

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Variabilidade genética no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de três espécies de mamíferos marinhos da costa do Rio Grande do Sul.

Larissa Schemes Heinzemann

Orientadora Profa. Dra. Karen Luisa Haag

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, fevereiro de 2002.

“Ou nem sequer o tente, ou senão lança-te por completo a fazê-lo”
(Ovídio, Poeta Romano, 43 a.c.-17 d.c.)

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido realizado de maneira tão satisfatória para mim se eu não tivesse tido a oportunidade de contar com pessoas tão especiais colaborando comigo.

Eu tive a sorte de conhecer a Karen, que conduziu este trabalho de maneira exemplar, avaliando criticamente todos os passos a serem dados, dando-me a liberdade de tentar e tornando suave mesmo os momentos mais “árduos” na bancada. Karen flower, obrigada pela ousadia e coragem em abraçar este trabalho, que é para mim tão especial.

A parte experimental desta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, do Instituto de Biotecnologia da UFRGS. Neste local de intensa produção científica pude conhecer “os maravilhosos habitantes dos laboratórios 204 e 206”, como diria a Ane. E sou imensamente grata por todas as discussões científicas, por todo o conhecimento compartilhado e por todos os momentos de diversão que passamos juntos, e que não foram poucos.

Devo muito da satisfação em realizar este trabalho aos meus amigos Aline Zandonai, Ana Arend, André Dannenhauer, Anelise Volkweiss, Claudinha Nunes, Cristian Derois, Cristiano Bizarro, Gustavo Chemale, Jeferson Badaracco, Karina Monteiro, Leonardo Alves Jr., Marlise Ladvocat-Bartholomei Santos, Melissa Markoski e Veridiana Virgínio.

Quero agradecer ao Professor Arnaldo Zaha por me deixar tomar conta do campinho e pelas colocações sempre apropriadas à respeito do trabalho, e ao Professor Henrique Ferreira, que apesar dos esforços, não me convenceu a abandonar os mamíferos marinhos (Henrique, vai pescar!).

Entre tantos amigos, gostaria de fazer um agradecimento especial para aqueles que compartilharam comigo bancadas, *tips*, *eppendorfs*, sequenciamentos e, principalmente, bons momentos. Muito obrigada Marlise, minha amiga de todas as horas, por sua inesgotável paciência, inestimável capacidade de atender qualquer dúvida, em qualquer momento, sempre, e pelo exemplo. À Ana e ao Cristian, pela ajuda essencial naqueles momentos decisivos. À Anelise, por sua gigantesca energia positiva. À Claudinha pela incrível capacidade de fazer tudo ficar mais divertido. À Deise Potrich por toda ajuda e dedicação, e pelas palavras sempre animadoras e cheias de entusiasmo.

Devo muitíssimo ao Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS), pela disponibilidade das amostras, pela amizade, pelos monitoramentos sempre surpreendentes, pelo conhecimento, e por demonstrar na prática que boas idéias funcionam quando se trabalha com dedicação, ética e companheirismo. Aos amigos Daniel Danilewicz Schiavon, Glauco Caon, Ignacio Moreno, Larissa Oliveira, Márcio Martins e Paulo Ott, o meu agradecimento.

Quero agradecer especialmente à três grandes amigos: Ignacio, pela confecção do mapa mais bonito desta dissertação e pela foto incrível de lobinho; Paulo, o gato da genética, pela participação essencial na execução deste trabalho. Pelos conselhos valiosos, por me confiar grande parte de suas amostras, por tentar me ensinar a “zipar” um arquivo (sem sucesso), por ligar do Canadá só para bater um papinho básico de meia hora; À English Lari, pelas palavras de estímulo e pela disposição em ajudar, sempre com alegria.

Ao amigo Eduardo (Eduzinho) Secchi pelas amostras de toninha do litoral sul, pelas sugestões, pela amizade, pela confiança e por fazer o Dani acreditar que os cubanos conseguiam chegar nadando à Key West, quando ele mais precisou nadar em sua vida.

Ao pesquisador Ricardo Bastida, pelas amostras de toninha da Argentina e por suas sempre sábias e estimadas palavras. Às pesquisadoras Ana Paula Di Benedito e Renata Arruda Ramos, pelas amostras de toninha do Rio de Janeiro e colaboração.

Às amigas Ana Lauer Garcia, e sua incrível capacidade de manter a calma quando mais se precisa, Chirlei Klein, e sua incrível capacidade de não manter a calma quando mais se precisa, Gabriela Fernandez, por participar definitivamente da minha vida desde os tempos da preparação para a prova do mestrado, e torná-la a partir de então, muito mais divertida. Essa equipe foi decisiva nos momentos finais desta dissertação, e em time que está ganhando, não se mexe!

Aos amigos Elmo Antunes Cardoso e Ellen Mezzeck, por dar suporte logístico à execução deste trabalho, e sempre dar um jeitinho para que tudo funcionasse, mesmo quando o Elmo estava de mau humor. À Ellen pela tranqüilidade e ajuda naqueles momentos de pânico total.

À minha família, que compreendeu a necessidade da ausência nestes últimos dois anos, e mesmo sem entender muito bem que tanto eu fazia no laboratório, sempre me apoiou incondicionalmente, com muito orgulho. Sem nunca esquecer de ligar para avisar que estava passando na televisão alguma coisa sobre golfinhos. Obrigada!

À CAPES, pelo suporte financeiro.

Ao meu amor Daniel, que de alguma maneira está sempre perto de mim e do meu coração. Pelo amor que eu jamais imaginei que pudesse existir. E por todos os sonhos.

Cheers!

Resumo

O MHC (Major Histocompatibility Complex) é um sistema genético importante para a manutenção de espécies ameaçadas, uma vez que baixa variabilidade para locos MHC tem sido associada a uma menor capacidade de resposta a doenças e diminuição do sucesso reprodutivo. Deste modo, pesquisas sobre a variabilidade genética do MHC têm demonstrado ser bastante informativas em estudos populacionais voltados para aspectos referentes à conservação. No presente trabalho foi investigada a variabilidade genética do MHC para três espécies de mamíferos marinhos (toninha, baleia franca austral e lobo marinho sul-americano) do sul do Brasil, com intensa mortalidade provocada por atividades humanas atuais ou passadas. As amostras foram coletadas de animais mortos encalhados na costa, de animais capturados acidentalmente por barcos pesqueiros, e também através de um sistema de biópsia. A região variável do exon 2 do gene DQB do MHC foi amplificada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em 109 amostras de toninhas (Rio de Janeiro n=32, Rio Grande do Sul n=52, Argentina n=25), 35 amostras de lobo marinho sul-americano e 30 amostras de baleia franca austral, utilizando-se um par de *primers* heterólogos. O fragmento resultante de 172 pares de bases foi analisado quanto ao polimorfismo de seqüência através da técnica de SSCP (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples) em todas as amostras de toninha e de lobo marinho sul-americano e 14 amostras de baleia franca austral. Dificuldades associadas à amplificação resultaram em padrões de SSCP pouco informativos para as amostras de lobo marinho sul-americano e baleia franca austral. Todas as amostras de toninha apresentaram um padrão de pelo menos 4 bandas por indivíduo. As 4 bandas de um único indivíduo do Rio Grande do Sul foram seqüenciadas, tendo sido possível verificar que 2 seqüências relacionadas ao genes DQB estão sendo amplificadas com estes *primers*. Pelas análises de SSCP foi possível detectar ausência de variabilidade para as amostras de toninha provenientes do Rio de Janeiro e diferenciá-las da população da Argentina, que é polimórfica. A população do Rio Grande do Sul parece apresentar níveis intermediários de variação em relação

aos extremos da distribuição da espécie. Analisando as três populações amostradas, conclui-se que a espécie apresenta baixos níveis de variabilidade para o loco DQB, a exemplo do que é reportado para os genes de MHC de outros mamíferos marinhos.

Abstract

The Major Histocompatibility Complex (MHC) is an important genetic system for the endurance of endangered species, since a low genetic variability in MHC locus has been associated to a diminished response to diseases and low reproductive success. In this manner, researches on the MHC variability have produced important results in population genetic studies, mainly those related with conservation problems. At present project the genetic variability of the MHC in three marine mammal species (the franciscana dolphin, the southern right whale and the south american fur seal) with a current or historical intense human-induced mortality was investigated. The samples were achieved from dead animals stranded in the beach, animals incidentally caught by fishing vessels, and also through a biopsy system. The variable region of the exon 2 of the MHC DQB gene was amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, from 109 samples of franciscana (Rio de Janeiro n=32, Rio Grande do Sul n=52, Argentina n=25), 35 samples of south american fur seal and 30 samples of southern right whale. The polymorphism of the resulting fragment of 172 base pairs was analyzed using the SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) technique. The difficulties associated at amplification resulted in few informative SSCP patterns to southern right whale and south american fur seal samples. All the franciscana samples showed the pattern of at least four bands per individual. The four bands from one sample of Rio Grande do Sul were sequenced, allowed us to find out that two sequences related to DQB gene are being amplified with primers used in this survey. Low levels of variability were detected by SSCP to franciscana samples from Rio de Janeiro, being possible to distinguish them from the population from Argentina, which is polymorphic. The levels of variation to DQB genes in the three populations analyzed are low, according to the variation reported to MHC genes in other marine mammals.

Sumário

| | |
|---|-----|
| Agradecimentos..... | iii |
| Resumo..... | vi |
| <i>Abstract</i> | vii |
| Sumário..... | ix |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1 O Complexo Principal de Histocompatibilidade..... | 1 |
| 1.2 MHC e Polimorfismo..... | 5 |
| 1.3 Os genes DQB (DQ beta), mamíferos marinhos e um pouco sobre conservação..... | 7 |
| 1.4 <i>Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)</i> | 10 |
| 1.5 Apresentação das Espécies..... | 11 |
| 1.5.1 Toninha..... | 11 |
| 1.5.2 Baleia Franca Austral..... | 15 |
| 1.5.3 Lobo Marinho Sul-Americano..... | 17 |
| 2. Objetivos..... | 19 |
| 3. Material e Métodos..... | 20 |
| 3.1 Coleta de Material..... | 20 |
| 3.2 Extração de DNA..... | 21 |
| 3.3 <i>Primers</i> | 22 |
| 3.4 As reações de PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)..... | 23 |
| 3.5 SSCP..... | 24 |
| 3.6 Reamplificação do DNA..... | 27 |
| 3.7 Seqüenciamento..... | 28 |
| 3.8 Análises das Seqüências..... | 31 |
| 4. Resultados..... | 32 |
| 4.1 Otimização das reações de PCR..... | 32 |
| 4.2 Análises de SSCP..... | 33 |
| 4.3 Seqüenciamento..... | 37 |
| 5. Discussão..... | 40 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 5.1 Aspectos técnicos..... | 40 |
| 5.2 Aspectos biológicos..... | 45 |
| 6. Conclusões..... | 49 |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 50 |

1.Introdução

1.1 O Complexo Principal de Histocompatibilidade

A origem da imunologia como ciência está freqüentemente associada ao sucesso obtido por Edward Jenner, no final do século XVIII, em um experimento com o qual foi possível conferir proteção contra a varíola humana, uma doença com alta incidência neste período e freqüentemente fatal (Janeway & Travers, 1997; Abbas *et al.*, 2000). Este físico inglês batizou esse processo de “vacinação”, termo adotado até os dias de hoje para descrever a inoculação de agentes patológicos modificados ou não, em indivíduos sadios a fim de garantir proteção contra doenças. Entretanto, quando da realização destes experimentos, Jenner nada sabia acerca do agente etiológico da varíola ou mesmo do funcionamento do sistema imune. Apenas no século XIX foi demonstrada, por Robert Koch, a associação entre doenças infecciosas e presença de microorganismos patogênicos (Janeway & Travers, 1997).

Desde então, os processos imunológicos têm sido minuciosamente estudados, e um entendimento geral relativo ao funcionamento do sistema imune, leva em consideração a atuação de células capazes de responder, de modos diferentes, a substâncias estranhas ao organismo. Dentre estas, os linfócitos (linfócitos B e T) e seus produtos exercem o papel principal na resposta imune adaptativa (Abbas *et al.*, 2000).

Os linfócitos B são capazes de reconhecer antígenos (substâncias estranhas) na sua forma nativa, através de seus receptores de superfície celular (imunoglobulinas), e na fase efetora da resposta, secretar anticorpos. Entretanto, os linfócitos T só realizam o reconhecimento através de seus receptores (*T Cell Receptor*) e, conseqüentemente, a indução a uma resposta, quando os antígenos lhes são devidamente apresentados. A apresentação neste caso envolve moléculas de superfície celular 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).

Essas moléculas, conhecidas como moléculas do MHC, são codificadas por genes do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*), e carregam para a superfície celular, peptídeos processados no interior da célula, provenientes da internalização de antígenos (antígenos exógenos) ou de antígenos produzidos dentro da célula hospedeira (antígenos endógenos). A natureza e as vias de processamento dos antígenos (citossólica ou vesicular) definem a que classe de moléculas 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. 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).

A região dos genes de MHC em humanos (*Human Leukocyte Antigen*, HLA) está localizada no braço curto do cromossomo 6, sendo constituída de aproximadamente 4 000 kilobases (Kb) de DNA, com pelo menos 82 genes distribuídos em cerca de 2,5 unidades de mapa (Hedrick, 1994). 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 dos genes de MHC classe I contém locos que codificam as moléculas clássicas de MHC classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) enquanto que a região de classe II inclui locos 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). A organização destes genes pode ser vista na Figura 1.

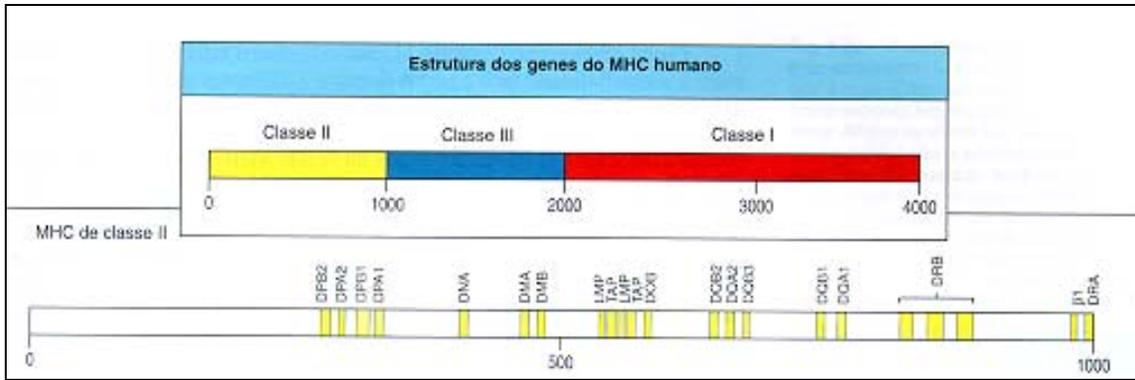


Figura 1. Representação dos genes de MHC classe II em humanos (modificado de Janeway & Travers, 1997)

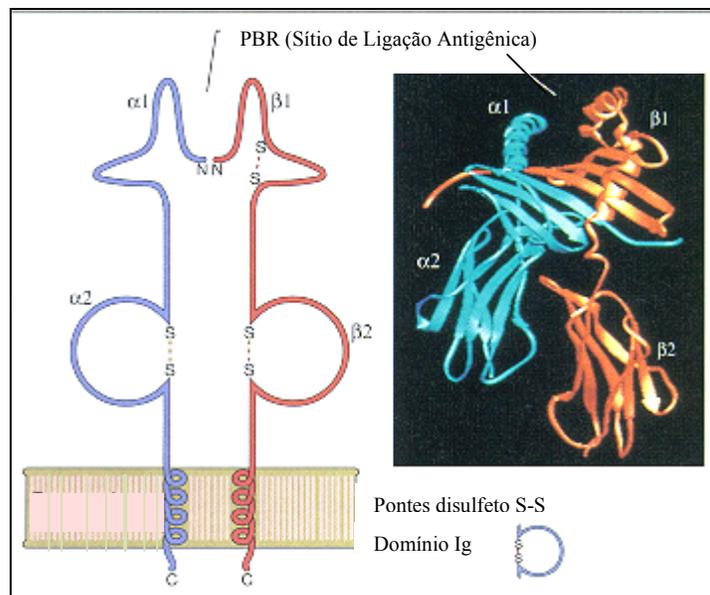


Figura 2. Representação da molécula de MHC classe II. Diagrama esquemático das diferentes porções da molécula de MHC (à esquerda). No detalhe o *Peptide Binding Region* (PBR), sítio de ligação do peptídeo antigênico. À direita, porção extracelular da molécula HLA-DR1. (Modificado de Abbas *et al.*, 2000).

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 (Abbas *et al.*, 2000).

As moléculas de MHC classe I maduras são compostas por uma única cadeia transmembrana, denominada cadeia alfa (α), ligada não covalentemente à β_2 -microglobulina, que é codificada fora da região do MHC. As moléculas de MHC classe II entretanto, são heterodímeros formados por duas cadeias transmembrana, as cadeias alfa (α) e beta (β), que do mesmo modo que as moléculas de MHC classe I, são estabilizadas com a ligação do peptídeo antigênico (Harding, 1997). No presente trabalho, as denominações alfa e beta serão representadas pelas letras A e B, respectivamente. As moléculas classe II e, especificamente a cadeia beta, são o alvo deste estudo e encontram-se representadas na Figura 2.

Credita-se a essas glicoproteínas de superfície celular, um papel chave na iniciação da resposta imune. A eficiência de toda a resposta depende da apresentação de peptídeos antigênicos às células T, pois a partir desta apresentação, as células T_H (*helper*) sinalizam às células B, que passam então à fase efetora da resposta. Sem esta sinalização não é possível dar continuidade à cascata de eventos que culminarão na eliminação dos patógenos pelo sistema imune. Vários trabalhos apontam as moléculas do MHC como o centro da resposta imune adaptativa de mamíferos, pássaros e provavelmente todos os vertebrados (Ohta, 1991; Slade, 1992; Page & Holmes, 1998).

1.2 MHC e Polimorfismo

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). 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 exon 2 dos genes A e B de classe II (que codificam as cadeias alfa e beta, respectivamente) e por parte dos exons 2 e 3 dos genes que codificam a cadeia alfa das moléculas de classe I (Figura 2).

A origem e principalmente a manutenção deste polimorfismo tem sido motivo de grande interesse e controvérsia. Vários modelos têm sido propostos para explicar o alto grau de polimorfismo. Análises da variação em seqüências de DNA, variação de aminoácidos, freqüências alélicas e genótípicas e a persistência de algumas linhagens alélicas fornecem fortes evidências sobre o papel da seleção balanceadora na manutenção da variação do MHC (Murray, 1997).

Acredita-se que uma das formas de seleção balanceadora, a vantagem ao heterozigoto (*overdominance*), permitiria uma maior capacidade de resposta frente à enorme diversidade de patógenos e estratégias desenvolvidas por estes para evadir o sistema imune. As evidências que sustentam este modelo baseiam-se na variação detectada na região que codifica o PBR através da relação das taxas de substituição de nucleotídeos não sinônima e sinônima. 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), o que representaria um

aspecto importante da manutenção do alto nível de polimorfismo descrito para estes genes (Satta *et al.*, 1994).

Outra forma de seleção balanceadora, a seleção dependente de frequência, também é apontada como provável explicação. Neste modelo, assume-se que o surgimento de uma variante alélica de MHC traria vantagens a seus portadores, uma vez que os parasitas não teriam tempo suficiente de evoluir a habilidade de evadí-la. O aumento da frequência desta variante é proporcional à diminuição da vantagem conferida por ela (Page & Holmes, 1998).

Taxas mais elevadas de mutação, sugeridas como fontes de variação, têm sido descartadas por alguns autores, uma vez que diferenças mutacionais entre genes de MHC humano e murino não são particularmente altas quando comparadas com outros genes destas mesmas espécies (Huges & Nei, 1988).

Alguns modelos de seleção propostos baseiam-se em mecanismos reprodutivos, como o de incompatibilidade materno-fetal em mamíferos, cuja semelhança entre o sistema HLA da mãe e do feto tem sido associada a abortos espontâneos como uma forma de manter a variabilidade destes locos (Hedrick & Thomsom, 1988; Hedrick, 1994). Todavia, a maioria dos modelos baseiam-se em mecanismos relacionados a parasitas. Um exemplo do papel que os parasitas podem exercer na manutenção da diversidade dos genes do MHC foi apresentado no trabalho de Paterson *et al.*(1998). Neste trabalho, os autores mostraram a associação entre a variação no MHC e diferenças na resistência a nematódeos intestinais e sobrevivência em faixas etárias suscetíveis, em uma população de ungulados (*Ovis aries L.*). Ainda, Hill *et al.*, (1991) demonstraram que determinados alelos do sistema HLA (de classe I e II) estão associados à menor suscetibilidade à malária observada em populações humanas do Oeste Africano, e que a seleção dirigida pela doença tem contribuído para a elevada frequência destes alelos nessa região, em comparação com outras regiões africanas.

1.3 Os genes DQB (DQ beta), mamíferos marinhos e um pouco sobre conservação.

Grande parte do conhecimento adquirido sobre a estrutura, funcionalidade, variabilidade e evolução dos genes do MHC advêm de estudos voltados a populações humanas, dada a sua importância nos processos imunológicos e a relativa facilidade em monitorá-las. O conhecimento sobre esses genes em outras espécies de vertebrados, tem aumentado nesta última década, mas ainda de maneira incipiente.

Para avaliar o nível da variabilidade das moléculas de MHC nas três espécies de mamíferos marinhos propostas no presente trabalho selecionou-se o loco DQ. Em humanos, a região HLA-DQ é constituída de um par de genes funcionais e 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 (Pavlovic, 1998).

O exon 2 dos genes DQB1, que codifica parte do domínio 1 da cadeia beta das moléculas de classe II que inclui o PBR, têm 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 (exon 2), sendo que para os três locos de classe II, o polimorfismo é significativamente mais alto para o exon 2 das cadeias beta (Gyllensten *et al.*, 1990; Janeway & Travers, 1997).

Em humanos, estão descritos pelo menos 25 alelos para o gene DQB1 (Janeway & Travers, 1997), 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). Entretanto, os

níveis de polimorfismo mostraram-se variáveis em análises comparativas entre diferentes espécies de vertebrados .

Um exemplo desta variação diz respeito ao loco DR. Nizetic' *et al.* (1987) reportaram a ausência deste loco em uma espécie de roedor (*Spalax ehrenbergi*), tendo sido sugerida uma provável transferência de função entre os genes de classe II, e importância reduzida deste loco para a espécie. Investigações do gene DRB em uma espécie de lobo que chegou a ser considerada extinta, o lobo mexicano (*Canis lupus*), identificaram cinco alelos entre os três grupos de animais amostrados, cujo histórico demonstra que apenas 7 indivíduos contribuíram para a sua formação (Hedrick *et al.*, 2000). E em humanos, cerca de 100 alelos foram identificados em populações caucasianas (Janeway & Travers, 1997).

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*). Em recente trabalho, Hoelzel *et al.* (1999) identificaram oito alelos para o elefante marinho do sul (*Mirounga leonina*) e apenas dois alelos para elefante marinho do norte (*Mirounga angustirostris*).

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 habitat. Acredita-se que o ambiente marinho possua características que implicariam em uma gama menor de

patógenos, o que configuraria em um habitat mais estável. Em seu trabalho, Slade (1992) aponta a diluição de secreções corpóreas no meio marinho, um fator limitante à transmissão potencial de patógenos, como sendo um dentre vários argumentos à favor da estabilidade deste meio em tratando-se de vetores de doenças.

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, 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 ser, portanto, 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 na orientação de planos de manejo para espécies ameaçadas.

Níveis de variabilidade mais baixos do MHC têm sido freqüentemente associados a um aumento da suscetibilidade a doenças e diminuição do sucesso reprodutivo. Alguns casos de ausência ou de baixa variabilidade para determinados locos de MHC, e ineficiência de resposta em episódios de deflagração de doenças são reportados em O'Brien *et al.*, (1986) Yukhi & O'Brien, (1990) e Hedrick *et al.*,(2000). Em tratando-se de espécies ameaçadas, é necessário 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.

O desenvolvimento da biologia molecular, e sua aplicação em conjunto a dados fisiológicos, ecológicos e etológicos, tem provado ser fundamental para elucidar questões relativas à variabilidade genética, como um instrumento efetivo para a problemática da conservação de espécies ameaçadas (O'Brien, 1994).

1.4 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

A metodologia de SSCP é uma técnica simples e bastante sensível na detecção de alterações em seqüências de DNA, permitindo distinguir em gel de eletroforese fragmentos de DNA de tamanho muito semelhante, mas que difiram em um ou mais nucleotídeos (Orita *et al.*, 1986; Lessa & Applebaum, 1993). Esta técnica é baseada na mobilidade eletroforética das fitas simples de DNA em gel de poliacrilamida não desnaturante, não dependendo apenas do tamanho destas, mas também de suas seqüências (Bannai *et al.*, 1994). As fitas simples de DNA obtidas a partir da desnaturação por aquecimento dos produtos de PCR previamente amplificados com *primers* de interesse, dobram-se sobre si mesmas quando submetidas a rápido resfriamento. A conformação destas estruturas secundárias depende da seqüência de nucleotídeos que compõem as fitas simples, sendo que indivíduos que apresentem seqüências diferentes podem ser facilmente identificados em gel por seus distintos padrões de corrida.

Para maximizar a sensibilidade deste método de detecção, a otimização das condições de eletroforese é necessária. Reifel-Miller *et al.*, (1996) corroboraram a eficiência da técnica e sua alta sensibilidade em um teste onde foram utilizados pares de *primers* com e sem modificações de apenas um nucleotídeo em suas seqüências, tendo sido possível identificar diferentes padrões de bandas com muita precisão.

Esta metodologia tem sido bastante empregada em estudos envolvendo os genes do MHC. A relativa facilidade desta técnica e a rapidez na obtenção dos resultados através dela, permitiu que sua utilização na genotipagem do sistema HLA em humanos tenha sido adotada em medicina forense (Akiyama, *et al.*, 1994), e em procedimentos de rotina de tipagem de HLA (Carrington, *et al.*, 1992; Hayashi, *et al.*, 1992; Bannai, *et al.*, 1994). Além disso, tem sido requerida como uma ferramenta eficiente na caracterização e identificação da variabilidade de populações naturais (Murray, 1997; Pavlovic, 1988; Hoelzel *et al.*, 1999; Prendergast, 1999; Hedrick, *et al.*, 2000a, Hedrick, *et al.*, 2000b).

1.5 Apresentação das Espécies

1.5.1 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, Uruguai e Brasil. A toninha (Figura 3) possui um pequeno porte, apresentando um comprimento máximo de 174,0 cm para fêmeas e 158,0 para machos. A espécie possui hábito essencialmente costeiro, ocorrendo normalmente dentro de 25-30 milhas náuticas da costa, correspondendo a uma profundidade máxima de 30 m (Pinedo *et al.*, 1989).

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, diferentes autores propõem que a distribuição da espécie se dá de forma descontínua. (Figura 4)

O primeiro trabalho que demonstrou haver diferenças entre o norte e o 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).



Figura 3. Toninha ou Franciscana, *Pontoporia blainvillei*.

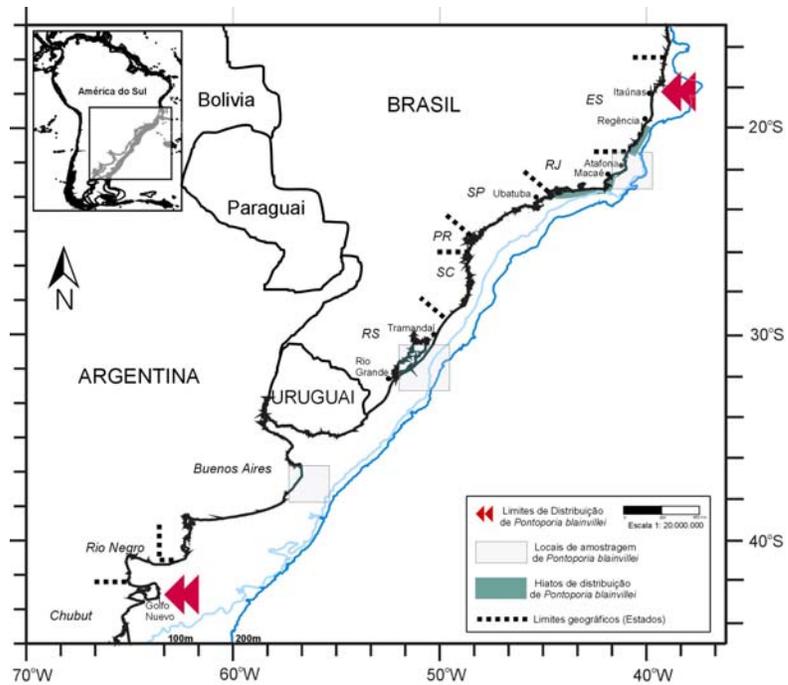


Figura 4. Mapa da distribuição de *Pontoporia blainvillei* e localidades de amostragem (modificado do Report of Fourth Workshop for the Coordinated Research and Conservation of the Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the Western South Atlantic, sob autorização dos autores) .

Secchi *et al.* (1998) conduziram a primeira análise genética sobre a espécie, investigando a 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) e do Rio Grande do Sul (forma sul).

Trabalhos adicionais realizados para identificação da estrutura populacional através da análise de DNA mitocondrial (Hamilton *et al.*, 2000; Lázaro & Lessa, 2000) 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). Adicionalmente, análises de frequência haplotípica em conjunto com um grande número de dados sobre ecologia alimentar, parasitismo, dinâmica e características de pesca e captura acidental, entre outros, sugerem para fins de manejo, o agrupamento das populações do Rio Grande do Sul e Uruguai em uma população distinta da Argentina (Secchi *et al.*, 2000).

Além disso, Siciliano *et al.* (2000) registraram falhas na distribuição da espécie no sudeste do Brasil. A análise dos dados obtidos através de diferentes metodologias de observação (de um ponto fixo da costa e em embarcações), através de pesquisa sobre material tombado em coleções zoológicas da região e pela compilação das informações fornecidas por pescadores, demonstra ausência de registro da espécie em determinadas regiões, os chamados “hiatos” da distribuição (Figura 4). As razões determinantes para a ocorrência destes hiatos não são bem claras, mas os autores consideram como prováveis fatores limitantes à distribuição de toninha as diferenças relativas à transparência da água (uma vez que a espécie tem preferência por águas mais turbias), uma maior oscilação de temperatura, cuja estabilidade é fator de grande importância para a distribuição de espécies marinhas, e a predação potencial associada à baixa turbidez das águas da região.

A preferência por um habitat marinho costeiro tem colocado em risco a conservação da espécie em decorrência da vulnerabilidade deste ecossistema à degradação ambiental. Uma alta mortalidade tem sido registrada para a espécie, e

dentre os fatores que ameaçam a conservação da toninha, certamente o mais sério é a captura acidental em redes de pesca comerciais, que ocorrem ao longo de toda a sua área de distribuição geográfica (Praderi *et al.*, 1989; Secchi *et al.*, 1997; Ott, 1998). Devido a esta mortalidade, a toninha vem sendo considerada a espécie de pequeno cetáceo mais ameaçada em todo Atlântico Sul Ocidental.

A toninha está incluída na categoria “insuficientemente conhecida” na lista de espécie de cetáceos da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN, 1991), embora Perrin *et al.*, (1989) tenham recomendado que ela seja classificada como “vulnerável”. Reforçando a necessidade de reformulação da classificação prévia, Secchi (1999) recomenda que a toninha seja classificada como “ameaçada”, mas até o ano de 2000 a classificação não havia sido reformulada (IUCN, 2000).

Secchi *et al.*, (2000) recomendam a continuidade de estudos que contribuam para a identificação de estoques desta espécie, dada a urgência em estabelecer planos de manejo para a toninha.

1.5.2 Baleia Franca Austral

A baleia franca austral, *Eubalaena australis* (Desmouilins, 1822), está entre as maiores espécies de cetáceos existentes (Figura 5). Os indivíduos adultos podem atingir entre 13,5 a 17 m de comprimento e pesar aproximadamente 55 toneladas. A espécie distribuiu-se em todos os oceanos do Hemisfério Sul (Figura 6), 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). Atualmente, no Brasil, a área de concentração principal para reprodução está limitada à costa do Rio Grande do Sul, Paraná e, principalmente, Santa Catarina (IBAMA, 1997).

A baleia franca austral foi a primeira espécie de baleia caçada comercialmente, com um “status” populacional mundial anterior à exploração calculado entre 100 000 e 300 000 animais, sofrendo intensa exploração nos séculos XVII, XVIII, XIX e primeiras décadas do século XX (Lichter, 1992). Apenas na costa brasileira, entre o período de 1770 e 1950, estima-se que cerca de 15 000 animais tenham sido capturados.

Entre 1950 e 1973, mesmo estando protegida internacionalmente desde 1935 pela Convenção Internacional para a Regulamentação da Caça à Baleia, da qual o Brasil foi signatário, foi registrada a captura de 350 animais (Campagna & Lichter, 1996).

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 3 000 no Atlântico Sul Ocidental, o que corresponderia à aproximadamente 3,5% da população original.

Atualmente a espécie encontra-se incluída na categoria “baixo risco dependente de conservação” da lista de espécies de cetáceos da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN, 2000).



Figura 5. A Baleia Franca Austral, *Eubalaena australis* (modificado de Campagna & Lichter, 1996).

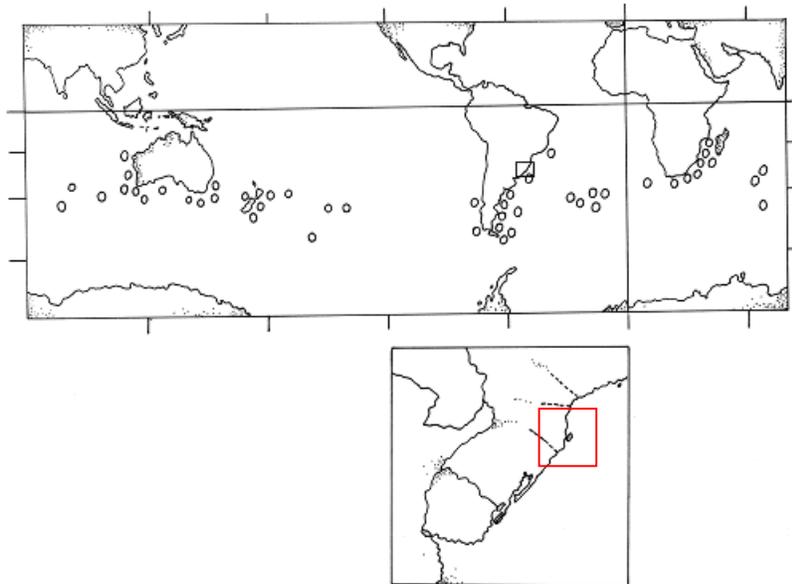


Figura 6. Mapa da distribuição de *Eubalaena australis* e localidades de amostragem. Os círculos representam áreas de distribuição da espécie (modificado de Cummings, 1985). Em destaque a área de amostragem (litoral de Santa Catarina, Brasil).

1.5.2 Lobo marinho sul-americano

O lobo marinho sul-americano (Figura 7), *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783), é uma espécie de pinípede que se distribui amplamente na costa da América do Sul (Figura 8), com suas colônias reprodutivas estendendo-se do Uruguai até a Terra do Fogo no Atlântico, e do sul do Chile até o Peru no Pacífico (Bonner, 1994). Apesar de não haver colônias reprodutivas no Brasil, um grande número de lobos marinhos sul-americanos ocorre na costa do Rio Grande do Sul, preferencialmente nos meses de inverno e primavera, devido à dispersão pós-reprodutiva natural da espécie (Oliveira, 1999). A estrutura social das colônias reprodutivas é caracterizada pela formação de haréns, onde cada macho copula com várias fêmeas numa mesma estação reprodutiva.

Os machos podem medir até 200 cm de comprimento e atingir 140 kg, enquanto as fêmeas podem medir até 150 cm de comprimento e pesar aproximadamente 50 kg (Bonner, 1994).

Os registros de caça desta espécie são datados a partir dos séculos XVIII, XIX e boa parte do século XX (Massola & Cheber, 1993). Esta espécie foi quase exterminada no século passado por caçadores interessados principalmente na sua pelagem, que possui um alto valor comercial, comparativamente a outras espécies de pinípedes (Lichter, 1992).

Atualmente, sabe-se que as populações de *A. australis* têm se recuperado, mas os dados são insuficientes para determinar o status atual da espécie.



Figura 7. O Lobo Marinho Sul-Americano, *Arctocephalus australis*.



Figura 8. Mapa da distribuição e localidade de amostragem de lobo marinho sul- americano. Representação esquemática das áreas de ocorrência de colônias reprodutivas. As linhas indicam as colônias, que no Atlântico estendem-se do Uruguai até a Terra do Fogo, e no Pacífico, do sul do Chile até o Peru. Em destaque a área de amostragem (litoral norte do Rio Grande do Sul, sem escala).

2. Objetivos

O estudo da variação genética dos genes DQB em mamíferos marinhos, com diferentes históricos relativos à redução do tamanho populacional e aos seus *status* de conservação, é importante para o entendimento de alguns pontos: 1) uma vez que algumas moléculas do MHC são fundamentais para a montagem da resposta imune, o estabelecimento do grau de polimorfismo dos genes do MHC para estas espécies, poderá auxiliar no entendimento acerca da vulnerabilidade das populações destes animais à exposição de patógenos no seu habitat ; 2) a informação acerca da variabilidade genética destas populações pode auxiliar na compreensão do “status” de conservação destas espécies ; 3) sendo os genes do MHC um dos mais variáveis sistemas genéticos conhecidos, a comparação da variação encontrada para os animais testados com a descrita para outros mamíferos, ameaçados ou não, permitirá inferir sobre o grau de erosão genética sofrida pelas populações de mamíferos marinhos ; 4) os dados sobre variabilidade genética provenientes deste trabalho, em conjunto com os dados que se tem sobre essas três espécies poderá auxiliar no entendimento da estrutura populacional das mesmas, informação fundamental para o estabelecimento de unidades de manejo.

Considerando os pontos descritos acima, os objetivos principais deste trabalho foram:

1. Quantificar a diversidade genética entre e dentro destas três espécies, utilizando a metodologia de PCR-SSCP para o exon 2 dos genes DQB do sistema MHC, através da identificação de variantes alélicas em populações de lobos marinhos, baleias francas e toninhas.
2. Comparar as estimativas de diversidade obtidas às encontradas para outros organismos, cujas populações não estejam vulneráveis, e que habitem ecossistemas com características distintas.

3. Material e Métodos

3.1 Coleta de Material

Foram obtidas amostras provenientes de três regiões da costa sul-americana: Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Argentina. As amostras provenientes do Rio Grande do Sul foram subdivididas quanto à distribuição em litoral norte e litoral sul.

No litoral norte do Rio Grande do Sul as amostras de toninha, bem como as de lobo marinho sul-americano, foram coletadas em monitoramentos sistemáticos pelo Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS).

No litoral sul, as amostras de toninha foram coletadas por pesquisadores do Laboratório de Mamíferos Marinhos do Museu Oceanográfico “ Eliézer de C. Rios” de Rio Grande, RS.

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, por pesquisadores do *Departamento de Ciencias Marinas da Universidad de Mar Del Plata*.

As amostras de baleia franca austral foram coletadas no litoral de Santa Catarina pelo biólogo MsC. Paulo Ott e pesquisadores do projeto Baleia Franca/IWC.

A distribuição geográfica das áreas de coleta encontra-se representada nas Figuras 4, 6 e 8.

Os procedimentos de coleta e os tecidos coletados foram distintos entre as espécies. As amostras de toninha foram obtidas de animais mortos, encalhados na praia ou capturados acidentalmente em redes de pesca. As amostras do Rio Grande do Sul utilizadas neste trabalho foram coletadas no período de 1993 a

2000, as do Rio de Janeiro de 1996 a 1999 e as da Argentinas, nos anos de 1997/98 e 2000.

Já as amostras de lobo marinho sul-americano foram obtidas apenas de animais mortos encalhados no litoral, entre 1998 e 2000. Ambas espécies tiveram coletados para extração de DNA, músculo cardíaco e/ou esquelético e fígado. Os tecidos foram preservados em etanol absoluto e estocados à -20°C . As amostras de baleia franca austral foram obtidas nas estações reprodutivas dos anos de 1999 e 2000. Usou-se um sistema de biópsia específico, que utiliza dardos com ponteiros próprias para a retirada de pequenas porções de pele e gordura. No momento em que o animal emerge à superfície para respirar, os dardos são atirados na sua porção dorsal, e posteriormente recuperados. O tecido coletado para fins de extração de DNA (pele) foi preservado em DMSO e estocado à -20°C .

3.2 Extração de DNA

As extrações de DNA de toninha e baleia franca austral seguiram o protocolo descrito por Secchi *et al.*, 1998. Foram processadas 109 amostras de toninha (Rio de Janeiro $n=32$, Rio Grande do Sul $n=52$, Argentina $n=25$) e 30 amostras de baleia franca austral.

Para lobo marinho sul-americano ($n=35$) utilizou-se o protocolo modificado de extração de DNA com NaCl (Medrano *et al.*, 1990). Aproximadamente 20mg de tecido de cada amostra foram lavados 3 vezes com 1ml de tampão STE (100mM NaCl, 10mM Tris.HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0). As amostras foram maceradas individualmente com nitrogênio líquido em um recipiente estéril, transferidas para tubos de 1,5ml e incubadas por 3 horas a 60°C em 550 μl de tampão de lise (50mM Tris.HCl pH 8,0, 20mM EDTA pH 8,0, 1% SDS, 200mM NaCl, 1% β -

mercapto etanol). Adicionou-se 11µl de proteinase K (10mg/ml) no início da incubação e novamente após 1 hora e 30 minutos de reação. Centrifugou-se (10 minutos, 13 000rpm) aquelas amostras que não foram totalmente lisadas e o sobrenadante (aproximadamente 550µl) foi transferido para um novo tubo. Foram adicionados ao sobrenadante 350µl de NaCl (5M), e após agitação vigorosa por 15 segundos, centrifugou-se o lisado por 30 minutos a 13 000rpm. O sobrenadante foi então transferido para 2 novos tubos (aproximadamente 400µl em cada) e adicionou-se etanol absoluto gelado equivalente a 2 vezes o volume da solução. As soluções foram misturadas por inversão e deixou-se que o DNA precipitasse por um período de aproximadamente 12 horas a 4⁰C. A precipitação foi seguida de uma etapa de centrifugação (30 minutos, 13 000rpm), uma etapa de lavagem com 1ml de etanol 70% (5 minutos, 6 000rpm) e secagem à temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em volume proporcional ao tamanho do precipitado (entre 20µl e 100µl) com tampão TE (10mM Tris.HCl pH 8,0, 0.1mM EDTA pH 8,0). A quantidade e a pureza das amostras foram estimadas por espectrofotometria através da razão A_{260}/A_{280} .

3.3 Primers

Para amplificar uma porção do exon 2 dos genes DQB de MHC classe II, que codifica o PBR (*Peptide Binding Region*), foi selecionado um par de *primers* descrito por Murray (1997) para *Delphinapterus leucas* (Beluga) e *Monodon monoceros* (Narval). O par Senso/Beluga 5' (CAT GTG CTA CTT CAC CAA CGG)3' e Antisenso/Beluga 5' (CTG GTA GTT TCT GCA ACA)3' amplifica um fragmento de 172 pares de base. Outro par de *primers*, desenhados por Hoelzel *et al.* (1999), que caracterizou polimorfismos em 4 espécies de pinípedes, *Mirounga leonina* (Elefante Marinho do Sul), *Mirounga angustirostris* (Leão Marinho do Norte), *Arctocephalus gazella* (Lobo Marinho Antártico) e *Arctocephalus forsteri*

(Lobo Marinho da Nova Zelândia), também foi testado. O Par Senso 5'(TCG TGT ACC AGT TTA AGG GC)3' e Antisenso 5'(ACG TCC TTC TGG CTG TTC CA)3' amplifica um fragmento de 142 pares de base. Ambos os pares de *primers* foram elaborados com base em seqüências descritas para os genes DQB de humanos.

3.4 As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

As reações para amplificação do fragmento do exon 2 das três espécies foram feitas sob as mesmas condições (10mM Tris.HCl pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP's, 20pmóis de cada *primer*, 1,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (CenBiot) e 50-200ng de DNA em um volume final de 50µl). Os programas de PCR utilizados para controlar os ciclos de amplificação envolveram um *touchdown* de temperaturas de anelamento de – 1^oC a cada 2 ciclos nos primeiros 20 ciclos. Para toninha e lobo marinho sul-americano usou-se um programa comum intervalo de temperaturas de anelamento entre 55^oC e 45^oC (Tabela 1). Para baleia franca austral, o intervalo de temperaturas de anelamento foi de 60^oC a 50^oC (Tabela 1). O resultado das amplificações foi verificado em gel de agarose 1,5% (Gibco BRL), 0,15µg/ml de brometo de etídio, diluído em tampão TEB (90mM Tris-borato, 2mM EDTA pH 8,0), sob radiação UV.

A fim de aumentar a especificidade da reação enzimática para as amostras de lobo marinho sul-americano e baleia franca austral, testou-se o sistema *PCR Enhancer* (GIBCO BRL) utilizando os programas de PCR acima descritos, além de um outro com intervalo de temperaturas de anelamento entre 65^oC e 55^oC (Tabela 1). Este sistema é composto por uma solução denominada *PCR Enhancer* e MgSO₄, que conferem termoestabilidade à polimerase envolvida na reação (*Taq* DNA Polimerase), quando do aumento das temperaturas de anelamento nas reações de maior estringência. Para estes testes, descritos na Tabela 2,

selecionou-se uma amostra de lobo marinho sul-americano e uma amostra de baleia franca austral com base na boa amplificação demonstrada pelas mesmas em reações de PCR. Nos testes 1 e 2, diferentes concentrações da solução *PCR Enhancer* (0,5, 1, 2, 2,5 e 3X) ou a ausência desta foram testadas, sendo mantidas as condições originais das reações de PCR. Nos testes 3 e 4, manteve-se a concentração de 2X da solução *PCR Enhancer*, testando-se diferentes intervalos de temperaturas de anelamento utilizando os programas TD 60-50 e TD 65-55 respectivamente. O teste 5 preservou as condições de temperatura de anelamento de 65⁰C e 55⁰C e a concentração da solução de *PCR Enhancer*, tendo sido alterada a quantidade de cada um dos *primers* para 10pmóis. Para o teste 6, diferentes concentrações de MgSO₄ foram testadas (1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0mM) preservando a concentração da solução *PCR Enhancer* (2X), a quantidade dos *primers* (20pmóis) e o programa de PCR (TD 60-50). Com o teste 7, utilizou-se um intervalo de temperaturas de anelamento entre 65⁰C e 55⁰C em combinação com aquelas concentrações de MgSO₄ que apresentaram resultados satisfatórios (2,0, 2,5 e 3,0mM).

Após o estabelecimento das condições com o sistema *PCR Enhancer*, as 35 amostras de lobo marinho sul-americano foram amplificadas segundo as condições que haviam sido estabelecidas para a espécie (teste 5). Entretanto, dada a não reprodutibilidade dos resultados para lobo marinho sul-americano optou-se por não submeter as amostras de baleia franca austral a um novo processo de amplificação.

3.5 SSCP

Para o estabelecimento das condições das análises de SSCP utilizou-se o *GeneGel SSCP Starter Kit* (Amersham Pharmacia) no sistema de eletroforese *GenePhor* (Amersham Pharmacia). O gel *GeneGel Clean SSCP* (Amersham Pharmacia) foi testado junto a diferentes tampões de corrida (*GeneGel SSCP buffer A* pH 9.0, *buffer B* pH7.4 e *buffer C* pH 8.3) em diferentes condições de

temperatura (5⁰C, 12⁰C e 20⁰C). Aproximadamente 40ng de produto de PCR de cada amostra foi desnaturada a 100⁰C por 4 minutos em tampão de desnaturação (95% formamida, 0,025% azul de bromofenol , 0,025% xileno cianol), em uma proporção volume/volume, não ultrapassando um volume total de 8µl. Após o processo de desnaturação as amostras foram imediatamente colocadas no gelo até o momento da aplicação no gel. As condições estabelecidas para as eletroforeses foram as mesmas para as análises de SSCP das três espécies (tampão A, 12⁰C, duração de 1 hora e 50 minutos, 200V). O processo de coloração dos géis compreendeu: 1) uma etapa de desnaturação do gel com ácido nítrico 1% por 4 minutos, 2) coloração com nitrato de prata (10mM AgNO₃) por 20 minutos com agitação, 3) revelação com solução de carbonato de sódio gelada (280mM Na₂CO₃, 0,02% de formaldeído), trocando a solução pelo menos uma vez quando da saturação da solução pelo nitrato de prata e do aparecimento da bandas, 4) fixação com ácido acético 10% por 5 minutos e 5) secagem com solução a 30% de metanol e 1% de glicerol. Nesta etapa o gel foi mergulhado na solução de secagem por aproximadamente 1 minuto, sendo retirado em seguida e colocado no centro de uma placa de vidro. No mesmo recipiente onde foi colocado o gel, mergulhou-se na solução de secagem um pedaço de papel celofane previamente cortado, cujas dimensões eram suficientes para cobrir toda a superfície do gel e da placa, de modo que fosse possível prendê-lo na placa de vidro com garras de metal. Deve-se evitar a formação de bolhas de ar no momento da colocação do papel celofane sobre a superfície do gel, tomando o cuidado de colocá-lo sem dobras sobre o mesmo. O gel foi deixado secando à temperatura ambiente por no mínimo 12 horas. A solução de secagem pode ser reaproveitada, tendo-se o cuidado de filtrar a mesma antes de uma nova utilização. Com exceção da etapa de revelação, onde a solução é trocada pelo menos uma vez sem que o gel seja lavado com água, as demais etapas foram intercaladas com etapas de duas lavagens com água destilada. Todas as soluções foram preparadas com água Mili-Q e filtradas.

Tabela 1. Programas de PCR *Touchdown* utilizados para amplificação do exon 2 parcial dos genes DQB MHC classe II.

| Programas | | | | | | | |
|-----------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------------------------|
| | TD 65-55 | | TD 60-50 | | TD55-45 | | Observações |
| 1 | 94 ⁰ C | 00:05:00 | 94 ⁰ C | 00:05:00 | 94 ⁰ C | 00:05:00 | |
| 2 | 65 ⁰ C | 00:01:00 | 60 ⁰ C | 00:01:00 | 55 ⁰ C | 00:01:00 | Diminuir 1 ⁰ C por ciclo |
| 3 | 72 ⁰ C | 00:01:00 | 72 ⁰ C | 00:01:00 | 72 ⁰ C | 00:01:00 | |
| 4 | 94 ⁰ C | 00:01:00 | 94 ⁰ C | 00:01:00 | 94 ⁰ C | 00:01:00 | |
| 5 | 65 ⁰ C | 00:01:00 | 60 ⁰ C | 00:01:00 | 55 ⁰ C | 00:01:00 | Diminuir 1 ⁰ C por ciclo |
| 6 | 72 ⁰ C | 00:01:00 | 72 ⁰ C | 00:01:00 | 72 ⁰ C | 00:01:00 | |
| 7 | 94 ⁰ C | 00:01:00 | 94 ⁰ C | 00:01:00 | 94 ⁰ C | 00:01:00 | |
| 8 | | 10 vezes para 2 | | 10 vezes para 2 | | 10 vezes para 2 | |
| 9 | 55 ⁰ C | 00:01:00 | 50 ⁰ C | 00:01:00 | 45 ⁰ C | 00:01:00 | |
| 10 | 72 ⁰ C | 00:01:00 | 72 ⁰ C | 00:01:00 | 72 ⁰ C | 00:01:00 | |
| 11 | 94 ⁰ C | 00:01:00 | 94 ⁰ C | 00:01:00 | 94 ⁰ C | 00:01:00 | |
| 12 | | 20 vezes para 9 | | 20 vezes para 9 | | 20 vezes para 9 | |
| 13 | 55 ⁰ C | 00:02:00 | 50 ⁰ C | 00:02:00 | 45 ⁰ C | 00:01:00 | |
| 14 | 72 ⁰ C | 00:05:00 | 72 ⁰ C | 00:05:00 | 72 ⁰ C | 00:05:00 | |
| 15 | 4 ⁰ C | 00:00:00 | 4 ⁰ C | 00:00:00 | 4 ⁰ C | 00:00:00 | |

Tabela 2. Condições testadas para *Arctocephalus australis* e *Eubalaena australis* com o sistema *PCR Enhancer* (Gibco BRL).

| Experimentos* | Programa | Concentração de MgSO ₄ | Quantidade de <i>primers</i> (em pmóis) | Diluição do <i>PCR Enhancer</i> |
|---------------|----------|-----------------------------------|---|---------------------------------|
| Teste 1 | TD55-45 | 1,5mM | 20 | 0,5 X |
| | | | | 1,0 X |
| | | | | 2,0 X |
| Teste 2 | TD55-45 | 1,5mM | 20 | 2,5 X |
| | | | | 3,0 X |
| Teste 3 | TD60-55 | 1,5mM | 20 | 2,0 X |
| Teste 4 | TD65-55 | 1,5mM | 20 | 2,0 X |
| Teste 5 | TD65-55 | 1,5mM | 10 | 2,0 X |
| Teste 6.1 | TD60-50 | 1,0mM | 20 | 2,0 X |
| Teste 6.2 | | 1,5mM | | |
| Teste 6.3 | | 2,0mM | | |
| Teste 6.4 | | 2,5mM | | |
| Teste 6.5 | | 3,0mM | | |
| Teste 7.1 | TD65-55 | 2,0mM | 20 | 2,0 X |
| Teste 7.2 | | 2,5mM | | |
| Teste 7.3 | | 3,0mM | | |

* Detalhes sobre os testes estão descritos no texto (item 3.4)

3.6 Reamplificação do DNA

Para a eluição do DNA das bandas de SSCP, foram selecionadas 7 amostras de toninha (Rio de Janeiro n=2, Rio Grande do Sul n=3, Argentina n=2). O produto de PCR de cada uma das 7 amostras foi aplicado em um gel de SSCP (*GeneGel Clean SSCP*, Amersham Pharmacia) de maneira que ficassem distantes umas das outras o suficiente para evitar contaminações durante a excisão das bandas. As condições de eletroforese foram idênticas às citadas anteriormente (item 3.5). O processo de coloração do gel foi alterado na etapa de fixação, tendo sido usado ácido cítrico 50% por 5 minutos ao invés de ácido acético, para evitar a depurinização do DNA (Calvert *et al.*, 1995). As demais etapas de coloração foram mantidas. Após a fixação com ácido cítrico 50%, as bandas foram excisadas do gel com lâminas de bisturi estéreis e individuais. Foram excisadas 30 bandas (4 ou 5 por amostra), tendo sido identificadas de acordo com sua posição (Figura 9). Cada uma das bandas foi transferida para tubos de 1.5ml, onde foram lavadas demoradamente por inversão, 2 vezes com água Mili-Q (400µl de água para cada lavagem) e posteriormente eluídas a 94⁰C por 20 minutos em um volume de 50µl de tampão de eluição (10Mm Tris, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂ pH 8,3, 0,1% Triton X-100). Foi utilizado 1µl do eluído em novas reações de PCR, sendo que cada uma das bandas excisadas do gel teve seu DNA reamplificado 2 vezes para seqüenciamento. Estes produtos de PCR foram purificados e seqüenciados manualmente seguindo os critérios estabelecidos para as reações de seqüenciamento manual.

Foi realizado um teste para inibição da reação de PCR a partir do material eluído, usando como controle positivo o DNA de uma amostra de toninha já testada em reações de PCR anteriores (Tabela 3). Para verificar a possibilidade de reamplificação direta de um produto de PCR, a reação A foi montada sob as mesmas condições das reações de PCR anteriores usando como molde cerca de 40ng do produto de PCR da amostra B.19 (toninha, Argentina). Para testar se um produto previamente amplificado inibe uma reação normal de PCR, usou-se na

reação B a mesma concentração do produto de PCR da amostra B.19 além de 200ng do DNA genômico do controle positivo, mantidas as mesmas condições enzimáticas da reação. As reações C, D, E, F e G testaram o grau de inibição decorrente da presença do material eluído, em concentrações crescentes. Utilizou-se o programa TD 55-45 para todos os testes.

Tabela 3. Testes de inibição da reação de PCR das amostras eluídas do gel de SSCP.

| Teste* | Produto de PCR (40ng) | DNA Controle (200ng) | Eluído** |
|----------|-----------------------|----------------------|----------|
| Reação A | + | - | - |
| Reação B | + | + | - |
| Reação C | - | + | + |
| Reação D | - | + | ++ |
| Reação E | - | + | +++ |
| Reação F | - | + | ++++ |
| Reação G | - | + | +++++ |

*Para estes testes foram utilizados o DNA da amostra B.19 (toninha, Argentina) como DNA controle e o produto de PCR desta mesma amostra (PCR67-8); Programa TD55-45; ** Cada sinal (+) representa a adição de 1µl do eluído à reação de PCR.

3.7 Seqüenciamento

Os produtos de PCR de 8 amostras de toninha (Rio de Janeiro n=3, Rio Grande do Sul n=4, Argentina n=1) e de 6 amostras de lobo marinho sul-americano foram purificados pelo sistema *GFX PCR* (Amersham Pharmacia) para seqüenciamento manual e automático. Nas reações de seqüenciamento manual foram utilizados o sistema *Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit* (USB Corporation), 0,225µCi/reação [³³P] ddNTP's (Amersham

Pharmacia), 10pmóis de cada *primer* (Senso/Beluga ou Antisenso/Beluga) e cerca de 40-80ng do produto de PCR purificado de cada amostra em um volume máximo de 7µl de reação. Para a reação de polimerização foi utilizado o programa *Cycle 3* (41 ciclos de 95⁰C por 30 segundos, 55⁰C por 30 segundos, 72⁰C por 1 minuto). As eletroforeses tiveram 1 hora e 30 minutos de duração a 55W, em gel de acrilamida 8% (38 acrilamida:2 bis-acrilamida), desnaturante (7M uréia). Depois de secados à vácuo por 1 hora e 30 minutos a 80⁰C, os géis foram expostos a filmes de autorradiografia (Kodak X Omat®), à - 80⁰C por um período que variou entre 24 e 48 horas.

Para o seqüenciamento automático, selecionou-se, dentre aquelas amostras seqüenciadas manualmente, 4 amostras de toninha (Rio de Janeiro n=1, Rio Grande do Sul n=2, Argentina n=1) e as 6 amostras de lobo marinho sul-americano. Adicionalmente, foram selecionadas 2 amostras de toninha (Argentina) e uma amostra de lobo marinho sul-americano cujos produtos de PCR não tivessem sido purificados, tendo recebido apenas tratamento com 1 unidade de fosfatase alcalina e 1 unidade de exonuclease EXO I (37⁰C por 15 minutos, 80⁰C por 15 minutos). A preparação das reações do seqüenciamento automático seguiu os critérios do sistema *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* (Amersham Pharmacia), com modificações. Utilizou-se para cada reação, entre 50 e 100ng do produto de PCR tratado ou purificado de cada amostra, 5pmóis de cada *primer* (Senso/Beluga ou Antisenso/Beluga) e 4µl do *DYEnamic ET terminator reagent premix* em um volume máximo de 10µl de reação. A polimerização se deu com o programa Gene001 (25 ciclos de 95⁰C por 20 segundos, 50⁰C por 15 segundos, 60⁰C por 1 minuto). As etapas posteriores seguiram rigorosamente os parâmetros estabelecidos pelo sistema. O tempo de injeção durou 1 minuto e 40 segundos à 1kV de voltagem. A corrida se deu à 9kV por 1 hora e 40 minutos. Estes procedimentos se deram no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Pharmacia).

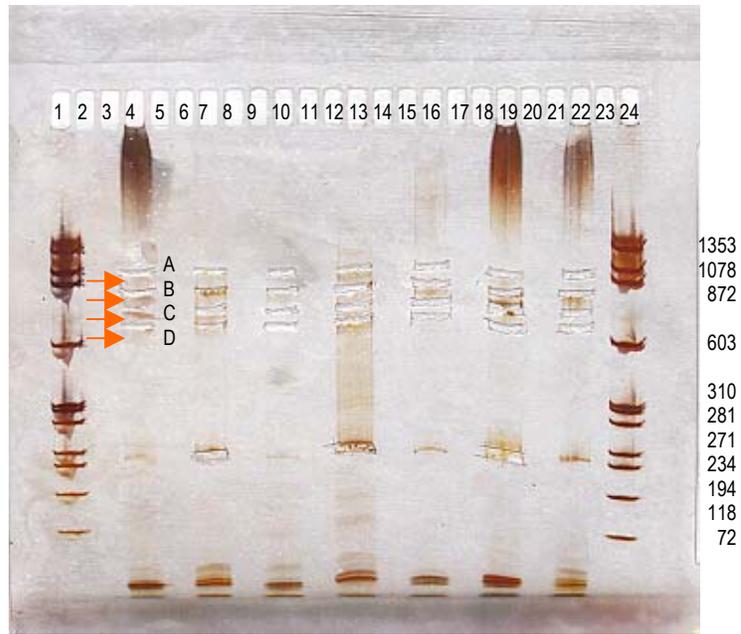


Figura 9. Gel de SSCP com bandas excisadas. Disposição das amostras da esquerda para direita: Marcador de Peso Molecular ϕ X174/Hae III (Gibco BRL) linhas 1 e 24, amostras de toninha do Rio de Janeiro linhas 4 e 7, amostras de toninha do Rio Grande do Sul linhas 10, 13 e 16, amostras de toninha da Argentina linhas 19 e 21. Não foram aplicadas amostras nas demais canaletas. As setas indicam as posições das bandas que foram excisadas. As letras A,B,C e D foram usadas para identificá-las conforme sua posição.

3.8 Análise das seqüências

As buscas de seqüências homólogas aos produtos de PCR de toninha seqüenciados no presente estudo foram realizadas através do programa *BLASTN 2.2.1* (Altschl *et al.*, 1997). Para o alinhamento das seqüências obtidas utilizou-se o programa *Pileup* do pacote GCG (Genetics Computer Group, *Wisconsin Package*) 9.1-Unix , *Madison, Wisc.* O alinhamento das seqüências foi editado no editor de alinhamentos de seqüências *Gene Doc* (Nicholas & Nicholas, 1997) .

4. Resultados

4.1 Otimização das reações de PCR

Os primeiros testes realizados utilizaram os *primers* descritos por Hoelzel *et al.* (1999) em algumas amostras de toninha, baleia franca austral e lobo marinho sul-americano. Com este par de *primers* não foi possível estabelecer condições que amplificassem adequadamente o segmento alvo nas três espécies, sendo que se observou uma maior dificuldade em relação à amplificação das amostras de toninha. Para obter a amplificação do exon 2 do gene DQB, foram feitas amplificações com o par de *primers* de Hoelzel *et al.* (1999), com os descritos por Murray (1997) e uma combinação entre os *primers* direto e reverso destes dois pares, para que fosse possível identificar a condição que resultaria em melhores resultados de amplificação. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização dos *primers* descritos por Murray (1997).

Entretanto, a amplificação do fragmento de 172 pares de base do exon 2 dos genes DQB, através dos *primers* Senso/Beluga e Antisenso/Beluga nas amostras de DNA genômico de toninha, baleia franca austral e lobo marinho sul-americano não pode ser plenamente otimizada. Em todas as reações observou-se a formação de dímeros de *primers*, um dos fatores que certamente contribuiu para a fraca amplificação de muitas amostras (Figura 10). Ajustes referentes à quantidade dos *primers* nas reações de PCR não foram eficientes na resolução do problema, mesmo quando da utilização de quantidades mínimas de cada *primer* (10pmóis).

Os problemas mais graves ocorreram nas amostras de baleia franca austral e de lobo marinho sul-americano, onde constatou-se a alta frequência de amplificações inespecíficas. O aumento da estringência da reação, por alteração nas temperaturas de anelamento, não foi suficiente para solucionar este problema. A utilização do sistema *PCR Enhancer* (Gibco BRL) mostrou-se pouco eficiente em ambas espécies, por não ter eliminado os produtos indesejados, apesar de ter

aumentado a quantidade de material amplificado (Figura 11). Além disso, não foi possível reproduzir os resultados estabelecidos nos testes com o sistema quando as condições foram aplicadas para as demais amostras de ambas espécies. A ineficiência do sistema na otimização das reações de PCR foi verificada em gel de agarose corado com brometo de etídio (Figura 11) e também em gel de acrilamida corado com nitrato de prata (Figura 12). Nos testes houve uma redução mínima no número de bandas inespecíficas, sendo que algumas ampliações aparentemente específicas em gel de agarose, mostraram-se também inadequadas ao serem visualizadas em um sistema de coloração mais sensível como o de nitrato.

4.2 Análises de SSCP

Primeiramente foram analisadas por SSCP 52 amostras de toninha do Rio Grande do Sul, 35 amostras de lobo marinho sul-americano e 14 amostras de baleia franca austral. Tanto para lobo marinho sul-americano quanto para baleia franca austral não foi possível estabelecer um padrão de bandas informativo, dadas as dificuldades na otimização das condições de PCR.

Para lobo marinho sul-americano foram identificados 4 grupos de padrões, chamados de padrão A, B, C e D, mas as seqüências destes produtos de PCR, obtidas manual e automaticamente não foram legíveis (veja a seguir). Dentre as 35 amostras de lobo marinho sul-americano amplificadas com o sistema *PCR Enhancer* (Gibco BRL), 10 foram selecionadas para a análise de SSCP, sendo que nenhuma destas apresentou melhora em relação à identificação dos padrões (Figura 12).

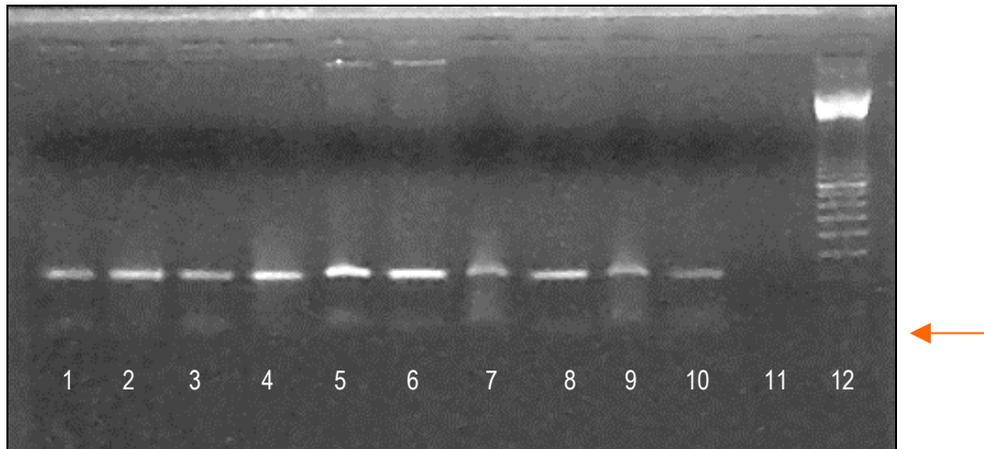


Figura 10. Produtos de PCR de amostras de toninha visualizados em gel de agarose 1.5%. Disposição das amostras no gel da esquerda para direita: G.125 linha 1, G.174 linha 2, G.215 linha 3, G.252 linha 4, G.424 linha 5, G.433 linha 6, G.456 linha 7, G.460 linha 8, G.476 linha 9, Controle Positivo linha 10, Controle Negativo linha 11, Marcador de Peso Molecular (*ladder* 100pb, Amersham Pharmacia) linha 12. A seta indica a banda do marcador que corresponde a 100pb. Os dímeros de *primers* encontram-se abaixo desta posição e são fracamente visualizados neste gel. Para descrição das condições de reação consulte o texto.



Figura 11. Resultado do teste 2 para amostras de baleia franca austral e lobo marinho sul-americano com o sistema *PCR Enhancer* (Gibco BRL) em gel de agarose 1.5%. Disposição das amostras da esquerda para a direita: (linhas 1-4 condição 2.5X *Enhancer*) EA05 linha 1, 664 linha 2, Controle Positivo linha 3, Controle Negativo linha 4; (linhas 5-8 condição 3.0X *Enhancer*) EA05 linha 5, 664 linha 6, Controle Positivo linha 7, Controle Negativo 8, Marcador de Peso Molecular (*ladder* 100 pb, Amersham Pharmacia) linha 9. Abaixo da banda de 100pb do marcador, os dímeros de *primers*. Amostras: EA05 baleia franca austral, 664 lobo marinho sul-americano. A seta indica a presença de bandas inespecíficas. Para descrição detalhada das condições consulte o texto e a Tabela 2.

Para as amostras de toninha do Rio Grande do Sul os resultados obtidos por SSCP foram mais informativos. Porém, todas as 52 amostras de toninha analisadas inicialmente apresentaram o mesmo padrão de 4 bandas, tendo sido observada a ocorrência de uma banda adicional em alguns indivíduos, em diferentes posições em relação às bandas de referência (Figura 13). Por esta razão, realizou-se análises adicionais incluindo amostras dos extremos da distribuição geográfica da espécie (32 amostras do Rio de Janeiro e 25 da Argentina).

O padrão de 4 bandas por indivíduo repetiu-se para todas as amostras. Entretanto, foi possível observar algumas diferenças significativas. Quando comparadas entre si, todas as amostras do Rio de Janeiro apresentaram os mesmos padrões de SSCP para o exon 2 dos genes DQB. Ao serem comparadas com as amostras do Rio Grande do Sul, observou-se que o padrão de migração de bandas das amostras destas duas localidades é semelhante (sugerindo um similaridade na sua seqüência primária), com algumas amostras do Rio Grande do Sul diferindo pela presença de bandas adicionais, como comentado anteriormente. Ainda, a comparação de amostras do Rio de Janeiro e algumas da Argentina demonstrou haver uma diferença mínima de migração eletroforética no gel de SSCP (Figura 12). É possível verificar um pequeno retardo em todas as bandas das amostras provenientes do Rio de Janeiro. Dentre as amostras provenientes da Argentina verificou-se dois padrões de migração: um mais rápido que os observados para o Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, e outro semelhante ao padrão de migração das amostras destas duas localidades de amostragem. Este fato sugere a ocorrência de polimorfismo no exon 2 do gene DQB de MHC classe II na população de toninha da Argentina, contrastando com uma baixa variabilidade genética neste mesmo loco nas populações de Rio Grande do Sul e do Rio de Janeiro.

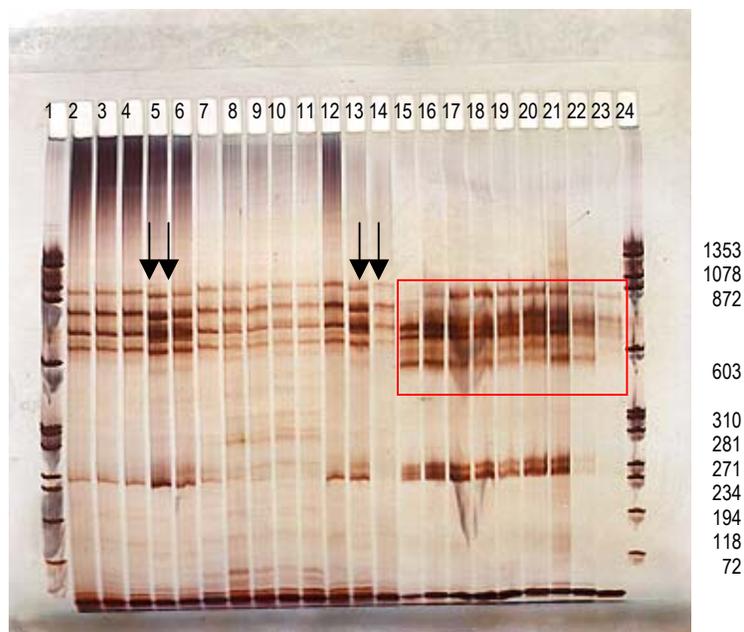


Figura 12. Gel de SSCP com amostras de toninha e lobo marinho sul-americano. Amostras de toninha provenientes do Rio de Janeiro e Argentina linhas 2-14 (as setas indicam amostras provenientes da Argentina). Em destaque, amostra de lobo marinho sul-americano sob diferentes condições com o sistema *PCR Enhancer* (Gibco BRL): teste 1.1 linha 16; teste 1.2 linha 17; teste 1.3 linha 18; teste 2.1 linha 19; teste 2.2 linha 20; teste 3 linha 21; teste 4 linha 22; teste 5 linha 23 (para detalhes consulte o item 3.6 e Tabela 2). Marcador de Peso Molecular ϕ X 174/Hae III (Gibco BRL) linha 1 e 24.

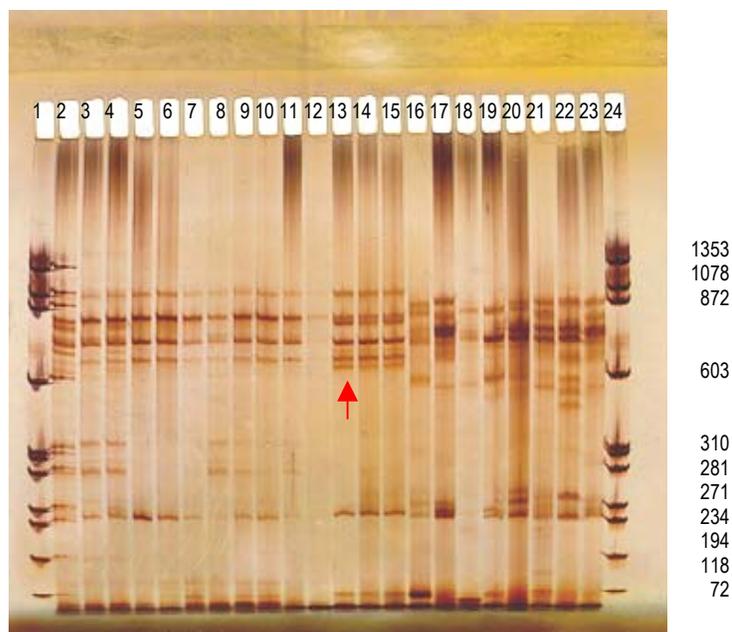


Figura 13. Gel de SSCP com amostras de toninha e lobo marinho sul-americano. Disposição das amostras de esquerda para direita: Marcador de Peso Molecular ϕ X 174/Hae III (Gibco BRL) linha 1 e 24, amostras de toninha provenientes do Rio Grande do Sul linhas 2-15; amostras de lobo marinho sul-americano linhas 16-23 (sem tratamento com o sistema *PCR Enhancer*, Gibco BRL). A seta indica a ocorrência de bandas adicionais (consultar o texto).

4.3 Seqüenciamento

Tanto o seqüenciamento manual quanto o automático dos produtos de PCR das amostras de lobo marinho sul-americano mostraram-se pouco informativos. A presença de ambigüidades nas seqüências refletiu-se na baixa qualidade da seqüência obtida no seqüenciamento automático (independentemente do modo de purificação ou tratamento do produto de PCR) e na impossibilidade de leitura da seqüência obtida pelo seqüenciamento manual. Dentre as 6 amostras seqüenciadas manualmente, apenas parte das seqüências de 2 amostras puderam ser lidas.

Para as amostras de toninha também foram observadas dificuldades em obter boas seqüências quando o produto de PCR era seqüenciado diretamente. Este problema foi parcialmente solucionado com a excisão das bandas do gel de SSCP e posterior reamplificação a partir do DNA eluído. Das 30 bandas excisadas do gel de SSCP (ver item 3.6), apenas o DNA eluído de 9 bandas foi reamplificado. A baixa eficiência de reamplificação foi provavelmente resultante de inibição proveniente dos produtos usados na coloração dos géis, ou da própria constituição dos mesmos, como pode ser visto na Figura 14.

A eficiência do processo de reamplificação direta foi demonstrada pelo resultado positivo de amplificação da reação A, que não incluía o eluído. Na reação B ficou evidente a ausência de inibição causada por um produto de PCR sobre uma nova reação de PCR. Entretanto, a adição do eluído das bandas do gel de SSCP em uma reação de PCR inibiu a amplificação. Por este motivo, utilizou-se para o seqüenciamento, o produto de PCR obtido em uma segunda etapa de reamplificação do material eluído.

Foram seqüenciados manualmente os produtos de reamplificação relativo a uma porção do exon 2 do gene DQB, derivados das 4 bandas de uma mesma amostra de toninha do Rio Grande do Sul. Foi possível fazer a leitura do fragmento completo de 172pb. A seqüência obtida tem homologia de 98, 86, 84% com as de *Delphinapterus leucas* (Beluga), *Arctocephalus gazella* (Lobo Marinho

Antártico) e humanos, respectivamente, para o referido gene. O alinhamento da seqüência é apresentado na Figura 15. Entretanto, o seqüenciamento de algumas bandas apresentaram ambigüidades na região próxima ao *primer* antisense, sugerindo que a reamplificação das bandas do gel de SSCP não é capaz de purificar o produto de PCR, e que as 4 bandas verificadas no gel de SSCP são derivadas de diferenças nas seqüências primárias dos produtos de amplificação de uma mesma amostra.

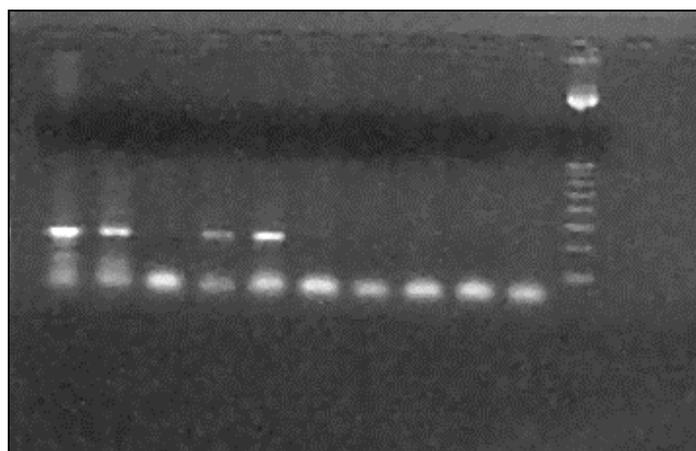


Figura 14. Resultado dos testes de inibição. Disposição das amostras da esquerda para a direita: Controles Positivos linhas 1 e 2 (amostra de toninha B.19 linha 1; DNA humano linha 2), Controle Negativo linha 3, Reação A linha 4, Reação B linha 5, Reação C linha 6, Reação D linha 7, Reação E linha 8, Reação F linha 9, Reação G linha 10, Marcador de Peso Molecular (*ladder* 100pb, Amersham Pharmacia). Para detalhes sobre as reações consulte o item 3.6 e a Tabela 3.

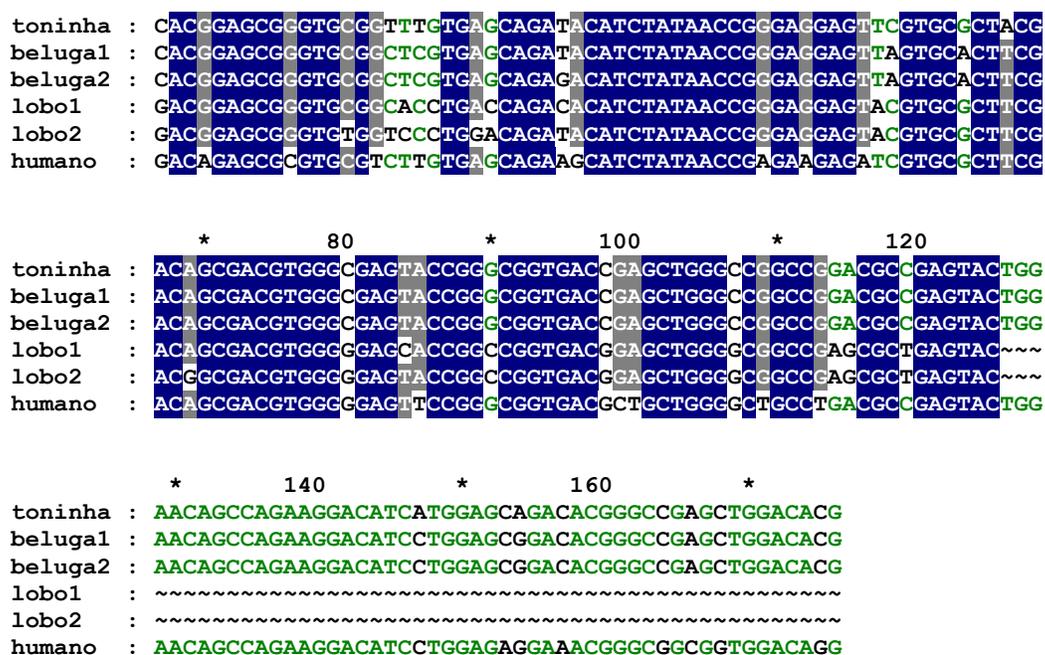


Figura 15. Alinhamento da sequência do exon 2 do gene DQB de MHC classe II de toninha. Alinhamento da sequência obtida no presente estudo com seqüências homólogas de outros mamíferos depositadas no *GenBank*.

5. Discussão

5.1 Aspectos técnicos

A formação de dímeros de *primers*, a qualidade do DNA extraído e a utilização de *primers* heterólogos podem ser apontados como responsáveis pela fraca amplificação ou mesmo a ausência desta em algumas das amostras. Dentre estes fatores, pode-se considerar a utilização de *primers* heterólogos como sendo a variável mais provável para explicar os problemas apresentados nas análises. Os *primers* utilizados neste trabalho foram construídos baseados em seqüências dos genes DQB descritas para humanos, e dificuldades associadas à utilização de *primers* heterólogos já haviam sido discutidas em trabalhos envolvendo a amplificação deste loco em outras espécies de mamíferos marinhos (Murray, 1997; Pavlovic, 1998). Prendergast (1999), usou *primers* descritos para *Eubalaena glacialis* (baleia franca do norte) para amplificar o exon 2 dos genes DRB de MHC classe II de *Eubalaena australis* (baleia franca austral), e considerou este o fator que determinou a fraca amplificação ocorrida para a maioria de suas amostras, dentre todos os fatores testados. Adicionalmente, o loco DQB em humanos é reconhecidamente um complexo sistema de alelos, cujas investigações acerca da composição alélica freqüentemente apresentam dificuldades (Akiyama *et al.*, 1994). A presença de um pseudogene (DBQ3) também está associada a problemas de amplificação desta região.

A utilização do sistema *Enhancer*, a redução da concentração dos *primers* e o aumento da temperatura de anelamento nas reações de PCR não foram suficientes para eliminar os produtos de amplificação inespecíficos, o que impediu a análise das amostras de lobo marinho sul-americano e baleia franca austral.

A metodologia empregada na coleta, armazenagem e processamento dos tecidos utilizados para a extração de DNA envolveu um grande número de

variáveis, não tendo sido possível estabelecer uma relação entre os métodos empregados, a qualidade do DNA extraído e a eficiência da sua amplificação. Para que seja possível estabelecer essa relação seria necessário considerar, por exemplo, fatores como a temperatura da água no momento do encalhe acidental em rede de pesca e o período compreendido entre a morte do animal e o procedimento de necropsia. No caso de animais encalhados na praia, dificilmente pode-se determinar a data da morte do animal. Os tecidos coletados em ambas situações variaram de acordo com o estado de decomposição dos animais, tendo sido dada preferência a tecidos menos degradados. Deste modo, coletou-se diferentes tipos de tecidos para as três espécies (considerando o material proveniente das biópsias de baleia franca austral). Adicionalmente, as amostras usadas no presente trabalho foram processadas diferentemente, o que pode ter contribuído para as diferenças relativas ao processo de amplificação observadas para as três espécies.

Para a toninha, as análises de SSCP revelaram diferenças pequenas entre os padrões eletroforéticos das amostras. A fraca distinção de padrões repetiu-se em diferentes condições de eletroforese durante os testes realizados para o estabelecimento das condições de análise de SSCP. Nestes testes foi avaliada a interferência da composição dos tampões de corrida, que variaram quanto ao pH, e a temperatura de eletroforese.

A influência da temperatura durante a eletroforese em relação à mobilidade das fitas simples de DNA em análise de SSCP foi demonstrada por Bannai *et al.* (1994). Naquele trabalho, verificou-se que o mesmo fragmento é capaz de migrar diferentemente dependendo da temperatura sob a qual a eletroforese é realizada. Os autores testaram duas temperaturas de eletroforese (4^oC e 22^oC) com amostras previamente “tipadas” quanto os genes DRB1, tendo sido possível identificar o mesmo número de alelos em ambas condições. Entretanto, quando não se dispõe de um padrão de referência é importante a reprodução dos padrões de bandas em diferentes condições de temperatura a fim de não haver dúvida quanto à possibilidade da formação de artefatos que interfiram na interpretação

dos mesmos. No presente trabalho, as diferentes temperaturas de corrida não alteraram significativamente os padrões de SSCP (dados não mostrados).

A utilização de um sistema de eletroforese que mantenha a temperatura constante durante a corrida eletroforética é fundamental, pois desta condição depende a estabilidade das estruturas secundárias formadas pelas fitas simples de DNA. O aquecimento do gel de acrilamida durante a corrida desestabiliza a estrutura secundária tornando-a menos compacta, resultando em bandas difusas, de difícil interpretação (Prendergast, 1999). A reprodução do padrão de 4 bandas para as amostras de toninha testadas, sob as diferentes condições avaliadas no processo de otimização de SSCP (temperatura, tampão de corrida), sugere não estar se tratando de um artefato da técnica. Se a presença de 4 bandas fosse um artefato, se esperaria alterações nesses padrões quando fossem alteradas variáveis envolvidas na migração.

Outro aspecto importante a considerar em relação à migração das bandas durante a eletroforese é a concentração de formamida utilizada na preparação de amostras a serem carregadas no gel. A formamida (CH_3NO) atua no processo de desnaturação enfraquecendo as pontes de hidrogênio entre as fitas duplas de DNA e dificultando seu reanelamento. Quando a fita simples dobra-se sobre si mesma ao ser resfriada após o processo de desnaturação, a estabilidade, a forma e o tamanho da estrutura secundária formada são mantidos pelo estabelecimento de pontes de hidrogênio entre as bases pareadas. Altas concentrações de formamida podem dificultar a formação destas ligações, interferindo na forma e tamanho de estruturas menos estáveis, ou até mesmo impedindo o seu estabelecimento. Do mesmo modo, a concentração de DNA das amostras é um parâmetro que exerce influência sobre a formação da estrutura a ser analisada por SSCP. Uma amostra com alta concentração de DNA fita simples aumenta a probabilidade de reanelamento após a etapa de desnaturação, e uma baixa disponibilidade de fitas simples capazes de formarem estruturas secundárias reflete-se na ocorrência de bandas fracamente visualizadas em gel (Prendergast, 1999).

Uma vez estabelecida a concentração de DNA ideal para a análise de SSCP optou-se pela coloração com nitrato de prata por ser uma técnica bastante sensível e eficiente, requerendo uma quantidade menor de amostra quando comparada a outros processos de coloração, como por exemplo a coloração com brometo de etídio (Bannai *et al.*, 1994). A maior sensibilidade permite que mesmo produtos de PCR fracamente visualizados em gel de agarose possam ser identificados nos géis de SSCP.

Entretanto, a coloração com nitrato de prata é apontada como a responsável pelas dificuldades observadas durante o processo de reamplificação do DNA eluído das bandas excisadas do gel de SSCP. Ao comparar géis corados com nitrato de prata e com brometo de etídio, Calvert *et al.* (1995), demonstraram a influência da coloração, da composição do gel, do procedimento de lavagem das bandas anterior à eluição e o número de ciclos de PCR, sobre o processo de reamplificação do DNA eluído. Os autores observaram que os produtos de PCR provenientes de géis corados com nitrato de prata requerem um número maior de ciclos de amplificação, e que as bandas devem ser lavadas por um período longo (pelo menos 30 minutos), a fim de evitar os efeitos inibitórios dos reagentes usados na coloração com prata. Outro aspecto a ser considerado é o efeito da quantidade do produto eluído das bandas excisadas de géis corados com prata em reações de PCR, uma vez que a utilização de uma quantidade maior do produto eluído em uma reação de PCR implica em uma quantidade maior também dos reagentes utilizados na coloração. Deste modo, torna-se necessário otimizar a reação de PCR utilizando-se quantidades mínimas do DNA eluído, a fim de minimizar os efeitos negativos relacionados aos reagentes utilizados na coloração presentes nesta solução.

Nos testes de inibição conduzidos no presente trabalho fica evidente a inibição proveniente dos produtos utilizados na coloração com prata dos géis em reações de PCR, uma vez que a utilização de apenas 1 μ l do eluído em uma reação de PCR em presença de DNA genômico foi suficiente para impedir a produção da amplificação. A reamplificação de bandas de géis de SSCP corados com prata, deve ser conduzida levando em conta estas restrições.

Em um estudo utilizando a técnica de SSCP para identificação de alelos do sistema HLA, mostrou-se que um único alelo em indivíduos homocigotos apresenta um padrão de duas bandas, correspondentes às fitas senso e antisenso, enquanto indivíduos heterocigotos para o mesmo loco apresentam um padrão de 4 bandas (Mwenda *et al.*, 1997). No entanto, a presença de padrões de 4 bandas foi generalizada no presente estudo.

Algumas hipóteses poderiam explicar a ocorrência de padrões de 4 bandas para todas as amostras de toninha. A hipótese menos provável seria a de que amostras aleatórias obtidas em diferentes porções da distribuição geográfica da espécie pudessem ser constituídas exclusivamente por indivíduos heterocigotos. Para tanto, deveria-se supor um excesso de heterocigotos nas três localidades amostradas, com frequências genotípicas idênticas entre elas, para que a probabilidade de coleta fosse a mesma nestes três pontos, e alta o suficiente para que o resultado fosse independente do número amostral proveniente de cada uma das localidades.

Outra hipótese seria a de que o padrão observado pudesse ser o resultado da amplificação de outra região além do DQB. Murray (1997) detectou por SSCP e confirmou por seqüenciamento a duplicação do gene DQB em baleia franca do norte, onde até 4 bandas por indivíduo puderam ser observadas, tendo identificado pelo menos uma seqüência comum à toda amostra.

Por outro lado, a ocorrência de duas estruturas secundárias igualmente estáveis originadas a partir de uma única seqüência de nucleotídeos não poderia ser descartada. A eluição do DNA das 4 bandas de um mesmo indivíduo e o seqüenciamento de cada uma delas foram importantes para o esclarecimento destas questões. O resultado do seqüenciamento sugere que os *primers* utilizados estejam anelando também em outra região além do loco DQB1, não tendo sido possível, entretanto, identificar que região está sendo amplificada inespecificamente.

5.2 Aspectos biológicos

A diferença detectada no padrão de migração das amostras do Rio de Janeiro em relação às da Argentina (Figura 14), está de acordo com os pressupostos sobre a existência de pelo menos duas populações ao longo da distribuição da espécie. A ocorrência de “hiatos” na distribuição (Figura 4), parece conferir à população de toninhas do Rio de Janeiro um isolamento em relação a populações próximas. Análises prévias de DNA mitocondrial de amostras do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul permitiram separar geneticamente estas duas populações e identificar níveis de variabilidade mais baixos para a população do Rio de Janeiro em relação à do Rio Grande do Sul (Secchi *et al.*, 1998). Embora não tenha sido corroborada a distinção genética entre estas duas populações no presente trabalho, o padrão de migração de SSCP idêntico observado entre todas as amostras de toninha do Rio de Janeiro concorda com a reduzida variabilidade genética desta população, descrita anteriormente por outros autores.

Parece razoável apontar o isolamento desta população como um fator importante para a reduzida variabilidade genética detectada. Recentemente, Lázaro (2000) sugeriu que as populações de toninha obedecem claramente a um padrão de isolamento por distância (fluxo gênico mais provável entre vizinhos) e que a colonização da região do Rio de Janeiro possa ser um evento recente.

As estimativas de abundância para a espécie nesta região ainda são incertas (Di Benedito & Ramos, 2001), mas baseando-se nos registros de captura acidental em redes de pesca sugere-se que esta população seja menor que a população ao sul da distribuição.

Gaines *et al.* (1997) demonstraram que isolamento, tamanho populacional reduzido e processos recentes de colonização compõem o cenário ideal para a redução de variabilidade em populações de mamíferos, pela redução do fluxo

gênico, aumento do endocruzamento e diminuição do tamanho efetivo da população (N_e).

As características da região que parecem confinar a distribuição da espécie ao norte do estado do Rio de Janeiro, como a descarga de água doce do Rio Paraíba do Sul, podem também influenciar a diversidade de patógenos deste habitat.

Uma menor pressão de seleção dirigida por uma baixa diversidade de patógenos no ambiente marinho tem sido atribuída como uma provável explicação para os níveis de polimorfismo mais baixos observados em diferentes espécies de mamíferos marinhos (Slade, 1992; Hoelzel *et al.*, 1999). Entretanto há pouca informação sobre a caracterização, ocorrência e prevalência de parasitas para toninha, havendo um maior número de dados para as populações do Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina (Aznar *et al.*, 1995; Andrade, *et al.*, 1997). Desse modo, associações deste tipo para as amostras de toninha do Rio de Janeiro, bem como para as do Rio Grande do Sul e da Argentina, dependem de mais dados, devendo ser conduzidas de modo criterioso.

Algumas amostras de toninha do Rio Grande do Sul apresentaram bandas adicionais (além das 4 presentes em todas as amostras, Figura 13) que correspondem em posição às bandas visualizadas em um dos dois padrões verificados para indivíduos da Argentina. Esta observação parece indicar a ocorrência de indivíduos heterozigotos para um dos locos, sendo que um dos alelos parece estar presente também na população da Argentina. Adicionalmente, a ocorrência de dois padrões de migração para a população da Argentina demonstra haver polimorfismo para esta população, diferentemente do que ocorre ao norte da distribuição.

A partir destas observações a população da Argentina poderia estar representando um centro de diversidade genética, sendo mais polimórfica que as populações marginais. A ausência de variabilidade detectada por SSCP para a população do Rio de Janeiro corrobora a hipótese sugerida por Lázaro (2000), que acredita estar se tratando de uma população marginal colonizada recentemente, uma vez que espera-se que este tipo de população apresente substancialmente

menor variabilidade genética que a população remanescente (Gaines *et al*, 1997). Do mesmo modo, a população do Rio Grande do Sul configuraria uma população marginal, que por proximidade à população central apresentaria níveis de variabilidade intermediários entre os extremos da distribuição da espécie, supondo haver fluxo gênico entre as populações mais próximas (Rio Grande do Sul e Argentina).

Sendo assim, quando se analisa a semelhança entre um dos padrões de bandas observados para as amostras da Argentina com os padrões observados para as amostras do Rio Grande do Sul e do Rio de Janeiro, parece razoável sugerir que o mesmo representa a presença de um alelo que diminui em frequência em direção ao sul da área de distribuição da espécie. A presença de um padrão alternativo na Argentina, que representaria um segundo alelo, e sua ocorrência em heterozigose em indivíduos coletados no Rio Grande do Sul reforçaria a idéia de um gradiente latitudinal de frequências alélicas.

Entretanto, a precisa identificação destes alelos nas três populações, suas frequências e a análise da variabilidade inter-populacional poderão ser melhor avaliados somente quando for possível obter seqüências claras dos produtos de PCR.

Baseando-se nas análises de SSCP do presente trabalho, a reduzida variabilidade é demonstrada pela semelhança no padrão de bandas de todas as amostras de toninha para a porção do exon 2 dos genes DQB, que codifica o sítio de ligação ao peptídeo antigênico na molécula de MHC classe II. Partindo desta constatação, quais seriam as causas determinantes para a redução de variabilidade nestas populações?

Em relação à população do Rio de Janeiro, os aspectos abordados anteriormente, como isolamento e um possível processo de colonização recente, parecem ser os principais responsáveis pela ausência de variabilidade detectada por SSCP. A redução na variabilidade é dependente do tamanho das populações isoladas, sendo necessário, portanto, mais dados sobre estimativas de abundância para a população de toninhas do Rio de Janeiro e sobre sua variabilidade genética em toda a área de distribuição, para que se possa avaliar a

depauperação genética suposta para esta localidade. Estes dados são fundamentais para o delineamento de ações locais que visem a manutenção da espécie.

Em relação às populações do Rio Grande do Sul e da Argentina, outros aspectos devem ser considerados. As taxas de mortalidade registradas para a espécie (Ott, 1998) diferem entre estas localidades, sendo que a situação mais crítica é registrada para o Rio Grande do Sul. Modelos matemáticos tem sido usados para estimar taxas de crescimento intrínseco e viabilidade desta população, tendo sido demonstrado que este estoque populacional está em declínio (Secchi, 2000). Alguns modelos teóricos sugerem que processos de constrição demográfica prolongados podem reduzir a variação em genes nucleares e mitocondriais (Gaines *et al.*, 1997). Mesmo que os registros sobre capturas acidentais em rede de pesca sejam datados, em termos evolutivos, de períodos muito recentes, sua continuidade nas duas regiões, certamente tem atuado na redução do tamanho das populações. Considerando o modelo proposto acima, a captura acidental pode ser apontada como uma das causas responsáveis pela reduzida variabilidade observada.

Em termos evolutivos, registros indicam que a emergência de espécies da família Delphinidae, na metade do período Mioceno, poderia ser responsável pela redução significativa das espécies da Família Platanistidae, da qual a toninha faz parte (Cassens *et al.*, 2000). A redução extrema da espécie, em número de indivíduos, pode ter resultado em uma redução global da sua variabilidade genética, sendo que resquícios desta reduzida variabilidade poderiam ter sido mantidos em alguns sistemas genéticos nas espécies atuais, a exemplo do que se tem descrito para algumas linhagens de alelos de MHC em humanos e primatas não humanos.

Os dados obtidos no presente trabalho não permitem maiores conclusões que possam orientar planos de manejo para a espécie, sendo necessários estudos adicionais sobre o loco DQB, bem como estudos incluindo outros genes de MHC (classe I e classe II).

6. Conclusões

1. A utilização de *primers* heterólogos foi considerada como sendo o principal fator que impossibilitou a otimização das reações de PCR. A técnica de SSCP mostrou-se eficiente na determinação da variabilidade, entretanto, as dificuldades associadas ao processo de amplificação refletiram-se negativamente na análise de SSCP e no seqüenciamento.
2. Os *primers* utilizados no presente trabalho amplificaram uma seqüência que corresponde ao exon 2 dos genes DQB de MHC classe II, e outra seqüência muito semelhante que não pode ser identificada por seqüenciamento.
3. Estes *primers* não são adequados para a identificação de polimorfismos de conformação de fita simples (SSCP) para lobo marinho sul-americano e baleia franca austral.
4. Os níveis de variabilidade do exon 2 do gene DQB de MHC classe II, detectados por SSCP para as amostras de toninha em três pontos da distribuição geográfica da espécie é reduzido, sendo possível sugerir ausência total de variabilidade para o norte da distribuição (Rio de Janeiro).
5. As amostras do Rio Grande do Sul e da Argentina parecem apresentar variabilidade de alelos nos locos amplificados por PCR, sendo maior no extremo sul da distribuição da espécie.
6. Não foi possível distinguir geneticamente a população do Rio Grande do Sul da do Rio de Janeiro, como sugerido em trabalhos anteriores, analisando os padrões de SSCP obtidos no presente trabalho.

7. Referências Bibliográficas

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pober, J.S. 2000. **Cellular and molecular immunology**. Pennsylvania, 4 Ed., W.B. Saunders Company.
- Akiyama, K., Yoshii, T., Obata, F., Kashiwagi, N.A. & Ishiyama, I. 1994. Polymerase Chain Reaction (PCR)/Single-strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis of the human HLA-DQB regions. **Japanese Journal of Legal Medicine**. 48(1): 38-43.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A. A., Zhang, J. Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST™: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. 25: 3389-3402.
- Andrade, A. & Pinedo, M.C. 1997. The gastrointestinal helminths of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*, in Southern Brazil. **Report of the International Whaling Commission**. 47: 669-673.
- Aznar, F.J., Raga, J.A., Corcuera, J. & Monzón, F. 1995. Helminths as biological tags for franciscana (*Pontoporia blainvillei*) (Cetacea, Pontoporiidae) in Argentinian and Uruguayan waters. **Mammalia**. 59(3): 427-435.
- Bannai, M., Tokunaga, K., Lin, L., Kuwata, S., Mazda, T., Amaki, I., Fujisawa, K. & Juji, T. 1994. Discrimination of human HLA-DRB1 alleles by PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) method. **European Journal of Immunogenetics**. 21:1-9.
- Bonner, N. 1994. **Seals and Sea Lions of the World**. Facts on File, New York.
- Calvert, R.J., Weghorst, C.M. & Buzard, G.S. 1995. PCR Amplification of Silver-Stained SSCP Bands from Cold SSCP Gels. **BioTechniques**. 18(5): 782-786.
- Campagna, C. & Lichter, A. 1996. **Las Ballenas de la Patagonia y Ensayos sobre la biología y la conservación de la ballena Franca Austral**. Leograf & Compañía. Argentina.
- Carrington, M., Miller, T., White, M., Gerrard, B., Stewart, C., Dean, M. & Mann D. 1992. Typing of HLA-DQA1 and DQB1 using DNA Single-Strand Conformation Polymorphism. **Human Immunology**. 33: 208-212.
- Cassens, I., Vicario, S., Waddell, V.G., Balchowsky, H., Van Belle, D., Ding, W., Fan, C., Mohan, R.S.L, Simões-Lopes, P.C., Bastida, R., Meyer, A., Stanhope, M.J. & Milinkovitch, M.C. 2000. Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages. **Proceedings of National Academie of Science USA**. 97(21): 11343-11347.

- Crespo, E.A., Harris, G & Gonzáles, R. 1998. Group size and distributional range of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. **Marine Mammal Science**. 14(4): 845-849.
- Cummings, W. 1985. Right whales *Eubalaena glacialis* (Müller, 1776) and *Eubalaena australis* (Desmoulins, 1822). Em: **Handbook of Marine Mammals**. Vol. 3. Academic Press Inc. London.
- Gaines, M.S., Diffendorfer, J.E., Tamarin, R.H. & Whittam, T.S. 1997. The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. **Journal of Heredity**. 88:294-304.
- Gyllensten, U.B., Lashakari, D. & Erlich, H.A. 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, H., Rosemberg, A., Corcuera, J., Monzon, F & Brownell, R.L. 2000. Secuencias de la region control de ADN mitocondrial de la franciscana, *Pontoporia blainvillei*: comparación entre poblaciones de Brasil y Argentina. Em: **9ª Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur**. Buenos Aires, Argentina. (datos não publicados)
- Harding, C.V. 1997. **MHC molecules and antigen processing**. R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA.
- Hayashi, T., Seyama, T., Ito, T., Kusunoki, Y., Hirai, Y., Nakamura, N. & Akiyama, M. 1992. A simple and rapid method for HLA-DAQ1 genotyping by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism and restriction enzyme cleavage analysis. **Electrophoresis**. 13: 877-879.
- Hedrick, P.W. & Thomsom, G. 1988. Maternal-fetal interactions and the maintenance of HLA polymorphism. **Genetics**. 119: 205-212.
- Hedrick, P. W. 1994. Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. **The American Naturalist**. 14(6): 945-964.
- Hedrick, P.W., Lee, R.N. & Parker, K.M. 2000a. Major Histocompatibility Complex (MHC) variation in the endangered Mexican Wolf and related canids. **Heredity**. 85:617-624.
- Hedrick, P.W., Parker, K.M., Gutiérrez-Espeleta, G.A., Rattink, A. & Lievers, K. 2000b. Major Histocompatibility Complex variation in the *Arabian orix*. **Evolution**. 54(6): 2145-2151.
- Hill, A.V.S., Allsopp, C.E.M., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Twumasi, P., Rowe, P.A., Bennett, S., Brewster, D., McMichael, A.J. & Greenwood, B.M. 1991. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. **Nature**. 352: 595-600.

- Hoelzel, A.R., Stephens, J. & O'Brien, S.J. 1999. Molecular Genetic Diversity and Evolution at the MHC DQB Locus in Four Species of Pinnipeds. **Molecular Biology and Evolution**. 16(5): 611-618.
- Huges, A.L. & Nei, M. 1988 Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. **Nature**. 335: 167-170.
- Huges, A.L. & 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. 1997. **Mamíferos Aquáticos do Brasil: Plano de Ação**. Edições Ibama – Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- IUCN. 1991. Dolphins, Porpoises and Whales of the World. **The IUCN Red Data Book**. Compilado por M. Klinowska. International Union for Conservation of Nature and Natural Resource. Gland, Switzerland.
- IUCN. 2000. **Red list of threatened species**. Compilado por Hilton-Taylor. International Union for Conservation of Nature and Natural Resource. Gland, Switzerland.
- IWC. 1986. Report of the workshop on the status on right whale. Em: Brownel, R.L., Best, P.B & Prescott, J.H.(eds.). **Right whales: past and present status. (special issue 10)**. Cambridge.
- Janeway, C.A. & Travers, P. 1997. **Imunobiologia. O sistema imunológico na saúde e na doença**. 2. Ed. Artes Médicas, Porto Alegre.
- Lázaro, M. 2000. Variacion genetica y estructura poblacional de la franciscana: aporte de um estudio basado en ejemplares de la costa uruguaya. Em: **Fourth workshop for the coordinated research and conservation of the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the western South Atlantic**. Porto Alegre, Brasil. (dados não publicados).
- Lázaro, M. & Lessa, E. P. 2000. Variation de la region de control de ADN mitocondrial en franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) de la costa Uruguay. Em: **9ª Reunión de Trabajo de Especialistas em Mamíferos Acuáticos del Sur**. Buenos Aires, Argentina. (dados não publicados).
- Lessa, E.P. & Applebaum, G. 1993. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. **Molecular Ecology** 2: 119-129.
- Lichter, A. 1992. **Huellas en la arena, Sombras en el mar**. Terra Nova, Buenos Aires.

- Massoia, E. & Chebez, J.C. 1993. **Mamíferos silvestres del archipiélago fuegino**. 2ª Ed. Lo. La., Buenos Aires, Argentina.
- Medrano, J.F.; Aasen, E. & Sharrow, L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. **BioTechniques** 8: 43.
- Moreira, L.M. & Siciliano, S. 1991. Northward extension range for *Pontoporia blainvillei*. Em: **9th Biennial Conference on Biology of Marine Mammals**. Chicago, Illinois.
- 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(4): 582-593.
- Murray, B.W. 1997. Major histocompatibility complex class II sequence variation in cetaceans: DQB e DRB variation in beluga (*Delphinapterus leucas*) and DQB variation in North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*). **Ph.D. Thesis**. McMaster University, Hamilton, Ontário, Canadá.
- Mwenda, J.M.; Hashiba, K.; Bamba, C.S. & Shotake, T. 1997. Analysis of primate histocompatibility complex (MHC) DQA1 locus by PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). **Cellular and Molecular Biology**. 43(4): 471-475.
- Nicholas, K.B, Nicholas, H.B.J. 1997. **Gene Doc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments**. Distributed by the author.
- Nizetic, D.; Figueroa, F.; Dembic, Z.; Nevo, E. & Klein, J. 1987. Major histocompatibility complex gene organization in the mole rat *Spalax ehrenbergi*: Evidence for transfer of function between class II genes. **Proceedings of National Academie of Science USA**. 84: 5828-5832.
- O' Brien, S.J.; Wildt, D.E. & Bush, M. 1986. The cheetah in genetic peril. **Scientific American**. 245 (5): 68-76.
- O' Brien, S.J. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. **Proceedings of National Academie of Science USA**. 91: 5748-5755.
- 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.
- Oliveira, L.R. 1999. Caracterização das ocorrências e ecologia alimentar de pinípedes(carnívora. pinnipedia) no litoral norte do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, entre 1993 e 1998. **Dissertação de mestrado**. Porto Alegre. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. & Hayashi, K. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**. 5:874-879.
- Ott, P.H. 1998. Análise das capturas acidentais da toninha, *Pontoporia blainvillei*, no litoral norte do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Porto Alegre. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Page, R.D.M. & Holmes, E.C. 1998. **Molecular Evolution A Phylogenetic Approach**. Blackwell Science, Malden, MA.
- Palazzo, J.T. & Flores, P.A.C. 1999. **Plano de ação para a conservação da baleia Franca, *Eubalaena australis*, no estado de Santa Catarina**. IWC/Brasil.
- Patterson, S., Wilson, K. & Pemberton, J.M. 1998. Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries L.*). **Proceedings of National Academie of Science USA**. 95:3714-3719.
- Pavlovic, Z. 1998. An examination of allelic variation at the DQ β locus of the MHC complex in the endangered North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*). **Masters Thesis**. McMaster University, Hamilton, Ontário, Canadá.
- Perrin, W.F. & Brownell, R.L., Jr. 1989. Report of the workshop. In: Perrin, W.F., Brownell, R.L., Zhou Kaya, Liu Jiankang (eds.). **Biology and Conservation of River Dolphins**, p. 1-22.
- Praderi, R., Pinedo, M.C. & Crespo, E.A..1989. Conservation and management of *Pontoporia blainvillei* in Uruguay, Brazil and Argentina. Em: Perrin, W.F., Brownell, R.L., Zhou Kaya, Liu Jiankang (eds.). **Biology and Conservation of River Dolphins**, p. 52-56.
- Prendergast, J. 1999. Allelic variation of Major Histocompatibility Complex (MHC) class 2 in DR β loci in the South Atlantic right whale (*Eubalaena australis*). **Masters Thesis**. McMaster University, Hamilton, Ontário, Canadá.
- Pinedo, M.C., Praderi, R. & Brownell, R.L., Jr. 1989. Review of the biology and status of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. In: Perrin, W.F., Brownell, R.L., Zhou Kaya, Liu Jiankang (eds.). **Biology and Conservation of River Dolphins**, p. 46-51.
- Pinedo, M.C. 1991. Desenvolvimento and variation of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. **Masters Thesis**. University of California, Santa Cruz.

- Reifel-Miller, A.E.; Conarly, D.M.; Schacht, P.S.; Birch, K.A.; Heath, W.F. & Stramm, L.E. 1996. Designing positive internal controls for mutation detection gel. **BioTechniques**. 21: 1036-1038.
- 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, E.R., Zerbini, A.N., Bassoi, M., Dalla Rosa, L., Moller, L.M. & Rocha-Campos, C.C. 1997. Mortality of franciscanas, *Pontoporia blainvillei*, in coastal gillnetting in southern Brazil. **Report of the International Whaling Commission**. 47: 653-658.
- 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.R. 1999. Taxa de crescimento potencial intrínseco de um estoque de franciscanas, *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1846) (Cetacea, Pontoporiidae) sob o impacto da pesca costeira de emalhe. **Tese de Mestrado**. Rio Grande. Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, Brasil.
- Secchi, E.R. 2000. Population viability analyses (PVA) for a franciscana stock: when is the time for action? Em: **Fourth workshop for the coordinated research and conservation of the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the western South Atlantic**. Porto Alegre, Brasil.(dados não publicados).
- Secchi, E.R.; Danilewicz, D.; Ott, P.H.; Ramos, R.; Lázaro, M.; Mango, J. & Wang, J. 2000. Report of the working group on stock's identity. Em: **Fourth workshop for the coordinated research and conservation of the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the western South Atlantic**. Porto Alegre, Brasil. (dados não publicados).
- Siciliano, S.; Di Benedito, A.P.M. & Ramos, R. 2000. Populações isoladas do loto-amarelo *Pontoporia blainvillei* no sudeste do Brasil: considerações sobre o uso habitat e aspectos de conservação. Em: **Fourth workshop for the coordinated research and conservation of the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the western South Atlantic**. Porto Alegre, Brasil. (dados não publicados).
- Slade, R.W. 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.

Trowsdale, J.; Groves, V. & Arnason, A. 1989. Limited MHC Polymorphism in whales. **Immunogenetics**. 29: 19-24.

Yukhi, N. & O' Brien, S.J. 1990. DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. **Proceedings of National of Science USA**. 87: 836-840.