---	---	---	-
CTA1559A.	A--	...	-
CTA1560A.	A--	...	-
CTA1561	---	---	---	---	---	-
CTA1562T.	.A.	A--	...	-
CTA1563T.	.A.	A--	...	-
LGA316	T..	.T.	A-	.T.-	-
LGA317C.	A..-	-
LGA318	AA.	A--	-
LGA418	AA.	A--	-
LGA411	---	---	---	---	---	-
FS0403-Acur	A..T.	.A.	ACK	G.T	TGA	---	-
LGA1121-AcurT.	.A.	ACG	G.T	TCA	AGC	-
LGA1621-AlindT.	.A.	ACK	G.T	TGA	---	-
AK1360-AparaT.	.A.	ACK	G.T	TGA	---	-
LGA1740-AparaT.	.A.	ACT	G.T	TGA	---	-
LGA1716-Alind	T..T.	.C.	ACT	G.T	TG-	---	-
LGA1704-AlindT.	-A.	ACT	G.T	TGA	---	-
LGA1711-AlindT.	.A.	ACT	G.T	TGA	---	-
RM98-AcurT.	.A.	ACT	G.T	TCA	A.C	G

Apêndice 4. Lista das espécies empregadas para o mapeamento filogenético, bem como o número seu número de acesso no GenBank

Espécie	Numero De Acesso
<i>Akodon. cursor</i>	Presente Estudo
<i>Akodon. montensis</i>	Presente Estudo
<i>Akodon. mystax</i>	Presente Estudo
<i>Akodon. lindberghi</i>	Presente Estudo
<i>Akodon. paranaensis</i>	Presente Estudo
<i>Akodon. boliviensis</i>	GU189321.1
<i>Akodon. azare</i>	EF622507.1
<i>Akodon. kofordi</i>	KC841365.1
<i>Akodon mollis</i>	U03546.2
<i>Akodon lutescens</i>	KC841353.1
<i>Akodon subfuscus</i>	KC841377.1
<i>Akodon torques</i>	KC841349.1
<i>Akodon varius</i>	EU260478.1
<i>Akodon toba</i>	U03527.2
<i>Akodon dolores</i>	EU260476.1
<i>Akodon fumeus</i>	KC841360.1
<i>Akodon aerosus</i>	KC841346.1
<i>Akodon molinae</i>	AY494839.1
<i>Akodon orophilus</i>	KC841335.1
<i>Akodon mimus</i>	M35710.2
<i>Akodon juninensis</i>	M35698.2
<i>Akodon iniscatus</i>	KC841337.1
<i>Akodon siberiae</i>	AY273909.1
<i>Akodon philipmyersi</i>	AY702967.1
<i>Akodon reigi</i>	AY195865.1
<i>Akodon spagazzinii</i>	HQ236017.1
<i>Akodon dayi</i>	EU260477.1
<i>Akodon albiventer</i>	AY341042.1

<i>Akodon affinis</i>	AY196164.1
<i>Akodon budini</i>	AY605060.1
<i>Akodon viridescens</i>	GU595287.1
<i>Necomys lasiurus</i>	EF531688.1
<i>Necomys obscurus</i>	EF531685.1