

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Aspectos genéticos de duas espécies de mamíferos marinhos da costa do Brasil: *Pontoporia blainvillei* e *Eubalaena australis*.

Larissa Schemes Heinzemann
Orientador: Dr. José Artur Bogo Chies

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.



Dedico este trabalho a todos nós, que passamos por isso pelo menos uma vez na vida.

Agradecimentos

Cheguei!!! Finalmente me vejo diante desta folha em branco com três itens fundamentais para o encerramento de um trabalho desse porte: um coração cheio de gratidão por um sem número de verdadeiros amigos, uma hora totalmente inapropriada para o mínimo senso de formalidade e uma música absolutamente estimulante para a expressão, sem retidão, de sentimentos plenos de felicidade. Cafona nada, só um pouco *over*.

Este trabalho começou de uma forma bem diferente da que terminou, com todos os problemas intrínsecos ao processo científico/criativo de um doutorado, o que permitiu que eu viesse a estabelecer colaborações e relações de trabalho com pessoas incríveis.

Uma destas pessoas é o Zeca, ou Profr. Dr. José Artur Bogo Chies para os mais íntimos. Graças à generosidade do Zeca este trabalho pode ser finalizado. Ele abriu as portas do seu laboratório para eu que pudesse enlouquecer um pouco o seu grupo de trabalho com as minhas amostras de “peixe”, como diz a professora Nance. Não foi fácil para eles, com certeza. O Zeca tem uma das características que eu considero mais importantes em uma relação orientador/aluno: senso de humanidade. Sem este sentimento é impossível compreender os altos e baixos da rotina de bancada e manter seus pupilos firmes em seus propósitos. Zeca, tu bem sabes o quanto tenho a te agradecer, mas nunca é demais tornar público esse tipo de dívida, então, muito obrigada!

Brincadeiras à parte, a querida Profa. Nance Nardi, com seu olho clínico capaz de descobrir s-e-e-e-e-mpre quando a gente esquece algum controle do experimento é um exemplo para mim (e para todo mundo que já passou pelo seu laboratório). Muito obrigada Nance por me permitir entrar na sala da cultura (sempre de guarda-pó) com um material tão incomum ao grupo de pesquisa e por me “emprestar” teus melhores alunos para me ensinar a cultivar células.

A Profa. Marion Schiengold, pela recepção mais calorosa que eu recebi na vida por um primeiro dia de trabalho da fase vale a pena ver de novo. Adorei!

Ainda no grupo das pessoas incríveis: o laboratório de imunogenética é o sonho de qualquer estudante. Não tanto pela infra-estrutura que ele tem a oferecer, que está cada vez melhor (que vontade que eu tenho de usar o *nanodrop*), mas pelas pessoas que formam os grupos de pesquisa dentro deste local. É uma lista enorme de pessoas, e por certamente esquecer alguém, peço desculpas antecipadamente. Mas não posso deixar de citar o humor sensível, nada delicado e insubstituível da Paula Rohr, o vocabulário regionalista da Priscila Vianna, a

viagem ao Líbano da Andréia Vargas, o esmalte para lâminas do Tiago Dalberto, os momentos Jennifer Lopez da Melissa Camassola, o dono dos computadores Gustavo Fioravante (brincadeira!!!), o glamour ofuscante do Daniel Oberdoerffer, o amor por árvores do Daniel Garcia, a amabilidade sem precedentes do Bruno Paiva, a porção internacional muitíssimo bem representada pelos importados de qualidade Elvira Cordeiro e Andrés Delgado, a serenidade no meio do “caos” da Márcia Trein (leia-se “sala de cultura”), a arte gastronômica da Patrícia Sesterhein (ninguém diz né?!, ela só come quando dá tempo, ou seja, nunca, e sendo a garota-glamour do lab é quase impossível imaginá-la numa cozinha!!!), o visual moderníssimo da Isabel Giehl (e sua energia contagiante para todas as novidades do mundo. Obrigada Bel por me levar para a aula gratuita de maracatu!), a risada retumbante da Luiza Macedo Braga.

Foi nessa profusão de estilos e personalidades que pude reencontrar meu irmão gêmeo, que havia sido separado de mim no nosso nascimento, o Pedro Chagastelles. Nós temos muita coisa em comum, demonstrando na prática que a genética é realmente forte, a despeito da influência do ambiente sobre nossas personalidades. Mano, sigo em busca da nossa mãe biológica (certamente uma milionária) e enquanto isso não acontece vamos recuperando o tempo perdido. Muito obrigada por tudo, passei a gostar de andar de T8 depois que te encontrei! E obrigada pelo Ricardo Hegenbart (que poder!), um dos melhores presentes que a nossa amizade me reservou.

A dona Dilma, que é a pessoa que acorda mais cedo que eu conheço, teve um papel fundamental para este doutorado, retirando as milhares de placas da estufa toda manhã, bem cedinho. Muito obrigada dona Dilma, a sua ajuda foi enorme e decisiva para a finalização deste trabalho.

Como se não bastasse eu me espalhar pelo laboratório de Imunogenética, naturalmente comecei a migrar para o nosso laboratório co-irmão, o Laboratório de Drosófila. Fiz de tudo um pouco lá: comecei com o *Southern blot* divinamente ensinado pelo Fabiano (Mini-homem) Torres, que é lindo, portátil e um dos meus melhores amigos. Um profissional como poucos e com o maior coração do mundo. Depois me meti em todos os experimentos dos outros, repiquei moscas, usei à exaustão a centrífuga “só para dar um *spin*”, e fiz amigos. Adriana Sassi, Juliana Cordeiro, Maríndia Dupré, Marícia Fantinel, Ronaldo Golombieski, Hermes Schmitz, Lizandra Robe (que me ensinou tudo sobre análise de seqüências), Ana Garcia. Profa. Vera Gaiesky, o seu grupo é maravilhoso, obrigada por abrir as portas do seu laboratório sempre que precisei.

Tudo isso foi possível porque algumas pessoas um dia resolveram estudar mamíferos marinhos. Este grupo seleto de pesquisadores não se incomodou com o fato de que Porto Alegre não tem mar, e já são 17 anos de idas e vindas do litoral, coletando, catalogando, se metendo em todas as furadas imagináveis que um trabalho a campo pode proporcionar, e mesmo assim, produzindo cientificamente com extrema qualidade. O Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul me permitiu usar boa parte das amostras deles, mas a melhor parte disso foram os amigos que fiz neste grupo: Paulo Ott, Ignacio Moreno, Márcio Borges Martins, Daniel Danilewicz, Maurício Tavares, Sue Nakashima, Rodrigo Machado, Cariane Campos Trigo, Larissa Oliveira.

Ainda na fase anterior à chegada ao laboratório de Imunogenética, vivi momentos maravilhosos ao lado de dois grandes amigos: Alessandra Morassutti (a filha mais querida do Mora) e Gustavo Chemale. Sei que não é só o nosso talento musical que vai nos manter juntos para o resto das nossas vidas (*overnight*, minhas bactérias crescem *overnight*, e a famosa Dança do eppendorff)....

Já na fase em que tentei ser citogeneticista fui surpreendida pela doçura e vigor da Jaqueline Andrades-Miranda. Nunca trabalhei tanto, nunca usei tanto os meus olhos e o regime semi-aberto não teria sido tão bom sem a sua mão firme e segura!!! Jaque, muito obrigada por me ensinar tudo o que eu sei sobre cariótipos e por fazê-lo de maneira irrepreensível.

Quero agradecer especialmente ao Elmo Cardoso e à Ellen Mezzeck por manterem tudo funcionando, a qualquer hora. À Profa. Tatiana Chies que me presenteou com uma discussão rápida, mas eficaz sobre filogenia, pelo empenho em ajudar e pela disponibilidade. E por me apresentar ao aluno dela, o Gustavo que se desdobrou para me ensinar a usar o PAUP (bem que ele tentou)!!!

Dois grandes amigos, dois grandes parceiros de PCN (Projeto Calada da Noite): Michelle Gallas-Rangel e Artur Rangel. Este pequeno grupo de pesquisadores patrocinou 90% dos sequenciamentos desta tese. Sem essa ajuda *24/7, no way thesis!* Sem o glamour da Michelle, *no way Bronx-Manhattan!* Sem o talento do Artur, *no way Eppendorfs' dance remix!*

A minha família esteve presente de uma maneira muito particular durante todo esse processo de formação acadêmica pelo qual passei: sentindo um orgulho injustificado. Cada vez que pensava em sair para comprar cigarros e não voltar mais, lembrava da fé inabalável da

minha família nas minhas conquistas. Obrigada aos queridos Schemes-Heinzelmanns: Cassandra, Alessandra, Felipe, Giulia e Victória por absolutamente tudo.

E se o final é reservado para o que há de melhor, esse lugar é de direito do Daniel Danilewicz. Se aprendi a viver plenamente, aproveitar cada segundo e a ser uma pessoa melhor foi porque o Dani me privilegiou com o seu amor. Sem palavras no momento, um coração cheio.

Cheers!!!

Apresentação

Para facilitar a leitura deste trabalho, esta tese está organizada em três capítulos. Uma introdução geral sobre os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), as espécies estudadas e os objetivos do trabalho antecedem o primeiro capítulo da tese onde são apresentados a metodologia utilizada, resultados e discussão, que serão formatados para submissão no periódico *Immunogenetics*. Estes resultados referem-se à análise de variabilidade em sistemas genéticos considerados importantes para a manutenção de espécies (ameaçadas ou não). Analisamos a variação de um gene de MHC em duas espécies de cetáceos que ocorrem na costa brasileira e que se encontram ameaçados em diferentes níveis. A determinação desta variação e caracterização das seqüências gênicas, sua comparação com seqüências descritas para outras espécies e sua assinatura de funcionalidade através da comparação com seqüências funcionais são extremamente importantes para o entendimento, mesmo que inicial, do status imunológico destas espécies. A observação de expressão desses genes através da análise dos seus transcritos é uma ferramenta consideravelmente mais robusta em se tratando de aspectos funcionais. No capítulo II desta tese são apresentados os resultados provenientes de dois eventos raros de obtenção de amostras viáveis para a extração de RNA das duas espécies, que permitiram a observação da expressão do gene DQB (MHC classe II) (manuscrito aceito para publicação no periódico *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom- JMBA*). No capítulo III é descrito pela primeira vez o cariótipo de toninha, *Pontoporia blainvillei*, o que só foi possível através da utilização de uma técnica de cultivo celular a partir da córnea de exemplares recém-mortos, outro evento raro considerando-se os registros de encalhes para o litoral do Rio Grande do Sul (manuscrito aceito para publicação no periódico *Journal of Heredity*). A formatação dos capítulos II e III obedece às normas dos periódicos nos quais foram submetidos.

Resumo

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) é um sistema genético reconhecidamente polimórfico em populações humanas. Em porções específicas dos genes que compõem o MHC de populações humanas também foi evidenciada a ação da seleção natural em nível molecular. Em várias espécies de vertebrados onde estes genes foram estudados diferentes níveis de variação, composição gênica e organização foram detectados, mantendo, entretanto, as características que os tornam tão interessante de ser estudados. Para mamíferos marinhos, as questões sobre a variação no MHC servem de pano de fundo para o entendimento sobre o sistema imunológico destas espécies e suas particularidades em relação ao ambiente marinho e a evolução destes genes em organismos não-modelos. No presente trabalho, duas espécies de cetáceos, a toninha ou franciscana (*Pontoporia blainvillei*) e a baleia-franca-austral (*Eubalaena australis*), foram investigadas quanto aos níveis de variação no gene DQB1 do MHC. O segundo exon da cadeia beta do gene DQ foi amplificado em 25 amostras de toninha e 18 amostras de baleia franca. Os fragmentos de 212pb (pares de base) resultantes do processo de amplificação foram clonados e, tiveram analisados por seqüenciamento 171pb correspondentes ao sítio de ligação ao peptídeo antigênico (PBR). Uma amostra de toninha e um par mãe-filhote de baleia-franca-austral foram analisadas quanto à expressão do gene DQB a partir de amostras de pele. A evidência de seleção natural a nível molecular nesta porção do gene é confirmada por um excesso de substituições não sinônimas em relação às substituições sinônimas (em um contexto de neutralidade as substituições sinônimas acumulam-se na mesma taxa de mutações) através da razão d_N (não sinônimas) e d_S (sinônimas). Para confirmar os desvios da neutralidade ($H_0 = d_N/d_S = 1$), foi usada a estatística z . Os valores de d_N/d_S para toninha e baleia-franca-austral foram, respectivamente, $d_N/d_S = 2,32$ ($p=0,014$) e $d_N/d_S = 3,75$ ($p=0,001$). Estes valores, as características das seqüências e a evidência de expressão desses genes na pele de cetáceos estão de acordo com os pressupostos de seleção positiva para esta região do gene e sugerem funcionalidade para estes genes nestas duas espécies. Há evidências de mais de uma cópia do gene para baleia-franca-austral. Foram descritos 6 alelos para toninha e 17 alelos para baleia-franca-austral sendo que um dos alelos é compartilhado entre as duas espécies, sugerindo que essa linhagem alélica é anterior à divergência entre odontocetos e misticetos. Paralelamente a este trabalho, o cariótipo de toninha foi descrito através de um processo de cultivo celular a partir da córnea de dois exemplares recém-mortos. Seu número cromossômico $2n=44$ corrobora a estabilidade cariotípica descrita para cetáceos.

Abstract

The Major Histocompatibility Complex is a highly polymorphic genetic system described to human populations. It is clear that a particular region from these genes is under natural selection which results in different patterns of variation from those expected under neutrality. In other vertebrates these genes were studied, these special characteristics seems to be preserved despite specific genomic organization and variation levels. In marine mammals, questions addressed to MHC molecular variation are focused in questions concerned on environmental restrictions and molecular evolution in non-model organisms. In the present study, two marine mammal species were surveyed concerning genetic variability using the gene DQB exon 2. Samples from 25 franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) and 18 southern right whales (*Eubalaena australis*) were used to amplify a 212bp (base pair) fragment from DQB exon 2. The 171bp resulting fragment was sequenced and analyzed in relation to the molecular level evidence of selection. Rates of nonsynonymous (d_N) and synonymous (d_S) base pair substitution and departures from neutrality for d_N/d_S (z statistics) were calculated. For both species examined, molecular evidence of selection was confirmed. The d_N/d_S ratios to franciscana and southern right whale were 2.32 ($p=0.014$) and 3.75 ($p=0.001$), respectively. These values, combined to data on DQB gene expression in franciscana and southern right whale skin and less restrictive aminoacid usage in both species, suggest a functional signature to sequences cetacean derived. Additionally, 6 alleles were described to franciscana dolphins and 17 to southern right whales. One more evidence of selection acting in this particular genomic region is provided from the fact that both species share one allele, suggesting that this allelic lineage was present before the splitting between mysticeti and odontoceti. To provide additional information on franciscana dolphins the karyotype of *P. blainvillei* is presented. The karyotype was obtained from corneal culture of two dead animals. The diploid number 44 confirms the clear prevalence of this pattern among cetaceans.

Sumário

Agradecimentos.....	ii
Apresentação.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Sumário.....	x
1. Introdução Geral.....	1
1.1 O Complexo Principal de Histocompatibilidade, MHC.....	1
1.2 Cariótipo.....	10
1.3 Breve histórico e descrição das espécies.....	11
1.3.1 A toninha.....	11
1.3.2 A baleia-franca-austral.....	15
1.4 Objetivos.....	19
2. Capítulo I.....	20
2.1 Material e Métodos.....	21
2.1.1 Coleta de Material.....	21
2.1.2 Análises Moleculares.....	22
2.1.3 Análises Filogenéticas.....	26
2.2 Resultados e Discussão.....	29
2.2.1 Análises Moleculares.....	29
2.2.2 Análises Filogenéticas.....	36
3. Capítulo II.....	45
4. Capítulo III.....	59
5. Referências Bibliográficas.....	72
6. Considerações finais.....	82

1. Introdução Geral

1.1 O complexo principal de histocompatibilidade, MHC.

Peter Alfred Gorer (1907-1961) patologista, imunologista e geneticista inglês, têm seu nome frequentemente ligado a um dos sistemas genéticos mais complexos e intrigantes do genoma de vertebrados. Um sistema que, à princípio, foi investigado e identificado não tanto pela função biológica exercida pelos seus componentes na regulação do sistema imunológico (estes, uma rede intrincada de genes que aos poucos foram sendo revelados paralelamente ao desenvolvimento de novas tecnologias), mas por problemas relacionados aos métodos de transplantes de tecidos, prática que começava a tornar-se comum no início do século 20. Este pesquisador é apontado como o precursor dos debates sobre funcionalidade dos genes envolvidos em resposta imunológica, especialmente os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade, o MHC (Amos, 1986).

A importância da pesquisa de Gorer para o entendimento dos processos imunológicos, por vezes é sobrepujada pelo cerne de seu trabalho, que centrou-se nos processos envolvendo transplante tecidual e rejeição. De fato, ao descrever o colega inglês no *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society*, em 1961, P. B. Medawar foi enfático: “*His position in science is not difficult to define: he was the world’s foremost authority on serology and serological genetics of tissue transplantation*”. (Medawar, 1961). A descoberta em 1936 de um “sistema envolvido no controle de rejeição tecidual”, o complexo H-2 de camundongos, não pôde descortinar, na época, a complexidade e fascínio intrínsecos a este complexo de genes que vem sendo desde então, sem dúvida, a região mais intensamente estudada no genoma de vertebrados.

Em 1972, concordava-se que esta era uma região bastante estudada e o significado evolutivo deste sistema (H-2 em camundongos e HLA em humanos) já despertava um intenso e interessantíssimo debate que perdura até os dias atuais: a ação da seleção natural favorável à variação nos genes que compõem esta região, e que estão diretamente ligados à resposta imunológica. Os altos níveis de polimorfismos já eram aceitos na época, mesmo com apenas dois grupos de antígenos reconhecidos para humanos (LA e 4) compreendendo poucos genes (Bodmer, 1972).

Em 1999, foi possível descrever pela primeira vez o grau de complexidade desta região no genoma de humanos (MHC Sequencing Consortium, 1999). O consórcio de pesquisa que culminou com a publicação do mapa da região de genes de MHC mais completo até então, usou seqüências derivadas de um grupo de indivíduos que não tinham sido caracterizados quanto aos seus genes HLA. Este mapa compreende uma região do braço curto do cromossomo 6 de

humanos de 3,6 megabases (Mb) de DNA, com 224 locos distribuídos em cerca de 2,5 unidades de mapa. Dentre estes 224 genes descritos, a predição de expressão é de 57% (128 genes expressos). Embora a organização e conteúdo desta região de MHC sejam comumente aceitos, também é senso comum que este mapa é considerado um mosaico (Horton et al., 2004).

O mapa mais completo da região de MHC de humanos é descrito em Horton et al., (2004). Os autores apresentam uma compilação de todos os genes e anotações de genes descritos por seqüenciamento, com função conhecida ou predita por comparação, com uma detalhada descrição de genes clássicos e não-clássicos de MHC, suas relações de paralogia dentro do genoma, genes ortólogos e discussões sobre origem e duplicação destes genes. A região estendida de MHC ou *xMHC* (*extended MHC*) comporta um grande número de genes (421 locos, dentre os quais 252 genes preditos expressos, 139 pseudogenes) organizados de forma contígua em uma região de 7,6 Mb no braço curto do cromossomo 6 de humanos, com orientação telômero → centrômero. (Figura 1). A região dos genes de MHC de classe III é a mais densa da região de MHC e do genoma humano (58 genes expressos, correspondendo a 23% dos genes totais). Os genes clássicos de MHC (classe I e II) estão distribuídos em forma de grupos (*clusters*), sugerindo uma vantagem funcional (co-expressão de genes fisicamente ligados como HLA-DQA1 e HLA-DQB1 em quantidades apropriadas para montagem da molécula de MHC de classe II). Credita-se ao processo de duplicação a origem deste excessivo número de genes parálogos nesta região e no restante do genoma (Rached et al., 1999; Yeager & Huges, 1999; Kumánovics et al., 2003; Horton et al., 2004).

A duplicação gênica e períodos de contração e expansão entre os genes de MHC clássicos são processos apontados para explicar o grande número de genes parálogos nesta região, provavelmente como uma resposta à demanda de variação patogênica (Horton et al., 2004). O modelo mais aceito para explicar a origem destes genes é o de ciclos de contração/expansão, chamado "*birth-and-death*": um único gene ancestral sofre vários eventos de duplicação gerando novas cópias (*birth*), que ao sofrer mutações podem ser deletadas (*death*) ou assumir diferentes estados de funcionalidade, como esperado para genes parálogos. Estes estados são classificados como estado não-funcional (pseudogenes), estado de uma nova função (adquirem novas funções) ou um estado de sub-função, onde os genes duplicados com múltiplas funções divergem por perda recíproca de função (Kumánovicz et al., 2003; Horton et al., 2004).

A despeito desta expansão do número de genes que compõem a região de MHC, suas variadas funções e seu envolvimento direto ou não nos processos imunológicos, os genes clássicos de MHC de classe I e II mantêm-se reconhecidamente importantes para a modulação da resposta imunológica. Para um entendimento extremamente simplificado sobre o funcionamento do sistema imune, deve-se considerar a atuação de células capazes de responder de modos diferentes a substâncias imunogênicas. Dentre estas células, os linfócitos (linfócitos B e T) e seus produtos exercem o papel principal na resposta imune adaptativa (Abbas et al., 2000).

Os linfócitos B reconhecem antígenos na sua forma nativa, através de seus receptores de superfície celular (imunoglobulinas), e na fase efetora da resposta, secretam anticorpos. A diferenciação celular que culmina na fase efetora da resposta é desencadeada pela sinalização das células T às células B. Esta etapa de sinalização, por sua vez, ocorre quando as células T reconhecem os antígenos através de seus receptores de superfície (*T Cell Receptor*). É neste ponto que os produtos dos genes de MHC atuam de modo fundamental, pois diferentemente das células B, os linfócitos T são capazes de reconhecer antígenos apenas quando estes lhe são devidamente apresentados. A apresentação neste caso envolve moléculas de superfície celular codificadas por genes do MHC, que carregam para a superfície das células peptídeos processados no interior destas, provenientes da internalização de antígenos (antígenos exógenos) ou de antígenos produzidos dentro da célula hospedeira (antígenos endógenos). Essas moléculas são expressas na superfície de células nucleadas (todas as células nucleadas do organismo), especializadas ou não no processo de apresentação. No caso de células especializadas, podem ser citadas as células dendríticas, células de Langerhans, macrófagos e células B (Janeway & Travers, 1997; Abbas et al., 2000).

Este reconhecimento específico da molécula de MHC ligada ao peptídeo antigênico foi primeiramente descrito em 1974 por Zinkernagel e Doherty. Estes dois autores demonstraram e definiram o funcionamento do sistema imunológico como sendo "*MHC restricted*", ou seja, uma célula T só é capaz de reconhecer uma célula infectada quando na superfície desta há a combinação de moléculas de MHC e peptídeos antigênicos. Embora as bases moleculares deste mecanismo não tenham sido esclarecidas pelos autores, a idéia de que a manutenção da resposta imunológica está restrita ao MHC garantiu a este sistema genético o status de responsável pela definição de montagem ou não da resposta imunológica. De fato, vários trabalhos apontam as moléculas do MHC como o centro da resposta imune adaptativa de mamíferos, pássaros e provavelmente de todos os vertebrados (Ohta, 1991; Slade, 1992; Page & Holmes, 1998; Meyer & Thomson, 2001; Meyer et al., 2006).

A natureza e as vias de processamento dos antígenos (citossólica ou vesicular) definem a que classe de moléculas de MHC os mesmos serão ligados (classe I ou classe II). Antígenos endógenos e peptídeos próprios são processados no citosol por um grande complexo de proteases antes de serem transportados para o retículo endoplasmático (Janeway & Travers, 1997), onde se dá a ligação dos peptídeos antigênicos à molécula de MHC classe I. O reconhecimento do complexo “molécula MHC classe I + peptídeo antigênico” é feito por células T citotóxicas (CD8+), que ao reconhecerem o peptídeo ligado ao MHC como não-próprio são estimuladas a eliminar diretamente a célula infectada. Antígenos exógenos são internalizados e processados em vesículas endossomais e lisossomais, adquirindo propriedades estruturais que tornam os peptídeos antigênicos resultantes deste processo aptos a ligarem-se à fenda peptídica da molécula de MHC classe II (Abbas et al., 2000). O reconhecimento deste complexo, por sua vez, é realizado por células T *helper* (CD4+), que sinalizam às células B, estimulando a diferenciação destas para a secreção de anticorpos.

A maioria dos locos contidos nesta região está direta ou indiretamente envolvida na apresentação de antígenos às células T e subsequente iniciação da resposta imunológica. Das três principais classes de genes que compõem esta região, apenas os genes de classe III não estão associados a funções clássicas de apresentação. A região de MHC classe I contém genes que codificam as moléculas clássicas de MHC classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) enquanto que a região de classe II inclui genes que codificam moléculas importantes para os mecanismos de processamento (TAP1, TAP2, LMP2, LMP7 e DM) além das clássicas de classe II: HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR (Harding, 1997).

Os genes MHC classe I e MHC classe II codificam dois grupos de proteínas homólogas mas estruturalmente distintas, sendo os genes mais altamente polimórficos do genoma de humanos, camundongos e de um grande número de espécies de vertebrados analisadas (The MHC consortium, 1999; Abbas et al., 2000, Horton et al., 2004).

As moléculas de MHC classe II são heterodímeros formados por duas cadeias transmembrana, as cadeias alfa (α ou A) e beta (β ou B), e a estrutura da molécula só se mantém estável durante o processo de transporte e ancoragem na superfície celular através da ligação de um peptídeo na fenda formada pelas duas cadeias (Harding, 1997).

Os genes do MHC são reconhecidamente um sistema genético altamente polimórfico. O elevado grau de polimorfismo, caracterizado pela longa persistência de algumas linhagens alélicas e grande número de diferenças de nucleotídeos entre alelos, foi confirmado em humanos, camundongos e outros vertebrados (Huges & Nei, 1989; Satta et al., 1994). Meyer & Thomson (2001) analisaram populações humanas baseados em modelos de seleção para a

região de MHC e as compararam às predições de modelos neutros. Nesta comparação, todos os índices de variação desviam-se do esperado para modelos que assumem a neutralidade e corroboram o que havia sido proposto anteriormente para explicar os níveis de variabilidade: 1) poucos alelos são raros e muitos foram encontrados em frequências similares em vários estudos populacionais; 2) as diferenças encontradas entre as seqüências de MHC são proporcionalmente muito maiores que os demais genes nucleares amostrados, cuja proporção média de diferenças é em torno de 0,1% (e.g. 3,2% para o loco HLA-A); 3) o número de alelos encontrados nas populações é baixo, mas ainda assim é maior que o esperado sob condições de neutralidade (independente do tamanho populacional e das taxas de mutações).

As análises dos produtos destes genes demonstram que a variabilidade parece restringir-se à porção N-terminal da molécula, onde o peptídeo antigênico é ancorado. Nesta porção, os resíduos mais altamente polimórficos são encontrados no PBR (*Peptide Binding Region*), sítio de ligação codificado por parte do segundo exon dos genes A e B de classe II (que codificam as cadeias alfa e beta, respectivamente).

A origem e principalmente a manutenção do polimorfismo descrito para as seqüências dos genes de MHC têm sido motivo de grande interesse e controvérsia. Dentre os modelos de seleção balanceadora mais aceitos para explicar a alta diversidade de seqüências, a vantagem ao heterozigoto é freqüentemente apontada como causa, uma vez que conferiria uma maior capacidade de resposta frente à enorme diversidade de patógenos e estratégias desenvolvidas por estes para evadir o sistema imune. Neste modelo, a vantagem dos indivíduos heterozigotos em relação aos homozigotos reside no fato de portarem dois alelos diferentes potencialmente capazes de efetivar a apresentação de antígenos. Juntamente a este mecanismo, a freqüência dependente de seleção e a seleção flutuante (*fluctuating selection*) compõem o painel de processos que explicam a seleção dirigida por patógenos (Meyer & Thomson, 2001). Estes dois processos baseiam-se em flutuações das frequências alélicas e de disponibilidade de patógenos, mas diferem em seus princípios básicos. Enquanto que a freqüência dependente de seleção gera um processo cíclico onde a freqüência dos alelos flutua em relação à capacidade adaptativa dos antígenos, assumindo um modelo onde a vantagem depende da minoria (um alelo raro tem um *fitness* aumentado na medida em que poucos patógenos tenham sido expostos à molécula e, portanto, tenham se adaptado a este novo cenário), a seleção flutuante baseia-se no pressuposto de que a freqüência dos patógenos muda constantemente. Desse modo, a seleção de diferentes moléculas de MHC se dá em diferentes tempos, sem restrições à freqüência dos alelos em uma população (Pages & Holmes, 1998; Meyer & Thomson, 2001).

Outro modelo proposto para explicar os altos níveis de diversidade para o MHC diz respeito aos mecanismos reprodutivos, como reconhecimento e escolha de parceiros sem compartilhamento de alelos MHC em camundongos, registros de abortos espontâneos para mulheres compatíveis com o MHC do feto, registros de infertilidade e baixa motilidade dos espermatozoides para espécies de felinos cuja homogeneidade genética no MHC tenha sido detectada (O'Brien et al., 1986; Hill et al., 1992; Jordan & Bruford, 1998). Entretanto, a validade destes pressupostos demanda um maior número de estudos para corroborá-los.

Alguns trabalhos importantes estabelecem uma prevalência da taxa de substituição de nucleotídeos não sinônima sobre a sinônima nesta região, tanto para moléculas de classe I quanto para as de classe II (Huges & Nei, 1988; 1989; Paterson, 1998), o que representaria um aspecto importante da manutenção do alto nível de polimorfismo descrito para estes genes (Satta et al., 1994).

Grande parte do conhecimento adquirido sobre a estrutura, funcionalidade, variabilidade e evolução dos genes do MHC advém de estudos voltados a populações humanas, dada a sua importância nos processos imunológicos. Entretanto, o conhecimento sobre esses genes em outras espécies de vertebrados tem aumentado nesta última década.

Para avaliar o nível da variabilidade das moléculas de MHC nas duas espécies alvo de mamíferos marinhos do presente projeto foi selecionado o loco DQ. Em humanos, a região HLA-DQ é constituída de um par de genes funcionais diretamente envolvidos na apresentação de antígenos (DQA1 e DQB1), um par não funcional, mas com regiões codificadoras intactas (DQA2 e DQB2) e o pseudogene DQB3 (The MHC consortium, 1999; Horton et al., 2004).

O segundo exon do gene DQB1, que codifica parte do domínio 1 da cadeia beta das moléculas de classe II e que inclui o PBR, tem sido selecionado para um grande número de análises, levando em consideração o alto grau de polimorfismo descrito para primatas e uma variedade de outras espécies terrestres (Hoezel et al., 1999). Virtualmente, todo o polimorfismo de seqüência de nucleotídeos dos genes de classe I e II está localizado no exon que codifica a porção da molécula que se liga ao antígeno (segundo exon), sendo que para os três locos de classe II, o polimorfismo é significativamente mais alto para o segundo exon das cadeias beta (Gyllensten et al., 1990; Janeway & Travers, 1997; Horton et al., 2004).

Em humanos, estão descritos 906 alelos para a região de MHC classe II (MHC clássico), assim distribuídos: DRA=3, DRB1=544, DRB2= 84, DQA1=34, DQB1=90, DPA1=24, DPB1=127 (www.anthonynolan.org.uk/HIG, acessado em abril de 2008), e muitas das espécies de mamíferos analisadas, principalmente primatas, ungulados e roedores apresentam altos níveis de polimorfismo para este e demais locos do MHC (Murray, 1997; Gauderi et al., 2000; Cutrera &

Lacey, 2007). Entretanto, os níveis de polimorfismo mostraram-se variáveis em análises comparativas entre diferentes espécies de vertebrados.

Análises referentes aos genes DQB também demonstram variação em relação ao número de alelos identificados nas espécies estudadas. Murray (1997) identificou nove alelos para a baleia franca do norte (*Eubalaena australis*), cinco alelos para beluga (*Delphinaterus leucas*) e um alelo para o narval (*Monodon monoceros*). Hoelzel e colaboradores (1999) identificaram oito alelos para o elefante marinho do sul (*Mirounga leonina*) e apenas dois alelos para o elefante marinho do norte (*Mirounga angustirostris*). Yang e colaboradores (2005) identificaram 43 alelos entre 18 golfinhos Baiji (*Lipotes vexillifer*), espécie de cetáceo considerada funcionalmente extinta em 2008. Este grande número de alelos sugere a duplicação do loco DQB nesta espécie. A duplicação deste loco também foi detectada em baleia-franca-austral (*Eubalaena australis*), e o nível de variação detectado para esta espécie e para outras espécies de mysticetos investigados foi relativamente alto (ver Baker et al., 2006). Para o boto rosa da Amazônia (gênero *Inia*) foi identificado apenas um alelo para cada uma das espécies amostradas (*Inia geoffrensis* e *Inia boliviensis*), mas essa restrição em número é proporcional ao número de indivíduos amostrados (duas amostras de *Inia geoffrensis* e uma de *Inia boliviensis*) (Martínez-Agüero et al., 2006).

Ao analisar comparativamente a variação total do MHC, alguns fatores devem ser levados em consideração, como a história evolutiva de cada grupo em questão, o grau de relacionamento entre as espécies em comparação (mais ou menos próximas) e os níveis de variação observados para vários locos de MHC em uma mesma espécie (Murray, 1997).

A despeito da grande variação descrita para diferentes espécies, em relação a mamíferos marinhos verificou-se a ocorrência de níveis de polimorfismos mais baixos, comparativamente a mamíferos terrestres. Diferentes autores encontraram níveis de polimorfismo significativamente baixos para os locos do MHC (classe I e II) em mamíferos marinhos (Trowsdale et al., 1989; Murray et al., 1995; Slade, 1992; Hoelzel et al., 1999). Uma das hipóteses para explicar essa diferença em relação a mamíferos terrestres diz respeito ao ambiente. O conceito de que as características do ambiente aquático refletem-se no sistema imunológico de mamíferos marinhos tem tido uma crescente aceitação nesta última década. Considera-se igualmente provável que mamíferos marinhos apresentem características imunológicas exclusivas, como um reflexo das adaptações necessárias à sobrevivência neste habitat. Adaptações que, tanto podem estar relacionadas à gama de patógenos disponíveis neste ambiente, quanto aos mecanismos que mantêm o funcionamento do sistema imune a despeito dos extremos fisiológicos aos quais estas espécies estão submetidas (baixas temperaturas, alta pressão, disponibilidade de oxigênio), que tem se mostrado imunossupressores em outras espécies (King et al., 2001). Uma questão

bastante importante a respeito das diferenças fisiológicas às quais estas espécies são submetidas é o caráter funcional dos produtos dos genes de MHC. Recentemente, Zabka et al., (2003) caracterizaram e descreveram a estrutura e a composição celular da epiderme e derme de *Tursiops truncatus* (golfinho-nariz-de-garrafa). O trabalho destes autores demonstrou pela primeira vez, por imunohistoquímica, a expressão de genes de MHC de classe II na pele de cetáceos, sugerindo que estes genes mantêm sua função neste grupo de mamíferos. A análise da expressão do gene DQB em pele das duas espécies de cetáceos investigados no presente trabalho é apresentada no capítulo II desta tese.

Yukhi & O'Brien (1990) sugerem que variações no MHC de mamíferos permitem considerações sobre o histórico geral destas populações, uma vez que a baixa variabilidade detectada para algumas espécies seria um reflexo de processos como contração demográfica e endocruzamento. As espécies de felinos analisadas pelos autores em um trabalho prévio, cuja uniformidade genética foi detectada para os genes de MHC classe I, demonstram um alto grau de mortalidade juvenil, espermatozoides anormais e aumentada suscetibilidade a determinados agentes patológicos, efeitos fisiológicos deletérios gerados por endocruzamento.

A baixa variabilidade do MHC descrita para mamíferos marinhos pode, portanto, ser considerada como um indicativo importante da história natural destas populações, refletindo eventos de perda de variabilidade genética em algum momento de sua história evolutiva, sendo útil, por exemplo na orientação de planos de manejo para espécies ameaçadas. É importante avaliar cuidadosamente os níveis de variabilidade genética, destinando atenção especial a sistemas importantes para a manutenção das espécies, como tem sido sugerido para os genes do MHC, e obter dados que possam esclarecer o funcionamento deste sistema genético.

1.2 Cariótipo

Dentre as informações genéticas básicas mais importantes sobre uma espécie, o conteúdo de DNA e sua organização dentro das células é um dos primeiros objetivos a ser alcançado para o direcionamento de pesquisas futuras. Essas informações são úteis, por exemplo, na orientação de projetos genoma, onde a distribuição, disposição dos genes e número de cromossomos permite uma anotação de seqüências mais precisa.

Do mesmo modo, a caracterização da região onde um gene ou grupo de genes está inserido em relação à organização cromossômica (*i.e.* mais ou menos condensada) e à densidade de genes, permite inferências sobre o padrão de expressão desses genes. Um exemplo disto é a região do braço curto do cromossomo 6 de humanos onde estão localizados os genes de MHC, identificada por métodos de bandeamento simples. Os genes de MHC localizam-se em uma região de banda R (reversa) cuja característica de menor condensação permite inferir tratar-se de uma região de atividade transcricional elevada (Kumánovics et al., 2003).

A citogenética é um ramo da genética clássica que permite a obtenção destas informações de uma maneira bastante elegante e precisa, e vem sendo utilizada desde os primórdios da genética moderna, mantendo-se robusta na qualidade de dados gerados.

Paralelamente aos estudos de variabilidade genética em populações de espécies ameaçadas, estudos comparativos usando o cariótipo de cetáceos têm-se mostrado importantes para o estabelecimento das relações filogenéticas e evolutivas entre grupos relacionados aos mesmos (Bielec, et al., 1997), para definição de estoques populacionais (Stock, 1981) e ainda, como uma ferramenta importante para projetos futuros de mapeamento genético e comparação genômica intra e interespecíficas. O número cromossômico de toninha (*Pontoporia blainvillei*, Gervais & D'Orbigny, 1844) foi descrito pela primeira vez no presente trabalho, e sua caracterização e implicações evolutivas para a espécie são discutidas com mais detalhes no capítulo III desta tese.

1.3 Breve histórico e descrição das espécies

1.3.1 A toninha

A toninha ou franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1844), é uma espécie de pequeno cetáceo cuja distribuição é restrita à região costeira central do Oceano Atlântico Sul Ocidental, ocorrendo na costa da Argentina, do Uruguai e do Brasil (figura 2).

Esta espécie de pequeno porte, com registros de comprimento máximo variando entre 174 cm para fêmeas e 158 cm para machos, possui hábito essencialmente costeiro, ocorrendo dentro de 25-30 milhas náuticas da costa, com marcada preferência por águas túrbidas com menos de 35 metros de profundidade, embora já tenham sido registrados animais em águas com até 50 metros de profundidade (Pinedo et al., 1989; Secchi et al., 2000; Danilewicz, 2000)

No litoral do Rio Grande do Sul não foram identificadas diferenças significativas em relação à ocupação de hábitat no que diz respeito à profundidade (e.g. faixa etária, tamanho, sexo ou condição reprodutiva), nem tampouco evidências de movimentos sazonais de grande escala (migrações), sabendo-se muito pouco sobre deslocamentos diários da espécie (Danilewicz, 2000). Ainda, a partir de amostras obtidas no litoral do Rio Grande do Sul, foi possível observar que a espécie reproduz-se sazonalmente, e ao final de um período de gestação de 11 meses o nascimento de um único filhote por fêmea se dá entre os meses de outubro e fevereiro. Os filhotes nascem com um tamanho médio de 73 cm e o período de lactação estende-se por cerca de 8-9 meses. Estima-se que as fêmeas possam gerar de 5 à 9 filhotes durante toda a sua vida, considerando o início da maturidade sexual (entre o 3º e o 5º ano de vida, sem diferença significativa para machos e fêmeas) e a estimativa de longevidade para espécie, que é aceita em torno de 15 anos (Kasuya & Brownell, 1979; Brownell, 1984; Danilewicz, 2003).

Os registros tradicionais acerca da distribuição geográfica desta espécie estendem-se desde a localidade de Itaúnas (18°25'S) norte do Espírito Santo, Brasil (Moreira & Siciliano, 1991), até Golfo Nuevo (42°35'S, 64°48'W), na Patagônia Argentina (Crespo et al., 1998). Entretanto, evidências de uma distribuição descontínua vêm sendo apontadas por diferentes autores.

O primeiro trabalho que demonstrou haver diferenças morfológicas entre exemplares encontrados no norte e no sul da distribuição da espécie baseou-se em dados osteológicos e morfométricos para apontar duas formas geográficas para a toninha: uma de tamanho menor distribuindo-se do estado de Santa Catarina até o Espírito Santo e outra de tamanho maior, do Rio Grande do Sul até a Argentina (Pinedo, 1991).

a



b



Fotos: Daniel Danilewicz/Arquivo GEMARS

Figura 2. Toninha ou franciscana, *Pantodon blainvillei*. A) Filhote encontrado no litoral norte do Rio Grande do Sul. As amostras provenientes deste indivíduo foram utilizadas nos trabalhos apresentados nos capítulos II e III desta tese. B) Procedimento de coleta de amostras de um indivíduo adulto encalhado no litoral norte do Rio Grande do Sul.

Secchi *et al.* (1998) conduziram a primeira análise genética sobre a espécie, analisando 476 pares de base (pb) da região controladora do DNA mitocondrial de amostras das duas formas geográficas sugeridas por Pinedo (1991). Não foi observado o compartilhamento de haplótipos entre as amostras do Rio de Janeiro (forma norte) (n=10) e do Rio Grande do Sul (forma sul)(n=10), suportando a hipótese de ocorrência de duas formas ao longo da sua distribuição.

Trabalhos adicionais realizados para identificação da estrutura populacional através da análise de DNA mitocondrial (Lázaro *et. al.*, 2004) estão em concordância com a existência de pelo menos duas populações ao longo da distribuição de toninha: uma ao norte (Rio de Janeiro) e outra ao sul (Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina).

O primeiro estudo sobre a variabilidade genética utilizando um gene de MHC como marcador molecular para toninha e mais duas espécies de mamíferos marinhos da costa do Rio Grande do Sul foi conduzido por Heinzemann (2001). Neste trabalho, a autora sugeriu níveis muito baixos de polimorfismo para o segundo exon do gene DQB de MHC classe II de toninha. As análises foram conduzidas com amostras provenientes de três pontos da distribuição geográfica da espécie: Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Argentina. Os dados gerados por PCR-SSCP (*Polymerase Chain Reaction - Single Strand Conformation Polymorphism*) neste trabalho levaram a autora a sugerir ainda, ausência de variabilidade para o norte da distribuição (Rio de Janeiro), mas diferentemente dos trabalhos anteriores, não foi possível distinguir geneticamente esta população das demais amostradas.

Os dados gerados para as amostras do Rio Grande do Sul e da Argentina sugerem variabilidade de alelos, sendo maior no extremo sul da distribuição da espécie. A partir destas observações, a autora propôs um modelo onde a população da Argentina estaria representando um centro de diversidade genética, sendo mais polimórfica que as populações marginais.

Entretanto, não foi possível analisar precisamente estes alelos nas três populações em relação às suas frequências e variabilidade inter-populacional, pois a amplificação de outra região que não pôde ser identificada por seqüenciamento além do segundo exon do gene DQB1, dificultou as análises de SSCP.

Ott (2002) analisou amostras de toninha ao longo de toda a sua distribuição geográfica, utilizando marcadores do tipo microssatélites e DNA mitocondrial. Neste trabalho ficou evidente que a estrutura populacional da espécie é bem mais complexa que o modelo de duas formas (norte e sul) proposto anteriormente. Os resultados indicaram a ocorrência de pelo menos três unidades geneticamente distintas, a saber: 1) Rio de Janeiro, 2) São Paulo e Paraná, e 3) sul de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina, sugerindo ainda uma subdivisão nesta última, separando a população da Argentina das demais. O autor identificou uma menor

diversidade genética para a região sudeste do Brasil e indica níveis semelhantes aos encontrados em outras espécies de pequenos cetáceos de ampla distribuição para as demais regiões amostradas. Entretanto, o mesmo aponta o limite no tamanho amostral para o sul de Santa Catarina, como um ponto a ser melhor considerado nestas análises.

A preferência por um habitat marinho costeiro e as características do seu ciclo de vida tem colocado em risco a conservação da espécie em decorrência da pressão exercida pelas operações de pesca e a vulnerabilidade deste ecossistema à degradação ambiental. Uma alta mortalidade tem sido registrada para a espécie e certamente o fator crítico para viabilidade da espécie é a captura acidental em redes de pesca comerciais, que ocorre ao longo de toda a sua área de distribuição geográfica (Praderi et al., 1989; Secchi et al., 1997; Ott, 1998). Devido a esta alta mortalidade, a toninha vem sendo considerada a espécie de pequeno cetáceo mais ameaçada de todo Atlântico Sul Ocidental.

Os registros de captura acidental não são recentes. Há registros de captura acidental em redes de emalhe para tubarões na região de Punta del Diablo no Uruguai, nos anos 40, e para o Brasil, a partir de 1980, contemplando toda a distribuição geográfica da espécie (Moreno et al., 1997; Praderi, 1997; Secchi et al., 1997; Di Benedetto & Ramos, 2001; Bertozzi & Zerbini, 2002; Ott et al., 2002; Rosas et al., 2002).

As estimativas atuais de mortalidade diferem entre as regiões estudadas como um reflexo da utilização de diferentes métodos e esforço aplicados para a obtenção dos dados, variando entre 110 indivíduos/ano (mínimo 63 – máximo 176) para a região entre Espírito Santo e Norte do Rio de Janeiro, 279 (mínimo 63 – máximo 497) para São Paulo e Santa Catarina, 1245 (mínimo 562 – máximo 1778) para Rio Grande do Sul e Uruguai e 405 (mínimo 241 - máximo 567) para a Argentina (Danilewicz, 2007). Ainda que estes valores sejam considerados subestimativas em relação ao número real de mortes por captura acidental devido aos diferentes métodos e esforço empregados para obtê-los, os mesmos são considerados muito altos para as populações de toninha. Apesar das estimativas de abundância da espécie ainda apresentarem várias incertezas e necessitarem de revisão (Secchi et al., 2001; Danilewicz et al., 2007), alguns trabalhos são firmes em apontar que a população que habita a região do Rio Grande do Sul e Uruguai está declinando (Pinedo & Polachek, 1999; Kinas, 2002; Secchi, 2006).

A toninha encontra-se atualmente em várias listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção internacionais, nacionais e regionais. Em termos mundiais, a espécie está listada na categoria de “dados insuficientes - DD” no Livro Vermelho da União Mundial para a Conservação. Este conceito não reflete o *status* de uma espécie, mas sim indica a ausência de informações necessárias para uma avaliação completa sobre a sua atual situação de

conservação. A partir de 1992, com o Primeiro Workshop para a Coordenação da Pesquisa e Conservação de *Pontoporia blainvillei* na América do Sul, as informações obtidas apontam para a inapropriação desta classificação. Atualmente, a população que habita a costa do Rio Grande do Sul e do Uruguai se encontra listada na categoria “Vulnerável - VU” nessa mesma lista (IUCN, 2006). Recentemente, a espécie foi também incluída em diversas listas nacionais e estaduais (Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro) da fauna brasileira ameaçada de extinção (e.g. Danilewicz & Oliveira, 2003).

1.3.2 A Baleia-franca-austral

A baleia-franca-austral, *Eubalaena australis* (Desmoulin, 1822), está entre as maiores espécies de cetáceos existentes. Os indivíduos adultos podem atingir entre 13,5 e 17 m de comprimento e pesar aproximadamente 55 toneladas (Figura 3). A espécie distribui-se em todos os oceanos do Hemisfério Sul apresentando um padrão de migração sazonal característico entre as áreas de alimentação, localizadas em altas latitudes durante o verão, e as áreas reprodutivas, localizadas em baixas latitudes durante o inverno (IWC, 1986). As áreas de alimentação utilizadas durante o período de verão e outono situam-se em águas oceânicas entre as zonas de Convergência Subtropical e Antártica (aproximadamente 30°S e 55°S de latitude) (Tormosov et al. 1998, IWC 2001). A localização exata das áreas de alimentação não é conhecida, mas no Atlântico Sul, a área localizada próxima às Ilhas Geórgias do Sul (53°30'S; 41°35'W) é considerada uma área de alimentação importante para a espécie (Ott, 2002). As duas áreas reprodutivas no Atlântico Sul mais importantes para espécie situam-se no litoral sul do Brasil (principalmente Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, este último com uma maior concentração reprodutiva), e na região da Península Valdés, na Argentina (42°30'S; 63°30'W) (IWC, 1986). Estas áreas são utilizadas para acasalamento, nascimento e amamentação de filhotes (Payne 1986, Palazzo & Flores, 1999).

Estima-se que a espécie atinja a maturidade sexual aos 9 anos, e o período gestacional médio é de 12 meses. As fêmeas têm apenas um filhote por gestação, e sugere-se que isto ocorra em intervalos de 3 anos (Cooke et al., 2001). A estimativa de longevidade de baleia-franca-austral não é conhecida. Os dados de longevidade são extrapolados ao gênero a partir de estudos com a espécie co-genérica, baleia franca do norte (*Eubalaena glacialis*), cujas estimativas indicam que possa viver pelo menos até 65 anos (Hamilton et al., 1998).

a



b



Foto: Arquivo GEMARS

Figura 3. Baleia-franca-austral, *Eubalaena australis*. A) Um exemplar de baleia-franca-austral no litoral do Rio Grande do Sul. B) À esquerda, balestra utilizada para a coleta de tecido e ao centro, tubo para armazenamento de amostras. À direita, porção de tecido coletado (gordura e pele).

Heinzelmann (2001) procurou acessar informações sobre a variabilidade genética no MHC de amostras (n=30) provenientes das áreas mais importantes de concentração invernal da espécie na costa brasileira (litoral de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul). As análises de SSCP não resultaram em dados informativos devido à impossibilidade de leitura dos padrões de bandas dos indivíduos amostrados.

As análises com DNA mitocondrial e microssatélites conduzidas por Ott (2002) revelaram níveis de variação significativos em se tratando de uma espécie que tenha sofrido intensa redução em seu tamanho original. O autor sugeriu que a população original da qual a população atual descende seja maior do que inicialmente havia se estimado através dos registros de exploração comercial e modelos matemáticos. Além disso, foi possível observar fluxo gênico entre as populações amostradas no sul do Brasil e Argentina, e análises em conjunto com os dados de foto-identificação permitiram ao autor concluir que estes indivíduos parecem fazer parte de uma única população, compartilhando estas áreas reprodutivas (Ott, 2002).

Patenaude et al. (2007) compararam os dados de variabilidade obtidos com DNA mitocondrial nas 4 áreas principais de reprodução da espécie no hemisfério sul e em duas áreas de alimentação adjacentes: Argentina e África do Sul (reprodução) com Ilhas Geórgia do Sul (alimentação) no Oceano Atlântico, e Nova Zelândia e Sudoeste da Austrália (reprodução) com uma área de alimentação mais ao sul da Austrália, na região dos oceanos denominada Indo-Pacífico (oceanos Índico e Pacífico). Os autores observaram que não há compartilhamento de haplótipos entre as 4 áreas de reprodução, mas ocorre entre as áreas de reprodução e sua área de alimentação adjacente, corroborando o padrão de migração sazonal sul-norte e sugerindo uma estruturação populacional marcadamente limitada pela região oceânica.

Os primeiros registros de caça à baleia-franca-austral datam do final do século dezoito, quando a indústria voltou sua atenção para a espécie após sua atividade reduzir drasticamente as populações de baleia franca do norte, levando-se a pensar que esta última estaria extinta. Com a diminuição dos estoques da espécie co-genérica no hemisfério norte, e conseqüentemente, a dificuldade em encontrar esses animais, a baleia-franca-austral compensou a indústria com as mesmas características que tornavam a baleia-franca-do-norte alvo fácil para a caça: hábito costeiro nas áreas de reprodução, movimentos lentos ao emergir para respirar e uma camada espessa de gordura que além de permitir a flutuação após a morte, produz óleo em abundância (Cummings, 1985).

Alguns autores sugerem que o *status* populacional mundial anterior à exploração esteja entre 100 000 e 300 000 animais (Lichter, 1992). De fato, entre 1785 e 1939, estima-se que 38 600 baleias francas tenham sido capturadas no Atlântico Sul (Du Pasquier 1986). No Pacífico Sul os dados apontam 26 000 baleias mortas entre 1827 e 1899 (Dawbin 1986) enquanto que no Oceano Índico, entre 1830 e 1909, 12 000 baleias teriam sido mortas (Best 1987). Os registros para o litoral brasileiro são imprecisos, mas os registros de funcionamento das estações costeiras (armações) em Santa Catarina estendem-se de 1740 a 1973 (Ott, 2002).

As estimativas mais recentes de tamanho populacional da espécie sugerem que existem entre 6 000 e 7 000 indivíduos no Hemisfério Sul, dos quais aproximadamente 3000 no Atlântico Sul Ocidental, o que corresponderia à aproximadamente 5% da população original (IWC 2001).

Atualmente a espécie encontra-se incluída na categoria “baixo risco dependente de conservação” (*lower risk/conservation dependent*) da lista de espécies de cetáceos da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN, 2006). A espécie encontra-se também incluída no Apêndice I da CITES e na Lista Oficial de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (Bernardes et al. 1989, IBAMA 2001).

1.4 Objetivos

A despeito da grande diversidade de espécies de cetáceos descritas para o litoral brasileiro (Ott, 2002), um número muito pequeno de informações baseadas em dados moleculares, sobre as mesmas, está disponível. Em relação a estudos sobre variabilidade de genes de MHC em mamíferos marinhos, há pouquíssimos trabalhos, e a sua quase totalidade restringe-se a espécies que habitam águas do hemisfério norte. O estudo de genes de MHC em diferentes espécies animais dos mais diversos habitats é importante para aspectos referentes à conservação, mas também para a compreensão da estrutura e função do sistema imune, da evolução das espécies e do próprio MHC. Para as espécies selecionadas para este estudo, o entendimento sobre os genes de MHC poderá contribuir para complementar efetivamente as informações sobre variabilidade obtidas com o uso de marcadores do tipo microssatélites e DNA mitocondrial, e por ser um sistema genético considerado importante para a manutenção das espécies, poderá auxiliar no esclarecimento de questões relativas à vulnerabilidade, ao *status* de conservação e ao grau de erosão genética sofrida por estas espécies. Deste modo, os objetivos gerais do trabalho são:

1. Analisar o segundo exon do gene DQB1 do sistema MHC em baleia-franca-austral e toninha, quantificar a diversidade genética entre e dentro de cada uma das espécies e comparar as estimativas obtidas às encontradas para outros organismos, cujas populações não estejam vulneráveis, e que habitem ecossistemas com características distintas (Capítulo I);
2. Verificar a expressão do gene DQB1 a partir de biópsias obtidas de baleia-franca-austral e toninha (Capítulo II);
3. Estabelecer o cultivo celular a partir da córnea de exemplares de toninha recém-mortos para a descrição do cariótipo da espécie (Capítulo III).

2. CAPÍTULO I

Variabilidade genética no MHC de duas espécies de cetáceos da costa brasileira: *Pontoporia blainvillei* e *Eubalaena australis*.

Este capítulo apresenta dados referentes às análises de variabilidade genética em toninha e baleia-franca-austral a partir do segundo exon do gene DQB de MHC. Compõem este capítulo a metodologia utilizada, os resultados e a discussão geral. Material a ser submetido para publicação no periódico *Immunogenetics*.

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Coleta de Material

As amostras de toninha foram coletadas em três pontos da distribuição da espécie: Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul (litorais norte e sul) e Argentina. As amostras provenientes do Rio Grande do Sul foram coletadas em monitoramentos sistemáticos desde 1995 pelo Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS) no litoral norte e, pelo Laboratório de Mamíferos Marinhos do Museu Oceanográfico “Eliézer de C. Rios” no litoral sul.

As amostras de toninha do Rio de Janeiro foram coletadas por pesquisadores do Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), e as da Argentina, pelos pesquisadores do Departamento de “Ciências Marinas da Universidade de Mar del Plata”.

As amostras de baleia-franca-austral foram coletadas no litoral de Santa Catarina durante a estação reprodutiva do ano de 1999 em colaboração com pesquisadores do Projeto Baleia Franca/IWC. Amostras provenientes de um par mãe-filhote foram coletadas na estação reprodutiva do ano de 2005 em colaboração com pesquisadores do GEMARS.

O procedimento de coleta diferiu entre as duas espécies, e foram executados sob autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

As amostras de baleia-franca-austral foram obtidas através de um sistema de coleta de biópsia que utiliza dardos modificados (CETA-DART, Dinamarca) e uma balestra, a partir de uma pequena embarcação, para a retirada de pequenas porções de pele e gordura, segundo Brown et al. (1991). No momento em que o animal emerge a superfície para respirar, os dardos são atirados na sua porção dorsal e posteriormente recuperados. As amostras de toninha do Rio Grande do Sul são provenientes de animais mortos encontrados na beira da praia (figura 2) ou capturados acidentalmente em redes de pesca e trazidos pelas embarcações das comunidades pesqueiras de Tramandaí e Torres, no litoral norte, e da frota de Rio Grande, no litoral sul. Os tecidos coletados de toninha (pele ou músculo) foram selecionados segundo o seu grau de preservação, visando uma extração de DNA genômico de qualidade. Os tecidos coletados de ambas as espécies (aproximadamente 20mm) foram preservados em uma solução de DMSO saturada com NaCl e preservados à -20°C até o processo de extração. A extração de DNA genômico seguiu o protocolo descrito em Secchi et al. (1998) e o material foi estocado à -20°C.

A quantidade e pureza das amostras foram estimadas por espectrofotometria através da razão A_{260}/A_{280} .

2.1.2 Análises moleculares

Um total de 25 amostras de toninha foi utilizado para as análises: Rio de Janeiro n=5, Rio Grande do Sul n=13 (n= 9 litoral norte e n= 4 litoral sul) e Argentina n=7. Para baleia-franca-austral foram analisadas 18 amostras. Os indivíduos desta última amostragem foram foto-identificados e sexados previamente para excluir a possibilidade de reamostragem. O único par mãe-filhote incluído no presente trabalho foi o coletado na estação reprodutiva de 2005, em Torres, e já havia sido analisado no trabalho de expressão do gene DQB (capítulo II desta tese).

A distribuição do número amostral de toninha para cada uma das localidades da distribuição geográfica da espécie foi determinado, a princípio, pelos resultados obtidos no trabalho prévio de Heinzelmann (2001) utilizando-se a metodologia de SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*). Neste trabalho foram sugeridos 3 padrões de migração diferencial em gel de SSCP para os produtos de PCR (padrões A, B (B₁ B₂ B₃ B₄) e C) de cada uma das amostras de toninha analisadas (Rio de Janeiro n=32, Rio Grande do Sul n= 52, Argentina n=25). As diferenças de migração correspondentes a cada um dos padrões propostos por SSCP variaram de muito sutis (gerando, por exemplo, a subdivisão do padrão denominado B em B₁₋₄) a diferenças bastante conspícuas (como o padrão denominado C que parecia ocorrer somente entre as amostras provenientes da Argentina) (Figura 4). As amostras de toninha selecionadas para o presente trabalho foram subdivididas entre estes 3 padrões a fim de corroborar os padrões sugeridos anteriormente.

Para a análise de variabilidade genética de toninha e baleia-franca-austral foi utilizado o par de *primers* universal descrito por Murray et al. (1995) que amplifica um fragmento de 212 pares de bases (pb) contendo a porção do segundo exon do gene DQB de MHC classe II que codifica o *PBR* (*Peptide Binding Region*). A reação de amplificação em cadeia (PCR) foi realizada sob as mesmas condições para ambas as espécies (50-200ng de DNA genômico em um volume total de 50µl contendo 20pmol de cada primer, 1,5mM MgCl₂, 20mM Tris pH8,4, 50mM KCl, 1,5 unidades de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) e 2,5mM de dNTPs). A amplificação seguiu um programa *touchdown* de temperaturas de anelamento de -1°C a cada

dois ciclos, começando com 94°C por 5 minutos, seguido de 20 ciclos com 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguido de diminuição de 1°C para a temperatura de anelamento a cada dois ciclos, seguido de 20 ciclos com 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, finalizando com extensão à 72°C por 5 minutos. O resultado do processo de amplificação foi verificado em gel de agarose 1% (GIBCO BRL), 0,20 µg/ml de brometo de etídio, diluído em tampão TEB (90mM Tris-borato, 2mM EDTA pH8,0), sob radiação UV.

Produtos com amplificação de um único fragmento de 212 pb correspondendo ao PBR (incluindo os *primers*) foram purificados pelo sistema de colunas *GFX DNA Purification Kit* (G&E Healthcare, NJ, USA). Os produtos purificados foram clonados em vetores da série pUC (pUC18) e comercial (TOPO TA, Invitrogen) e transformados em células XL1-blue^{tet}. Para preparar células XL1-blue^{tet} competentes para transformação por choque térmico, uma colônia foi retirada diretamente da placa estoque LB/ágar/Tetraciclina e pré-inoculada em um volume de 3ml de meio LB líquido estéril, por 14 horas à 37°C, sob agitação. O volume de 1ml deste pré-inóculo foi transferido para o inóculo definitivo (62,5 ml de meio LB líquido estéril) e mantido à 37°C sob agitação até atingir valores entre 0,35 e 0,6 a uma O.D.₅₅₀. Após esta etapa, o material foi transferido para o gelo por um período que variou de 15 a 60 minutos. O material sofreu duas etapas de centrifugação por 15 minutos à 4°C, 2000 rpm.

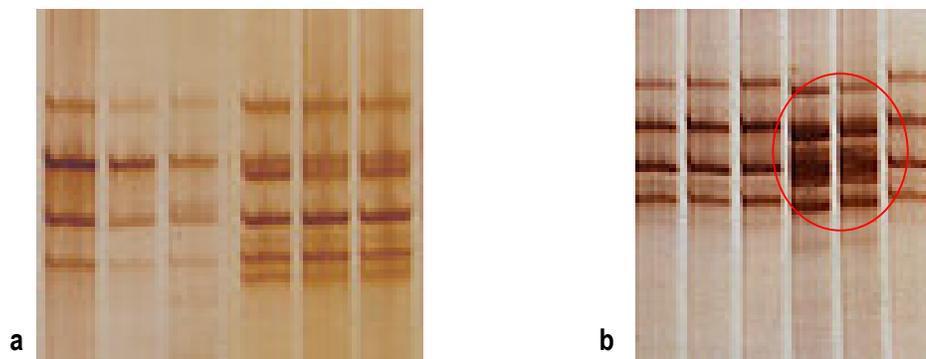


Figura 4. Géis de SSCP. Padrões de migração diferencial em amostras de toninha. Em (a) padrão de migração B (ocorrência sugerida para os três pontos de distribuição geográfica da espécie- RJ, RS e ARG); Em (b), no detalhe, padrão de migração C (ocorrência sugerida para Argentina). Para detalhes ver o texto.

O precipitado da primeira etapa de centrifugação foi ressuspenso em 21ml de meio FB estéril (100mM KCl, 50mM CaCl₂.2H₂O, 10mM C₂H₃KO₂, 10% glicerol) e submetido novamente à centrifugação. O precipitado desta segunda etapa foi ressuspenso em 5ml de meio FB estéril e distribuído em alíquotas de 40ul que permaneceram preservadas à -80°C por um período de 2 meses sem alteração significativa de sua capacidade de transformação. Para a transformação por choque térmico foram utilizadas alíquotas individuais de células competentes (40ul) para cada produto clonado (3ul - 4ul) e após a delicada homogeneização por pipetagem destes produtos em contato com as células, os mesmos foram mantidos por 20 minutos em gelo, seguido do choque de temperatura (42°C por 90 segundos seguidos de 2 minutos em gelo) e tiveram a reação finalizada com a adição de 400 ul de meio LB líquido estéril suplementado com 250mM KCl, 2M MgCl₂ e 20mM glicose. Este material foi mantido em banho à 37°C por 1 hora, semeado em placas com meio LB sólido e cultivado por 16-20 horas em estufa 37°C. O número de colônias variou entre as duas espécies com baleia-franca-austral apresentando o maior número de colônias por placa. Para confirmar a presença do inserto, entre 5 e 10 colônias de cada uma das amostras foram selecionadas diretamente da placa contendo LB/agar/Ampicilina (alguns poucos indivíduos produziram menos que 5 colônias por transformação e nestes casos, repetiu-se os procedimentos de clonagem e transformação para unificar o número de colônias disponíveis para as análises) e tiveram o DNA plasmidial extraído por lise alcalina. Os insertos foram amplificados utilizando-se *primers* M13 (Invitrogen) ou os descritos anteriormente para o segundo exon (DQB). Os produtos de amplificação de tamanho correto (derivados dos *primers* DQB ou M13) foram tratados com 1 unidade de cada uma das enzimas, Exonuclease do tipo I-EXO 1 (Invitrogen) e Fosfatase Alcalina de Camarão- SAP (Biolabs, MA, USA) e seqüenciados nos equipamentos MegaBACE 1000 (Amersham Pharmacia) e ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Hitachi). Seqüências de baixa qualidade, com índices de confiança para os sítios amostrados inferiores ao valor padrão definido pelo pacote de programas STADEN (abaixo de 25) foram seqüenciadas novamente. A definição do número de recombinantes a serem seqüenciados para cada uma das espécies (3 clones para toninha e 5 clones para baleia-franca-austral, seqüenciados em ambas as direções) baseou-se nos resultados obtidos a partir do seqüenciamento do material para a análise de expressão do gene DQB na pele de ambas as espécies (capítulo II desta tese).

As análises de similaridade de seqüências e os alinhamentos apresentados neste trabalho foram conduzidos utilizando-se os programas NCBI BLAST (Altschul et al 1990), CHROMA (Goodstadt et al. 2001) e STADEN (Bonfield et al. 1995). As comparações pareadas de

substituição de nucleotídeos entre os alelos descritos neste trabalho foram conduzidas no segmento de 171pb (57 codons completos) do segundo exon do gene DQB e as frequências relativas de substituições não sinônimas (d_N) e sinônimas (d_S) foram calculadas seguindo os modelos de *Nei-Gojobori* modificado (1986) com correção de *Jukes & Cantor* (1969), disponíveis no programa MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007). O modelo modificado de *Nei-Gojobori* assume que as substituições do tipo transição e transversão não ocorram com a mesma frequência, corrigindo desvios da razão $R(s/v) = 0,5$, enquanto o modelo de *Jukes & Cantor* assume taxas de evolução diferentes para todos os sítios de seqüências. A variação para a região do *PBR* é considerada resultado de seleção positiva e espera-se um excesso de substituições não-sinônimas para esta porção do gene. O desvio da neutralidade ($H_0 = d_N/d_S = 1$) foi avaliado para as razões de d_N/d_S de ambas as espécies através do pacote estatístico *Condon Based Z-test (large sample)* (MEGA4.0) com valores de significância inferiores à 5% validando a hipótese alternativa $H_A = d_N/d_S > 1$ (seleção positiva).

A análise da conservação das propriedades físico-químicas dos aminoácidos para os sítios considerados importantes para a ligação do peptídeo antigênico no *PBR* seguiu os pressupostos da classificação de Taylor (1986). Foram incluídos nestas análises os alelos descritos nas análises de expressão de gene DQB na pele de ambas as espécies (número de acesso ao GeneBANK EU048216-EU048220) (capítulo II). Os alelos identificados no presente trabalho foram nomeados segundo modificações sugeridas para mamíferos marinhos em Baker et al. (2006) e seguem os critérios para a identificação de novos alelos sugeridos em Yang et al. (2005), onde seqüências confirmadas em diferentes clones ou indivíduos podem ser consideradas novos alelos. Os alelos propostos no presente trabalho foram identificados em mais de um clone de um mesmo indivíduo e/ou em mais de um indivíduo.

2.1.3 Análises filogenéticas

A relação filogenética entre os alelos foi reconstruída usando o programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) através do método de *Neighbor-joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987), assumindo o modelo de distâncias genéticas de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), pressupondo uma frequência nucleotídica desigual. O suporte estatístico para cada um dos nós da árvore foi calculado através de 1000 réplicas de *bootstrap*. Foram incluídas nas análises

seqüências do segundo exon do gene DQB de cetáceos e de 3 espécies de artiodátilos (grupo externo) disponíveis em bancos de dados de seqüências (números de acesso na tabela 1). As seqüências correspondentes ao segundo exon do gene DQB das espécies *Inia geoffrensis* e *Inia boliviensis* (boto rosa amazônico) não estão depositadas em bancos de dados, mas encontram-se disponíveis em Martínez-Agüero et al. (2006).

Tabela 1. Números de acesso de seqüências do segundo exon do gene DQB de cetáceos depositadas no GenBank. Entre parênteses a nomenclatura padrão dos alelos (abreviação do gênero e espécie, código de 4 letras). Seqüências utilizadas nas análises filogenéticas. As espécies de artiodátilos utilizadas como grupo externo para o enraizamento da árvore estão identificadas por (*). As seqüências para o gênero *Inia* não estão disponíveis em bancos públicos de dados de seqüências. Algumas espécies de cetáceos não possuem nome comum em português.

Espécie (Identificação do alelo)	Nome comum	Número de acesso ao GenBank
<i>Alces alces</i> * (Alal)		AY077785
<i>Sus scrofa</i> * (Susc)		U53206
<i>Bos taurus</i> * (Bota)		U77787
Subordem Mysticetos		
Família Balaenidae		
<i>Balaena mysticetus</i> (Bamy)	Baleia-franca-da-Groelândia	DQ354623-354625
<i>Eubalaena australis</i> (Euau)	Baleia-franca- austral	DQ354630- DQ354634
Família Baleopteridae		
<i>Balaenoptera acutorostrata</i> (Baac)	Baleia-minke-anã	AB164201
<i>Balaenoptera bonaerensis</i> (Babo)	Baleia-minke-antártica	AB164202-64207
<i>Balaenoptera musculus</i> (Bamu)	Baleia-azul	AB164200
<i>Balaenoptera physalus</i> (Baph)	Baleia-fin	DQ354626-354627/ DQ300261-300263
<i>Megaptera novaeangliae</i> (Meno)	Baleia-jubarte	DQ354642-354664
Família Eschrichtiidae		
<i>Eschrichtius robustus</i> (Esro)	Baleia-cinza	DQ354635-35636

Subordem Odontocetos

Família Ziphiidae		
<i>Hyperoodon ampullatus</i> (Hyam)		DQ354637
<i>Mesoplodon carlhubbsi</i> (Meca)		AB164210
<i>Mesoplodon europaeus</i> (Meeu)		DQ354640-354641
<i>Mesoplodon grayi</i> (Megr)	Baleia-bicuda-de-gray	DQ354639
<i>Mesoplodon stejnegeri</i> (Mest)		DQ354638/ AB164209
Família Physeteridae		
<i>Physeter catodon</i> (Phma-a)		AB164208
Família Delphinidae		
<i>Cephalorhynchus hectori</i> (Cehe)		DQ354628-354629
<i>Delphinus delphis</i> (Dede)	Golfinho-comum	AB164220
<i>Globicephala macrorhynchus</i> (Glma)	Baleia-piloto-nadadeira-curta	AB164228- AB164227
<i>Grampus griseus</i> (Grg)	Golfinho-de-Risso	AB164222
<i>Lagenorhynchus obliquidens</i> (Laob)		AB164224-164225
<i>Orcaella brevirostris</i> (Orbr)		AB164223
<i>Tursiops aduncus</i> (Tuad)		EF017816
<i>Tursiops truncatus</i> (Tutr)	Golfinho- nariz-de-garrafa	AB164221/EF690293-690297
Família Monodontidae		
<i>Delphinapterus leucas</i> (Dele)	Baleia-beluga	U16986-16991
<i>Monodon monoceros</i> (Momo)	Narval	MMU16991
Família Lipotidae		
<i>Lipotes vexillifer</i> (Live)	Baiji	AY177150-177153/ AY177284-177293/ AY333383-333341
Família Phocoenidae		
<i>Neophocaena phocaenoides</i> (Neph)		AB164212-164218/ DQ843614-843623/ EF056477-056480
<i>Phocoena phocoena</i> (Phph)		AB164211
<i>Phocoena sinus</i> (Phsi)	Boto-de-dorsal-espinhosa	AY170897

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Análises Moleculares

Foram geradas seqüências de alta qualidade para 18 amostras de toninha (Rio de Janeiro n= 4, Rio Grande do Sul (litoral norte n=6, litoral sul n= 3) e Argentina n= 5), e para 9 amostras de baleia-franca-austral. Foram identificados 5 novos alelos para toninha (*Pobl-DQB*2-6*) e 13 novos alelos para baleia-franca-austral (*Euau-DQB* 10-22*).

Dentre todos os alelos descritos no presente trabalho e registrados como alelos exclusivos de cada uma das espécies, dois são idênticos nesta porção do gene (dentro do sítio PBR do segundo exon do gene DQB): *Pobl-DQB*4* e *Euau-DQB*7*. O alelo nomeado em toninha (*Pobl-DQB*4*) foi identificado em mais de um clone em 3 indivíduos (2 do Rio de Janeiro e 1 do litoral sul do Rio Grande do Sul). O alelo nomeado em baleia-franca-austral (*Euau-DQB*7*) foi identificado em mais de um clone em 4 indivíduos.

O número elevado de alelos identificados para baleia-franca-austral, a despeito do número de animais em que foram encontrados, está de acordo com a sugestão de que o gene DQB está triplicado no genoma de baleia-franca-austral (Baker et al., 2006).

Dentre os alelos identificados para toninha, o alelo *Pobl-DQB*1* é o prevalente, tendo sido observado em 14 indivíduos (5 heterozigotos) representantes dos 3 pontos da distribuição geográfica da espécie. Esta distribuição de um mesmo alelo ao longo da distribuição geográfica da espécie é contrária à idéia apresentada pelos padrões de SSCP sugeridos anteriormente. Os padrões de SSCP identificados por Heinzemann (2001) sugeriam alelos exclusivos nas regiões do Rio de Janeiro e Argentina, além de alelos compartilhados entre as 3 regiões de coleta de amostras (Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Argentina). A confirmação dos alelos por seqüenciamento demonstrou que a metodologia de PCR-SSCP não é adequada para análise desta região do gene DQB de MHC (o mesmo ficou demonstrado para baleia-franca-austral). Especialmente porque o padrão de migração de bandas considerado exclusivo da Argentina (padrão C), que diferia claramente dos demais, foi detectado em heterozigose em um indivíduo portador do alelo prevalente (*Pobl-DQB*1*), cuja distribuição abrange indivíduos das 3 regiões de coleta. Os alelos *Pobl-DQB*2-4* foram identificados entre 2 e 3 indivíduos e os alelos *Pobl-DQB*5* e 6 ocorreram em apenas um indivíduo cada (Tabela 2). Não foram observados mais de dois alelos por indivíduo, não evidenciando deste modo duplicação gênica para este loco.

A distribuição dos alelos dentro do grupo amostral de baleia-franca-austral foi mais equilibrada, com apenas 2 alelos (*Euaa*-DQB*7 e 10) ocorrendo em mais de um indivíduo (entre 2 e 4 indivíduos). Os alelos remanescentes ocorreram em um indivíduo cada. A ocorrência de 3 alelos para um único indivíduo (*Euaa*-DQB* 6, 7 e 8) evidencia a ocorrência de, pelo menos, duplicação gênica para este loco.

As seqüências de nucleotídeos e as seqüências deduzidas de aminoácidos são características de genes de MHC de classe II de mamíferos. Para toninha, foram determinados 25 sítios variáveis (25/171) sendo 9 sítios para a primeira posição do códon, 10 para a segunda e 6 para a terceira. Foram observadas 11 substituições de nucleotídeos nas primeiras e segundas posições e 6 na terceira (Figuras 5 e 6). Para baleia-franca-austral foram determinados 60 sítios variáveis (60/171) sendo 25 sítios para a primeira posição do códon, 21 e 14 para a segunda e terceira posições, respectivamente. As substituições de nucleotídeos distribuíram-se de modo semelhante ao ocorrido para toninha, com a primeira e a segunda posições com maior número de substituições (29 e 27, respectivamente) e 16 substituições na terceira posição do codon (Figuras 7 e 8).

Os alelos identificados nas duas espécies não apresentam inserções, deleções ou códons de terminação e o padrão de substituição de nucleotídeos sugere um provável papel funcional *in vivo*. Para toninha foram observadas médias de d_N e d_S de 0,072 e 0,031 respectivamente, resultando em uma razão $d_N/d_S = 2,32$ ($p=0,014$). Para baleia-franca-austral, as médias observadas d_N e d_S de 0,12 e 0,03, respectivamente, resultaram na razão $d_N/d_S = 3,75$ ($p=0,001$). Os valores da razão d_N/d_S para ambas as espécies estão de acordo com os esperados para esta região, que é apontada como a região do genoma de humanos onde se evidencia seleção balanceadora (Seleção Positiva) (Huges and Nei 1988; Yeager and Huges 1999, Meyer & Thomson, 2001). A razão entre as substituições do tipo transição (s) e transversão (v) calculadas para toninha e baleia-franca-austral é $R = 0,744$ ($R = s/v$). Os valores para esta razão, quando calculados separadamente para cada uma das espécies, também indicaram uma prevalência em substituições do tipo transversão. A freqüência de nucleotídeos para ambas as espécies é desigual, com valores médios de cada um dos nucleotídeos assim distribuídos: T(12,4%) + C (25,6%) + A (22,4%) + G (39,5%) em toninha, e T (11,6%) + C (27,4%) + A (21,9%) + G (39,1%) em baleia-franca-austral.

Tabela 2. Frequência e distribuição geográfica dos distintos alelos identificados em *Pontoporia blainvillei*. A identificação dos alelos segue as modificações sugeridas em Baker et al. (2006). As populações estão separadas em Rio de Janeiro (RJ), Litoral Norte do Rio Grande do Sul (RSN), Litoral Sul do Rio Grande do Sul (RSS) e Argentina (ARG). Foram incluídos nesta tabela os alelos identificados no trabalho de expressão do gene DQB (capítulo II).

Identificação dos alelos	População				Total
	RJ	RSN	RSS	ARG	
PobIDQB*1	3	6	2	3	14
PobIDQB*2				3	3
PobIDQB*3	2				2
PobIDQB*4	2		1		3
PobIDQB*5	1				1
PobIDQB*6			1		1
Total	8	6	4	6	24

	21					*		*		*							*		*			
PoblDQB*1	acg	gag	cgg	gtg	cgg	<u>ttt</u>	gtg	<u>agc</u>	aga	tac	atc	tat	aac	cgg	gag	gag	<u>ttc</u>	<u>gtg</u>	cgc	tac		
PoblDQB*2	C..		
PoblDQB*3		
PoblDQB*4acCa.	.C.	...t.		
PoblDQB*5ga	gga	.C	gcg	c..
PoblDQB*6
																		*		*		
PoblDQB*1	gac	agc	gac	gtg	ggc	gag	tac	cgg	gcg	gtg	acc	gag	ctg	ggc	cgg	ccg	<u>gac</u>	<u>gcc</u>	gag	tac		
PoblDQB*2g.	ac.		
PoblDQB*3g.		
PoblDQB*4	tc.	...	a..	...	
PoblDQB*5	t.		
PoblDQB*6		
								*	*		*	*		*								
																					77	
PoblDQB*1	tgg	aac	agc	cag	aag	gac	atc	atg	gag	cag	<u>aca</u>	cgg	gcc	<u>gag</u>	ctg	gac	acg					
PoblDQB*2	C..g.	g..					
PoblDQB*3					
PoblDQB*4	C..					
PoblDQB*5					
PoblDQB*6	...	g..					

Figura 5. Seqüências nucleotídicas MHC-DQB de toninha, *Pontoporia blainvillei*. Alelos *Pobl-DQB*2-6* identificados no presente trabalho. Disposição dos códons 21-77 (57 códons completos). As posições sublinhadas correspondem aos sítios considerados importantes para o sítio de ligação antigênica (PBR). As posições marcadas com (*) correspondem aos sítios polimórficos dentro da fenda peptídica (Brown et al., 1993).

	21																				77
PoblDQB*1	TERVRFV	<u>SR</u>	IYNREE	<u>FV</u>	RY	DSDVGE	YRAV	TELGRP	DAEY	WNSQK	DIMEQ	<u>TRAE</u>	LD								
PoblDQB*2N...	..L...	RT...	..N....	..L.RV..								
PoblDQB*3N....G.....N.....								
PoblDQB*4	Y..S.	..N..	YA.F	S.K.	..N....	..L..								
PoblDQB*5N..	GG.AH	..Y.....N.....								
PoblDQB*6N.....D.....								

Figura 6. Seqüências preditas de aminoácidos MHC-DQB de toninha. Para facilitar comparação com as seqüências de nucleotídeos da qual derivaram, apenas as informações sobre os sítios considerados importantes para a ligação do peptídeo antigênico foram mantidas (sublinhado).

A região do PBR funcional em humanos possui 14 posições que são preditas importantes para a ligação ao peptídeo antigênico (28, 30, 32, 37, 38, 47, 56, 60, 61, 65, 68, 70, 71, 74) (Brown et al, 1993). As seqüências derivadas de toninha e baleia franca do sul demonstraram o mesmo padrão de variação descrito para humanos e outros mamíferos analisados em relação ao PBR do segundo exon do gene DQB. A baixa variação observada para toninha concentrou-se nestes sítios e/ou proximamente a eles (Figura 5). Para baleia-franca-austral, a alta variação observada apresentou pequenos desvios em relação a estes sítios, mas como descrito para toninha, também se manteve nestes e ao redor deles (Figura 7).

As seqüências deduzidas de aminoácidos de toninha e baleia-franca-austral correspondem aos sítios 21-77 de beluga (*Delphinapterus leucas*) descritos em Murray et al. (1995). Em toninha, a substituição de nucleotídeos foi observada nos sítios 26, 29, 36, 37, 38, 39, 43, 56, 57, 59, 62 e 70. Em baleia-franca-austral, as substituições ocorreram nos sítios 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 37, 38, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 57, 59, 60, 67, 69, 70, 71, 74. Polimorfismos observados em sítios que não os descritos como relevantes para o reconhecimento e ligação do peptídeo antigênico já haviam sido observados em outras seqüências de mamíferos marinhos (Murray et al., 1995, Yang et al., 2005), especialmente o sítio 26. Duas das mais importantes características físico-químicas dos aminoácidos que determinam a conformação de uma proteína são volume e tipo (e.g. carga, hidrofobicidade, etc.) (Taylor, 1986). A caracterização das substituições de aminoácidos nos sítios determinantes da ligação ao peptídeo antigênico em relação à conservação destas características é sumarizada em conservação fraca, moderada e forte, de acordo com o número de diferenças entre as propriedades. Segundo Taylor (1986) diferenças em relação ao volume tendem a alterar mais significativamente a conformação das proteínas, ao passo que o tipo pode produzir alterações menos sensíveis (como por exemplo a ambivalência do comportamento do aminoácido em relação à água). Deste modo, a classificação das propriedades advém de uma série de diagramas que procuram reduzir as informações relativas aos aminoácidos a números de diferenças entre eles: nenhuma diferença (forte conservação), uma diferença (moderada conservação) e duas diferenças ou mais (fraca conservação). Apesar de este modelo ser apropriado para diferenças detectadas nas seqüências deduzidas de aminoácidos dos genes de MHC, em particular a região dos segundos exons dos genes de classe II, a sumarização de informações sobre as propriedades pode deixar dúvidas em relação à conservação moderada, pelo número de características que são avaliadas para cada aminoácido.

	21					*	*	*								*	*			
EuauDQB*6	acg	gag	cgg	gtg	cgg	<u>cta</u>	gtg	<u>agc</u>	agc	tac	atc	tat	aac	cgg	gag	gag	<u>tac</u>	<u>gcg</u>	cgc	ttc
EuauDQB*7	tac
EuauDQB*8	tacc.	..a	c..t.	ct.	..t	...
EuauDQB*9	tac	ct.	.t.
EuauDQB*10c.	..a	ct.	.t.
EuauDQB*11c	g..	tc.	gt.	..a	c..
EuauDQB*12
EuauDQB*13
EuauDQB*14	gct	agt	g..	..at.	...	ct
EuauDQB*15	gc.a
EuauDQB*16acc.	..a	c..t.
EuauDQB*17	tacc.	..at.
EuauDQB*18	tacc.	..at.
EuauDQB*19t	.gt
EuauDQB*20	gt.	..a	c..
EuauDQB*21	gt.	..at.
EuauDQB*22	gt.	..a	c..t.
																	*	*		
EuauDQB*6	gac	agc	gac	gtg	ggc	gag	tac	cgg	gcg	gtg	acc	gag	ctg	ggc	cgg	ccg	<u>tcc</u>	<u>gcc</u>	aag	tac
EuauDQB*7
EuauDQB*8t.	c..
EuauDQB*9	t..g.	g..	...	g..	...
EuauDQB*10g.	g..	...	g..	...
EuauDQB*11	ga.
EuauDQB*12	gg.	g..	...	g..	...
EuauDQB*13g.	g..	...	g..	...
EuauDQB*14	ga.
EuauDQB*15	acg	tg.	.cg	agt	ac.	g..	cg.	tg.	.g.	ga.	...	g..	...
EuauDQB*16	tg.	..cgt.	tg.	g..	...	g..	...
EuauDQB*17	ga.	...	g..	...
EuauDQB*18g.
EuauDQB*19	aca	t..
EuauDQB*20	g..	...
EuauDQB*21	ga.	...	g..	...
EuauDQB*22	ga.
						*	*		*	*				*			77			
EuauDQB*6	tgg	aac	agc	cag	aaa	gac	atc	ctg	gag	cag	<u>aca</u>	cgg	gcc	<u>gag</u>	ctg	gac	acg			
EuauDQB*7g
EuauDQB*8gg.
EuauDQB*9g
EuauDQB*10g
EuauDQB*11gg.	.a
EuauDQB*12gg.	ga.c.	g..
EuauDQB*13gg.	ga.c.	g..
EuauDQB*14g	ca.	...	a.c	agc	.g.
EuauDQB*15gg.	ga.c.	g..
EuauDQB*16gg.	.a
EuauDQB*17g
EuauDQB*18gg.	.at.	g..
EuauDQB*19gcc	ag.	a..
EuauDQB*20g
EuauDQB*21g	ca.
EuauDQB*22g	ca.g.

Figura 7. Sequências nucleotídicas MHC-DQB de baleia-franca-austral, *Eubalaena australis*. Alelos *Euau*-DQB*10-22 identificados no presente trabalho. Disposição dos códons 21-77 (57 códons completos). As posições sublinhadas correspondem aos sítios considerados importantes para o sítio de ligação antigênica (PBR). As posições marcadas com (*) correspondem aos sítios polimórficos dentro da fenda peptídica (Brown et al., 1993).

	21					77
EuauDQB*6	TERVRL <u>V</u> SSY	IYNRE <u>E</u> YARF	DSDVGEYRAV	TELG <u>R</u> PSAKY	WNSQKDILEQ	TRAE <u>L</u> DT
EuauDQB*7 <u>Y</u>N.....N.....
EuauDQB*8Y.TRH	..N...FL..F...H	.N.....	R.....
EuauDQB*9Y....	..N...LV..	..Y.....	S.....A.E.	.N.....
EuauDQB*10TR.	..N...LV..	S.....A.E.	.N.....
EuauDQB*11	.DGS...VRH	..N.....D...	.N.....	R K.....
EuauDQB*12N.....	G.....A.E.	.N.....	R E..AV..
EuauDQB*13N.....	S.....A.E.	.N.....	R E..AV..
EuauDQB*14ASGR.	..N...V.SD...	.N...H.NS	R.....
EuauDQB*15A..R.	..N.....	..TWASTGRW	S.....D.E.	.N.....	R E..AV..
EuauDQB*16H.TRH	..N...F...F...A.E.	.N.....	R K.....
EuauDQB*17Y.TR.	..N...F...D.E.	.N.....
EuauDQB*18Y.TR.	..N...F...	S.....	.N.....	R K..VV..
EuauDQB*19R....	..N.....	..TL.....N.....	..ARN.
EuauDQB*20VRH	..N.....E.	.N.....
EuauDQB*21VR.	..N...V..D.E.	.N...H...
EuauDQB*22VRH	..N...V..D...	.N...H...	R.....

Figura 8. Seqüências previstas de aminoácidos MHC-DQB de baleia-franca-austral. Para facilitar comparação com as seqüências de nucleotídeos da qual derivaram, apenas as informações sobre os sítios considerados importantes para a ligação do peptídeo antigênico foram mantidas (sublinhado).

Em toninha, as substituições de um aminoácido por outro nas posições 29, 36, 39 e 56 levaram a uma fraca conservação das características físico-químicas de aminoácidos. As posições 37, 38, 43, 57, 59 e 62 apresentaram níveis de conservação mais relaxados variando de moderada à fraca no que diz respeito a volume e tipo dos resíduos de aminoácido. Nas posições 26, 40 e 70 foi observada uma forte conservação das propriedades físico-químicas. Em baleia-franca-austral, a maioria das posições onde foi detectada substituição de aminoácidos apresentou fraca conservação das propriedades físico-químicas: 23, 26, 29, 40, 43, 46, 47, 48, 49, 50, 67, 69, 70 e 74. As posições 22, 27, 38, 44, 59, 60 e 71 sofreram substituições que levaram as modificações de moderada à fraca conservação enquanto que as posições 28, 30, 37, 51 e 57 apresentaram níveis de moderada a forte conservação. Os alelos *Pobl-DQB*3* e *Pobl-DQB*6* sofreram apenas uma modificação de nucleotídeos cada, em diferentes códons. O alelo *Pobl-DQB*3* apresenta modificação na posição 43, onde a troca de um nucleotídeo (gac/ggc) leva à substituição de um ácido aspártico por uma glicina (Asp/Gly). O alelo *Pobl-DQB*6* apresenta modificação na posição 62, onde a troca de um nucleotídeo (aac/gac) leva à substituição de uma asparagina por um ácido aspártico (Asn/Asp). Ambas as substituições de aminoácidos apresentaram níveis moderados de conservação de propriedades físico-químicas.

Este padrão de substituições de aminoácidos, que privilegia substituições com fraca conservação das propriedades importantes para a conformação protéica, é esperado para uma molécula funcional de MHC, ao permitir uma interação menos restritiva com os peptídeos antigênicos, dada a diversidade de topologias das moléculas de MHC assim geradas.

As seqüências de ambas as espécies foram comparadas com seqüências DQB descritas previamente e revelaram alta similaridade com seqüências publicadas para o segundo exon do gene DQB dos mamíferos marinhos *Monodon monoceros*, *Mesoplodon grayi* e *Delphinapterus leucas* (95%-94%), *Lipotes vexillifer* (93%), cervídeos *Alces alces* (92%), ursídeos *Ailuropoda melanoleuca* (95%) e humanos (88%).

2.2.2 Análises filogenéticas

A análise em conjunto dos dados obtidos no presente trabalho e seqüências do segundo exon do gene DQB em outras espécies de cetáceos demonstram uma tendência em agrupar membros de uma mesma família, mas o suporte estatístico é relativamente baixo em alguns ramos da árvore (Figura 9). Alguns agrupamentos já haviam sido identificados em trabalhos anteriores, como é o caso dos alelos descritos para a família Phocoenidae (Martinez-Agüero et al., 2006), mas as relações filogenéticas das seqüências do segundo exon do gene DQB das

famílias Monodontidae, Iniidae e superfamília Delphinoidea diferem dos achados anteriores (Baker et al., 2006).

As duas seqüências correspondentes às duas espécies do gênero *Inia* formaram um clado com seqüências de baleia-franca-austral e de cachalote (*Physeter macrocephalus*) cujo clado mais proximamente relacionado é o formado por espécies da família Monodontidae (beluga e narval). Entretanto, a família Monodontidae não agrupa em um mesmo clado.

O clado de toninha, formado pelos alelos *Pobl-DQB*1, 2, 3, 5, 6*, encontra-se proximamente relacionado a alguns dos alelos de baleia-franca-austral agrupados em dois clados próximos. O clado de toninha está posicionado na árvore proximamente ao clado formado pela linhagem alélica MHC-DQB*01, descrita em Murray et. al. (1995) para beluga e narval (família Monodontidae). Esta linhagem alélica agrupa distantemente de outra linhagem (MHC-DQB*02) também descrita para a família Monodontidae no trabalho anterior.

O alelo compartilhado por ambas as espécies e nomeado, respectivamente, *Pobl-DQB4/Euau-DQB7* foi agrupado no clado da família Balaenidae. Os alelos de baleia-franca-austral identificados no presente trabalho, em conjunto com as seqüências previamente publicadas da espécie, aparecem distribuídos entre diversos clados, a exemplo do que ocorre com as seqüências de outra espécie de baleia, a baleia jubarte (*Megaptera novaengliae* –Meno), que do mesmo modo que a baleia-franca-austral tem a região DQB duplicada (ou triplicada). A distribuição dos alelos de ambas as espécies parece estar de acordo com o esperado para genes duplicados em uma mesma espécie (parálogos).

Os valores de *bootstrap* variaram com poucos ramos apresentando valores iguais ou superiores à 50%. Considerando estes baixos valores, é possível identificar uma perceptível separação por ordem, percebendo-se uma tendência em agrupar seqüências de mysticetos e odontocetos em dois clados principais. Entretanto, ambos os clados agrupam seqüências derivadas de espécies do grupo oposto (odontocetos dentro do clado de mysticetos e vice-versa). As seqüências de toninha estão agrupadas no clado com o maior número de seqüências de mysticetos, apesar do baixo suporte estatístico dado para este agrupamento.



Figura 9. Reconstrução da relação filogenética de alelos MHC-DQB (exon2) de cetáceos.

Árvore filogenética de todas as seqüências do segundo exon do gene DQB de cetáceos depositadas em bancos de seqüências. Os alelos *Pobl-DQB*2-6* e *Euau-DQB*10-22* foram descritos no presente trabalho. Seqüências de artiodáctilos enraizam a árvore. Reconstrução pelo método Neighbor-joining, modelo Tamura-Nei (para detalhes, ver o texto). Para facilitar a visualização dos grupamentos, os mesmos estão indicados por famílias (observar que membros de outras famílias podem estar inseridos nestes grupamentos): A) Família Balaenidae; B) Família Ziphiidae; C) Família Monodontidae; D) Família Pontoporiidae; E) Família Balaenopteridae ; F) Família Delphinidae G) Família Phocoenidae; H) Família Lipotidae.

Os níveis de variação de genes considerados importantes para a manutenção das espécies começaram a despertar a atenção para o estudo destes em espécies selvagens a partir do trabalho clássico de O'Brien et al. (1986), onde os autores puderam associar redução da variabilidade em genes de MHC ao aumento da suscetibilidade a uma nova variante patogênica e drástica redução do sucesso reprodutivo da espécie de felinos avaliada neste trabalho. A partir deste trabalho, o interesse de pesquisadores voltou-se a espécies que estariam sofrendo algum tipo de ameaça ou que fossem categorizados como espécies em risco.

Com mamíferos marinhos não poderia ser diferente, uma vez que raras são as espécies de mamíferos marinhos e, especialmente pequenos cetáceos, que não se encontram sob algum tipo de ameaça. Os primeiros estudos utilizando os genes de MHC como indicadores de suscetibilidade destas espécies apontavam uma característica muito peculiar e fascinante sobre esses genes em mamíferos marinhos: a baixíssima variabilidade detectada quando comparada a mamíferos terrestres (Trowsdale et al., 1989; Hoelzel, 1992, Murray et al., 1995).

Esses trabalhos geraram uma série de questionamentos sobre os processos que estariam levando as espécies de mamíferos marinhos a manter níveis de variação tão baixos em um sistema reconhecidamente altamente variável em mamíferos terrestres. A explicação considerada mais óbvia e aceita por vários anos consistia na suposição de que o ambiente marinho possui uma variedade de patógenos mais restrita que o ambiente terrestre. Essa visão extremamente simplificada do processo que geraria diversidade começou a ser bastante questionada quando se percebeu que o grande número de trabalhos publicados com espécies de mamíferos marinhos concentrava-se em espécies bastante ameaçadas, cujo número populacional havia sofrido uma redução intensa ao longo de sua história de vida, e, portanto, os níveis de variação poderiam ser um reflexo de endocruzamento sofrido pelas mesmas. Esta relação é apontada por Weber et al. (2004). Os baixos níveis de variação detectados 3 locos de MHC em populações de leões marinhos do norte (*Mirounga angustirostris*) são considerados um reflexo da drástica redução no número populacional desta espécie por conta da caça que quase a levou à extinção, e evidencia claramente endocruzamento.

Novas interpretações sobre as diferenças entre os ambientes marinho e terrestre e o reflexo disso na variação dos genes de MHC enfraqueceram a suposição de limitação de patógenos ao considerar que a fisiologia diferencial para habitar este ambiente seria fundamental para a modulação do sistema imunológico em espécies de mamíferos marinhos. A despeito desta discussão sobre o efeito de ambos os fatores (reduzido número de patógenos e restrições

fisiológicas) devemos considerar dois pontos importantes e ainda vagos para o entendimento dos processos de geração de diversidade nos genes de MHC de mamíferos marinhos: primeiro, não há estudos conclusivos sobre prevalência, níveis de infestação espécie-específica, associação entre alelos de MHC e doenças, ou mesmo sobre identificação de parasitas e outros patógenos em mamíferos marinhos, especialmente cetáceos. Poucos estudos contemplam susceptibilidade a doenças ou aspectos epidemiológicos do ambiente marinho (Acevedo-Witthehouse et al., 2003, Van Bresseem et al., 1998). Em toninha, à exemplo do que ocorre com outros pequenos cetáceos, os trabalhos concentram-se na identificação e caracterização da fauna de helmintos (Aznar et al, 1994; Andrade et al., 2000), enquanto que para baleia-franca-austral, à exemplo do que ocorre com grandes cetáceos, os trabalhos concentram-se em ectoparasitas, especificamente os do gênero *Cyamus* (Kaliszewska et al., 2005).

Segundo, há trabalhos que apontam níveis de variabilidade nos genes de MHC bastante altos para algumas espécies de mamíferos marinhos, como por exemplo, para o golfinho de rio *Lipotes vexillifer* (Baiji), sugerindo duplicação desta região genômica na espécie, para baleia-franca-austral e baleia-jubarte (Baker et al., 2006) e para o leão marinho da Califórnia (*Zalophus californianus*) (Bowen et al., 2002).

No presente trabalho, encontramos níveis de variação diferentes para as duas espécies estudadas. Toninha apresentou um nível de variação baixo considerando-se o número de sítios variáveis em seqüências e o número de alelos identificados. Baleia-franca-austral manteve os níveis altos de variação detectados anteriormente pelo trabalho de Baker et al(2006). Para baleia-franca-austral, estes dados estão de acordo com os níveis gerais de variação detectados por marcadores neutros (Ott, 2002), diferentemente do que ocorre com toninha. As populações de baleia-franca-austral têm dado sinais de recuperação e a grande variação detectada neste gene de MHC, a evidência de múltiplas cópias e a suposição de manutenção de função a partir da expressão do mesmo, são pontos importantes a serem considerados em relação à conservação da espécie.

Toninha apresentou níveis de variação semelhantes a outras espécies de cetáceos quando utilizados marcadores do tipo DNA microsatélite e mitocondrial, tendo sido observada uma variação consideravelmente baixa na região norte da distribuição geográfica da espécie, incluindo as populações do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (Ott, 2002). Para genes de MHC é esperado que o número de alelos varie entre as populações como um indicativo das diferenças demográficas e graus de cruzamento entre elas. Para populações humanas isoladas

(ameríndios) o número de alelos é menor e, à medida que as populações apresentam altos índices de cruzamento, como populações africanas, o número de alelos de MHC aumenta consideravelmente (Meyer & Thomson, 2001). Do mesmo modo, não foi possível distinguir dentro de cada uma das regiões de toninha amostradas (RJ, RS e ARG) uma variação maior ou menor. O pequeno número de alelos identificados no presente trabalho se distribuiu de maneira relativamente constante entre as 3 regiões e permitiria uma avaliação de que ao longo da distribuição geográfica da espécie, a variação para este gene seria baixa. Juntamente com os dados obtidos a partir de marcadores neutros podemos reafirmar que o estoque do Rio de Janeiro é a que apresenta os menores índices de variação geral. A partir dos dados gerados no presente trabalho, não podemos descartar a possibilidade desse estoque estar isolado do restante da distribuição, como sugerido em outros trabalhos (Secchi et al., 1998; Di Benedetto et al., 2001; Secchi et al., 2003). A presença de alelos comuns aos outros pontos amostrados indica que os mesmos se fixaram anteriormente ao evento de isolamento. A fixação de alelos de MHC em populações naturais e a manutenção destas linhagens alélicas ao longo da história evolutiva de populações ou da divergência de espécies é um dos indicativos mais aceitos para demonstrar o efeito da seleção sobre esses genes (Cutrera & Lacey, 2006; Meyer et al., 2006).

No caso de toninha e baleia-franca-austral, um dos aspectos mais interessantes acerca da ação da seleção sobre esse gene é a identificação de um mesmo alelo em duas espécies que divergiram há pelo menos 35 milhões de anos quando da separação em duas ordens: odontocetos (cetáceos com dentes) e mysticetos (cetáceos com cerdas bucais) (Árnason et al., 2004). É sabido que algumas linhagens alélicas de MHC humanas são mais relacionadas a linhagens alélicas descritas para chimpanzés do que outras linhagens descritas para humanos, cujas estimativas de divergência datam 5 milhões de anos. Do mesmo modo, foram identificados alelos idênticos entre duas espécies de chimpanzés, cujas estimativas de divergência datam 2 milhões de anos (Lawlor et al., 1988; Cooper et al., 1998). O tempo estimado de divergência entre mysticetos e odontocetos é muito superior ao esperado para a manutenção de linhagens alélicas entre espécies, gerando questionamentos sobre os processos que explicariam o compartilhamento de um alelo entre as espécies destas duas ordens (e.g. convergência), e sobre a evolução do MHC em espécies pouco estudadas em relação a este sistema genético.

Se considerarmos que o processo de seleção possa estar sendo influenciado por fatores demográficos, como de fato é aceito (Dobson et al., 2004; Meyer et al., 2006; Cutrera & Lacey, 2006) poderíamos supor um cenário onde essas espécies estivessem sofrendo o mesmo tipo de pressão de seleção ao compartilharem o mesmo habitat. Se considerarmos que patógenos

influenciam a variação nos genes de MHC, poderíamos supor também que as populações de baleia-franca-austral, que migram sazonalmente para reproduzir-se em águas que fazem parte da distribuição geográfica de toninha, estejam sofrendo pressão de seleção dirigida por patógenos semelhante à sofrida por toninha (mesmas espécies patogênicas, por exemplo). Há duas categorias de seleção aceitas para os genes de MHC: a seleção dirigida por patógenos e a seleção dirigida pela reprodução (escolha preferencial de parceiros e interação materno-fetal). Ambas as categorias carecem de evidências que as comprovem em detrimento uma de outra ou não as tornem excludentes. Do mesmo modo, a evidência de que há seleção nos genes DQB das duas espécies (toninha e baleia-franca-austral) à exemplo do que ocorre para genes de MHC onde já tenha sido evidenciada (humanos, por exemplo), é clara. Entretanto, os processos que estão influenciando a manutenção desta linhagem alélica (*Pobl-DQB*4/Euau-DQB*7*) nas duas espécies, permanecem sem evidências.

A despeito desta dificuldade em estabelecer estudos de associação de doenças e alelos de MHC em mamíferos marinhos, no presente trabalho ficou demonstrado que ambas as espécies portam alelos que possuem todas as características de seqüências de genes de MHC funcionais de primatas não-humanos e humanos. Essa caracterização de seqüências quanto a sua similaridade com seqüências comprovadamente funcionais em outras espécies demonstra haver uma provável retenção de função destes genes e, portanto os torna um modelo bastante interessante para o estudo da evolução do próprio MHC.

Alguns autores começaram a questionar a importância dos genes de MHC para o entendimento do sistema imunológico de espécies naturais quando do surgimento de dados sobre a região de MHC de humanos e seus inúmeros parálogos com diferentes funções (não exclusivas do sistema imunológicas) (Acevedo-Whitehouse & Cunningham, 2006). Estudos comparativos sobre genes de MHC em espécies como cetáceos que sofreram adaptações extremas para o uso do ambiente marinho podem vir esclarecer questões relativas à função destes genes. No capítulo II desta tese, a evidência de expressão do gene DQB em toninha e baleia-franca-austral sinaliza uma provável retenção de função, e, portanto, demonstra a importância do estudo destes genes em espécies de mamíferos marinhos.

Adicionalmente, as relações filogenéticas do segundo exon do gene DQB em cetáceos apresentaram algumas modificações em relação a trabalhos publicados anteriormente, mesmo considerando que estas relações estejam comprometidas pelo tamanho da seqüência utilizada e o grande número de táxons incluídos na construção da árvore filogenética.

No trabalho de Martínez-Agüero e colaboradores, os dados relativos aos alelos do segundo exon do gene DQB colocam o gênero *Inia* como grupo irmão de Beluga (*Delphinapterus leucas*-Monodontidae), espécie da superfamília Delphinoidea.

Trabalhos anteriores utilizando genes mitocondriais e nucleares sugerem que toninha (*Pontoporia blainvillei*, família mono-específica - Pontoporiidae) e o gênero *Inia* (boto do rio Amazonas- família Iniidae) sejam mais proximamente relacionados e que ambos formem o clado irmão das famílias Monodontidae (beluga e narval) e Phocoenidae, ambas pertencentes à superfamília Delphinoidea (Cassens et al., 2000, Árnason et al., 2004).

Árnason et al. (2004) estabeleceram relações filogenéticas e estimaram tempos de divergência entre 13 espécies de cetáceos atuais utilizando dados do genoma mitocondrial completo (12 genes codificantes). Neste trabalho, juntamente a comparações de análises anteriormente publicadas de dados morfológicos, as espécies do gênero *Inia* são identificadas como espécies irmãs de toninha (*Pontoporia blainvillei*), sendo esse clado menos divergente de outra espécie de golfinhos de rio (*Platanista gangetica*-Susu). As duas seqüências correspondentes às duas espécies do gênero *Inia* formaram um clado com seqüências de baleia-franca-austral e de cachalote (*Physeter macrocephalus*) cujo clado mais proximamente relacionado é o formado por espécies da família Monodontidae (beluga e narval). As seqüências de toninha formaram um clado irmão às seqüências de beluga no presente trabalho, mas encontram-se distantemente relacionadas às seqüências de *Inia*.

As seqüências do segundo exon do gene DQB de outra espécie de golfinho de rio, *Lipotes vexillifer* (Baiji) mudaram de posição na árvore quando analisadas em conjunto com os dados obtidos no presente trabalho. Os trabalhos baseados em dados morfológicos, paleontológicos e moleculares a posicionam próxima a um clado formado pelas famílias Pontoporidae e Iniidae (Lipotidae (Pontoporidae+Iniidae)) (Yang & Zhou, 1999). No presente trabalho, Baiji está agrupado em um clado basal da árvore sugerindo tempos de divergência bastante anteriores aos demais golfinhos de rio (toninha e boto do rio Amazonas) representados na reconstrução filogenética.

Modelos evolutivos dos genes de MHC em primatas humanos e não humanos estão melhor entendidos comparativamente a modelos de outras espécies de vertebrados. Isto fica claro quando se observam as modificações nas relações filogenéticas do gene em toninha e baleia-franca-austral, em relação às demais espécies de cetáceos. Análises compreendendo outros

genes de MHC e outras regiões que não apenas o PBR poderão contribuir para elucidação das dúvidas em relação à evolução destes genes.

3. Capítulo II

O capítulo II refere-se à expressão do gene DQB em toninha e baleia-franca-austral. Manuscrito aceito para publicação no periódico *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* (JMBA). A formatação final obedece às regras do periódico.

MHC class II expression in skin biopsies from the franciscana dolphin *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1844) and the southern right whale *Eubalaena australis* (Desmouilins, 1822)

Larissa Heinzelmann^{*}, Maurício Tavares^{§,‡}, Paulo H. Ott^{§,‡,†} Ignacio M. B. Moreno^{§,‡}

José Artur B. Chies^{*}

§ Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS). ‡ Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR – UFRGS). † Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS). * Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil. Corresponding author e-mail: lari2512@yahoo.com.br

Abstract

Presently, there is no information about the functionality of the immune system in franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*), a small dolphin from southern Brazil. As the franciscana, the population of southern right whale (*Eubalaena australis*) that inhabits Brazilian waters has not yet been surveyed in what concerns MHC expression. For the first time it was possible to observe the DQB gene expression in skin of these two species of cetacean using RT-PCR. Skin pieces of the animals were collected to RNA extraction. The fragment corresponding to DQB exon 2 was amplified, cloned and sequenced. A total of five alleles were found, one to franciscana and four to southern right whale. The observed d_N/d_S ratio of 2.77 ($p=0.03$) suggests that this gene is under balancing selection pressure (positive Darwinian selection). The sequences indicate that, in both species analysed, the DQB gene is functional.

INTRODUCTION

The major histocompatibility complex (MHC) comprises a family of closely related genes and it is considered the most gene-dense and polymorphic region of the human genome. There are 224 genes in this region, with nearly half of the 128 expressed genes are related to immune responses (The MHC Sequence Consortium, 1999). The highly polymorphic MHC molecules are expressed in cell surface and play a key role in the initiation and in the maintenance of immune responses by presenting

antigens to the effectors cells (Kumanóvics et al., 2003). There are two major subfamilies of MHC genes (classes I and II), whose products are involved in distinct antigen presentation pathways. In humans, the classical class II genes (DP, DQ, DR) are constitutively expressed basically in professional antigen-presenting cells (such as macrophages, dendritic cells, B cells and on the thymic epithelium).

In marine mammals, studies focusing the genomic organization and levels of diversity of the MHC system have been conducted with increased interest in the last years (Baker et al., 2006; Lehman et al., 2004; Yang et al., 2005;). The reduced MHC diversity described for some cetaceans and pinnipeds is approached sometimes as an indication of a less effective immune system as compared to terrestrial mammals (Murray et al., 1995; Slade, 1992). Nevertheless, more information about the expression of MHC genes is essential to characterize the immune system of marine mammals as well as to improve our understanding of the interactions between these animals and their environment. One of the most studied cetaceans in Brazil is the franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1844), a small coast dolphin. The population inhabiting the coast of Rio Grande do Sul (the southernmost state of Brazil) and Uruguay has been recently classified as vulnerable by the IUCN Red List of Threatened Species (IUCN, 2006). Studies about the behavior and ecology of *P. blainvillei* have been conducted (e.g. Danilewicz et al., 2004; Secchi et al., 2003; Siciliano et al., 2002), but limited data are available about the genetic diversity and phylogenetic relationships of this species (e.g. Lázaro et al., 2004; Secchi et al., 1998). Another cetacean observed in southern Brazil is the southern right whale, *Eubalaena australis* (Desmouilins, 1822), a conservation dependent species (IUCN, 2006). This is a migratory large whale, mating and calving off Brazil during winter and part of spring (IWC, 2001).

Analyses of MHC class II gene expression in cetacean skin were initially performed in *Tursiops truncatus* (bottlenose dolphin) using immunohistochemistry by Zabka & Romano (2003). Their study revealed a pattern of DQB genes expression that reflected the cellular structural and functional characteristics expected to this kind of protein. Besides this work, analyses of MHC expression in cetaceans were basically performed in lymphatic tissues in the harbour porpoise *Phocoena phocoena* (Beineke et al., 2007) and in blood lymphocytes from beluga whale *Delphinapterus leucas* (Bernier et al., 2000). In the present study skin samples from franciscana dolphin and right whale were used in order to test the MHC class II DQB gene expression in cetacean skin using a more accurate method.

MATERIAL AND METHODS

Collecting Samples

Samples from both cetacean species described in the present study were collected in the northern coast of Rio Grande do Sul, southern Brazil. In a rare event of live stranded animal (January, 2005), a skin sample (ca. 5mm) of a newborn franciscana dolphin was collected (Tramandaí, 29°58'S; 50°07'W). Skin samples (ca. 10mm) from a free-ranging mother and calf pair of southern right whales were collected with a biopsy dart on July 2004 (Torres, 29°19'S; 49°43'W). The samples from both species were stored in 4ml of RNAlater solution (Ambion, Tx, USA) at 4°C until processing (ranging from 2 – 3 weeks).

RNA Extraction and amplification protocols

Total cellular RNA was isolated by silica-based gel membranes combined with microspin technology to skin samples (RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Germany) and stored at - 20°C. The full length cDNA synthesis was performed using a SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Palo Alto, CA) according to the manufacturers specifications. Universal primers were used to amplify a fragment of 212 base pairs of the DQB exon 2 Peptide Binding Region (PBR) as described by Murray et al. (1995). Briefly, the PCR reactions were carried out on 50ng of cDNA in a total volume of 50µl containing 20 pmol of each primer, 1.5mM MgCl₂, 20mM Tris pH8.4, 50mM KCl, 1.5 units of Recombinant *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) and 2.5mM of each dNTP. The amplification followed a touchdown protocol, starting with 94°C for 5 minutes, followed by 20 cycles with 94°C for 1 minute, 65°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, decreasing 1°C at each two cycles, followed by 20 cycles with 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and ending with an extension step of 72°C for 5 minutes. Glyceraldehyde-3P-dehydrogenase (GAPDH) gene amplification was used as a positive control of expression, since it is considered to be a reliable control for gene expression studies on samples from cetacean skin biopsies (Spinasanti et al., 2006). To confirm the absence of DNA on the purified samples, the RNA from each specimen was used as template for amplification, prior to the cDNA synthesis. Also, as a negative control, RNA purified from K562, a cell lineage defective on MHC expression, was used in each test. The amplification products were loaded in a 1% agarose gel and visualized under UV by ethidium bromide staining (Figure 1). A unique fragment of 212 bp, corresponding to the DQB exon 2, was amplified from each cDNA

sample, excised from the gel and purified by *GFX PCR* DNA Purification Kit (GE Healthcare, NJ, USA). Purified PCR products were cloned into TOPO TA vector (Invitrogen). To confirm the sequences, 5 colonies per each sample were picked directly from de LB agar plate and the insert was amplified using the M13 primers (Invitrogen). Amplified fragments of the correct size were sequenced in a MegaBACE 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) (Figure 2). Data were confirmed by sequencing in both directions.

Statistical analyses

Several analyses were performed in order to establish if sequences corresponded to functional genes. The nucleotide sequences were analyzed using the sequence alignment software programs CHROMA (Goodstadt et al. 2001) and STADEN (Bonfield et al. 1995) and compared using the NCBI BLAST program (Altschul et al. 1990). To detect molecular-level evidence of selection, pairwise comparisons of nucleotide substitutions between alleles were conducted on a segment of 171 bp (57 complete codons) and relative frequencies of non-synonymous (d_N) and synonymous (d_S) substitutions were calculated following Jukes and Cantor correction of Modified Nei and Gojobori (1986) in MEGA4 (Tamura et al. 2007). The ratio of non-synonymous to synonymous divergence was tested for departure from the neutral expectation of unity using the z statistic available in MEGA4. The amino acids physicochemical properties were analyzed using a ProtParam program from ExPASy (Gasteiger et al. 2003) and their conservation properties followed Taylor's classification (1986).

RESULTS

The analyses concerned evidence of selection and departures from neutrality for d_N/d_S ratio were carried out to southern right whale. Since we have just one franciscana sample we preferred do not to include that in these analysis. The remaining analyses were conducted among the three individuals (all alleles) with the aim to identify characteristics expected to functional MHC sequences. We followed the standard four-letter abbreviations for species recommended for MHC nomenclature and adapted from Baker et al. (2006). We observed five alleles, one from franciscana (*Pobl-DQB*1*) and four different alleles from right whales (*Euau-DQB* 6-9*). The mother and calf southern right whales shared one allele (*Euau-DQB*7*). Besides that, both have exclusive alleles, the calf has *Euau-DQB*9* and the mother has *Euau-DQB* 6* and *8*. The sequences were

deposited in the GeneBank (access numbers EU048216-EU048220). This elevated number of alleles found in right whale was expected since it was already suggested the existence of three copies of the DQB gene in the southern right whale genome (Baker et al., 2006). The nucleotide and deduced amino acid sequences of the amplified products were typical of transcripts from mammalian class II genes (Figures 2 and 3). The five alleles identified in the two species do not show insertions, deletions or stop codons, suggesting a functional role *in vivo*. Nevertheless, we were able to identify nucleotide substitutions in all possible three codon positions. Nine nucleotide substitutions could be assigned to both first and second bases and four to the third base of codons. Pairwise comparisons of nucleotide substitutions also indicated a functional status of southern right whales alleles. The average of d_N and d_S 0.075 and 0.027, respectively, resulting in a ratio of $d_N/d_S = 2.77$ significantly different from unity ($p=0.03$). This high substitution ratio suggests a balancing selection pressure (positive Darwinian selection), which was expected to this particular region of the gene as shown in the functional PBR in humans (Huges & Nei, 1988). There are 14 predicted positions as important to peptide binding (28, 30, 32, 37, 38, 47, 56, 60, 61, 65, 68, 70, 71, 74) in humans (Brown et al., 1993). As expected, the sequences derived from *P. blainvillei* and *E. australis* differed from other MHC sequences mainly in and around the sites predicted to be important to peptide binding and recognition (Figures 2 and 3). The franciscana and right whale amino acid sequences correspond to sites 21-77 of the beluga DQB1 sequences (Murray et al., 1995). Polymorphism was observed in residues 28, 37, 38, 47, 60, 65, 68 and 71, as well as in positions considered polymorphic within human PBR but not described as relevant to peptide recognition and binding (26, 29, 39, 40, 43, 51, 58, 59). This same situation was previously described in other marine mammal sequences (Murray et al., 1995; Yang et al., 2005).

Two of the most important physiochemical amino acid characteristics that determine the protein structure are volume and type (hydrophobicity). In the positions 29 (Arg/Ser), 38 (Val/Ala/Leu), 40 (Tyr/Arg) and 43 (Asp/Tyr) the different amino acids observed at the different alleles presented a weak conservation of these physiochemical characteristics. In positions 28 (Ser/Thr), 30 (Tyr/His), 57 (Asp/Ser/Ala) and 59 (Gln/Lys) the replacements lead to a conservation degree varying from moderate to weak, concerning type and volume of amino acid, whereas in positions 26 (Phe/Leu/Tyr) and 37 (Phe/Leu/Tyr) the substitutions involved amino acid residues with quite similar characteristics (strong conservation). The strong

conservation of physiochemical amino acid characteristics was also observed in the predicted positions outside the peptide recognition sites. A similar comparison clustering the four alleles from the southern right whale provided similar results, suggesting that this substitution pattern is related to the MHC molecule itself, reinforcing that the described alleles will lead to functional MHC molecules. This pattern suggests that the bias in amino acid usage with less conserved physiochemical characteristics is important to the molecule function. It is expected in a functional system that these sites influence the diversity of molecules topologies allowing a less restrictive interaction with antigens within a population. The five new alleles were compared to previously published DQB exon 2 sequences of mammals and revealed a high sequence similarity with human (88%), bovine (91%), canine (89%) as well as with sequences derived from other marine mammals: *Delphinapterus leucas* (94%), *Balaenoptera musculus* (94%), *Zalophus californianus* (91%).

DISCUSSION

Marine mammals are subject to characteristic selective pressures in the sea environment, such as physiological constraints due to the availability of oxygen, low temperatures and high pressure, that are considered to be immunosuppressive to other species (King et al., 2001). In addition, over the last decades, these species have been submitted to environmental degradation, exposure to contaminants and climate changes that have been implicated in the emergence of new marine diseases (Harvel et al., 1999). In a study with two species of southern American river dolphins, *Inia geoffrensis* and *Inia boliviensis* (Martínez-Agüero et al., 2006), the authors observed different sequences, identified as DQB alleles, on each species. The authors hypothesized that the difference observed could reflect a different selection pressure generated by differences in environment, as well as distinct parasite diversity, virulence and load. Nevertheless this can be corrected, it is necessary improve the knowledge about the marine mammals immune system and its potential in elicit a response against pathogens and in developing resistance to them before more assumptions. There is little information about MHC class II expression in marine mammals. The skin is a natural barrier against injuries and pathogens and it is know that important genes related to immunity can be expressed at this tissue, e.g. classical class I MHC genes. Even considering the scarcity of studies demonstrating association between specific MHC alleles and diseases or parasite prevalence in wild populations, the identification of new alleles as well as the analysis of MHC gene expression will provide important tools to population

management. The knowledge about marine mammals immune system will be useful to identify the diversity of natural populations, explain such specific immune processes and to perform comparative evolutionary studies. In conclusion, the detection of MHC class II genes expression in skin of cetacean by molecular methods provides an accurate tool to immunological studies with cetacean and gives support to the utilization of skin when other tissues are less feasible to be achieved.

Acknowledgments. We would like to thank Daniel Danilewicz, Lizandra Robe, Fabiano Torres and Alexandre Zerbini for helpful in collecting samples and kindly provided constructive suggestions on the manuscript. One anonymous reviewer provided valuable comments on an earlier draft of the manuscript. The Fundo Nacional do Meio Ambiente-FNAMA/MMA, The Yaqu Pacha Foundation and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) provided funds to the Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul that contributed to this project. L.H. and I.M.B received a scholarship from CNPq, respectively, Grants 141610/2003-4 and 140660/2004-6.

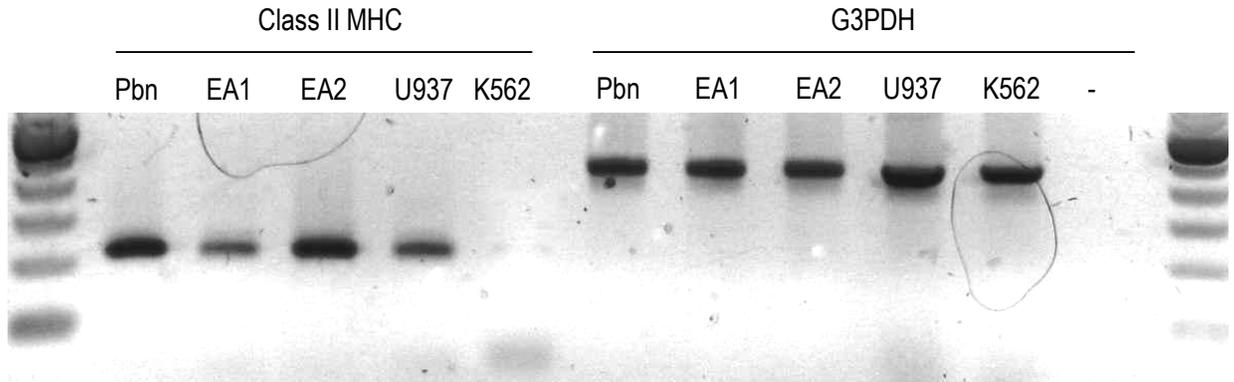


Figure 1. Amplification of MHC fragments from Franciscana and Right Whale cDNA. Exon 2 DQB amplified from Franciscana (Pbn), Right whale (mother identified as EA1 and her calf identified as EA 2), cDNA from cell lineage U937, corresponding to 212bp. K562 cell lineage defective to MHC expression. Positive control was primers to human GAPDH (440bp). Ladder 100bp.

```

                21          *   *   *           *   *
Pobl-DQB*1    acggagcgggtgctggtttgtgacgagatcacatctataaccgggaggagttcgtgcgctacgacagcgcagctgggcgagtac
Euau-DQB*6    .....c.a.....c.....a.c.....t.....
Euau-DQB*7    .....ac.....c.....a.c.....t.....
Euau-DQB*8    .....ac.....c.....c.....c.....t.t.....t.....
Euau-DQB*9    .....ac.....c.....c.....c.....t.....t.....
MenoSEA-DQ    .....c.a..gt...c.....a.c.....t.....
Live-DQB*1    .....gag.....ac.....t.....c.....
Dele-DQB*01   .....c.c..ag.....a.....a.t.....
HLA-DB1      .....c.....tc.....c.....a.a.....a.c.....t.....g.t...
                *   *           *   *
Pobl-DQB*1    cgggcggtgaccgagctgggccggcgcgagtagcggcagtagtactggaacagccagaaggacatcatggagcagacacgggcgag
Euau-DQB*6    .....tc.....a.....a.....c.....
Euau-DQB*7    .....tc.....a.....c.....
Euau-DQB*8    .....tc.....a.c.....c.....g.....
Euau-DQB*9    .....g.....c.....c.....c.....
MenoSEA-DQ    .....c.....tc.....a.....c.....c.....g.....
Live-DQB*1    .....c.....g.ac.....c.c.....a.....t.....
Dele-DQB*01   .....c.....g.....c.....g.....
HLA-DB1      ..c.....gcc..a..g...t..t.....ag..c....gg...c....g...
                77
Pobl-DQB*1    ctggacacg
Euau-DQB*6    .....
Euau-DQB*7    .....
Euau-DQB*8    .....
Euau-DQB*9    .....
MenoSEA-DQ    g.....
Live-DQB*1    g.....
Dele-DQB*01   .....
HLA-DB1      t.....

```

Figure 2. DQB nucleotide sequences. In non variable codons a dot is used to display identity. Abbreviations for individual species MHC sequences are as follows: Pobl, Franciscana (*Pontoporia blainvillei*), Euau, Right whale (*Eubalaena australis*), Live, Baij (*Lipotes vexilifer*), Dele, Beluga Whale (*Delphinapterus leucas*), Meno, Humpback whale (*Megaptera novaengliae*), HLA-DQB (*Homo sapiens*). Underlined codons indicate positions polymorphic in human MHC molecules and an asterisk (*) indicates codons postulated to be important to peptide binding (Brown et al 1993).

*Pobl-DQB*1* TERVRFVSRYYINREEFVRYDSDVGEYRAVTELGPRDAEYWNSQKDIMEQTRAE LDT
*Euau-DQB*6*L..S.....YA.F.....S.K.....L.....
*Euau-DQB*7*Y..S.....YA.F.....S.K.....L.....
*Euau-DQB*8*Y.T.H.....L.F.....F.....S.KH.....L..R.....
*Euau-DQB*9*Y..S.....L.F.Y.....S.....A.....L.....
MenoSEA-DQL.V.H.....YA.F.....S.K.....LL..R..V..
*Live-DQB*1*E.....T.F...A.....RT.....LL..K..VV..
*Dele-DQB*01*L.....L.HF.....L.R.....
HLA-DB1L.T.....YA.F.....V.....PQ.....EVL.G.....

Figure 3. Predicted amino acid sequences of DQB alleles. To ease comparison no character is used to display identity. The identification of sequences follow the abbreviations used to DQB nucleotide sequences. To physiochemical characteristics information see the text.

REFERENCES

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215,403-410.
- Baker, S.C., Vant, M.D., Delabout, M.L., Lento, G.M., O'Brien, S.J., Yuhki, N., 2006. Diversity and duplication of DQB and DRB-like genes of the MHC in baleen whales (suborder: Mysticeti) *Immunogenetics* , 58,283-296.
- Beineke, A., Siebert, U., Stott, J., Muller, G., Baumgärtner, W., 2007. Phenotypical characterization of changes in thymus and spleen associated with lymphoid depletion in free-ranging harbor porpoises (*Phocoena phocoena*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117,254-65.
- Bernier, J., De Guise, S., Martineau, D., Beland, P., Beaudet, M., Fournier, M. 2000. Purification of functional T lymphocytes from splenocytes of the beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Developmental and Comparative Immunology*. 24,653-662.
- Bonfield, J.K., Smith, K.F., Staden, R., 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, 24, 4992-4999.

- Brown, J.H., Jardetzky, T. S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C., 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, 364:33-39.
- Danilewicz, D., Claver, J.A., Pérez Carrera, A.L., Secchi, E., Fontoura, N.F., 2004. Reproductive biology of male franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) (Mammalia: Cetacea) from Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Fishery Bulletin*, 102(4), 581-592.
- Gasteiger, E., Gattikern, A., Hoogland, C., Ivanvi Appel, R.D., Bairoch, A., 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31, 3784-3788.
- Goodstadt, L., Ponting, C.P. 2001. CHROMA: consensus-based coloring of multiple alignments for publication. *Bioinformatics*, 17, 845-846.
- Harvel, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwel, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, O.D., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W., Vasta, G.R., 1999. Emerging marine disease – climate links and anthropogenic factors. *Science*, 285,1505-1510
- Huges, A.L., Nei, M., 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*, 335, 167-170.
- IUCN Red List of Threatened Species: A Global Species Assessment, 2006. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge. *Pontoporia blainvillei* (Rio Grande do Sul/Uruguay subpopulation). Available from <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/41761/all> (accessed December 2006).
- IWC 2001. Report of the Workshop on the Comprehensive Assessment of Right Whales: A Worldwide Comparison. *J. Cetacean Res. Manage.* (Special Issue) 2, 1–35.
- King, D.P., Aldridge, B.M., Kennedy-Stoskopf, S., Stott, J.L., 2001. *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. 2nd Ed. CRC Press.
- Kumanóvicz, A., Takada, T., Lindhal, K.F., 2003. Genomic organization of the mammalian MHC. *Annual Review of Immunology*, 21, 629-57.
- Lázaro, M., Lessa, E.P., Hamilton, H., 2004. Geographic genetic structure in the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). *Marine Mammal Science*, 20(2),201-214.

- Lehman, N., Decker, D.J., Stewart, B.S., 2004. Divergent patterns of variation in major histocompatibility complex class II alleles among antarctic phocid pinnipeds. *Journal of Mammalogy*, 85,1215-1224.
- The MHC Sequencing Consortium, 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401, 921-923.
- Martínez-Agüero, M., Flores-Ramírez, S., Ruíz-García, M., 2006. First report of major histocompatibility complex class II loci from the Amazon pink river dolphin (genus *Inia*). *Genetics and Molecular Research*, 5(3),421-431.
- Murray, B.W., Malik, S., White, B.N., 1995. Sequence variation at the major histocompatibility complex locus DQB in beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Molecular Biology and Evolution*, 12,582-593.
- Nei, M., Gojobori, T., 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, 3,418-426.
- Secchi, E.R., Wang, J.Y., Murray, B.W., Rocha-Campos, C.C., White, B.N., 1998. Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic location in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Canadian Journal of Zoology*, 76(9), 1622-1627.
- Secchi, E., Ott, P.H., Danilewicz, D., 2003. Effects of fishing bycatch and the conservation status of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. In: *Marine Mammals: Fisheries, Tourism and Management Issues*. SCIRO Publishing Collingwood. Australia.
- Siciliano, S., Di Benedetto, A.P., Ramos, R., 2002. A toninha, *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea, Pontoporiidae) nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, costa sudeste do Brasil: caracterizações dos habitats e fatores de isolamento das populações. *Boletim do Museu Nacional, Zoologia*, 476, 1-15.
- Slade, R.W., 1992. Limited MHC Polymorphism in the Southern Elephant Seal: Implications for MHC Evolution and Marine Mammal Population Biology. *Proceedings of the Royal Society of London, series B*, 249, 163-171.
- Spinsanti, G., Panti, C., Lazzeri, E., Marsili, L., Casini, S., Frati, F., Fossi, C.M., 2006. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) skin dolphins. *BMC Molecular Biology*, 7,32.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24,1596-1599.
- Taylor, W., 1986. The classification of amino acid conservation. *Journal of Theoretical Biology*, 119, 205-218.
- Yang, G., Yan, J., Zhou, K., Wei, F., 2005. Sequence variation and gene duplication at MHC DQB loci of Baiji (*Lipotes vexilifer*) a chinese river dolphin. *Journal of Heredity*, 96, 310-317.
- Zabka, T., Romano, T., 2003. Distribution of MHC II (+) cells in skin of the Atlantic Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*): an initial investigation of dolphin dendritic cells. *The Anatomical Record, Part A*, 273A,636-647.

4. Capítulo III

O capítulo III refere-se à determinação do cariótipo de toninha. Manuscrito aceito para publicação no periódico *Journal of Heredity*, a formatação final obedece às regras do periódico.

The karyotype of franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*)

Larissa Heinzelmann ^{1,2}, Pedro Cesar Chagastelles ², Daniel Danilewicz ³, José A. B. Chies ²
and Jaqueline Andrades-Miranda¹

1. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil. Phone/fax 55-51-33086722/33087311.

2. Laboratório de Imunogenética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 43323 lab 212, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil. Phone: 55-51-33086737.

3. Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS), Rua Felipe Neri, 382/203, Porto Alegre, RS, 90440-150, Brazil.

Corresponding author e-mail: lari2512@yahoo.com.br

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Andrés Delgado Cañedo, Dr. Eduardo Secchi and Andrea Adornes Conrado for support in collecting samples and in the cytogenetic preparations. To Ricardo Hegenbart for all of their expert technical assistance in provided the images of this manuscript. Previous drafts of the manuscript were improved by insightful comments from Dr. Márcio Borges Martins and 2 anonymous reviewers. The Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of the Brazilian Government (CNPq) has granted postgraduate fellowships to L.H. and P.C.C (Grants 141610/2003-4 and 142863/2006-8, respectively). PRO-DOC Protax CAPES/CNPq/MCT has granted postdoctoral fellowships to J. A-M.

Running title: franciscana dolphin's karyotype

Abstract

Despite the recent increase in studies on franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) molecular biology, there is no karyotype information since live animals are very rare to be achieved. In the present study the diploid number was established for the two new born male franciscanas live-stranded ($2n= 44$) from corneal cell cultures. From the comparison of the chromosomal number into the cetacean karyotype phylogeny we suggest that the most parsimonious hypothesis is that the ancestral character state in the group is the diploid number of 42, with an extra chromosome pair appearance independently twice along the cetacean evolution, once in the suborder Odontoceti and once in the suborder Mysticeti. The information of the chromosomal number may be useful to future genetic mapping projects of the species.

The franciscana, *Pontoporia blainvillei*, is a small dolphin endemic to shallow coastal waters of tropical and temperate regions along the coasts of Brazil, Uruguay and Argentina (Crespo et al. 1998; Siciliano et al. 2002). The species is the only member of the family Pontoporiidae. Due to the species behavior of avoiding engine boats, its small size, inconspicuous color pattern and small group size, franciscanas are one of the most difficult coastal cetaceans to be observed in the wild.

This species is probably the most endangered small cetacean of the Southwest Atlantic Ocean, due to the high levels of entanglement in commercial gillnets (Danilewicz 2007). The population that inhabits southern Brazil and Uruguay suffers a mortality of more than one thousand animals each year (Ott et al. 2002; Secchi et al. 2003) and is currently listed as Vulnerable in the IUCN Red List of Threatened Species (IUCN 2007).

The franciscana is one of the most studied cetaceans of South America, having many aspects of its biology described (e.g. Pinedo and Hohn 2000; Danilewicz et al. 2002; Danilewicz et al. 2004). Nevertheless, molecular studies have been first published only in the last ten years with the description of differences in the mtDNA between two populations of franciscanas (Secchi et al. 1998). Subsequently, studies applying mtDNA and microsatellite techniques to investigate population structure, social ecology and phylogeny have been conducted by many authors (Hamilton et al. 2001; Ott 2002; Valsecchi and Zanelatto 2003; Lázaro et al. 2004). Despite these advances in the franciscana molecular biology, there are still no data on the species' karyotype. At genetic light, the knowledge about DNA organization and content of a species is one of the most important biological aspects concerned to species itself. The objective of this note is to describe the karyotype of the franciscana. Moreover, a comparison with the karyotype of the living cetacean families is provided.

Methods

Two newborn male franciscanas, live-stranded in northern Rio Grande do Sul, southern Brazil, in October and November 2006 were sampled before and after demise in this study. The blood collected before death did not result in an appropriately cell culture (data not shown). After their death, the animals were preserved at 4°C until processing. Corneal culture for cytogenetic preparations was obtained according to Duffield et al. (1991), with modifications. The eyes from each animal were harvested two days after its death and stored in plastic bags with attention against liquids surrounding them and they were maintained at 4°C for 3-5 days before use. Then the eyes were rinsed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) and the entire corneal layer was excised before the treatment, to prevent contamination, with 1 ml of normal culture medium (NM) consisting of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma), 3.7 g/l sodium bicarbonate, 2.5 g/l HEPES, 10% fetal calf serum (v/v), gentamicine (0.6 mg/ml) and Fungizone 2.5 µg/ml (Amphotericin B, Gibco). After 1 hour at 37°C, 5% CO₂, the corneas from both animals were minced in small pieces and transferred to 12 well cell culture plates (one piece by well) and were maintained at the same conditions but without Fungizone. After 24 hours the corneal pieces were washed with Hanks balanced salt solution-Ca²⁺ and Mg²⁺ free (HBSS-CMF, Sigma) and incubated with 0.25% trypsin-EDTA solution (Sigma) for 5 minutes to facility the detachment of cells from tissue. The released cells were centrifuged, resuspended in NM without Fungizone and transferred to another 12 wells cell culture plates without remained tissue. After the adherent cells reached confluence, they were transferred to 6 well cell culture plates (first passage). The culture was expanded to 25 cm² bottle.

The karyotype was prepared from the 3rd to the 5th passages to avoid possible aneuploidy events induced by long-term culture maintenance. Metaphase cells were collected by the addition of colchicine 0.1 µg/ml for 2 hours at 37°C. Cells were resuspended using 0.075 M KCl hypotonic solution for 10 minutes at 37°C and fixed in ethanol-glacial acetic acid solution (3:1). From each preparation a minimum of 15 chromosome spreads were analyzed to establish the diploid numbers.

GTG- and CBG-bands were performed according to the methods of Seabright (1971) and Sumner (1973) respectively. Four complete sets of chromosomes from each individual were measured for relative total length and arm ratios were computed. The numbers of autosomal

arms was designed as FNa. The photomicrographs were obtained using FUJI Neopan® ISO 100 under a Zeiss microscope. The karyotype groups were assembled in a fashion similar to the published karyotype for the *Inia geoffrensis* (Hsu and Benirschke 1967) and the chromosome group classification followed Levan et al. (1964).

In order to provide a figure of the evolution of karyotype pattern in cetaceans, information on the karyotype was collated by the compilations presented by Arnason (1974) and O'Brien et al. (2006) and applied to the complete cetacean phylogeny proposed by Price et al. (2005). In this comparison, the gray whale (*Eschrichtius robustus*) was nested together with the other balaenopterids, since the support for a monophyletic clade comprising the traditional families Eschrichtiidae and Balaenopteridae is considered high (Price et al. 2005).

Results

The modal diploid and autosomal arm numbers of *P. blainvillei* were 44 and 74 respectively. The karyotype has sixteen large to small bi-armed and five median and small acrocentric pairs (Figures 1 and 2). The sex pair is metacentric, the X chromosome being median (between pairs 10 and 11) and the Y is the smallest chromosome as expected from mammal karyotypes. It was possible to identify all chromosomes pairs from one franciscana using G-banding (Figure 1). As to compared with other cetaceans, franciscana's karyotype possesses large amounts of C-heterochromatin and showed heteromorphism between homologous chromosomes (Figure 1 box B). The C-bands were detected in the terminal regions in the short arms of the chromosomes pairs one to nine (in the long arm of pair five) and in the proximal regions in the long arm of pairs two and seven, and in the pericentromeric regions of the all acrocentrics (Figures 1 and 3). In the X chromosome the C-band was observed in the terminal region. This banding was not detected in pairs 11 to 16 and chromosome Y.

Discussion

The order Cetacea is currently recognized to contain about 90 species divided in 14 families: Balaenidae (right whales), Neobalaenidae (pygmy right whale), Eschrichtiidae (gray whale), Balaenopteridae (rorqual whales), Physeteridae (sperm whale), Kogiidae (pygmy and dwarf sperm whales), Platanistidae (Ganges and Indus river dolphins), Ziphiidae (beaked

whales), Lipotidae (baiji), Pontoporiidae (franciscana), Iniidae (Amazon river dolphin), Monodontidae (beluga and narwhal), Delphinidae (dolphins and small toothed whales) and Phocoenidae (porpoises) (Rice 1998). Cetacean karyotypes range from $2n=42$ to $2n=44$, with a clear prevalence of the last pattern (Arnason, 1974). The karyotype of two cetacean families - Neobalaenidae and Platanistidae - has never been reported.

The phylogenetic and cytogenetic data compiled in this study presented in Figure 4 may throw some light onto the karyotype evolution in cetaceans. The most parsimonious hypothesis is that the ancestral character state in the group is the diploid number 42. An extra chromosome pair appeared independently twice along the cetacean evolution, once in the suborder Odontoceti and once in the suborder Mysticeti (positions 4 and 5, respectively, in Figure 4). It would be interesting to investigate the karyotype of the family Platanistidae in order to corroborate the hypothesis that the extra-pair of chromosomes in the toothed whales appeared in position 4 of the phylogeny. Otherwise, the diploid number 44 would have evolved from position 3, and a reversion of this character state would have occurred in the family Ziphiidae.

Opportunities for sampling live franciscanas and to obtain quality tissues for cell cultures are very rare. The dolphins are seldom seen alive and are not kept in captivity. In this sense, the technique utilized in our study proved to be useful as an alternative in cytogenetic studies of a species that is not suitable to achieve samples from live animals, especially those whose sample processing is limited by distance between the collecting site and laboratory. We are aware that the cytogenetic data presented here are limited since they are restricted only to two animals, and may be refined in further studies. Nevertheless, as stated before, in light of the scarcity of opportunities to sample franciscanas and due to the lack of knowledge on its karyotype, it is significant to be presented. Moreover, the information presented here may be useful for future genetic mapping projects for the franciscana.

References

- Arnason U, 1974. Comparative chromosome studies in Cetacea. *Hereditas*. 77: 1-36.
- Crespo EA, Harris G, González R, 1998. Group size and distribution range of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. *Mar Mam Sci*. 14 (4): 845-849.
- Danilewicz D, Rosas F, Bastida R, Marigo J, Muelbert M, Rodriguez D, Brito Jr JL, Ott PH, Caon G, Secchi ER, 2002. Report on the working group on biology and ecology. *LAJAM*. (1): 25-42.
- Danilewicz D, Claver JA, Pérez Carrera AL, Secchi ER, Fontoura NF, 2004. Reproductive biology of male franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) (Mammalia: Cetacea) from Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Fish Bull*. 102 (4): 581- 592.
- Danilewicz, D, 2007. A toninha, *Pontoporia blainvillei* (Mammalia: Cetacea), no litoral norte do Rio Grande do Sul: mortalidade acidental em redes de pesca, abundância populacional e perspectivas para a conservação da espécie. PhD Thesis. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Brazil). 108pp.
- Duffield DA, Chamberin-Lea J, Sweeney JC, Odell DK, Asper ED, Gilmartin WG, 1991. Use of corneal cell culture for R-band chromosome studies on stranded cetaceans. *NOAA Tech Rep NMFS*. 98: 91-100.
- Hamilton H, Caballero S, Collins AG, Brownell RL Jr., 2001. Evolution of river dolphins. *Proc R Soc Lond B*. 268: 549-556.
- Hsu TC, Benirschke K, 1967. *An Atlas of mammalian chromosomes*. Springer-Verlag (NY).
- IUCN, 2007. Red List of Threatened Species: A Global Species Assessment. *Pontoporia blainvillei* ((Rio Grande do Sul/Uruguay subpopulation). (Accessed December, 2007). Available from <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/41761/all>
- Lázaro M, Lessa EP, Hamilton H, 2004. Geographic genetic structure in the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). *Mar Mam Sci*. 20:201–214
- Levan A, Fredga K, Sandberg A, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52:201-220.
- O'Brien SJ, Menninger JC, Nash WG, 2006. *Atlas of Mammalian Chromosomes*. Wiley-Liss.

- Ott, PH, 2002. Diversidade genética e estrutura populacional de duas espécies de cetáceos do Atlântico Sul Ocidental: *Pontoporia blainvillei* e *Eubalaena australis*. Ph.D. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 142pp.
- Ott PH, Secchi ER, Moreno IB, Danilewicz D, Crespo EA, Bordino P, Ramos R, Di Benedetto AP, Bertozzi C, Bastida R, Zanelatto R, Perez J, Kinas PG, 2002. Report of the working group of fishery interactions. *Lajam* (special issue). 1 (1): 55-64.
- Pinedo MC, Hohn A, 2000. Growth layer patterns in teeth from the franciscana, *Pontoporia blainvillei*: developing a model for precision in age estimation. *Mar Mam Sci*. 16 (1): 1-27.
- Price, SA, Bininda-Emonds, ORP, Gittleman, JL, 2005. A complete phylogeny of the whales, dolphins and even-toed hoofed mammals (Cetartiodactyla). *Biol Rev*. 80: 445-473.
- Rice D, 1998. *Marine Mammals of the world – Systematics and Distribution*. Special Publication No. 4. The Society for Marine Mammalogy. Allan Press. Lawrence, KS. USA. 231 pp.
- Secchi ER, Wang JY, Murray BW, Rocha-Campos CC, White BN, 1998. Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Can J Zool*. 76:1622–1627
- Secchi ER, Ott PH, Danilewicz D, 2003. Effects of fishing bycatch and the conservation status of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. In Gales N, Hindell M, Kirkwood R (ed). *Marine Mammals: Fisheries, Tourism and Management Issues*. CSIRO Publishing. Collingwood. Australia, pp. 174-191.
- Seabright M, 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 2: 971-972.
- Siciliano S, Di Benedetto AP, Ramos RMA, 2002. A toninha, *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea, Pontoporiidae), nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, costa sudeste do Brasil: caracterizações dos habitats e fatores de isolamento das populações. *B Museu Nac Zoo*. 476:1-15.
- Sumner AT, 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res*. 75: 304-306.

Valsecchi E, Zanelatto RC, 2003. Molecular analysis of the social and population structure of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*): conservation implications. *J Cetacean Res Manage.* 5:69–75

Figure legends

Figure 1. Chromosomal composition of franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). a) At left position: Giemsa staining, central: G-band and right: C-band. b) Evidence of heteromorphism between homologous chromosomes (pair one). Three different metaphase plates from the same individual were used.

Figure 2. Representative Giemsa stained karyotype of franciscana (*Pontoporia blainvillei*) (individual number 1).

Figure 3. Metaphase plate C-banded of franciscana (individual number 2). Arrows indicating the heterochromatin position.

Figure 4. Phylogenetic relationships of extant cetacean families, according to Price et al., (2005). Black branches indicate diploid number 44 and grey branches indicate diploid number 42. Dashed grey branches indicate families with no information on karyotype

Tables

Table 1. Means arm ratios of franciscana, *Pontoporia blainvillei*, based on measurements from four metaphase cells from each animal. Acrocentric pairs are not assigned and measured in this table. Groups of bi-armed chromosomes followed Levan et al. (1964) classification.

Groups	Assigned Chromosome	Relative mean length	Mean <i>q/p</i> arm ratio
Submetacentric	1	18.70	2.25
	2	15.29	2.77
	3	13.96	3.18
	4	12.33	2.76
	5	12.07	2.00
	6	11.17	2.27
	7	10.40	2.35
	8	9.57	1.93
	9	8.51	1.86
Metacentric	10	7.53	1.25
	11	7.28	1.60
	12	6.60	1.23
	13	6.12	1.34
	14	5.76	1.20
	15	5.20	1.10
	16	5.05	1.19
Sex chromosome	X	7.42	1.31
	Y	na	na

Figures

Figure 1

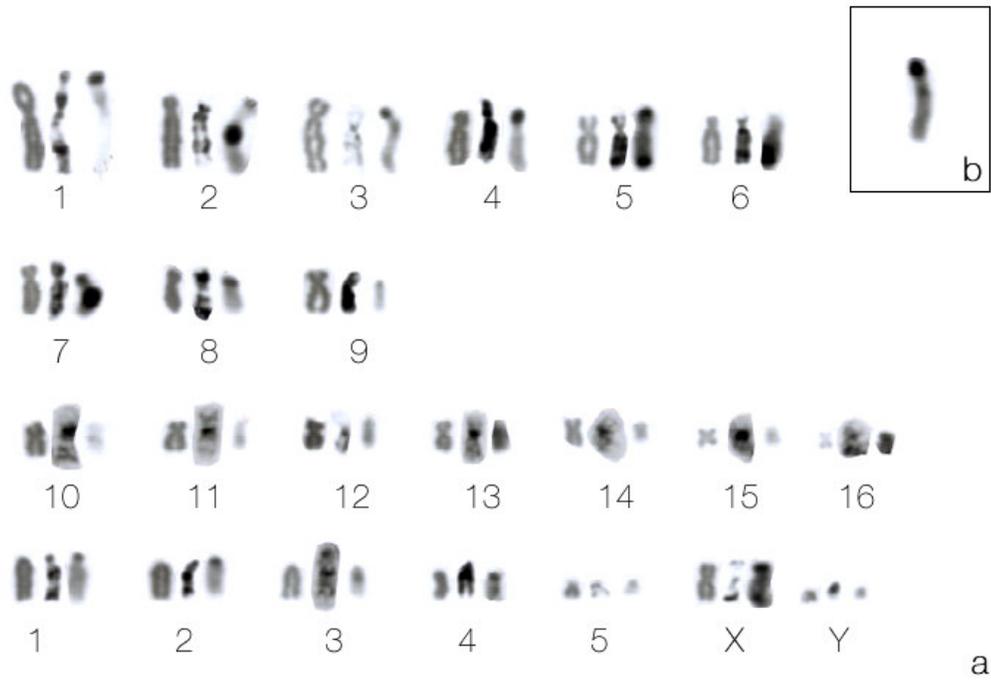


Figure 2

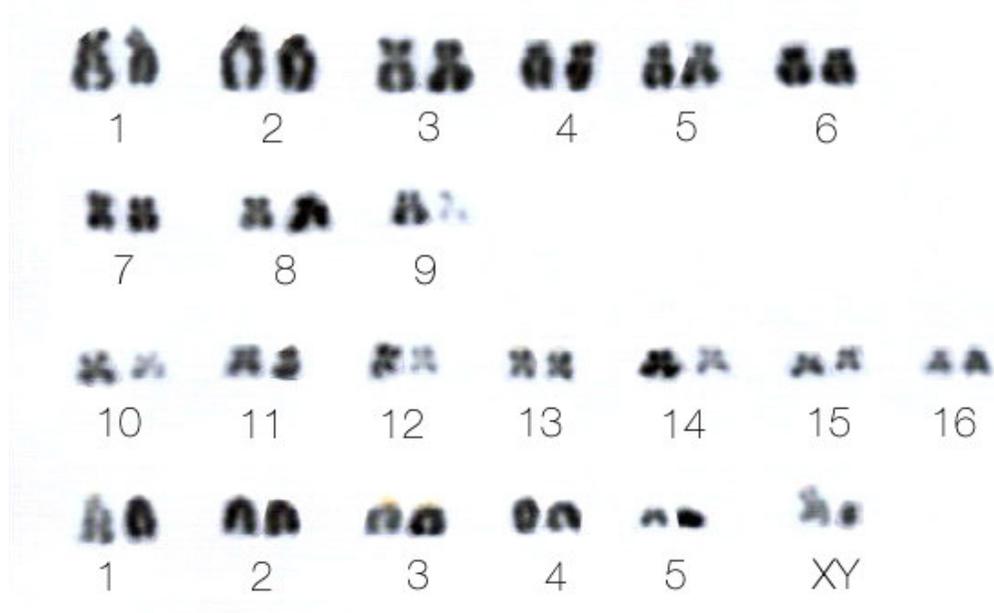
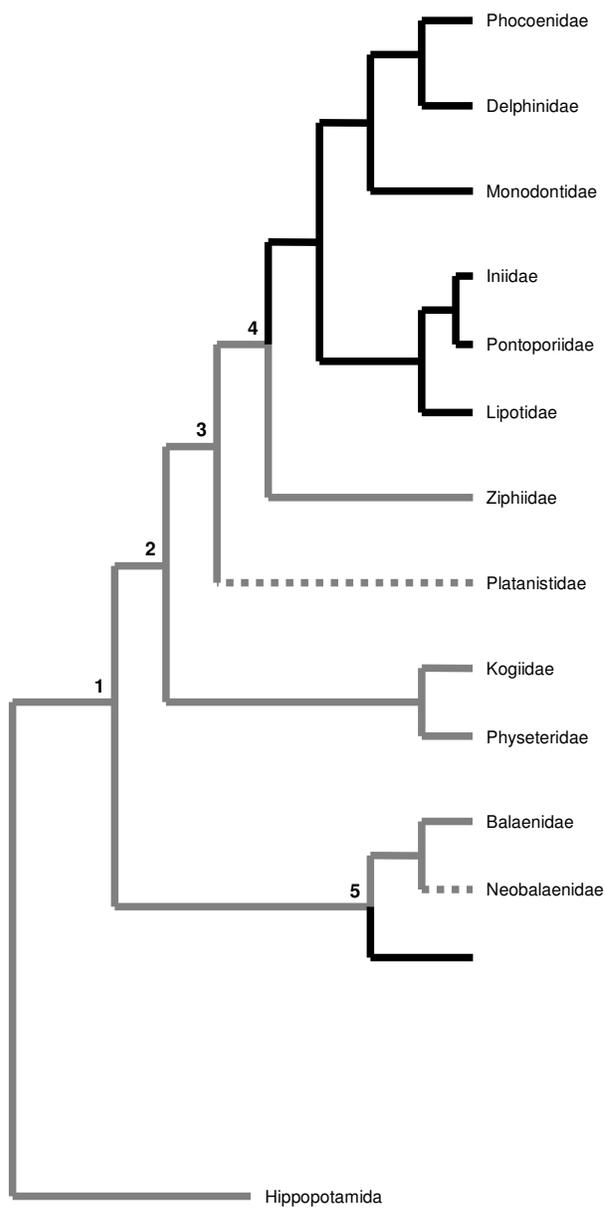


Figure 3



Figure 4



5. Referências bibliográficas

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. Cellular and molecular immunology. Pennsylvania, 4 Ed., W.B. Saunders Company.
- Acevedo-Whitehouse K, Gulland F, Greig D, Amos W. 2003. Disease susceptibility in California sea lions. *Nature*, 422:35.
- Acevedo-Whitehouse K & Cunningham AA. Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? *TRENDS in Ecology and Evolution*, 21:432-438.
- Amos BD. 1986. Recollections of Dr. Peter Gorer. *Immunogenetics*, 24:341-344.
- Andrade A, Pinedo MC, Pereira JJ. 2000. As franciscanas do sul do Brasil, Uruguai e Argentina constituem distintos estoques? Anais do terceiro encontro sobre a coordenação de pesquisa e manejo da franciscana (*Pontoporia blainvillei*) no Atlântico Sul. UNEP/CMS. Argentina.
- Árnason U, Gullberg A, Janke A. 2004. Mitogenomic analyses provide new insights into cetacean origin and evolution. *Gene*, 21:112-120.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410.
- Aznar FJ, Balbuena JA, Raga JA. 1994. Helminth communities of *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) in Argentinean waters. *Canadian Journal Zoological – Revue Canadienne Zool*, 72:702-706.
- Aznar FJ, Raga JA, Corcuera J, Monzon F. 1995. Helminths as biological tags for franciscana (*Pontoporia blainvillei*)(Cetacea, Pontoporiidae) in Argentinean and Urugayan waters. *Mammalia*, 59:427-435.
- Baker SC, Vant MD, Delabout ML, Lento GM, O'Brien SJ, Yuhki N. 2006. Diversity and duplication of DQB and DRB-like genes of the MHC in baleen whales (suborder: Mysticeti). *Immunogenetics*, 58:283-296.
- Bernardes AT, Machado ABM, Rylands AB. 1989. Fauna brasileira ameaçada de extinção. Fundação Biodiversitas para a Conservação da Diversidade Biológica, Belo Horizonte.
- Bertozi C & Zerbini AN. 2002. Incidental mortality of franciscana (*Pontoporia Blainvillei*) in the artisanal fishery of Praia Grande, São Paulo State, Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 1: 153-160.
- Bielec PE, Riggs PK, Womack JE, Busbee DL. 1997. A high resolution GBG-banded karyotype of the atlantic bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*: generation of an ideogram, and NOR localization by fluorescenced in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 78:6-11.
- Bodmer WF. 1972. Evolutionary significance of the HL-A system. *Nature*, 237:139-145.

- Bonfield JK, Smith KF, Staden R. 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, 24:4992-4999
- Bowen L, Aldridge BM, Gulland F, Woo J, Van Bonn W, DeLong R, Stott JLS, Johnson ML. 2002. Molecular characterization of expressed DQA and DQB genes in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics*, 54:332-347.
- Brown M, Kraus SD, Gaskin DE. 1991. Reaction of North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*) to skin biopsy sampling for genetic and pollutant analysis. *IWC Special issue*, 13:81-89.
- Brownell RL Jr. 1984. Review of reproduction in platanistid dolphins. Report of the International Whaling Commission (Special Issue), 6: 149-158.
- Cassens I, Vicario S, Waddell V, Balchowsky H, Van Belle D, Ding W, Fan C, Mohan RS, Simões-Lopes P, Bastida R, Meyer A, Stanhope M, Milinkovitch M. 2000. Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages. *Proceedings of National Academie of Science USA*, 21:11343-11347.
- Cooke JG, Rowntree VJ, Payne R. 2001. Estimates of demographic parameters for southern right whales (*Eubalaena australis*) observed of Peninsula Valdes, Argentina. *Journal of Cetacean Research and Management*, 2:125-132.
- Cooper S, Adams EJ, Wells RS, Walker CM, Parham P. 1998. A major histocompatibility complex class I allele shared by two species of chimpanzee. *Immunogenetics*, 47:212-217.
- Cummings W. 1985. Right whales *Eubalaena glacialis* (Müller, 1776) and *Eubalaena australis* (Desmoulins, 1822). Em: *Handbook of marine mammals*, Volume 3. Academic Press Inc. London.
- Crespo EA, Harris G, Gonzales R. 1998. Group Size and distributional range of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. *Marine Mammal Science*, 14(4): 845-849.
- Cutrer AP & Lacey EA, 2007. Trans-species polymorphism and evidence of selection on class II MHC loci in tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Immunogenetics*, 59: 937-948.
- Danilewicz D. 2000. Biologia reprodutiva e padrões de uso de habitat da toninha, *Pontoporia blainvillei* (Mammalia, Cetacea) no litoral do Rio Grande do Sul, Sul do Brasil. Dissertação de Mestrado. Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Danilewicz D & Oliveira L. 2003. Cetáceos. Em: CS Fontana, GA Bencke & RE Reis (Eds.), *Livro Vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul*. Pp. 535-545. Edipucrs Porto Alegre.
- Danilewicz D. 2003. Reproduction of female franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 2: 67-78.

- Danilewicz D. 2007. A toninha, *Pontoporia blainvillei* (Mammalia: Cetacea), no litoral norte do Rio Grande do Sul: mortalidade acidental em redes de pesca, abundância populacional e perspectivas para a conservação da espécie. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Brazil).
- Dawbin WH. 1986. Right whales caught in waters around south eastern Australia and New Zeland during the nineteenth and early twentieth centuries. IWC Special issue, 10:261-267.
- Di Benedetto APM & Ramos RMA. 2001. Biology and conservation of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in the north of Rio De Janeiro State, Brazil. Journal of Cetacean Research and Management, 3: 185-192.
- Di Benedetto APM. 2003. Interactions between gillnet fisheries and small cetaceans in northern Rio de Janeiro, Brazil: 2001-2002. The Latin American Journal of Aquatic Mammals, 2:79-86.
- Dobson FS, Chesser RK, Hoogland JL, Sugg DW, Foltz DW. 2004. The influence of social breeding groups on effective population size in black-tailed prairie dogs. Journal of Mammalogy, 85:58-66.
- Du Pasquier T. 1986. Catch history of French Right Whaling mainly in the south Atlantic. IWC Special issue, 10:269-274.
- Gauderi S, Dawkins RL, Habara K, Kulski J, Gojobori T. 2000. SNP profile within the human major histocompatibility complex reveals an extreme and interrupted level of nucleotide diversity. Genome Research, 10:1579-1586.
- Goodstadt L, Ponting CP. 2001. CHROMA: consensus-based coloring of multiple alignments for publication. Bioinformatics, 17, 845-846.
- Gyllensten UB, Lashakari D, Erlich HA. 1990. Allelic diversification at the class II DQB locus of the mammalian major histocompatibility complex. Proceedings of National Academie of Science USA, 87: 1835-1839.
- Hamilton PK, Knowlton AR, Marx MK, Kraus SD. 1998. Age structure and longevity in north Atlantic right whales. Marine Ecology Progress Series, 171:285-292.
- Hamilton H, Caballero S, Collins AG, Brownell Jr RL. 2001. Evolution of river dolphins. Proceedings of the Royal Society of London, 268:549-558.
- Harding CV. 1997. MHC Molecules and Antigen Processing. R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA.
- Heinzelmann LS. 2001. Variabilidade genética no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em três espécies de mamíferos marinhos da costa do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

- Hill AV, Kwiatkowski D, McMichael A, Greenwood BM, Bennet WS. 1992. Maintenance of MHC polymorphism. *Nature*, 355:402-403.
- Hoelzel AR, Stephens J, O'Brien SJ. 1999. Molecular genetic diversity and evolution at the MHC DQB locus in four species of pinnipeds. *Molecular Biology and Evolution*, 16(5): 611-618.
- Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot Jr C, Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S. 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nature Genetics*, 5: 889-899.
- Huges AL & Nei M. 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*, 335: 167-170.
- Huges AL & Nei M. 1989. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proceedings of National Academie of Science USA*, 86: 958-962.
- IBAMA, 2001. Mamíferos Aquáticos do Brasil: Plano de Ação. Edições IBAMA-Ministério do Meio ambiente, Brasília.
- IUCN, 2006. IUCN Red List of Threatened Species: A Global Species Assessment. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge. *Pontoporia blainvillei* (Rio Grande do Sul/Uruguay subpopulation). Disponível em <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/41761/all> (acessado em dezembro de 2007).
- IWC, 2001. Report of the Workshop on the Comprehensive Assessment of Right Whales: A Worldwide Comparison. *J. Cetacean Res. Manage. (Special Issue) 2*, 1–35.
- Janeway CA & Travers P. 1997. *Imunobiologia. O sistema imunológico na saúde e na doença*. 2. Ed. Artes Médicas, Porto Alegre.
- Jordan WC & Bruford W. 1998. New perspectives on mate choice and the MHC. *Heredity*, 81:127-133.
- Kaliszewska Z, Seger J, Rowntree VJ, Barco S, Benegas R, Best P, Brown MW, Brownell Jr RL, Carribero A, Harcourt R, Knowlton AR, Marshall-Tilas K, Patenaude NJ, Rivarola M, Schaeff CM, Sironi M, Smith WA, Yamada TK. 2005. Population histories of right whales (Cetacea: *Eubalaena*) inferred from mitochondrial sequences diversity and divergences of their whale lice (Amphipoda: *Cyamus*). *Molecular Ecology*, 14:3439-3456.
- Kasuya T & Brownell RL Jr. 1979. Age determination, reproduction and growth of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. *Scientific Report of the Whales Research Institute*, 31: 45-67.
- King DP, Aldridge BM, Kennedy-Stoskopf S, Stott JL. 2001. Immunology. Em: *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. 2nd Edition. Eds. Leslie Dierauf & Frances Gulland. CRC Press. 1063p.

- Kumánovics A, Takada T, Lindahl KF. 2003. Genomic organization of the mammalian MHC. *Annual Review of Immunology*, 21:629-657.
- Kinas PG. 2002. The impact of incidental kills by gillnets on the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in southern Brazil. *Journal of Marine Science*, 70:409-421
- Lázaro M, Lessa EP, Hamilton H. 2004. Geographic genetic structure in the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). *Marine Mammal Science*, 20(2): 201-214.
- Lawlor DA, Ward FE, Ennis PD, Jackson AP, Parham P. 1988. HLA-A and B polymorphisms predate the divergence of humans and chimpanzees. *Nature*, 335: 268-271.
- Lichter A. 1992. *Huellas em la Arena, Sombras em el Mar*. Terra Nova, Buenos Aires.
- Martínez-Agüero M, Flores-Ramírez S, Ruiz-García M. 2006. First report of Major Histocompatibility complex class II loci from the Amazon pink river dolphin (genus *Inia*). *Genetics and Molecular Research*, 5(3):421-431.
- Medawar PB. 1961. Peter Alfred Gorer: 1907-1961. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society*, 7:94-109.
- Meyer D & Thomson G. 2001. How selection shapes variation of the Human Major Histocompatibility Complex: A Review. *Annals of Human Genetics*, 65: 1-26.
- Meyer D, Single RM, Mack SJ, Erlich HA, Thomson G. 2006. Signatures of demographic history and natural selection in the human Major Histocompatibility Complex loci. *Genetics*, 173: 2121-2142.
- MHC sequencing consortium, The. 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401:921-923.
- Moreira LM & Sicilian S. 1991. Northward extension range for *Pontoporia blainvillei*. *Livro de resumos da 9th Biennial Conference on Biology of Marine Mammals*. Chicago, USA.
- Moreno IB, Ott PH, Danilewicz DS. 1997. Análise preliminar do impacto da pesca artesanal costeira sobre *Pontoporia blainvillei* no litoral norte do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. Em: Pinedo MC & Barreto A. (Eds.), *Anais do segundo encontro sobre a coordenação de pesquisa e manejo da franciscana (Pontoporia blainvillei) no Atlântico Sul*. Rio Grande, Brasil.
- Murray BW, Malik S, White BN. 1995. Sequence variation at the Major Histocompatibility Complex Locus DQB in beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Molecular Biology and Evolution*, 12(4): 582-593.
- Murray BW. 1997. Major histocompatibility complex class II sequence variation in cetaceans: DQB and DRB variation in beluga (*Delphinapterus leucas*) and DQB variation in North Atlantic

- right whales (*Eubalaena glacialis*). Ph.D. Thesis. McMaster University, Hamilton, Ontário, Canadá.
- O'Brien SJ, Wildt DE, Bush M. 1986. The cheetah in genetic peril. *Scientific American*, 245(5): 68-76.
- Ohta T. 1991. Evolution of the multigene family: a case of dynamically evolving genes at major histocompatibility complex. Em: *Evolution of Life, Fossils, Molecules and Culture*. Springer-Verlag, Tokyo.
- Ott PH. 1998. Análise das capturas acidentais de *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'orbigny, 1844) (Cetacea, Pontoporiidae) nas comunidades pesqueiras do litoral norte do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. Dissertação de mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre..
- Ott PH. 2002. Diversidade genética e estrutura populacional de duas espécies de cetáceos do Atlântico Sul Ocidental: *Pontoporia blainvillei* e *Eubalaena australis*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Ott PH, Secchi ER, Moreno IB, Danilewicz D, Crespo EA, Bordino P, Ramos R, Di Benedetto AP, Bertozzi C, Bastida R, Zanelatto R, Perez JE, Kinas PG. 2002. Report of the working group on fishery interactions. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 1: 55-64.
- Page RDM & Holmes EC. 1998. *Molecular Evolution A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science, Malden, MA.
- Palazzo JT & Flores PAC. 1999. Plano de ação para a conservação da baleia franca, *Eubalaena australis*, no estado de Santa Catarina, IWC/Brasil.
- Patenaude NJ, Portway VA, Schaeff CM, Bannister JL, Best PB, Payne RS, Rowntree VJ, Rivarola M, Baker CS. 2007. Mitochondrial diversity and population structure among southern right whales (*Eubalaena australis*). *Journal of Heredity*, 98(2): 147-157.
- Paterson S, 1998. Evidence for balancing selection at the major histocompatibility complex in a ree-living ruminant. *The American Journal of Human Genetics*, 89:289-294.
- Payne R. 1986. Long term behavioral studies of the southern right whale (*Eubalaena australis*). IWC Special issue, 10:161-168.
- Pinedo MC, Praderi R, Brownell Jr RL. 1989. Review of the biology and status of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. Em: Perrin WF, Brownell RL, Zhou Kaya, Liu Jiankang: *Biology and Conservation of River Dolphins*, 46-51.
- Pinedo MC. 1991. Development and variation of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. Tese de mestrado, Universidade da Califórnia, Santa Cruz, USA.

- Pinedo MC & Polachek T. 1999. Trends in Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) stranding rates in Rio Grande do Sul, Southern Brazil (1979-1998). *Journal of Cetacean Research and Management*, 1(2):179-189.
- Praderi R, Pinedo MC, Crespo EA. 1989. Conservation and management of *Pontoporia blainvillei* in Uruguay, Brazil and Argentina. Em: Perrin WF, Brownell RL, Zhou Kaya, Liu Jiankang. *Biology and Conservation of River Dolphins*:1-22.
- Praderi R. 1997. Análisis comparativo de estadísticas de captura y mortalidad incidental de *Pontoporia blainvillei* en Uruguay durante 20 años. Em: MC Pinedo & AS Barreto (Eds.). *Anais do 2o. Encontro sobre a coordenação de pesquisa e manejo da franciscana*. Pp. 42-53 Ed. Furg, Rio Grande.
- Rached LA, Mcdermott Mf, Pontarotti P. 1999. The MHC Big Bang. *Immunological Review*,167:33-45.
- Rosas FCW, Monteiro-Filho ELA & Oliveira MR. 2002. Incidental catches of franciscana (*Pontoporia blainvillei*) on the southern coast of São Paulo state and the coast of Paraná state, Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 1: 161-167
- Saitou N & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.
- Satta Y, O' Huigin C, Takahata N, Klein J. 1994. Intensity of natural selection at the major histocompatibility complex loci. *Proceedings of National Academie of Science USA*, 91: 7184-7188.
- Secchi ER, Zerbini AN, Bassoi M, Dalla Rosa L, Moller LM, Rocha-Campos C. 1997. Mortality of franciscanas, *Pontoporia blainvillei*, in coastal gillneting in southern Brazil: 1994-1995. *Reports of the International Whaling Commission*, 47: 653-658.
- Secchi ER, Wang JY, Murray BW, Rocha-Campos CC, White BN. 1998. Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic location in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Canadian Journal of Zoology*, 76(9): 1622-1627.
- Secchi ER & Ott PH. 2000, A profundidade como um fator determinante da distribuição de toninhas, *Pontoporia blainvillei*, conforme indicado pelos índices de CPUE. Pp. 55-7. Em: Unep/Cms (Ed.) *Report of the third Workshop for coordinated research and conservation of the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the southwestern Atlantic, 26-28 November 1997, Buenos Aires, Argentina*. Unep/Cms, Bonn. 112pp.

- Secchi ER, Ott PH & Danilewicz DS. 2003. Effects of fishing by-catch and conservation status of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. Em: N Gales, M Hindell & R Kirkwood (Eds.), Marine Mammals: Fisheries, Tourism and Management Issues. Pages 174-191, Csiro Publishing, Collingwood, Australia.
- Secchi ER. 2006. Modelling the population dynamics and viability analysis of franciscana (*Pontoporia blainvillei*) and hector's dolphins (*Cephalorhynchus hectori*) under the effects of bycatch in fisheries, parameter uncertainty and stochasticity. Tese de doutorado. University of Otago. NZ.
- Slade RW. 1992. Limited MHC Polymorphism in the Southern Elephant Seal: Implications for MHC Evolution and Marine Mammal Population Biology. Proceedings of Royal Society of London. 249: 163-171.
- Stock A D. 1981. Chromosomal variation and constitutive heterochromatin in three porpoise species (genus *Stenella*). Cytogenetic and Cells Genetics, 31:91-100.
- Tamura K & Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution, 10:512-526.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596-1599. (disponível em PDF em <http://www.kumarlab.net/publications>)
- Taylor, W., 1968. The classification of amino acid conservation. Journal of Theoretical Biology, 119, 205-218
- Tormosov DD, Mikhalev YA, Best PB, Zemsky VA, Sekiguchi K, Brownell Jr RL. 1998. Soviet catches of southern right whales, *Eubalaena australisi*, 1951-1971; biological data and conservation implications. Biological conservation, 86:185-197.
- Trowsdale J, Groves V, Arnason A. 1989. Limited MHC Polymorphism in whales. Immunogenetics, 29: 19-24.
- Yang G, Yan J, Zhou K, Wei F. 2005. Sequence variation and gene duplication at MHC DQB loci of Baiji (*Lipotes vexillifer*) a chinese river dolphin. Journal of Heredity, 96:310-317.
- Yeager M & Huges AI. 1999. Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination and convergent evolution. Immunological Review, 167:45-58.
- Yukhi N & O' Brien SJ. 1990. DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. Proceedings of National Academy of Science USA, 87: 836-840.

- Van Bresseem MF, Jepson P, Barret T. 1998. Further insight on the epidemiology of cetacean morbillivirus in the northeastern Atlantic. *Marine Mammal Science*, 14:605-613.
- Weber DS, Stewart BS, Schienman J, Lehman N. 2004. Major histocompatibility complex variation at three class II loci in the northern elephant seal. *Molecular Ecology*, 13:711-718.
- Zabka T & Romano T. 2003. Distribution of MHCII (+) cells in skin of the Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): an initial investigation of dolphin dendritic cells. *The Anatomical Research Part A*. 273a:636-647.

6. Considerações finais

O presente trabalho analisou a variabilidade genética de duas espécies de cetáceos de ocorrência no litoral brasileiro, a toninha e a baleia-franca-austral, utilizando como marcador molecular a porção variável de um gene envolvido em resposta imunológica (genes do MHC). Os genes de MHC são comumente utilizados em diferentes espécies de vertebrados para esclarecer questões evolutivas intrínsecas a este sistema genético como o papel da seleção natural sobre essa região genômica e questões de variabilidade específicas das espécies onde são analisados. Utilizamos metodologias baseadas em biologia molecular e celular (amplificação da região genômica, clonagem, seqüenciamento, análise de expressão, cultivo celular) para identificar níveis de variabilidade dentro das seqüências geradas para ambas as espécies, além de estabelecermos o cultivo celular a partir da córnea de toninha para a obtenção do cariótipo da espécie.

Os níveis de variabilidade genética para o gene DQB em toninha são baixos (tanto em número de alelos quanto em número de sítios variáveis dentro das seqüências). A espécie não apresenta este gene duplicado. Em contrapartida, variabilidade detectada para baleia-franca-austral é alta em relação à toninha, e parece estar em acordo com os níveis de variação detectados para outras espécies de cetáceos a partir de marcadores moleculares do tipo microssatélites e DNA mitocondrial. O número de alelos identificados em baleia-franca-austral é alto e corrobora a sugestão de que a espécie possui mais de uma cópia deste gene. Foram identificados 6 alelos para toninha, sendo um deles (*Pobl-DQB*1*) prevalente ao longo da distribuição da espécie. Foram identificados 17 alelos para baleia-franca-austral com uma distribuição mais homogênea entre os indivíduos amostrados.

Há compartilhamento de haplótipos entre as três regiões amostradas dentro da distribuição geográfica de toninha, mas isto não descarta as evidências de isolamento da população do Rio de Janeiro. Os alelos encontrados nesta população e compartilhados entre as demais regiões amostradas podem ter sido fixados antes do isolamento da espécie.

A metodologia de PCR-SSCP, que havia sido utilizada anteriormente para detectar variação nesta região do gene, não é eficiente para este tipo de avaliação. Os alelos pressupostos por PCR-SSCP não foram confirmados em sua maioria por seqüenciamento. O seqüenciamento só é factível para este sistema a partir dos clones recombinantes.

Há evidências de seleção positiva para a variabilidade dentro desta região do genoma de ambas as espécies, como demonstrado pelas taxas de substituição não-sinônima prevalentes sobre as taxas de substituição sinônimas.

Há evidências de seleção para o gene DQB como demonstrado pelo compartilhamento de um alelo entre as duas espécies estudadas. É provável que este alelo tenha se fixado nas duas espécies antes da divergência entre as duas ordens: odontocetos e mysticetos. Entretanto, não se pode descartar outros mecanismos envolvidos no compartilhamento de seqüências gênicas, como o processo de convergência.

A detecção de expressão do gene DQB a partir das amostras de pele de toninha e baleia-franca-austral evidencia a funcionalidade do gene nestas espécies, bem como as características de funcionalidade das seqüências.

Algumas questões permanecem em aberto, como: uma vez que estas espécies estão sob um regime fisiológico bastante diverso em relação a outros mamíferos, como a seleção estaria atuando sobre os níveis de diversidade destas espécies? Como estes genes evoluíram em espécies tão distantes dos modelos comumente utilizados para responder a estas questões? O isolamento de seqüências completas destes genes (principalmente exons que fazem parte da fenda peptídica) e análise de evidências moleculares de seleção dentro e fora de sítios considerados importantes para a ligação ao peptídeo antigênico complementarariam os dados descritos no presente trabalho.

A utilização de tecido de animais recém mortos mostrou-se extremamente eficiente para o cultivo celular. Durante o processo de estabelecimento do cultivo da córnea, para fins citogenéticos, foi possível estabelecer protocolos de diferenciação celular (dados não mostrados) que criam perspectivas interessantes sobre o processo de diferenciação celular em organismos não modelos. Além disso, a caracterização dos genes de MHC nos cromossomos (organização, localização), complementando as informações sobre a evolução destes genes é uma das possibilidades de utilização dos cultivos celulares a partir dos protocolos estabelecidos no presente trabalho.