

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Estudo de Polimorfismo de Tamanho em Sequência
do DNA Mitocondrial de Felinos da América do Sul**

Eduardo Eizirik

Orientador: Prof. Dr. Aldo M. Araújo

Co-orientador: M. Sc. Sandro L. Bonatto

Dissertação apresentada para a
conclusão do Curso de Bacharelado
em Ciências Biológicas, Ênfase
em Genética, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

1994

Agradecimentos

Ao Sandro L. Bonatto pela orientação; pelos ensinamentos sobre evolução e biologia molecular; pela oportunidade diária de discutir idéias sobre os mais diversos assuntos; pelo convívio amigo e estimulante.

Ao Prof. Aldo M. Araújo pela chance de realizar o presente trabalho; pelos conselhos e sugestões; pela amizade.

À minha família, em especial meus pais e minha irmã, pelo constante apoio, incentivo e companheirismo.

À Laura Utz pelo carinho, pela ternura e pelo auxílio na realização deste trabalho.

À Profa. Loreta B. Freitas pela amizade, pelos constantes ensinamentos, sugestões e conselhos, bem como pela leitura crítica de parte deste trabalho.

Ao Prof. Francisco M. Salzano pela possibilidade de realizar o presente estudo no Laboratório de Grupos Sangüíneos do Departamento de Genética da UFRGS e pelo custeio de praticamente todos os reagentes utilizados.

Aos colegas e professores do Departamento de Genética da UFRGS que colaboraram para a realização deste trabalho, em especial à Eliane Bandinelli, à Profa. Mara Hutz e ao Prof. Thales R. O. Freitas, pelo empréstimo de material bibliográfico e de laboratório.

A Jan K. F. Mähler Jr., Cibele B. Indrusiak, Dênis A. Sana, Wanderlei Moraes, Peter G. Crawshaw Jr., Edson Salomão, Faiçal Simon, Adauto V. Nunes, Cláudio Giacomini, José L. Boorer e Julio Monguillot, pelo auxílio na obtenção de amostras de material biológico de felinos.

Ao Prof. Alfredo Ximenez, ao Dr. Warren Johnson e ao Marcelo Mazzolli pelo fornecimento de material bibliográfico, bem como pela discussão a respeito de diversos tópicos envolvendo evolução, biogeografia e ecologia de felinos neotropicais.

A todos aqueles que me auxiliaram de alguma forma na realização das várias etapas deste trabalho.

Sumário

	pg.
1. Introdução	6
a) A Família Felidae	6
b) Felinos Neotropicais	12
c) Estudos Evolutivos, Genéticos e Moleculares em Felinos	34
d) O Genoma Mitocondrial Animal	38
e) Variação de Tamanho no DNA Mitocondrial Animal	44
f) Objetivos	49
2. Material e Métodos	50
a) Obtenção de Amostras	50
b) Extração de DNA	52
c) Amplificação por PCR	56
d) Identificação e Caracterização do Polimorfismo de Tamanho	60
3. Resultados	61
a) Amostras Obtidas	61
b) Extração de DNA	65
c) Amplificações por PCR	66
d) Caracterização do Polimorfismo de Tamanho	66

	pg.
4. Discussão	75
a) Obtenção de Amostras, Extração de DNA e Amplificações por PCR	75
b) Polimorfismo de Tamanho	77
5. Conclusões e Resumo	82
6. Conclusions and Summary	84
7. Referências Bibliográficas	86
8. Anexos	102

1. Introdução

a) A Família Felidae

A família Felidae (Mammalia: Carnivora) compreende cerca de 37 espécies (Nowak, 1991), distribuídas por todo o planeta, à exceção dos pólos, Austrália, Nova Zelândia, Japão, Madagascar e certas ilhas da Australásia e do Caribe. Todos os seus integrantes são predadores especialistas, ocupando posições de topo de pirâmide alimentar nos mais diversos biomas terrestres compreendidos em sua distribuição, dos desertos aos pântanos, das florestas tropicais às cordilheiras de montanhas. Essa diversidade de habitats sugere uma versatilidade que aparentemente se opõe à extrema especialização morfológica, anatômica e comportamental característica de todos os membros desta família (Eisenberg, 1981; Neff, 1986). Observa-se, entretanto, que esta variabilidade e adaptabilidade refletem especializações secundárias, muitas delas incluindo comportamentos aprendidos, para novos hábitos, ao mesmo tempo em que são mantidos traços comuns que já revelam uma acentuada especialização, principalmente morfológica, para o hábito predatório. Estes traços, provavelmente conservados desde a origem da família, deixam poucas dúvidas quanto ao seu caráter monofilético. Entre estas características derivadas compartilhadas (sinapomorfias), pode-se destacar a diminuição do comprimento da face, a extrema redução no número de dentes, a divisão do ectotimpânico e o surgimento de lobos cutâneos na ponta dos dedos que protegem garras retráteis (Salles, 1992).

O posicionamento filogenético da família Felidae em relação às outras linhagens que compõem a ordem Carnivora permanece controverso, pois

diferentes abordagens levam a arranjos taxonômicos diversos (ver Wozencraft, 1989a), alterando inclusive o número de famílias reconhecidas (Simpson, 1945; Neff, 1986; revisão em Wozencraft, 1989b). Parece ser consensual, entretanto, a colocação dos felídeos na superfamília Feloidea (ou Aeluroidea), juntamente com as famílias atuais Hyaenidae (hienas) e Viverridae (mangustos, civetas, etc.), além de outras linhagens extintas (ver Martin, 1989; Bryant, 1991). Dois dos esquemas filogenéticos atualmente aceitos para as linhagens de carnívoros estão representados na figura 1.1.

A aparição mais antiga de um felídeo no registro fóssil é a do gênero *Pseudaelurus*, do Mioceno da Europa (Simpson, 1945; Martin, 1989). Presume-se que a origem da família Felidae teria se dado há cerca de 35 milhões de anos, no Oligoceno Superior ou Mioceno Inferior (Savage & Long, 1986; Neff, 1986), possivelmente no norte da Ásia (Martin, 1989), e provavelmente a partir de uma linhagem derivada da família Viverridae. Esta família, extinta desde o Eoceno, estaria na base do tronco comum da superfamília Feloidea (ver figura 1.2). A separação da linhagem dos Feloidea da outra superfamília de carnívoros, Canoidea (ou Arctoidea), provavelmente ocorreu muito cedo na evolução da ordem Carnivora, possivelmente no Paleoceno (Neff, 1986).

Apesar de apresentarem a maior variação de tamanho entre todas as famílias atuais de carnívoros (Gittleman, 1985 apud Wozencraft, 1989b) e uma considerável diversidade de hábitos e habitats, os felinos¹ revelam uma

¹ O conceito de "felino", a nível de sistemática, refere-se originalmente a um membro da subfamília Felinae (e.g. Simpson, 1945). A definição desta, entretanto, é extremamente controversa na literatura (Simpson, 1945, Savage & Long, 1986, Wozencraft, 1989b), e estudos recentes (e.g. Collier & O'Brien, 1985; Janczewski et al., 1992) indicam que trata-se de um grupo não natural, perdendo, portanto, sua validade taxonômica. Desta forma,

surpreendente conservação no que tange aos seus traços básicos de morfologia, cariologia e comportamento (Leyhausen, 1979 apud Neff, 1986; Wurster-Hill & Centerwall, 1982; Wozencraft, 1989b). Isto, associado a um alto grau de paralelismo e convergência, tanto geográfica (Kiltie, 1988; Martin, 1989) quanto temporal (Martin, 1989), entre espécies atuais e fósseis, torna peculiar e complexa a tarefa de propor uma organização sistemática consistente para este grupo (Simpson, 1945; Nowak, 1991; Salles, 1992).

A grande maioria dos autores atuais concorda com o número de 37 espécies (Nowak, 1991), embora ainda haja divergências consideráveis envolvendo casos específicos (ver Nowak, 1991). As relações filogenéticas entre estas espécies, entretanto, estão ainda consideravelmente obscuras, o que se reflete no grande número de diferentes esquemas propostos para agrupá-las em gêneros e sub-gêneros (Honacki et al., 1982; ; Wozencraft, 1989b; Nowak, 1991), de acordo com a priorização, por parte de cada autor, de um ou de outro conjunto de caracteres taxonômicos.

Os esquemas mais recentes variam desde a colocação de todos os felinos em apenas dois gêneros (*Felis* e *Acinonyx*) até a subdivisão da família em 19 gêneros diferentes (ver Nowak, 1991). Uma das classificações mais aceitas atualmente, e que será seguida no presente trabalho, divide a família Felidae em quatro gêneros: *Felis*, *Neofelis*, *Panthera* e *Acinonyx* (Nowak, 1991).

O gênero *Felis* Lineu, 1758 compreenderia 14 subgêneros e 30 espécies, sendo estas as de menor porte dentro da família, à exceção do puma, *Felis* (*Puma*) *concolor*. Estudos recentes (e.g. Collier & O'Brien, 1985; Wayne et al.,

utilizo, neste trabalho, o termo mais coloquial "felino" como sinônimo de "felídeo", ou seja, qualquer membro da família Felidae.

1989) indicam que não se trata de um grupo monofilético, e sua composição é extremamente controversa (Nowak, 1991).

O gênero *Neofelis* Gray, 1867 contém uma única espécie, com um conjunto de características que parece ser intermediário entre os gêneros *Felis* e *Panthera* (Neff, 1986). Parece tratar-se de uma linhagem muito próxima deste último grupo (Collier & O'Brien, 1985; Wayne et al., 1989).

O gênero *Panthera* Oken, 1816 engloba as cinco espécies atuais de maior porte, cada uma delas colocada em um subgênero próprio. O caráter diagnóstico deste gênero, além do grande porte, seria a capacidade de rugir, proporcionada pela não ossificação dos ligamentos suspensores dos hióides, na laringe (Neff, 1986). Estudos recentes (e.g. O'Brien et al., 1987; Wayne et al., 1989) sustentam o caráter monofilético deste grupo.

O gênero *Acinonyx* Brookes, 1828 contém uma única espécie, cujas acentuadas adaptações morfológicas, anatômicas e fisiológicas para um hábito cursorial especializado tornam difícil a compreensão de suas relações filogenéticas dentro da família. Estudos paleontológicos (Adams, 1979) indicam um parentesco próximo com o puma, e diversas fontes recentes (e.g. Janczewski et al., 1992) sugerem uma proximidade com as espécies incluídas no gênero *Panthera*.

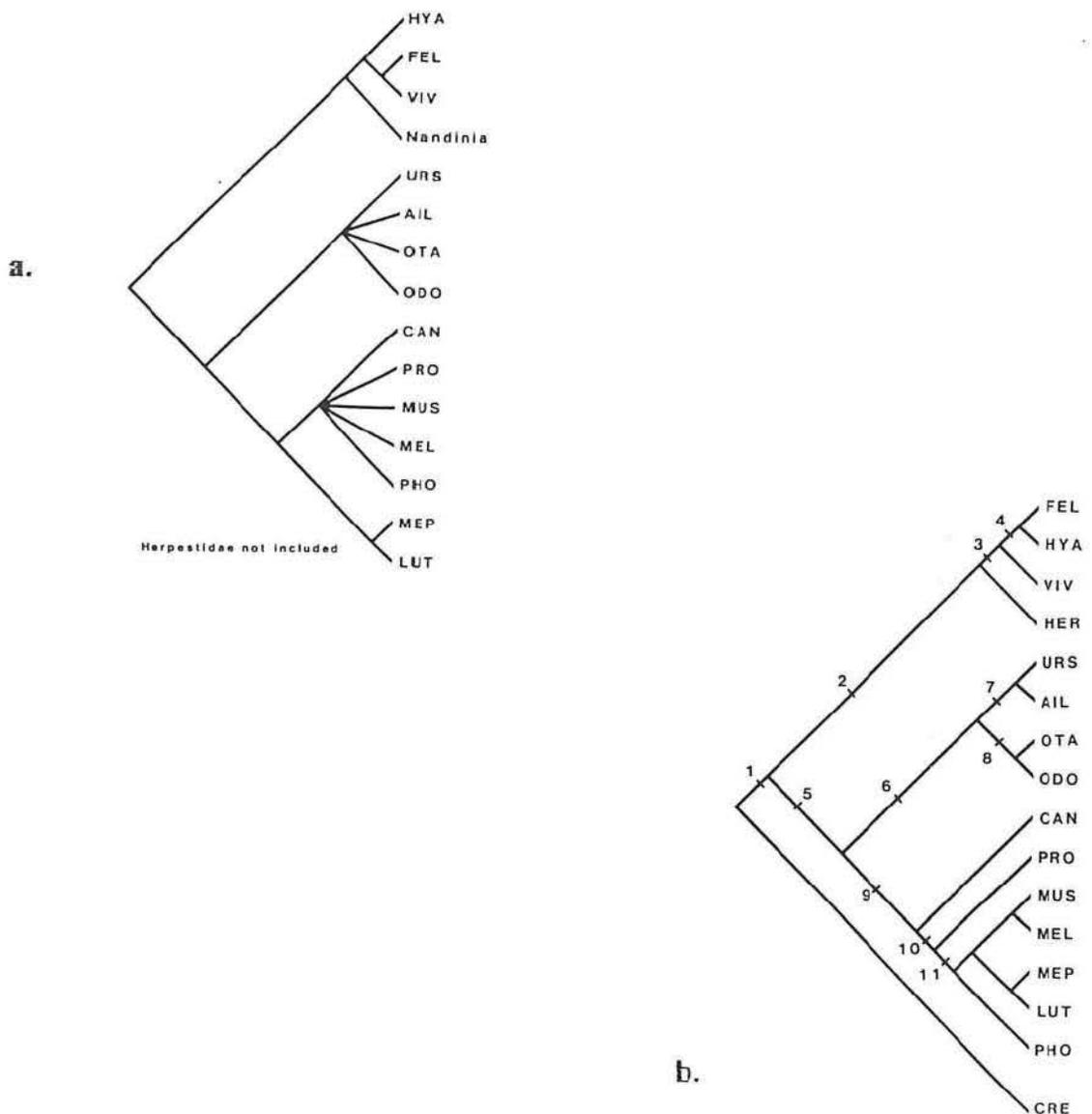


Figura 1.1. Esquemas filogenéticos das linhagens compreendidas na ordem Carnivora. a) Dados morfológicos (extraído de Hunt, 1974 apud Wozencraft, 1989a); b) Dados morfológicos (proposto por Wozencraft, 1989a). Abreviações: AIL - *Ailurus*; CAN - Canidae; CRE - Creodonta; FEL - Felidae; HER - Herpestidae; HYA - Hyaenidae; LUT - Lutrinae; MEL - Melinae; MEP - Mephitinae; MUS - Mustelinae; ODO - Odobeninae; OTA - Otariidae; PHO - Phocidae; URS - Ursidae; VIV - Viverridae.

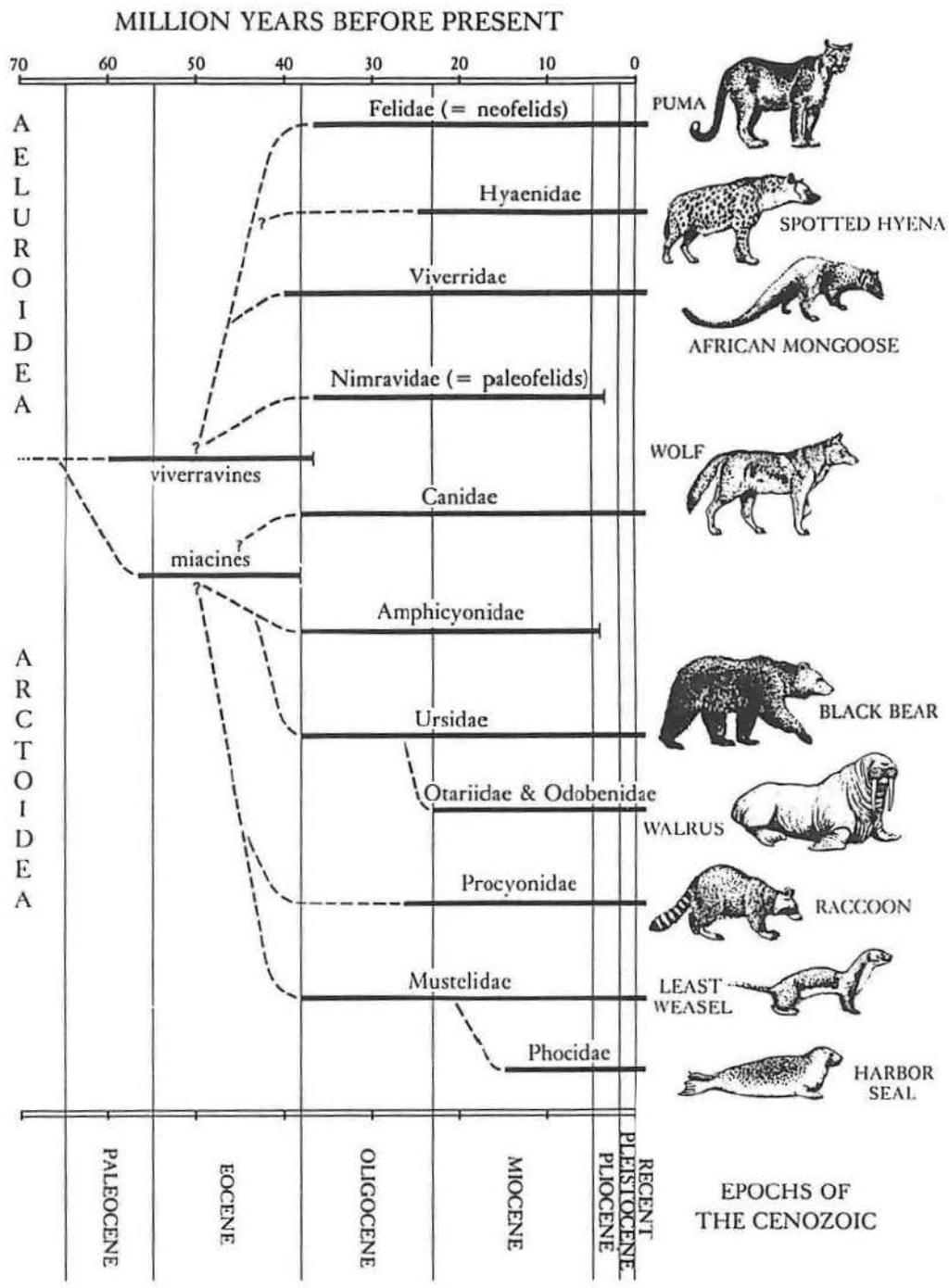


Figura 1.2. Relações filogenéticas estimadas entre linhagens fósseis e atuais de carnívoros (Extraído de Neff, 1986)

b) Felinos Neotropicais

A região biogeográfica Neotropical se estende desde o sul da América do Norte até o extremo sul da América do Sul (Emmons, 1990), compreendendo uma grande variedade de ecossistemas. Sua fauna de mamíferos é bastante diversificada, sendo ela o resultado de uma história evolutiva complexa de imigrações, radiações adaptativas e extinções (Paula Couto, 1953 e 1979; Marshall et al., 1982.). Esta complexidade é ilustrada pelos diversos grupos de mamíferos "carnívoros" presentes em seu registro fóssil, incluindo "pseudo-felinos" marsupiais com dentes-de-sabre (Savage & Long, 1986) e verdadeiros felinos dentes-de-sabre do gênero *Smilodon* (Simpson, 1945; Moreira, 1970).

A fauna neotropical atual de felinos consiste de dez espécies: a onça [*Panthera (Jaguaris) onca*]; o puma [*Felis (Puma) concolor*]; o jaguarundi [*Felis (Herpailurus) yagouaroundi*]; a jaguatirica [*Felis (Leopardus) pardalis*]; o gato-maracajá [*Felis (Leopardus) wiedii*]; o gato-do-mato-grande [*Felis (Leopardus) geoffroyi*]; o gato-do-mato-pequeno [*Felis (Leopardus) tigrina*]; o gato-dos-pampas ou kodkod [*Felis (Leopardus) guigna*]; o gato-palheiro [*Felis (Lynchaillurus) colocolo*] e o gato-andino [*Felis (Oreailurus) jacobita*]. Acredita-se que este grupo tenha invadido a América do Sul após a formação do Istmo do Panamá, no final do Plioceno (e.g. Wayne et al., 1989). A onça, que parece ser proximamente relacionada aos outros grandes gatos, muito provavelmente entrou na América do Sul como uma espécie independente. O mesmo parece ter ocorrido com o jaguarundi e com o puma. Por outro lado, seis espécies de pequenos felinos neotropicais (*F. pardalis*, *F. wiedii*, *F. geoffroyi*, *F. tigrina*, *F. guigna* e *F. colocolo*) formam um grupo extremamente coeso em termos morfológicos (Salles, 1992) e citogenéticos (Wurster-Hill e Centerwall, 1982), e vêm sendo apontadas como constituindo um grupo monofilético muito próximo

(Collier & O'Brien, 1985; Wayne et al., 1989). Curiosamente, esta linhagem parece ter divergido do tronco principal dos felinos há cerca de 10 milhões de anos e, no entanto, acredita-se que tenha radiado para formar estas seis espécies atuais há apenas 2-3 milhões de anos (Wayne et al., 1989). Isto estaria de acordo com a hipótese de que uma única espécie ancestral, proveniente da América do Norte e atualmente extinta, teria invadido a América do Sul no final do Plioceno e dado origem a uma radiação extremamente rápida, deixando como únicos descendentes atuais estas seis espécies (Wayne et al., 1989). Estas teriam, posteriormente, invadido a América Central e o sul da América do Norte, atingindo sua distribuição atual (ver figuras 1.10; 1.12; 1.14; 1.16; 1.18; 1.20).

Martin (1989) sugere que a espécie invasora ancestral poderia ter sido "*Felis stouti*", do Mioceno Superior da América do Norte. Um registro fóssil bastante pobre (Berta, 1983) e a falta de maiores informações filogenéticas sobre este grupo, entretanto, não permitem que isto seja mais do que uma especulação.

A origem e as relações filogenéticas do décimo felino sul-americano, o gato-andino, permanecem extremamente obscuras, tendo em vista a dificuldade em se ter acesso a material desta espécie para qualquer tipo de estudo.

De uma forma geral, conhecimentos sobre a biologia, ecologia, comportamento, genética, evolução e sistemática dos felinos neotropicais são ainda muito escassos, embora trabalhos recentes (e.g. Emmons, 1987; Emmons, 1988; Ximenez, 1988; Johnson & Franklin, 1991; Mazzolli, 1992; Slattery et al., no prelo) tenham contribuído para uma melhor compreensão destes temas.

A seguir será feita uma breve caracterização das espécies de felinos sul-americanos.

A onça (*Panthera onca*), representada na figura 1.3, é a maior espécie entre os felinos neotropicais, com comprimento total variando entre 1.6 m e 2.6 m e peso entre 36 kg e 158 kg (Nowak, 1991). Sua distribuição até meados deste século estendia-se por toda a região Neotropical, desde o sul dos Estados Unidos até a Patagônia (Cabrera, 1934; Carman, 1984; Neff, 1986), mas hoje se encontra fragmentada e bastante reduzida (ver figura 1.4). Habita principalmente áreas de floresta e cerrado, e alimenta-se de uma grande variedade de presas, em que se destacam veados, porcos-do-mato e grandes roedores (Emmons, 1990). É atualmente considerada "vulnerável" pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 1990) e consta no Apêndice I (animais ameaçados) da CITES [Convenção sobre o Tráfico Internacional de Espécies Ameaçadas] (Honacki et al., 1982).

O puma (*Felis concolor*), representado na figura 1.5, é o segundo maior felino das Américas, medindo entre 1.5 m e 2.6 m e pesando geralmente entre 36 kg e 60 kg (Nowak, 1991). Apresenta uma distribuição muito vasta, estendendo-se desde o norte do Canadá até o extremo sul do Chile (figura 1.6), e ocupando uma grande variedade de habitats, incluindo florestas tropicais e temperadas, savanas e montanhas. Seus hábitos alimentares são bastante ecléticos, variando principalmente de acordo com a disponibilidade local de diversos tipos de presa, entre as quais se destacam veados, marsupiais, roedores e lagomorfos (Iriarte et al., 1990). Sua distribuição encontra-se hoje bastante fragmentada, e algumas populações são consideradas como estando altamente ameaçadas de extinção (Honacki et al., 1982; IUCN, 1990; Fergus, 1991).

© Luiz Claudio Marigo

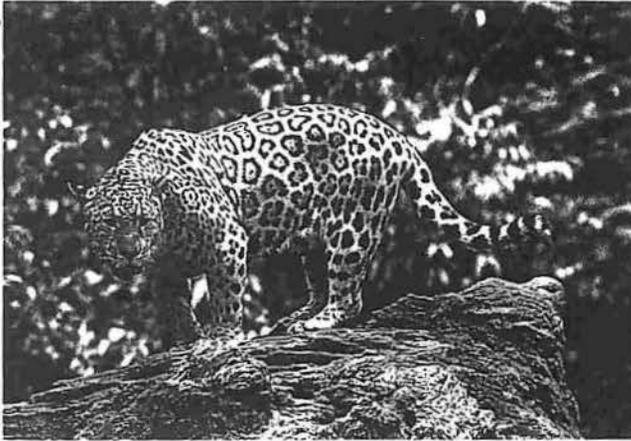


Figura 1.3. Onça-pintada (*Panthera onca*).

Obs.: As figuras 1.3 a 1.22 foram extraídas de Oliveira (1994).

© Luiz Claudio Marigo

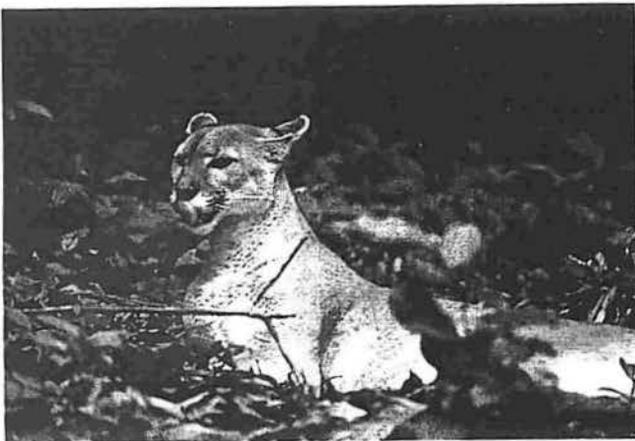


Figura 1.5. Puma (*Felis concolor*).



Figura 1.4. Distribuição geográfica da onça na Região Neotropical.



Figura 1.6. Distribuição geográfica do puma na Região Neotropical.

O jaguarundi (*F. yagouaroundi*), representado na figura 1.7, ocorre desde o sul dos Estados Unidos até a Patagônia (Ximenez, 1972; Honacki et al., 1982; Zapata, 1982 - ver figura 1.8). Mede entre 90 cm e 1.1 m, e pesa entre 4.5 kg e 9.0 kg. Habita florestas e zonas arbustivas, alimentando-se principalmente de pequenos mamíferos e aves (Nowak, 1991). É considerado "ameaçado" pela IUCN (1990) e quatro de suas subespécies estão enquadradas no apêndice I da CITES (Honacki et al., 1982).

A jaguatirica (*F. pardalis*), representada na figura 1.9, ocorria originalmente desde o sudoeste dos Estados Unidos até o Uruguai (Cabrera & Yepes, 1940; Ximenez, 1988), habitando desde áreas de floresta úmida até estepes arbustivas semi-áridas (Nowak, 1991). Sua distribuição encontra-se hoje um tanto reduzida (figura 1.10). Mede entre 85 cm e 1.5 m, e pesa entre 11.5 kg e 16 kg. Sua dieta inclui roedores, lagomorfos, veados de pequeno porte, aves, lagartos e cobras (Nowak, 1991; Emmons, 1988). É considerada "vulnerável" pela IUCN (1990) e duas de suas subespécies (uma das quais ocorre no Rio Grande do Sul) estão colocadas no apêndice I da CITES.



Figura 1.7. Jaguarundi (*Felis yagouaroundi*).



Figura 1.9. Jaguatirica (*Felis pardalis*).



Figura 1.8. Distribuição geográfica do jaguarundi na Região Neotropical.



Figura 1.10. Distribuição da jaguatirica na Região Neotropical.

O gato-maracajá (*F. wiedti*), representado na figura 1.11, é tido como o mais ágil dos felinos neotropicais, habitando quase que exclusivamente florestas e apresentando diversas adaptações anatômicas para uma vida arbórea especializada (ver Nowak, 1991). Sua distribuição estende-se desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Brasil e norte do Uruguai (Honacki et al., 1982; Bisbal, 1991 - ver figura 1.12). Mede entre 80 cm e 1.3 m, destacando-se uma cauda extremamente longa. Pesa entre 2.3 kg e 4.1 kg (Crawshaw, Jr., 1991; Oliveira, 1994). Sabe-se pouco sobre seus hábitos alimentares, mas presume-se que sua dieta seja composta principalmente por pequenos mamíferos, aves e lagartos. É considerado "vulnerável" pela IUCN (1990), e duas de suas subespécies estão colocadas no apêndice I da CITES (Honacki et al. 1982).

O gato-do-mato-grande (*F. geoffroyi*), representado na figura 1.13, está distribuído do sul da Bolívia ao extremo sul do Chile (figura 1.14), habitando principalmente áreas de bosque e estepe arbustiva (Ximenez, 1975). Mede entre 70 cm e 1.0 m (Nowak, 1991), e pesa entre 2.6 kg e 4.1 kg (Ximenez, 1973). Sua dieta inclui lagomorfos, roedores, aves e outros pequenos vertebrados (Johnson & Franklin, 1991). Não parece estar em perigo iminente de extinção, encontrando-se no apêndice II (animais que tendem a se tornar ameaçados) da CITES (Honacki et al., 1982).

O gato-do-mato-pequeno (*F. tigrina*), representado na figura 1.15, mede entre 65 cm e 95 cm, e pesa entre 1.75 kg e 2.75 kg (Nowak, 1991). Ocorre da Costa Rica até o sul do Brasil e norte da Argentina (Honacki et al., 1982 - ver figura 1.16), habitando principalmente florestas (Nowak, 1991). Pouco se sabe sobre seus hábitos, mas Emmons (1990) comenta que sua dieta consiste de pequenos mamíferos e aves. É tido como "vulnerável" pela IUCN (1990), e uma

de suas subespécies está enquadrada no apêndice I da CITES (Honacki et al., 1982).

O gato-dos-pampas (*Felis guttata*), representado na figura 1.17, ocorre no Chile central e meridional, e no sul da Argentina (Honacki et al., 1982 - ver figura 1.18), habitando quase que exclusivamente áreas de floresta. Mede entre 60 cm e 73 cm (Nowak, 1991). Provavelmente sua dieta está baseada em pequenos mamíferos e aves (Oliveira, 1994). Apesar de ter uma distribuição muito restrita e ser muito pouco conhecido, o gato-dos-pampas não parece ser localmente raro, nem estar iminentemente ameaçado, constando apenas do apêndice II da CITES (Honacki et al., 1982).

O gato-palheiro (*Felis colocolo*), representado na figura 1.19, ocorre do Equador, Bolívia e sudoeste do Brasil até o Chile central (Honacki et al., 1982 - ver figura 1.20), habitando áreas de campo, floresta e montanha. Mede de 87 cm a 1.2 m, e apresenta uma pelagem espessa, podendo ocorrer grande variação na coloração (Nowak, 1991). Acredita-se que sua dieta consista de pequenos mamíferos, especialmente roedores, e também de aves terrícolas (Nowak, 1991). Parece ocorrer em densidades populacionais bastante baixas, e vem sofrendo significativa redução em seu habitat, entretanto não é considerado oficialmente ameaçado, estando colocado apenas no apêndice II da CITES (Honacki et al., 1982).

O gato-andino (*Felis jacobita*), representado na figura 1.21, é o mais raro de todos os felinos sul-americanos, ocorrendo em regiões áridas e semi-áridas de grande altitude (Nowak, 1991; Oliveira, 1994) no sul do Peru, sudoeste da Bolívia, nordeste do Chile e norte da Argentina (figura 1.22). Parece ocorrer em densidades populacionais bastante baixas, e muito pouco é conhecido a seu respeito. Sua alimentação possivelmente está baseada em pequenos mamíferos como chinchilas e viscachas, incluindo também aves e lagartos (Oliveira, 1994). Mede cerca de 95 cm (Nowak, 1991) e pesa aproximadamente 4.0 kg (Oliveira, 1994). É considerado "raro" pela IUCN (1990), e consta do apêndice I da CITES (Honacki et al., 1982).

© Zig Koch



Figura 1.11. Gato-maracajá (*Felis wiedii*)

© Alan Shoemaker



Figura 1.13. Gato-do-mato-grande (*Felis geoffroyi*)



Figura 1.12. Distribuição geográfica do gato-maracajá na Região Neotropical.



Figura 1.14. Distribuição geográfica do gato-do-mato-grande na Região Neotropical.

© Zig Koch



Figura 1.15. Gato-do-mato-pequeno (*Felis tigrina*).

© Eduardo Ramilo / FOCUS



2. *Felis guigna*

Figura 1.17. Gato-dos-pampas (*Felis guigna*).



Figura 1.16. Distribuição do gato-do-mato-pequeno na Região Neotropical.



Figura 1.18. Distribuição do gato-dos-pampas na Região Neotropical.



© Tadeu Oliveira

Figura 1.19. Gato-palheiro (*Felis colocolo*).



© Gunter Ziesler - Peter Arnold, Inc.

Figura 1.21. Gato-andino (*Felis jacobita*)

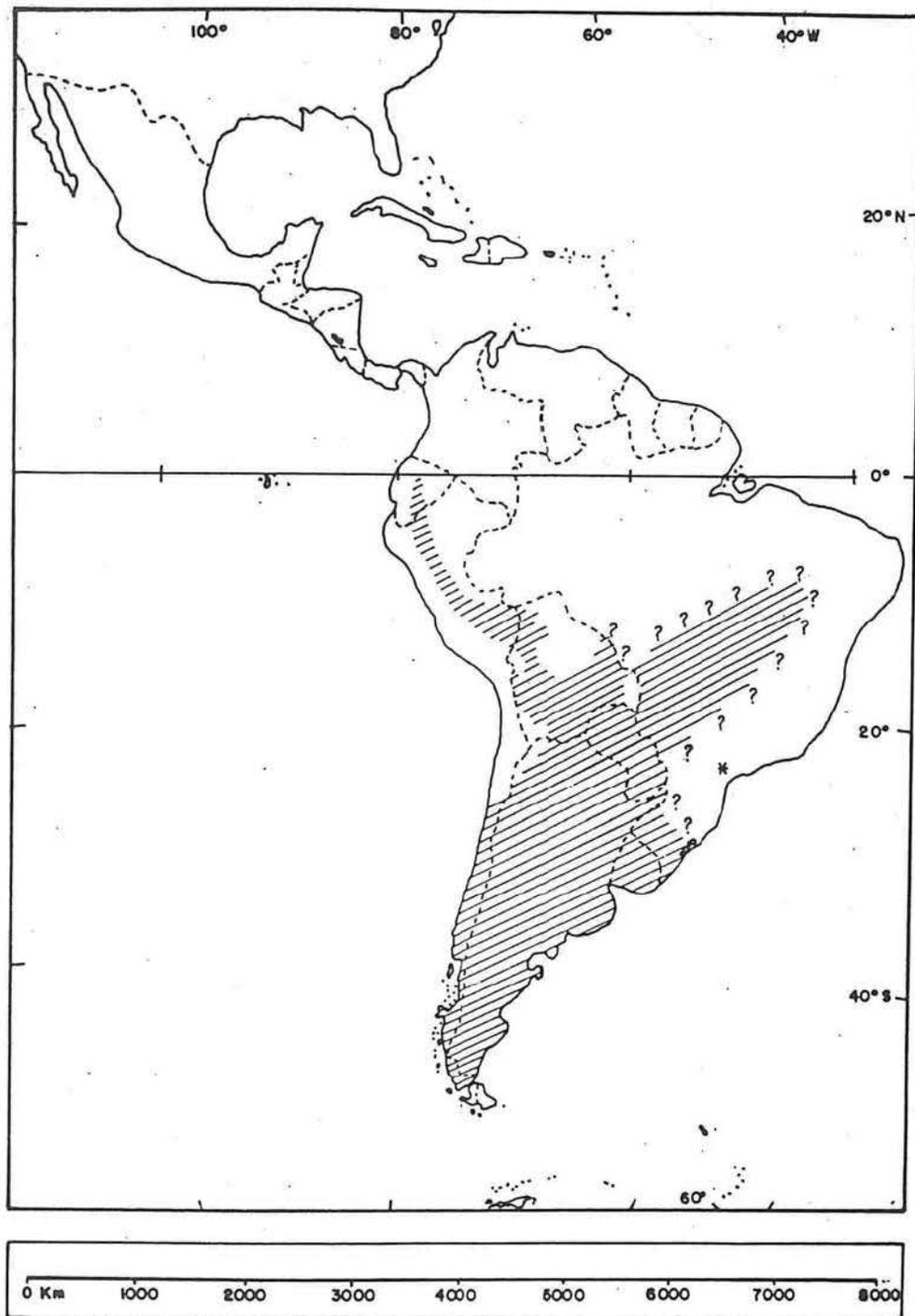


Figura 1.20. Distribuição do gato-palheiro na Região Neotropical.



Figura 1.22. Distribuição do gato-andino na Região Neotropical.

c) Estudos Evolutivos, Genéticos e Moleculares em Felinos

Até meados do século XX, estudos a respeito dos diferentes grupos de mamíferos "carnívoros", incluindo os felinos, se restringiam quase que exclusivamente a investigações sobre agrupamentos taxonômicos baseados em morfologia e anatomia comparadas de formas fósseis e atuais (Simpson, 1945; Martin, 1989). Devido a fatores mencionados acima, como a extensa conservação e convergência de caracteres observadas neste grupo, estas abordagens têm levado a conclusões usualmente controversas, tanto no que diz respeito às relações filogenéticas entre as linhagens de felinos quanto ao posicionamento da família como um todo dentro da ordem Carnivora (Wozencraft, 1989a; Salles, 1992).

A caracterização do cariótipo dos diferentes grupos de felinos teve início apenas na segunda metade do século XX, passando-se a utilizar técnicas de bandeamento cromossômico somente a partir da década de 1970 (ver Wurster-Hill & Centerwall, 1982). Ao longo desses estudos observou-se uma acentuada conservação no perfil cariológico da família, que, via de regra, dificulta qualquer inferência mais aprofundada acerca de sua evolução com base em dados citogenéticos. Apenas em 1982, através de uma detalhada revisão dos padrões de bandeamento cromossômico de 30 felinos, Wurster-Hill & Centerwall conseguem separar a família em 16 grupos cariotípicos, ainda assim com base em pequenas diferenças. Alguns destes subgrupos parecem ser consistentes em termos filogenéticos, como os grandes felinos do gênero *Panthera*, que apresentam um cariótipo idêntico e, principalmente, cinco espécies de pequenos felinos neotropicais (*F. pardalis*, *F. wiedii*, *F. tigrina*, *F. geoffroyi* e *F. colocolo*) que apresentam um número $2n = 36$, em contraste com $2n = 38$ de todo o restante da família, o que corrobora o caráter monofilético deste grupo restrito (Wurster-Hill & Centerwall, 1982; Pieczarka, 1983).

A partir da década de 1980, passaram a ser realizados estudos utilizando técnicas de eletroforese de proteínas com várias espécies de felinos, inicialmente com o objetivo de estimar e comparar índices de variabilidade genética intra-específica e intra-populacional, especialmente voltados para a conservação de espécies ameaçadas (O'Brien et al., 1985; Newman et al., 1985). A partir daí passou-se a empregar estas técnicas também em estudos evolutivos, biogeográficos e populacionais (e.g. Miththapala et al., 1991; Randi & Ragni, 1991).

Foram também empregadas técnicas que estimam a "distância imunológica" entre diferentes espécies, com o objetivo de resolver de forma mais consistente as relações filogenéticas entre os felinos (Collier & O'Brien, 1985). Estas técnicas, baseadas na comparação entre anticorpos recíprocos para albumina produzidos por diferentes espécies, levaram às primeiras indicações, hoje bastante aceitas, de que a família Felidae é composta por três linhagens principais (ver figura 1.23). A primeira, que teria divergido do tronco central há cerca de 10 milhões de anos, compreenderia as seis espécies já mencionadas de pequenos felinos neotropicais, o que estaria de acordo com dados morfológicos e citogenéticos. A segunda, que teria divergido há cerca de 8 milhões de anos, compreenderia o gato doméstico e cinco espécies de pequenos felinos da região que circunda o Mar Mediterrâneo. O grupo de radiação mais recente inclui diversas espécies de pequeno e médio porte divergindo sucessivamente de um tronco principal, permanecendo ao final um grupo monofilético próximo compreendendo as espécies do gênero *Panthera*. Estes agrupamentos vêm sendo corroborados por outras técnicas genéticas e moleculares, como hibridização DNA-DNA e estudo de seqüências de famílias endógenas de retrovírus (O'Brien et al., 1987; Wayne et al., 1989).

Até o momento, apenas um trabalho empregando seqüenciamento de DNA de espécies de felinos foi publicado (Janczewski et al., 1992). Este trabalho utiliza a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - Saiki et al., 1985 e 1988), para amplificar parte do gene mitocondrial para rRNA 12S e do gene nuclear FLA-I (gene da classe I do Complexo Maior de Histocompatibilidade de felinos) de nove espécies de felinos atuais e de três indivíduos fósseis do extinto "tigre-dente-de-sabre" *Smilodon fatalis*. Após clonagem e seqüenciamento dos fragmentos de DNA obtidos, foi construída uma filogenia que corrobora a existência das três linhagens mencionadas acima e inclui os "tigres-dente-de-sabre" na radiação recente dos grandes gatos, próximo às espécies do gênero *Panthera*, contrariando convicções bastante firmes na literatura que apontavam estes felinos fósseis como sendo uma linhagem antiga, que teria divergido antes da formação das linhagens atuais.

Outro estudo molecular de felinos dedica-se a esclarecer relações de parentesco e cooperação dentro de grupos de leões africanos, correlacionando dados de etologia com informações genéticas individuais obtidas através da técnica de "DNA fingerprinting" (Packer et al., 1991).

Quanto a estudos genéticos e moleculares especificamente de felinos sul-americanos, o único trabalho produzido até o momento é o de Slattery et al. (no prelo), que procura resolver as relações filogenéticas dentro desta linhagem através da análise de padrões de eletroforese bidimensional de proteínas, associada a eletroforese convencional de aloenzimas. O trabalho traz interessantes contribuições no que se refere à proximidade entre certas espécies, entretanto a obtenção de informações mais detalhadas e conclusivas torna-se difícil, tendo em vista o curto tempo de divergência dentro desta linhagem.

Até o momento nenhum trabalho foi publicado sobre a dinâmica do DNA mitocondrial em espécies da família Felidae.

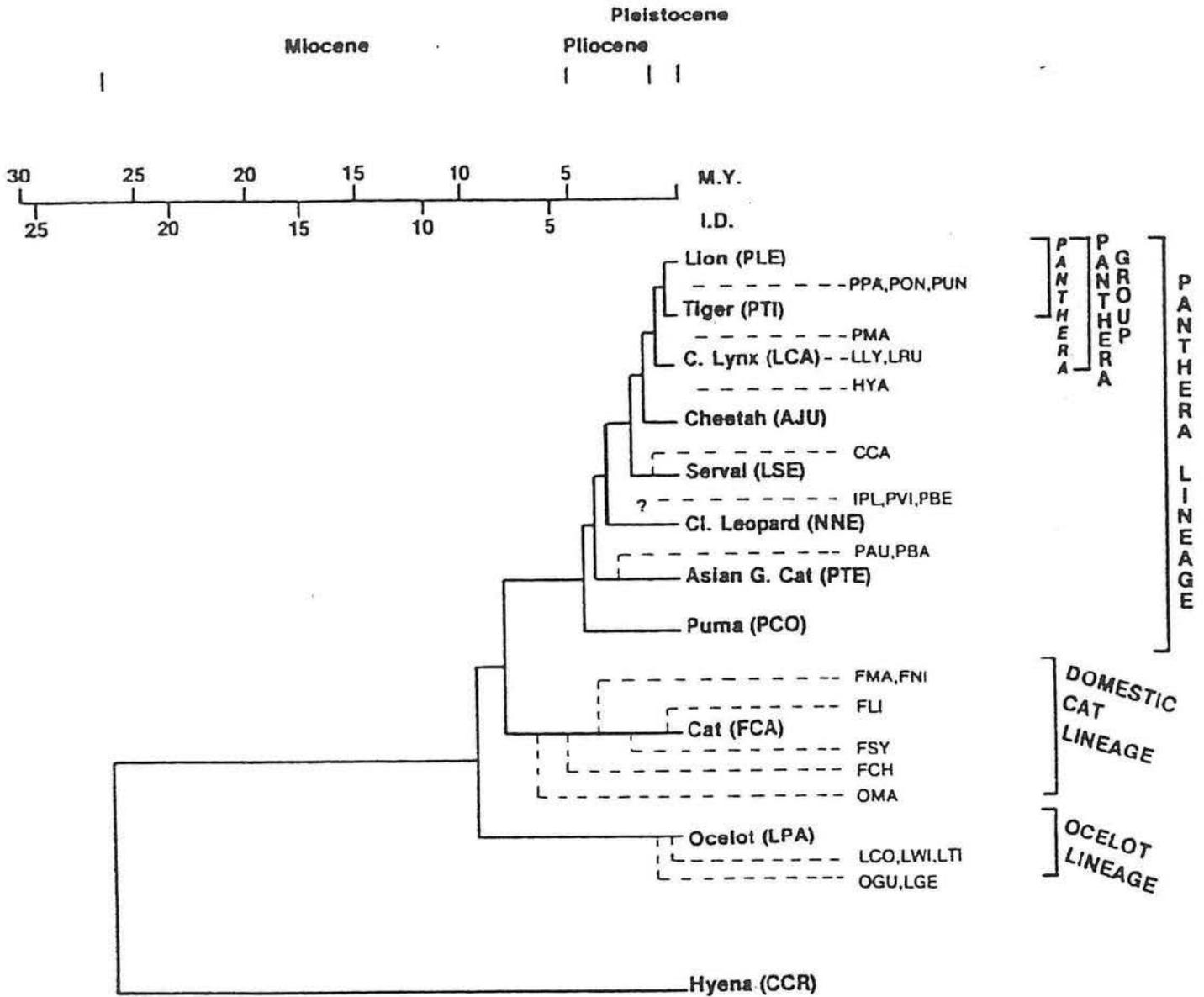


Figura 1.23. Cladograma demonstrando a separação das três linhagens atuais de felinos (Extraído de Collier & O'Brien, 1985).

d) O Genoma Mitocondrial Animal

Acredita-se que as mitocôndrias tenham sido originadas a partir de bactérias que, através de um evento endossimbiótico, passaram a fazer parte das células de organismos eucariotos (Rand, 1993; Meyer, 1993). Neste processo, passou a ocorrer uma complexa interação entre os genomas mitocondrial e nuclear, incluindo ações regulatórias e transferência de genes principalmente do primeiro para o segundo sistema (Smith et al., 1992; Meyer, 1993).

No caso de animais, em que o genoma mitocondrial é composto por uma molécula de DNA circular com um tamanho médio aproximado de 16-17 kb (Meyer, 1993), observa-se uma acentuada redução e compactação deste sistema em relação aos genomas nuclear de eucariotos e mitocondrial de plantas, fungos e protistas (Tzagoloff, 1982; Brown, 1985; Meyer, 1993). Esta compactação do DNA mitocondrial (mtDNA) de animais está relacionada à transferência de genes para o núcleo e à estruturação deste genoma de forma bastante simples e "econômica" (Brown, 1985; Meyer, 1993). Isto é evidenciado pela ausência de seqüências espaçadoras intra-gênicas (introns), pela extrema redução nas seqüências espaçadoras inter-gênicas (geralmente com menos de 10 pb) e pela predominância significativa de genes cópia única (Meyer, 1993).

A replicação do mtDNA animal é contínua, assimétrica e unidirecional, em contraste com a replicação descontínua, simétrica e bidirecional dos genomas procariótico e eucariótico nuclear (Brown, 1985; Meyer, 1993). Desta forma, o DNA mitocondrial requer um número consideravelmente menor de enzimas para catalisar este processo do que os sistemas mencionados acima, tanto que, até o momento, apenas uma DNA polimerase foi identificada para o genoma

mitocondrial, enquanto que o DNA nuclear eucariótico apresenta três tipos desta enzima (Brown, 1985; Meyer, 1993).

O mtDNA animal apresenta diversas características que tornam interessante o seu uso em estudos evolutivos e populacionais (e.g. Avise et al., 1987; Milinkovitch et al., 1993; Vogler et al., 1993). Além do seu tamanho reduzido e relativa simplicidade, que o tornam um modelo de estudo mais acessível do que genomas mais complexos, pode-se destacar: (1) o fato de ser haplóide (Meyer, 1993); (2) a herança predominantemente matrilinear (Moritz et al., 1987); (3) a frequência extremamente baixa de rearranjos por recombinação, inversões ou transposições (Brown, 1985); (4) as altas taxas de substituição de nucleotídios e de inserções e deleções, que fazem com que seqüências mitocondriais modifiquem-se de forma mais rápida do que seqüências nucleares (Saitou & Ueda, 1994). Isto pode estar relacionado tanto a taxas mais altas de mutação (Saitou & Ueda, 1994) quanto à redução nas pressões seletivas que dificultam a fixação de mutantes (Avise, 1986; Rand, 1994).

Além disso, o estudo da evolução do mtDNA torna-se ainda mais interessante pelo fato de suas variações poderem ser investigadas em níveis hierárquicos crescentes (Rand, 1993). Estes seriam (1) diferenças entre as muitas cópias de mtDNA que podem existir em cada mitocôndria; (2) diferenças entre as inúmeras mitocôndrias presentes no citoplasma de uma única célula; (3) variação a nível organismal, já que um indivíduo metazoário apresenta muitas células, especializadas para funções diferentes e portanto distintas morfológica e fisiologicamente; (4) variação dentro de uma linhagem direta de parentesco (família matrilinear); (5) variação intra-populacional; (6) variação inter-populacional (intra-específica); (7) variação inter-específica, e assim por diante seguindo um aumento na abrangência do nível filogenético em questão.

A presença de genomas mitocondriais diferentes em um mesmo indivíduo, denominada heteroplasmia, é registrada para diversos grupos de animais (Densmore et al., 1985; Buroker et al., 1990; Hoelzel et al., 1993). O fenômeno pode envolver variações tanto na seqüência quanto no tamanho do mtDNA, sendo que este caso parece ser mais freqüente (Meyer, 1993). A ocorrência de heteroplasmia, que em parte torna mais difícil o uso do mtDNA como modelo simples para estudos evolutivos, oferece novas oportunidades para que se investigue os mecanismos envolvidos na origem de variações nesta molécula (Wilkinson & Chapman, 1991; Rand, 1994).

O conteúdo gênico do mtDNA é altamente conservado em todos os grupos de metazoários (Brown, 1985; Meyer, 1993), compreendendo dois genes para RNA ribossomal (rRNA), 22 genes para RNA transportador (tRNA) e 12 ou 13 genes para RNA mensageiro, ou seja, codificadores de proteínas (ver figura 1.24). Estes últimos são responsáveis principalmente pela codificação de subunidades de enzimas envolvidas na respiração celular (Meyer, 1993). Além disso, está presente uma "região controladora", que apresenta ação regulatória sobre a dinâmica do mtDNA e que não tem função codificadora. Nela estão localizados os sítios de iniciação para replicação do mtDNA e também para transcrição de RNA (Brown, 1985; Meyer, 1993).

A região controladora normalmente compreende cerca de 1 kb e é predominantemente rica em bases A-T, apesar de incluir uma porção central conservada rica em G-C (Hoelzel et al., 1993). Devido a isto, foi denominada a princípio (a partir de estudos em *Drosophila* - ver Solignac et al., 1986) simplesmente de "região rica em A+T do mtDNA", sem que fossem conhecidas em maior detalhe suas funções regulatórias. Hoje esta denominação continua válida, mas é empregada principalmente quando se está referindo ao genoma mitocondrial de invertebrados. Nos vertebrados esta região recebeu o nome de

D-Loop (proveniente de "Displacement Loop") devido à formação, em seu interior, de uma estrutura de fita tripla que gera deslocamentos e movimentações interativas das fitas envolvidas (Brown et al., 1986; Buroker et al., 1990). Uma das principais causas deste fenômeno é o mecanismo assimétrico de replicação do mtDNA: no genoma mitocondrial de vertebrados, os pontos de origem da replicação de cada uma das fitas (fita H ["heavy"] e fita L ["light"]) se encontram bastante afastados. No início do processo de replicação forma-se uma terceira fita de DNA (denominada 7S mtDNA), de tamanho variável, que pareia com a fita L e desloca a fita H original (ver figura 1.25), formando uma estrutura topológica diferenciada e dinâmica. A competição entre as fitas H e 7S (ela própria denominada "D-loop") pelo pareamento com a fita L pode gerar deslocamentos recíprocos reversíveis e também levar à formação de estrutura secundária ("loop") estável em uma delas. Isto poderia levar a um pareamento desigual entre as fitas, ocasionando erros de replicação (Brown et al., 1986; Buroker et al., 1990), como será visto a seguir.

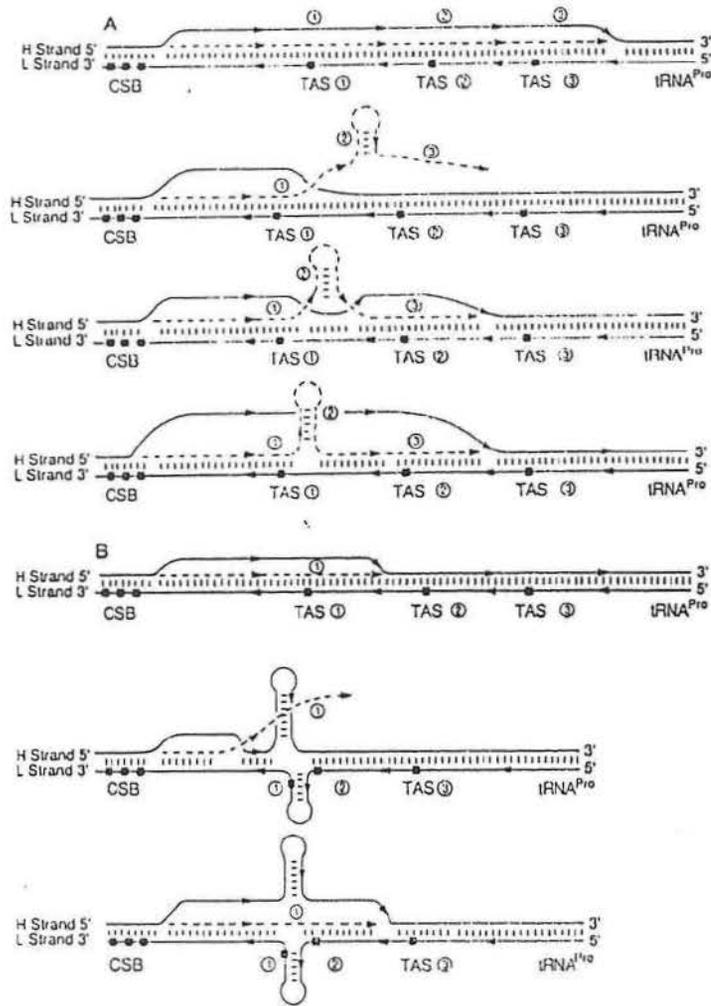


Figura 1.25. Desenho esquemático representando as interações que podem ocorrer entre as fitas H e L (linhas cheias externas) e a fita D-loop (linha tracejada central) na região controladora do mtDNA, segundo modelo de Buroker et al., 1990. Observa-se que a formação de estrutura secundária na fita D-loop leva a um erro de pareamento que pode gerar a repetição de um segmento (A). A formação de estrutura secundária nas fitas L e H pode levar à deleção de um segmento (B). [Extraído de Buroker et al., 1990]

e) Variação de Tamanho no DNA mitocondrial

Durante muito tempo acreditou-se que a extrema conservação do mtDNA incluía também uma grande estabilidade no tamanho desta molécula, que manter-se-ia sempre entre 16-18 kb (Rand, 1993). A partir da década de 1980, entretanto, estudos com *Drosophila* (Solignac et al., 1986); grilos (Harrison et al., 1985; Rand & Harrison, 1989); nematodos (Powers et al., 1986; Beck & Hyman, 1988; Hyman et al., 1988), moluscos (Snyder et al., 1987; Gjetvaj et al., 1992) e vertebrados ectotérmicos (Densmore et al., 1985; Bermingham et al., 1986; Moritz & Brown, 1986) começaram a indicar a existência de grandes variações no tamanho desta molécula em diversos grupos de metazoários. Observou-se não só a presença de genomas mitocondriais muito maiores do que o padrão esperado, como no caso de moluscos cujo mtDNA media cerca de 35 kb (LaRoche et al., 1990), mas também variações significativas no tamanho desta molécula entre linhagens muito próximas, inclusive entre indivíduos da mesma população (Brown et al., 1992; Gjetvaj et al., 1992). Além disso, diversos estudos identificaram freqüências bastante altas de heteroplasmia, ou seja, variação de tamanho do mtDNA em um mesmo indivíduo, em diversas linhagens de animais (Harrison et al., 1985; Buroker et al., 1990).

Desde então, a ocorrência de variações no tamanho de certas regiões do mtDNA vem sendo registrada para vários outros grupos de animais, incluindo aves (Edwards & Wilson, 1990) e mamíferos (Cann & Wilson, 1983; Mignotte et al., 1990; Wilkinson & Chapman, 1991; ver revisão em Rand, 1993). Entre estes, pode-se destacar a ocorrência de variações de tamanho no mtDNA de musaranhos (Stewart & Baker, 1994), morcegos (Wilkinson & Chapman, 1991), primatas (Ferris et al., 1981; Cann & Wilson, 1983), lagomorfos (Mignotte et al.,

1990; Biju-Duval et al., 1991), roedores (Brown et al., 1986), cetáceos (Hoelzel et al., 1991; Dillon & Wright, 1993) e carnívoros (Hoelzel et al., 1993).

Estudos recentes (Rand, 1993 e 1994) indicam que existe uma forte correlação entre hábito termal, taxa metabólica e variações no tamanho do mtDNA. Comparações entre diversas espécies de animais endotérmicos e ectotérmicos indicam que os primeiros tendem a ter genomas mitocondriais menores e menos variáveis (Rand, 1993). Isto pode estar relacionado a (1) uma taxa de mutação de tamanho mais alta em ectotermos, gerando uma maior variabilidade; ou (2) uma taxa mais alta de seleção direcional e purificadora para genomas menores em endotermos. Embora estas hipóteses não sejam totalmente excludentes, Rand (1993 e 1994) defende que a segunda seria mais consistente com a maior parte das observações feitas até o momento, argumentando que uma taxa metabólica mais alta nos organismos endotérmicos, algo diretamente ligado ao funcionamento das mitocôndrias, implicaria que moléculas menores e mais compactas de mtDNA seriam favorecidas em uma "corrida para replicação". Outros fatores ligados à taxa metabólica, como tamanho corporal e tempo de geração, estariam também relacionados a diferentes taxas de variação no tamanho do mtDNA (Rand, 1993 e 1994).

O surgimento de heteroplasmia, por outro lado, não parece estar diretamente relacionado a diferenças na taxa metabólica (Rand, 1993 e 1994). Possivelmente, ao menos em alguns casos, este fenômeno esteja relacionado a uma instabilidade na replicação do mtDNA nas células de cada indivíduo, promovendo um constante surgimento de mutantes com curta duração (Hoelzel et al., 1993).

As causas destas variações no tamanho do mtDNA vêm sendo bastante estudadas (e.g. Buroker et al., 1990; Rand, 1993) e acredita-se que estejam relacionadas a processos como (1) eventos de duplicação, inserção e deleção de

segmentos (e.g. Hyman et al., 1988); e (2) repetições em tandem de seqüências específicas (e.g. Biju-Duval et al., 1991; Stewart & Baker, 1994). Os dois processos parecem ocorrer em freqüências similares, em grupos variados de animais (ver Rand, 1993), envolvendo principalmente a região controladora (e.g. Wilkinson & Chapman, 1991; Hoelzel et al., 1993), mas também atingindo outros segmentos, alguns com atividade codificadora, do mtDNA (e.g. Hyman et al., 1988; LaRoche et al., 1990). Em mamíferos, estes processos gerando variações no tamanho do mtDNA parecem estar quase que totalmente restritos à região controladora (Mignotte et al., 1990; Stewart & Baker, 1994). Algumas exceções, verificadas por Cann & Wilson (1983) em humanos, consistem de inserções e deleções pequenas (entre 6 e 14 pb), localizadas em porções não-codificadoras menores do mtDNA, situadas em pontos de junção entre dois genes.

Os mecanismos responsáveis pelo surgimento e manutenção destas duplicações, deleções e repetições são bastante complexos, e ainda pouco compreendidos. Rearranjos de grandes blocos do mtDNA, ocasionando significativas alterações no tamanho e na estrutura do genoma mitocondrial, como observado em nematodos (Hyman et al., 1988), requerem modificações bastante profundas neste sistema, possivelmente envolvendo repetições em tandem com variações internas de seqüência, pontos de quebra levando a inversões de fragmentos, entre outros.

Eventos mais simples de inserção e deleção, especialmente de fragmentos pequenos, ocorrem com uma freqüência bastante alta no mtDNA de animais. Saitou & Ueda (1994), através de um estudo comparativo em regiões não-codificadoras do genoma de primatas, estimaram que a taxa de inserções e deleções no mtDNA seja cerca de dez vezes maior do que no DNA nuclear,

diferença semelhante ao que se observa com relação a taxas de substituição de nucleotídios (Saitou & Ueda, 1994).

Em se tratando de variações de tamanho ocasionadas por números variáveis de repetições em tandem de uma mesma seqüência, os mecanismos envolvidos parecem estar principalmente relacionados à dinâmica da região controladora do mtDNA, à qual estas mutações estariam quase que totalmente restritas (Buroker et al., 1990). Estudos recentes (Buroker et al., 1990; Wilkinson & Chapman, 1991; Hoelzel et al., 1993; Stewart & Baker, 1994) sugerem que o número variável de repetições teria origem a partir de pareamento desigual entre as fitas L e H do mtDNA, no momento inicial da replicação desta molécula. Além disso, sugere-se que este processo estaria aliado à ocorrência de eventos de recombinação entre moléculas diferentes (Hoelzel et al., 1993), e que ele levaria a episódios de evolução em concerto entre as seqüências repetidas (Solignac et al., 1986, Stewart & Baker, 1994).

O modelo proposto por Buroker et al. (1990) leva em consideração a estrutura de fita tripla formada na região controladora do mtDNA, ocasionando um "equilíbrio dinâmico competitivo" entre as fitas H e D-loop pelo pareamento com a fita L (ver figura 1.25). Em presença de seqüências repetidas nesta região do mtDNA, o deslocamento de uma das fitas (H ou D-loop) pode ocasionar a formação de estruturas secundárias estáveis em parte do segmento livre ou no segmento pareado (ver figura 1.25). A formação destas estruturas secundárias pode gerar um alinhamento errôneo entre as repetições durante o processo de replicação, o que poderia ocasionar tanto o aumento quanto a redução no número de repetições presentes na nova molécula. Este modelo, proposto a partir de estudos em peixes, não só explica a origem e manutenção de um número variável de repetições na região controladora do mtDNA, mas também prevê que as repetições centrais tenderiam a apresentar seqüências idênticas, devido à

ocorrência de evolução em concerto, e que as duas repetições localizadas nos extremos tenderiam a divergir mais. Isto está de acordo com dados de seqüenciamento das repetições encontradas em outros grupos de animais (Wilkinson & Chapman, 1991; Stewart & Baker, 1994). Este modelo sustenta que deve haver um mínimo de três repetições iniciais, para que este processo tenha início, embora Stewart & Baker (1994) argumentem que, com apenas duas repetições, seria possível a formação de estrutura secundária na fita deslocada e, portanto, poderia ser gerada variação no tamanho.

Hoelzel et al. (1993), que encontraram um padrão bastante complexo de seqüências repetitivas na região controladora do mtDNA de elefantes-marinhos, sugerem que nem sempre estas variações seriam geradas segundo o modelo descrito acima. No caso dos elefantes-marinhos e de outros organismos mencionados (ver Hoelzel et al., 1993), a localização das repetições indicaria que seu surgimento está relacionado à síntese de RNA, e não da fita D-loop de DNA. Além disso, a complexidade e variabilidade dos padrões de variação observados nestas espécies indicaria que motivos curtos seriam constantemente repetidos e eliminados do genoma por freqüentes erros de pareamento, que envolveriam ainda "crossing-over" desigual dentro de uma linhagem e também entre linhagens diferentes (Hoelzel et al. 1993). Lopez (comunicação pessoal em Hoelzel et al., 1993) encontrou um tipo semelhante de arranjo repetitivo no mtDNA de gato doméstico, o que será discutido mais adiante com base nos resultados do presente estudo.

f) Objetivos

O presente estudo, desenvolvido durante o ano de 1993 e início de 1994, procurou atender aos seguintes objetivos:

1. Formar um banco de amostras de material biológico provenientes do maior número possível de indivíduos pertencentes a todas as espécies de felinos neotropicais. Estas amostras servirão de base para diversos estudos genéticos, evolutivos e populacionais destas espécies, especialmente com o uso de técnicas moleculares. Estes estudos terão por objetivo esclarecer inúmeras questões sobre a evolução, sistemática, biogeografia e estrutura populacional destes animais, além de fornecer bases para que sejam propostas estratégias de conservação para estas espécies.

2. Estabelecer técnicas eficazes para a extração de DNA a partir das amostras obtidas.

3. Desenvolver um protocolo de amplificação por PCR de segmentos do DNA mitocondrial das espécies em estudo, para posterior aplicação em investigações filogenéticas e populacionais.

4. Descrever e caracterizar o polimorfismo de tamanho da região controladora do mtDNA de felinos, identificado no decorrer do presente trabalho.

2. Material e Métodos

a) Obtenção de Amostras

Procurou-se obter amostras de sangue, pêlos e outros tecidos corporais das espécies em estudo a partir de exemplares provenientes da natureza (capturados por projetos de campo envolvendo carnívoros ou encontrados mortos em estradas) e também de indivíduos mantidos em Parques ou Jardins Zoológicos que apresentassem procedência geográfica conhecida. Os esforços para conhecer a procedência geográfica dos animais em estudo da forma mais precisa possível tiveram por objetivo possibilitar a utilização do material obtido em inúmeros estudos (alguns já em andamento) de evolução, biogeografia e genética de populações das espécies em questão. Sempre que possível, procurou-se também obter dados morfométricos e outros parâmetros biológicos, como sexo, idade aproximada, características de pelagem, entre outros, dos indivíduos estudados. O modelo de ficha para registro em campo de dados sobre os indivíduos de felinos em estudo encontra-se no Anexo 1.

As amostras de sangue foram conservadas com anti-coagulante (geralmente ACD², EDTA ou Heparina Sódica) e mantidas sob refrigeração até a triagem em laboratório, sendo subsequenteemente congeladas a -20°C. As

² A composição deste anti-coagulante, bem como dos tampões e demais soluções citadas em todas as técnicas descritas no item Material e Métodos, se encontra detalhada no Anexo II.

amostras de pêlo ou fragmentos de pele foram mantidas secas ou em etanol absoluto até triagem, sendo então igualmente congeladas. Amostras de tecido muscular foram mantidas inicialmente em etanol absoluto ou diretamente congeladas.

Obteve-se também amostras de pêlos e fragmentos de outros tecidos corporais a partir de exemplares conservados em museus e coleções particulares (especialmente peles preparadas e animais taxidermizados), sendo estas mantidas secas até o congelamento.

Além da obtenção de amostras de material biológico dos felinos sul-americanos, procurou-se também ter acesso a amostras de sangue ou outros tecidos corporais de outras espécies, que poderiam ser úteis em estudos comparativos de genética e evolução. Entre estas, priorizou-se a obtenção de amostras (provenientes de Parques Zoológicos ou Hospitais Verinários) de felinos exóticos à Região Neotropical e de espécies pertencentes às famílias Hyaenidae e Viverridae (tidas como sendo bastante próximas filogeneticamente da família Felidae; ver Introdução)

Construiu-se um banco de dados com informações de identificação, caracterização e procedência geográfica de todos os indivíduos estudados, bem como registro das técnicas empregadas na obtenção, conservação e análise das amostras. Para tal, utilizou-se o programa Reflex, versão 2.0 (Borland International, Inc., 1989).

b) Extração de DNA

A extração de DNA para uso no presente estudo foi realizada exclusivamente a partir de amostras de sangue. Entre estas, observou-se diferenças quantitativas e qualitativas bastante grandes nos produtos extraídos, relacionadas principalmente com o anti-coagulante empregado e com as condições de conservação do sangue antes do envio ao laboratório. Devido a isto, diversos protocolos de extração de DNA foram testados, sendo quatro deles subseqüentemente utilizados com sucesso.

No caso de amostras que haviam sido conservadas com os anti-coagulantes EDTA ou ACD seguiu-se um protocolo (Protocolo A) modificado a partir de Lahiri e Numberger, Jr. (1991), detalhado a seguir:

Protocolo A:

1. Misturar:

- 750 ul de sangue total.
- 750 ul do tampão TKM 1.
- 19 ul de Nonidet P-40.

2. Centrifugação: 3.000-5.000 rpm por 10 min.

3. Ressuspender precipitado de células em 750 ul de TKM 1.

4. Repetir 2 e 3, e novamente 2.

5. Ressuspender pellet em 400 ul do tampão TKM 2.

Adicionar: - 25 ul de SDS 10 %

- 75 ul de Proteinase K (2 mg/ml)

6. 2 hs em banho a 60°C ou 12-16 hs a 37°C.

7. Adicionar 1 volume de Clorofórmio

8. Agitar intensamente; centrifugação: idem a 2.
9. Retirar 700 ul da fase superior, passando para novo tubo.
10. Repetir 7 e 8.
11. Retirar 500 ul da fase superior, passando para novo tubo.
12. Adicionar 2 volumes de etanol absoluto gelado.
13. Centrifugação: 10.000 rpm por 10 min.
14. Lavar precipitado em 1 ml de etanol 70 %.
15. Repetir 13.
16. Remover sobrenadante; secar precipitado à temperatura ambiente.
17. Ressuspender precipitado em 50-100 ul de TE.
18. Overnight a 4°C.
19. Congelar a -20°C.

No caso de amostras conservadas com o anti-coagulante Heparina Sódica, entretanto, a técnica acima descrita não gerou bons resultados, pois não foi possível a amplificação por PCR do material extraído (provavelmente devido à presença de inibidores da PCR na solução resultante). Nesses casos utilizou-se dois protocolos de extração de DNA que se mostraram eficazes na eliminação dos inibidores, sendo o primeiro (Protocolo B, detalhado abaixo) uma modificação da técnica descrita por Zeillinger et al. (1993), que utiliza a afinidade das partículas de sílica, provenientes de diatomáceas, por DNA para retirar estas macromoléculas de uma solução inicial de lise celular.

Protocolo B:

1. Misturar:

- 50 ul de sangue total
- 500 ul de STE
- 100 ul de SDS 10 %

2. 5 min a 95° C.

3. 5 min à temperatura ambiente, com agitação periódica.

4. Agitação rápida com vortex; pulso de centrifugação.

5. Retirar 500 ul do sobrenadante, passando-o para novo tubo.

- Adicionar: - 900 ul do Tampão de Extração (EB)
- 40 ul da Solução com Diatomáceas.

6. Agitar em vortex por 5 s.

7. Deixar 10 min à temperatura ambiente.

8. Repetir 4.

9. Descartar sobrenadante, mantendo-se precipitado no tubo.

10. Adicionar 600 ul do Tampão de Lavagem (WB).

11. Repetir 4.

12. Repetir 9, 10 e 11, e novamente 9.

13. Adicionar 600 ul de Etanol 70 %

14. Repetir 4.

15. Repetir 9, 13 e 14, e novamente 9.

16. Adicionar 1ml de Acetona absoluta.

17. Repetir 4 e 9.

18. Secar precipitado à temperatura ambiente.

19. Eluir DNA do precipitado em 40-60 ul de TE (banho a 37° C por 1h - 2hs).

20. Centrifugar a 10.000 rpm por 1min - 3 min.

21. Retirar sobrenadante (agora contendo o DNA), passando-o para novo tubo.
22. Repetir 20 e 21.
23. Congelar solução resultante a - 20° C.

O outro protocolo utilizado para a extração de DNA de amostras de sangue com Heparina Sódica (Protocolo C, detalhado abaixo) é uma combinação dos passos iniciais (de lise celular) da técnica de Lahiri e Numberger (1991) com a extração com sílica, modificada a partir de Zeillinger et al (1993).

Protocolo C:

1. Seguir passos 1 a 11 do Protocolo A.
2. Seguir passos 5 a 23 do Protocolo B.

Um quarto protocolo de extração (Protocolo D, detalhado abaixo), também modificado a partir de Zeillinger et al. (1993), foi empregado principalmente em amostras antigas, que apresentavam más condições de conservação.

Protocolo D:

1. Misturar:
 - 100 ul de sangue total.
 - 900 ul do Tampão de Extração (EB)
 - 40 ul da Solução com Diatomáceas
2. 5 min a 95° C.
3. 1 h a 60° C com agitação esporádica.
4. Seguir passos 6 a 23 do Protocolo B

c) Amplificação por PCR

Realizou-se diversos testes com o objetivo de estabelecer um protocolo de amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - Saiki et al., 1985 e 1988) de segmentos da região controladora do DNA mitocondrial (mtDNA) das várias espécies de felinos em estudo. Foram testadas várias combinações de um conjunto de primers originalmente desenhado para amplificar seqüências de humanos. Na tabela 2.1 estão descritas as seqüências dos primers testados, e na figura 2.1 encontra-se a localização das seqüências-alvo destes no genoma mitocondrial de mamíferos.

Testou-se ainda vários parâmetros pertinentes às condições da reação, como alterações no número de ciclos de PCR, tempo de duração e temperatura de cada passo, além de diferentes combinações e concentrações dos reagentes (primers, DNA polimerase) e do DNA a ser analisado.

Com base nestes testes, optou-se por trabalhar com o segmento localizado entre os primers L15926 (localizado na seqüência codificadora do tRNA^{Thr}) e H16498 (localizado no Bloco de Seqüência Conservada D [CSB D] - ver figura 2.1). Subseqüentemente, realizou-se amplificações deste segmento em amostras de 26 indivíduos pertencentes a sete espécies de felinos neotropicais, além de um indivíduo de gato doméstico (ver Resultados - tabela 3.4). As reações de PCR foram realizadas em volumes totais entre 10ul e 20ul. Cada reação de 10 ul consistiu de:

- 0.1 ul a 3.0 ul de DNA genômico.
- 1 ul de Tampão de PCR 10 X.
- 0.5 unidades de Taq polimerase (Cenbiot/UFRGS).
- 0.2 uM de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- 0.2 uM de cada primer.
- H₂O para completar o volume
- óleo mineral

A variação na quantidade de DNA genômico utilizado nas reações de PCR foi crítica para a que se conseguisse sucesso nas amplificações. Isto ocorreu não só pelas diferenças quantitativas e qualitativas no DNA extraído de cada indivíduo, mas também provavelmente devido à homologia relativamente baixa entre os primers e as seqüências-alvo nas espécies estudadas.

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores seguindo o perfil de temperaturas descrito abaixo:

- 5 min de denaturação inicial a 94^o C.
- 35 ciclos (1 min de denaturação a 94^o C ; 1 min de anelamento a 50^o C ; 1 min 30 s de extensão a 72^o C).
- 5 min de extensão final a 72^o C.

Testou-se ainda a amplificação de outro segmento do mtDNA das espécies estudadas, o qual engloba o gene do citocromo *b* (*cyb*). Para tal utilizou-se dois primers tidos como universais para mamíferos (ver tabela 2.1). O primeiro deles está localizado na seqüência codificadora do tRNA^{Glu}, e o segundo situa-se na região do tRNA^{Thr} (ver figura 2.2). As reações tiveram um

volume total de 10 ul, utilizando-se as mesmas concentrações de reagentes e os mesmos equipamentos descritos para a amplificação do segmento da região controladora. As reações foram realizadas com 35-45 ciclos de temperatura detalhados a seguir: denaturação a 94°C por 1 min; anelamento a 50°C por 1 min; extensão a 74°C por 1 min 30" ou 2 min. A isto se acrescenta 5-7 min de denaturação inicial a 94°C e 7 min de extensão final a 72°C. Amplificou-se este segmento de seis indivíduos de felinos neotropicais (cada um pertencendo a uma das espécies estudadas), e também do indivíduo de gato doméstico.

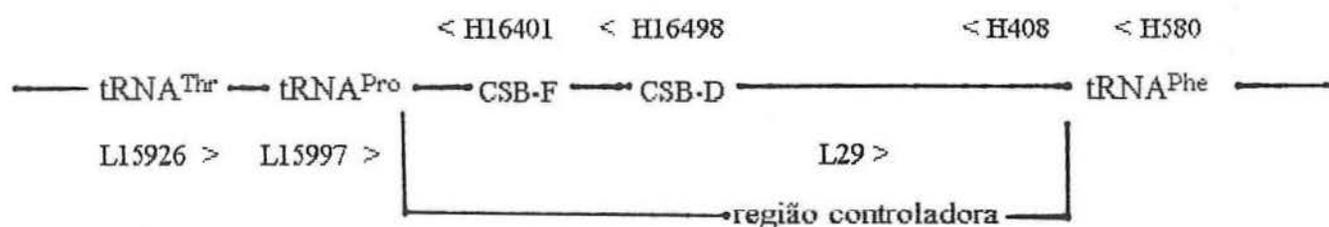


Figura 2.1. Localização das seqüências-alvo dos primers utilizados no presente estudo para a região controladora do mtDNA.

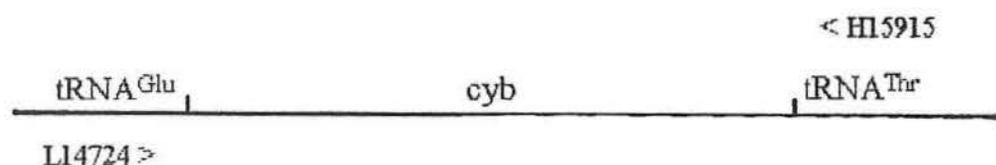


Figura 2.2. Localização das seqüências-alvo dos primers utilizados no presente estudo para o gene do citocromo *b* (*cyb*).

Tabela 2.1. Identificação dos primers para a região controladora do mtDNA (CR) e para o gene do citocromo *b* (*cyb*) testados no presente trabalho.

Obs.: As letras L e H referem-se à fita leve [light] ou pesada [heavy] do mtDNA, e os números referem-se à posição, no genoma mitocondrial humano, da base na extremidade 3' do primer (Anderson et al., 1981).

Primer	Seqüência	Referências
CR		
L15926	5' - TCAAAGCTTACACCAGTCTTGTAACC - 3'	1
L15997	5' - CACCATTAGCACCCAAAGCT - 3'	1
H16401	5' - TGATTTACGGAGGATGGTG - 3'	1
H16498	5' - CCTGAAGTAGGAACCAGATG - 3'	1
L29	5' - GGTCTATCACCCCTATTAACCAC - 3'	2
H408	5' - CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA - 3'	2
H580	5' - TTGAGGAGGTAAGCTACATA - 3'	3
<i>cyb</i>		
L14724	5' - CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG - 3'	4
H15915	5' - AACTGCAGTCATCTCCGTTTACAAGAC - 3'	4

1. Ward et al., 1991; 2. Vigilant et al., 1989; 3. Primer desenvolvido pelo grupo de A. C. Wilson (Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of California, Berkeley) e gentilmente cedido pela Dra. Mara Hutz (Departamento de Genética, UFRGS); 4. Irwin et al. (1991). Gentilmente cedidos pela Dra. Chris Simon (Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut)

d) Identificação e Caracterização do Polimorfismo de Tamanho

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 % ou 2 % corado com Brometo de Etídio (0.5 ug/ml), utilizando-se tampão TBE 1X ou TAE 1X. Os fragmentos foram subsequente visualizados através de transluinação por ultra-violeta (UV), e tiveram seu comprimento determinado através de comparação com marcadores de tamanho molecular. O gel foi fotografado (através do uso de câmera "polaroid" montada sobre o transluminador) e as medidas de mobilidade (distância migrada pelos fragmentos) foram tomadas a partir da fotografia, com o uso de uma régua com precisão de 0.5 mm. A conversão das distâncias migradas para comprimento (em pares de base - pb) foi realizada com o uso do programa SeqAid versão 3.7 (D.D. Rhoads & D. J. Roufa, Kansas State University, USA, 1990).

Para determinar de forma mais precisa a localização do polimorfismo de tamanho identificado na região controladora do mtDNA, realizou-se novas reações de PCR, utilizando-se os fragmentos amplificados anteriormente (com os primers L15926 e H16498) como DNA molde ("template") e dois novos conjuntos de primers. O primeiro utiliza os primers internos L15997 (localizado na seqüência codificadora do tRNA^{Pro}), e H16401 (localizado no Bloco de Seqüência Conservada F [CSB F]). O segundo utiliza os primers L15997 e H16498 (ver figura 2.1). Estas reações seguiram o protocolo descrito acima para a região controladora, sem, entretanto, utilizar o os 5 min iniciais de denaturação.

3. Resultados

a) Amostras Obtidas

Obteve-se amostras de material biológico (principalmente sangue, mas também pêlos e fragmentos de músculo e pele, em alguns casos) de 47 indivíduos pertencentes a oito espécies de felinos neotropicais (tabela 3.1). Obteve-se também amostras de material biológico de um indivíduo de gato doméstico e de um viverrídeo (tabela 3.2).

Tabela 3.1. Relação das amostras de material biológico de felinos neotropicais obtidas entre junho de 1993 e julho de 1994.

Indivíduo	Espécie	Procedência geográfica	Fonte ^a
F ti-01	<i>Felis tigrina</i>	Triunfo, RS	. b
F ti-02	<i>Felis tigrina</i>	SE Brasil (SP ? ^c)	Zoo Sorocaba ^d
F ti-03	<i>Felis tigrina</i>	S Brasil (RS ?)	Zoo Sapucaia ^e
F ti-04	<i>Felis tigrina</i>	S Brasil (RS ?)	Zoo Sapucaia
F ti-05	<i>Felis tigrina</i>	S Brasil (RS ?)	Zoo Sapucaia
F ti-06	<i>Felis tigrina</i>	Cachoeira do Sul, RS	Zoo Cachoeira ^f
F ti-07	<i>Felis tigrina</i>	SW Brasil	Zoo I. Solteira ^g
F ti-08	<i>Felis tigrina</i>	S. Miguel Iguaçu, PR	Zoo I. Solteira

Tabela 3.1 (continuação):

Indivíduo	Espécie	Procedência geográfica	Fonte
F wi-01	<i>Felis wiedti</i>	Morungava, RS	-
F wi-02	<i>Felis wiedti</i>	SE Brasil (SP ?)	Zoo Sorocaba
F wi-03	<i>Felis wiedti</i>	Triunfo, RS	Zoo Sapucaia
F wi-04	<i>Felis wiedti</i>	Cachoeira do Sul, RS	Zoo Cachoeira
F ge-01	<i>Felis geoffroyi</i>	Sta. Cruz do Sul, RS	Zoo Sapucaia
F ge-02	<i>Felis geoffroyi</i>	Cachoeira do Sul, RS	Zoo Cachoeira
F ge-03	<i>Felis geoffroyi</i>	Cachoeira do Sul, RS	Zoo Cachoeira
F ge-04	<i>Felis geoffroyi</i>	Cachoeira do Sul, RS	Zoo Cachoeira
F ge-05	<i>Felis geoffroyi</i>	Cachoeira do Sul, RS	Zoo Cachoeira
F ge-06	<i>Felis geoffroyi</i>	Cachoeira do Sul, RS	Zoo Cachoeira
F ge-07	<i>Felis geoffroyi</i>	Cachoeira do Sul, RS	Zoo Cachoeira
F ge-08	<i>Felis geoffroyi</i>	Cachoeira do Sul, RS	-
F ge-09	<i>Felis geoffroyi</i>	Prov. Cordoba (Arg.)	Zoo Cordoba ^h
F pa-01	<i>Felis pardalis</i>	Pq. Nac. Iguaçu - PR	Proj. Carn. ⁱ
F pa-02	<i>Felis pardalis</i>	Pq. Nac. Iguaçu - PR	Proj. Carn.
F pa-03	<i>Felis pardalis</i>	P. Iguazu (Arg.)	Proj. Carn.
F pa-04	<i>Felis pardalis</i>	Pq. Nac. Iguaçu - PR	Proj. Carn.
F pa-05	<i>Felis pardalis</i>	P. Iguazu (Arg.)	Proj. Carn.
F pa-06	<i>Felis pardalis</i>	Pq. Nac. Iguaçu - PR	Proj. Carn.
F pa-07	<i>Felis pardalis</i>	Pq. Nac. Iguaçu - PR	Proj. Carn.
F pa-08	<i>Felis pardalis</i>	Pq. Nac. Iguaçu - PR	Proj. Carn.

Tabela 3.1 (continuação):

Indivíduo	Espécie	Procedência geográfica	Fonte
F pa-09	<i>Felis pardalis</i>	Pq. Iguazu (Arg.)	Proj. Carn.
F pa-10	<i>Felis pardalis</i>	Umuarama, PR	CASIB J
F pa-11	<i>Felis pardalis</i>	SW Brasil	Zoo I. Solteira
F co-01	<i>Felis colocolo</i>	Alegrete, RS	-
F co-02	<i>Felis colocolo</i>	Cachoeira do Sul, RS	-
F co-03	<i>Felis colocolo</i>	Centro-W Brasil	Zoo SP ^k
F ya-01	<i>Felis yagouaroundi</i>	SE Brasil (SP ?)	Zoo Sorocaba
F ya-02	<i>Felis yagouaroundi</i>	SE Brasil (SP ?)	Zoo Sapucaia
F ya-03	<i>Felis yagouaroundi</i>	Prov. Cordoba (Arg.)	Zoo Cordoba
F ya-04	<i>Felis yagouaroundi</i>	Prov. Cordoba (Arg.)	Zoo Cordoba
F ya-05	<i>Felis yagouaroundi</i>	Prov. Cordoba (Arg.)	Zoo Cordoba
F ya-06	<i>Felis yagouaroundi</i>	Prov. Cordoba (Arg.)	Zoo Cordoba
F cn-01	<i>Felis concolor</i>	Bataguassu, MS	Proj. Carn.
F cn-02	<i>Felis concolor</i>	Porto Primavera, MS	Proj. Carn.
F cn-03	<i>Felis concolor</i>	-	Zoo Sapucaia

Tabela 3.1 (continuação):

Indivíduo	Espécie	Procedência geográfica	Fonte
P on-01	<i>Panthera onca</i>	Pq. Nac. Iguaçu - PR	Proj. Carn.
P on-02	<i>Panthera onca</i>	Pq. Nac. Iguaçu - PR	Proj. Carn.
P on-03	<i>Panthera onca</i>	Bataguassu, MS	Proj. Carn.

^aInstituição responsável pelo fornecimento da amostra; ^bAmostra coletada em campo; ^cProcedência provável; ^dZoológico Municipal Quinzinho de Barros, Sorocaba, SP; ^eParque Zoológico de Sapucaia do Sul, Fundação Zoobotânica, RS; ^fZoológico Municipal de Cachoeira do Sul, RS; ^gZoológico de Ilha Solteira, SP; ^hZoológico Córdoba, Córdoba, Argentina; ⁱProjetos de Ecologia de Carnívoros coordenados por Peter Crawshaw, Jr. (IBAMA); ^jCriadouro de Animais Silvestres Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, PR; ^kFundação Parque Zoológico de São Paulo, SP.

Tabela 3.2. Relação das amostras adicionais de material biológico obtidas entre junho de 1993 e julho de 1994.

Indivíduo	Espécie	Procedência geográfica	Fonte ^a
F ca-01	<i>Felis catus</i> ^b	-	H.V. UFRGS ^c
A bi-01	<i>Arctictis binturong</i> ^d	Ásia	Zoo SP ^e

^aInstituição responsável pelo fornecimento da amostra; ^bgato doméstico; ^cHospital Veterinário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; ^dbinturong (Viverridae); ^eFundação Parque Zoológico de São Paulo, SP.

b) Extração de DNA

Foram utilizadas amostras de sangue de 26 indivíduos de felinos neotropicais (pertencentes a sete espécies) e do indivíduo de gato doméstico (identificados na tabela 3.3). para a extração de DNA. A quantidade de DNA obtido nas extrações variou de forma considerável para cada indivíduo, indo de menos de 100 ng/ul, em alguns casos, até cerca de 2.000 ng/ul, em outros. A qualidade do DNA obtido também foi variável, desde alguns casos com visível degradação (embora mantendo uma banda de alto peso molecular) até outros em que o DNA parecia intacto.

Amplificações por PCR

De uma forma geral, as amplificações por PCR dos segmentos do mtDNA dos 26 indivíduos de felinos neotropicais estudados, bem como do indivíduo de gato doméstico, foram bem-sucedidas e levaram a resultados consistentes (reproduzíveis).

Amostras de todos os indivíduos mencionados foram amplificadas para o segmento inicial da região controladora do mtDNA (ver tabela 3.4).

A amplificação do gene do citocromo *b* foi realizada em seis indivíduos, cada um de uma das espécies neotropicais (Fti-02, Fwi-02, Fge-01, Fpa-02, Fya-01, Pon-02), bem como no indivíduo de gato doméstico (Fca-01).

d) Caracterização do Polimorfismo de Tamanho

Através da visualização (em gel de eletroforese) dos fragmentos amplificados da porção inicial da região controladora do mtDNA, foi possível constatar a existência de uma considerável variação no tamanho deste segmento nos indivíduos estudados (ver figuras 3.1 e 3.2). Esta variação de tamanho foi observada tanto a nível inter- quanto intra-específico, verificando-se ainda a presença de cinco indivíduos heteroplásmicos (18.5 % do total). Os fragmentos amplificados para os indivíduos em estudo foram enquadrados em oito classes de tamanho (ver tabelas 3.3 e 3.4), que tiveram seu comprimento estimado através de comparação com marcadores de tamanho molecular. Estima-se que os fragmentos da classe de tamanho 1 apresentem um comprimento de cerca de 610 pares de base (pb), aproximadamente 20 pb a mais do que o mesmo segmento na

espécie humana (592 pb). A variação de tamanho entre classes sucessivas (entre 1 e 2, 2 e 3, etc.) parece ser de aproximadamente 110 pb (ver tabela 3.3). Tal regularidade indica que estas variações são provavelmente causadas por repetições em tandem de um mesmo segmento. Os fragmentos da classe 0 são consideravelmente menores (medem cerca de 300 pb) do que os da classe 1 e do que este segmento na espécie humana, indicando que teriam sido gerados possivelmente a partir de um evento de deleção.

A classe de tamanho mais comum (modal) entre os indivíduos analisados foi a 2 (que compreenderia 2 repetições, apresentando um comprimento estimado de cerca de 720 pb), representando 50.0 % de todas as bandas visualizadas (ver figura 3.3).

Duas ocorrências de heteroplasma tripla (três tamanhos de fragmentos amplificados) foram observadas, nos indivíduos Fge-01 e Fca-01 (ver tabela 3.4).

Em termos de variação intra-específica, foi possível observar desde espécies totalmente uniformes, como *Felis tigrina* e *Panthera onca*, ambos com 100 % de fragmentos da classe 2, até espécies com considerável polimorfismo de tamanho inter-individual e ocorrência de heteroplasma, como *Felis geoffroyi* (ver figura 3.4). A maior variação de tamanho foi observada no indivíduo de gato doméstico.

A localização deste sítio de tamanho variável no mtDNA destas espécies foi identificada de forma mais precisa através de reamplificações de segmentos menores, internos à região em estudo (ver Material e Métodos). Através desta abordagem, foi possível determinar que este sítio está localizado entre as seqüências-alvo dos primers H16401 e H16498 (ver figuras 3.5 e 3.6). Este segmento, que na espécie humana compreende 76 pb, estende-se entre os Blocos de Seqüência Conservada D e F (CSB-D a CSB-F) da região controladora do mtDNA, identificados em diversas espécies animais. Entre as espécies de felinos

estudadas, este segmento parece variar entre cerca de 100 pb e 700 pb, excetuando-se os fragmentos da classe 0. A existência de tal variação de tamanho em uma região tida como de seqüência conservada levanta inúmeras questões sobre a dinâmica desta região do mtDNA de felinos.

Tabela 3.3. Classes de tamanho identificadas na porção inicial da região controladora do mtDNA de felinos.

Classe	Tamanho Aproximado (pb)
0	300
1	610
2	720
3	830
4	940
5	1050
6	1160
7	1270

Tabela 3.4. Identificação das classes de tamanho dos fragmentos da região controladora do mtDNA amplificados para os indivíduos em estudo ^a.

Indivíduo	Espécie	Classe de Tamanho
F ti-02	<i>Felis tigrina</i>	2
F ti-03	<i>Felis tigrina</i>	2
F ti-05	<i>Felis tigrina</i>	2
F ti-06	<i>Felis tigrina</i>	2
F wi-01	<i>Felis wiedti</i>	2
F wi-02	<i>Felis wiedti</i>	2
F wi-03	<i>Felis wiedti</i>	2
F wi-04	<i>Felis wiedti</i>	1
F ge-01	<i>Felis geoffroyi</i>	1 / 5 / 6
F ge-02	<i>Felis geoffroyi</i>	5
F ge-03	<i>Felis geoffroyi</i>	2
F ge-04	<i>Felis geoffroyi</i>	1 / 2
F ge-05	<i>Felis geoffroyi</i>	2
F ge-06	<i>Felis geoffroyi</i>	4
F ge-07	<i>Felis geoffroyi</i>	5

Tabela 3.4. Continuação.

F pa-01	<i>Felis pardalis</i>	1 / 3
F pa-02	<i>Felis pardalis</i>	2
F pa-03	<i>Felis pardalis</i>	2
F pa-06	<i>Felis pardalis</i>	3
F pa-07	<i>Felis pardalis</i>	3
F ya-01	<i>Felis yagouaroundi</i>	2
F cn-01	<i>Felis concolor</i>	0 / 3
F cn-03	<i>Felis concolor</i>	2
P on-01	<i>Panthera onca</i>	2
P on-02	<i>Panthera onca</i>	2
P on-03	<i>Panthera onca</i>	2
F ca-01	<i>Felis catus</i>	0 / 1 / 7

^a Indivíduos heteroplásmicos estão identificados pela presença de fragmentos amplificados pertencendo a mais de uma classe de tamanho.



Figura 3.1. Gel de eletroforese com fragmentos amplificados da porção inicial da região controladora do mtDNA de felinos. Legenda: 1, 2, 8, 9: marcadores de tamanho molecular, 3: Fwi-04; 4: Fpa-02; 5: Fpa-01; 6: Fge-01; 7: Fca-01. Obs. Notar a presença de heteroplasmia em Fpa-01.

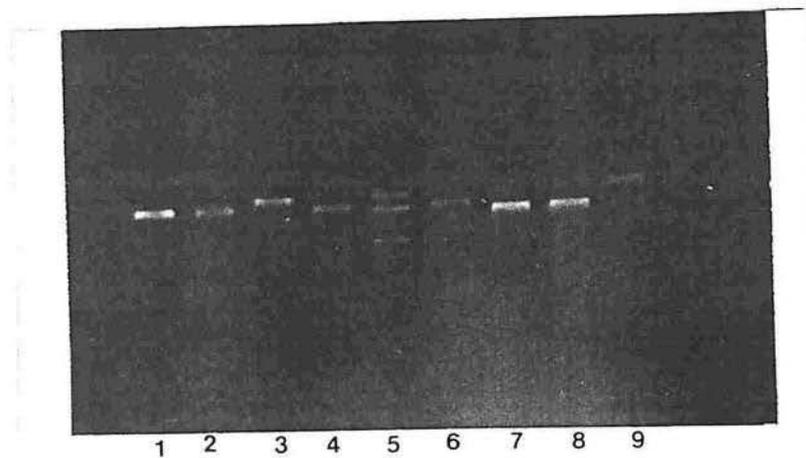


Figura 3.2. Gel de eletroforese com fragmentos amplificados da porção inicial da região controladora do mtDNA de felinos. Legenda: 1: Fwi-02; 2: Fwi-03; 3: Fwi-04; 4: Fti-02; 5: marcadores de tamanho molecular; 6: Fpa-02; 7: Fpa-06; 8: Fpa-07; 9: Fcn-01.

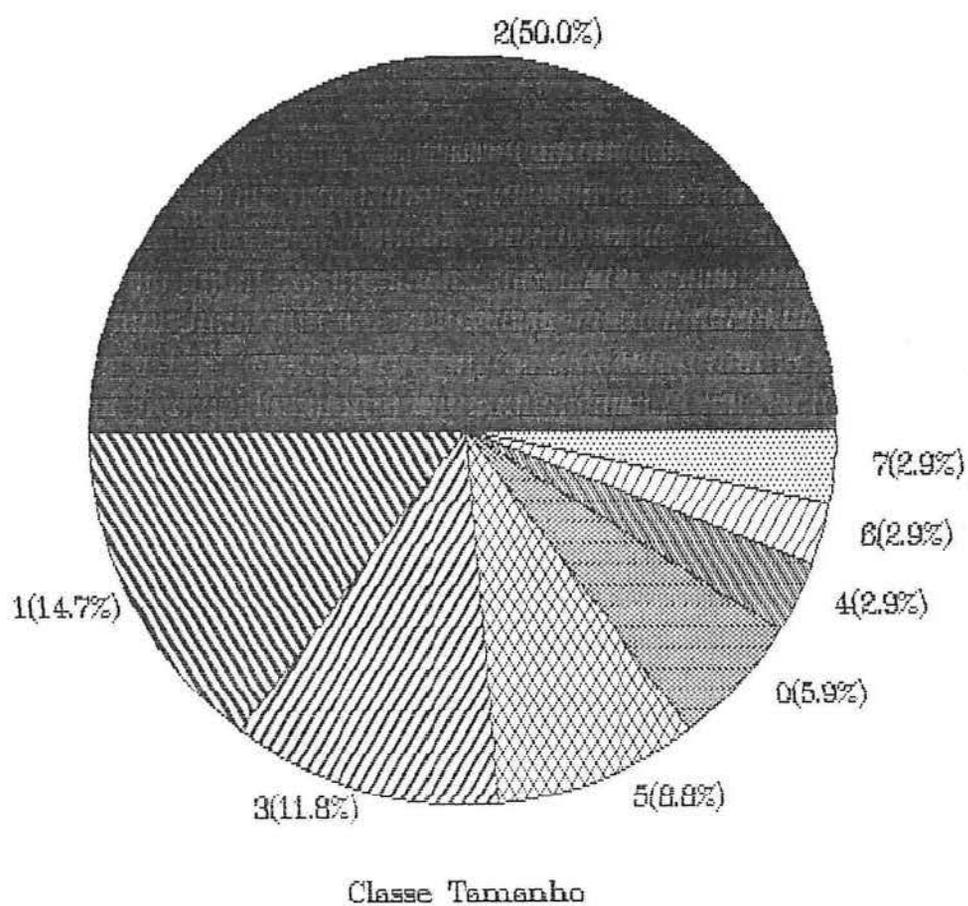


Figura 3.3. Distribuição das frequências das classes de tamanho dos fragmentos amplificados da porção inicial da região controladora do mtDNA de felinos.

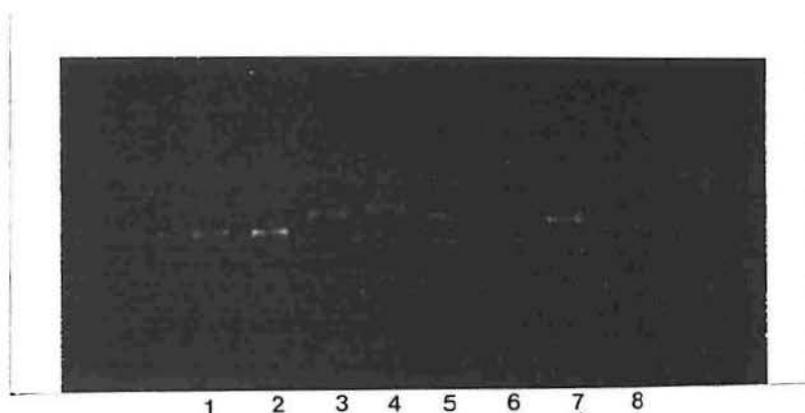


Figura 3.4. Gel de eletroforese com fragmentos amplificados da porção inicial da região controladora do mtDNA de sete indivíduos da espécie *Felis geoffroyi*. Legenda: 1: Fge-01; 2: Fge-02; 3: Fge-03; 4: Fge-04; 5: marcadores de tamanho molecular; 6: Fge-05; 7: Fge-06; 8: Fge-07.

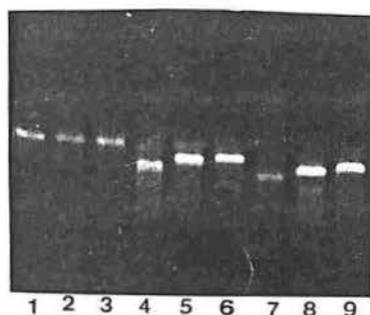


Figura 3.5. Gel de eletroforese com fragmentos amplificados da região controladora do mtDNA de felinos. Legenda: 1, 4, 7: Fwi-01; 2, 5, 8: Fwi-04; 3, 6, 9: humano. As pistas 1-3 apresentam fragmentos amplificados com os primers L15997 e H16401; as pistas 4-6 apresentam fragmentos amplificados com os primers L15997 e H16498; nas pistas 7-9 estão fragmentos amplificados com os primers L15926 e H16498.

4. Discussão

a) Obtenção de Amostras, Extração de DNA e Amplificações por PCR

O número de amostras de material biológico de felinos neotropicais obtido durante o presente trabalho pode ser considerado muito bom, especialmente se for considerado o fato de que grande parte dos indivíduos em questão apresentam procedência geográfica conhecida, ainda que esta, em muitos casos, não seja bastante precisa. A obtenção destas amostras será certamente de grande importância para a realização de estudos evolutivos, biogeográficos e populacionais sobre felinos da Região Neotropical, especialmente no que diz respeito a populações destas espécies que habitem o sul do Brasil, tendo em vista o maior número de amostras provenientes desta área.

A extração de DNA a partir das amostras de sangue pode ser considerada bem-sucedida, considerando-se o uso dos diferentes protocolos em casos específicos. O baixo rendimento em algumas extrações é provavelmente devido a diferenças no estado de conservação das amostras. Estudos recentes (e.g. Cushwa & Medrano, 1993) indicam que a temperatura de estocagem das amostras de sangue, por exemplo, pode influenciar de maneira significativa no rendimento de extrações de DNA que venham a ser feitas. Diferenças fisiológicas entre os vários indivíduos estudados também podem ter influenciado na quantidade de DNA presente na amostra.

As ampliações por PCR também foram bem-sucedidas. Os bons resultados obtidos com o gene do citocromo *b* indicam que este segmento é facilmente amplificável através da técnica descrita, viabilizando o seu uso em estudos de evolução molecular de felinos neotropicais, especialmente para fins de análise filogenética. As ampliações da porção inicial da região controladora do mtDNA, além de revelarem o polimorfismo de tamanho, que será tratado em detalhe a seguir, podem ser muito úteis para estudos filogenéticos em linhagens de divergência recente, como é o caso dos pequenos felinos sul-americanos, e também em estudos filogeográficos e populacionais.

b) Polimorfismo de Tamanho

A existência de variação de tamanho no DNA mitocondrial (mtDNA) é largamente documentada para diversos grupos de animais (Solignac et al., 1986; Wilkinson & Chapman, 1991; Rand, 1993). Os mecanismos responsáveis pelo seu surgimento e manutenção, entretanto, são ainda pouco compreendidos, embora se saiba que grande parte dos casos tenham sua origem em eventos de deleção e inserção (Cann & Wilson, 1983; Hyman et al., 1988) ou na repetição em tandem de seqüências específicas (Biju-Duval et al., 1991; Stewart & Baker, 1994).

A maior parte dos registros de variação de tamanho no mtDNA realizados até o momento provêm de polimorfismos localizados dentro ou próximo da região controladora. Isto seria provavelmente devido ao caráter não codificador desta região do mtDNA, o que permitiria que mutações de tamanho, assim como substituições de nucleotídios, aí ocorridas não trouxessem prejuízo direto à célula ou ao organismo portador da variação, se comparadas ao que ocorre em segmentos codificadores (Awise, 1986). Isto não significa, entretanto, que variações de tamanho ou alterações na seqüência da região controladora sejam seletivamente neutras, já que as funções regulatórias exercidas por este segmento do mtDNA parecem estar relacionadas à manutenção de estruturas secundárias conservadas, localizadas em porções específicas desta região (Brown et al., 1986; Mignotte et al., 1990). De uma forma geral, observa-se que a maior parte dos registros de variação de tamanho, especialmente por repetições em tandem de segmentos, localiza-se nos domínios externos (5' e 3', designados pela fita L) da região controladora, tidos como sendo muito mais variáveis, em termos de seqüência, do que a porção central conservada (Wilkinson & Chapman, 1991; Hoelzel et al., 1993)

A variação de tamanho descrita no presente estudo deriva provavelmente de uma série de repetições em tandem localizada na porção 5' da região controladora do mtDNA, entre os blocos de seqüência conservada D e F (CSB-D e CSB-F, ver figura 3.6). Trata-se de um ponto próximo daquele descrito para as séries de repetições em tandem observadas no mtDNA de morcegos (Wilkinson & Chapman, 1991) e musaranhos (Stewart & Baker, 1994). Estes dois grupos, entretanto, apresentam suas repetições localizadas mais proximamente do gene para o tRNA^{Pro}, já fora dos blocos de seqüência conservada. Isto estaria mais de acordo com a idéia vigente de que estas repetições tendem a estar localizadas em áreas de alta variabilidade de seqüência situadas nos extremos 5' e 3' da região controladora (Hoelzel et al., 1993). Neste aspecto, a série de repetições aqui relatada seria uma exceção, levantando duas hipóteses: (1) repetições em tandem podem ocorrer em porções bastante conservadas da região controladora do mtDNA; ou (2) a região em que estas repetições se inserem apresenta altas taxas de variação de seqüência, significando que o CSB-E e ao menos parte do CSB-D e CSB-F não são conservados no mtDNA de felinos. Tendo em vista que os primers utilizados para amplificação por PCR deste segmento apresentaram um bom desempenho, significando uma homologia considerável com suas seqüências-alvo, localizadas nos CSB D e F, deduz-se que ao menos estes segmentos são conservados em felinos, o que deixaria aberta a possibilidade de que o CSB-E e seqüências adjacentes, num total de cerca de 100 pares de base (pb) poderiam ser mais variáveis. Existem registros de grupos de animais em que certos CSBs não se apresentam conservados, como é o caso do CSB-1 em roedores (Brown et al., 1986) e do CSB-3 em bovídeos e cetáceos (Dillon & Wright, 1993).

O modelo de Buroker et al. (1990) para a formação de séries de repetições em tandem na região controladora do mtDNA, pode ser relacionado de duas

formas com o padrão observado no presente estudo. Em primeiro lugar, a posição das repetições aqui relatadas é compatível com a hipótese dos referidos autores de que elas seriam geradas a partir da competição entre as fitas H e D-loop do mtDNA, ao contrário do que acontece com as repetições descritas por Hoelzel et al. (1993), que se encontram no lado oposto da região controladora. Assim, pode-se sugerir que a variação de tamanho aqui descrita é gerada através de erros no pareamento entre as três fitas do mtDNA durante a replicação desta molécula. Isto seria ocasionado pela formação de estruturas secundárias estáveis nas fitas envolvidas, modificando o alinhamento das repetições já existentes.

Por outro lado, o modelo de Buroker et al. (1990) implica a existência prévia de ao menos três repetições para que se forme uma estrutura secundária capaz de iniciar o processo indutor de variação de tamanho e heteroplasmia. A origem destas três repetições não fica clara no referido modelo, mas presume-se que estas surjam por variação aleatória na seqüência ou por outras formas de pareamento errôneo durante a replicação. Wilkinson & Chapman (1991) sugerem que apenas duas repetições seriam suficientes para iniciar o processo, mas ainda assim torna-se difícil explicar os padrões de repetição observados no mtDNA de felinos com base neste modelo. Isto porque o comprimento de cada repetição aqui verificada parece ser de aproximadamente 110 pb, o mesmo tamanho do segmento total observado na classe 1. Se a classe 1 significa a presença de apenas uma cópia da repetição, então o presente caso não se enquadraria nos padrões de variação previstos no modelo de Buroker et al. (1990), pois implicaria um evento de deleção irreversível a partir de um tipo original com no mínimo duas cópias. Se, por outro lado, a classe de tamanho 1 contém duas repetições, viabilizando o seu enquadramento nos padrões de variação do modelo, então cada repetição teria um comprimento de cerca de 55 pb. Isto parece ser bastante improvável, tendo em vista que todas as classes de tamanho

verificadas diferem entre si por múltiplos de 110 pb, e não há por que imaginar que os segmentos fossem ser repetidos sempre aos pares.

O fato de que a classe de tamanho mais freqüente seja a 2 (ver figura 3.3) estaria de acordo com a hipótese de que um mínimo de duas repetições poderia dar origem a variações de tamanho e heteroplasmia como observado no presente estudo. Entretanto, a freqüência consideravelmente alta (15.2 %) de fragmentos da classe 1 sugeriria que eventos únicos deletando uma repetição inteira não são muito raros no mtDNA de felinos. Isto seria acentuado pela ocorrência de fragmentos da classe 0, nos quais se presume que uma deleção em maior escala tenha reduzido grandemente o segmento em questão do mtDNA, possivelmente eliminando por completo os supostos blocos de seqüência conservada ali presentes e também outros segmentos. Tendo em vista que fragmentos da classe 0 foram observados em apenas dois indivíduos, ambos heteroplásmicos, é possível supor que estes eventos maiores de deleção ocorram de maneira ocasional, em linhagens celulares isoladas, não havendo qualquer evidência de fixação a longo prazo dos mutantes. A fixação da classe de tamanho 1 foi observada de maneira consistente em apenas um indivíduo (Fwi-04), para o qual várias amplificações por PCR resultaram invariavelmente na presença de apenas este tamanho de fragmento. Os demais indivíduos portadores da classe de tamanho 1 eram heteroplásmicos, o que pode significar que os processos que originam este tamanho de segmento sejam realmente deleções a partir de um número maior de segmentos repetidos.

O tipo de repetição presente no mtDNA dos felinos estudados em alguns aspectos se parece com o encontrado em morcegos (Wilkinson e Chapman, 1991) e musaranhos (Stewart & Baker, 1994), ou seja, seqüências relativamente grandes (> 70 pb), bem delimitadas e repetidas de forma direta, em um arranjo bastante simples. A freqüência de indivíduos heteroplásmicos (18.5 %) não se

afasta muito do encontrado no primeiro grupo, o que também suporta um tipo de repetição similar.

Por outro lado, a presença de variações de tamanho no mtDNA dos felinos estudados que não são explicadas de maneira completa pelo modelo de Buroker et al. (1990) pode significar que o tipo de seqüência repetida é mais complexo do que os encontrados nos grupos de animais mencionados acima, talvez assemelhando-se mais aos intrincados padrões observados por Hoelzel et al. (1993) em elefantes-marinhos. Estes autores comentam que Lopez (comunicação pessoal em Hoelzel et al., 1993) encontrou no mtDNA de gatos domésticos um arranjo de seqüências repetitivas similares aos observados em elefantes-marinhos e em focas comuns (Hoelzel et al., 1993).

Caso esta similaridade entre focas e felinos seja realmente constatada em termos de arranjos complexos de seqüências repetitivas, indicando uma origem comum, será possível propor que o surgimento destas repetições ocorreu ainda no início da evolução da ordem Carnivora (ver Introdução). Isto levaria a uma previsão de que este tipo de arranjo deva estar presente (a menos que tenha sido perdido de forma secundária) em todas as outras famílias de carnívoros.

O presente estudo suporta uma origem bastante antiga para os mecanismos geradores destas repetições ao menos no âmbito da família Felidae. Isto porque foram encontradas evidências de um mesmo tipo de variação de tamanho em espécies pertencentes às três linhagens principais de felinos, propostas por Collier & O'Brien (1985), Wayne et al. (1989), entre outros. Isto parece indicar que o surgimento destes mecanismos de variação no tamanho da região controladora do mtDNA de felinos ocorreu antes da separação destas três linhagens, provavelmente há mais de 10 milhões de anos.

5. Conclusões e Resumo

Conhecimentos acerca da biologia, ecologia e genética das espécies de felinos neotropicais são ainda muito escassos, o que dificulta uma maior compreensão sobre a sua história evolutiva e organização sistemática. Além disso, a falta de informações nessas áreas torna difícil a tarefa de propor estratégias adequadas para a conservação destas espécies.

O presente trabalho teve por objetivos: (1) construir um banco de amostras de material biológico de felinos neotropicais para uso em estudos evolutivos e populacionais; (2) desenvolver protocolos eficientes para extração de DNA e amplificação por PCR de duas regiões do DNA mitocondrial (mtDNA) a partir das amostras obtidas; (3) descrever e caracterizar um polimorfismo de tamanho identificado na região controladora do mtDNA destas espécies.

Foi possível a obtenção de amostras de material biológico de 47 indivíduos pertencentes a oito espécies de felinos neotropicais, além de dois indivíduos de espécies aparentadas, o que representa uma considerável fonte de informação para estudos evolutivos e populacionais deste grupo, especialmente com relação ao sul do Brasil.

A extração de DNA a partir das amostras obtidas trouxe bons resultados, assim como a amplificação por PCR dos fragmentos do gene do citocromo *b* e da região controladora do mtDNA. Estes resultados abrem novos caminhos para o uso destas técnicas em estudos filogenéticos, biogeográficos e populacionais das espécies em questão.

A identificação de um polimorfismo de tamanho na porção inicial da região controladora do mtDNA de felinos permitiu que se estudasse aspectos da dinâmica evolutiva do genoma mitocondrial neste grupo. Concluiu-se que o

polimorfismo de tamanho observado é provavelmente devido a uma série de repetições em tandem de uma seqüência de cerca de 110 pb, aliada a eventos independentes de deleção.

A localização deste sítio de tamanho variável é curiosa, pois trata-se de uma região tida como sendo bastante conservada, em termos de seqüência. Isto estaria em oposição a tendências observadas em outros grupos de que polimorfismos de tamanho ocorrem em regiões de seqüência mais variável.

A estrutura das seqüências repetitivas observadas no mtDNA de felinos ainda não está completamente esclarecida. Os dados obtidos no presente estudo indicam que se trata de uma série limitada de repetições completas, envolvendo uma seqüência relativamente grande, o que estaria de acordo com modelos propostos para outros grupos de animais. Por outro lado, a ocorrência de variações não previstas nos referidos modelos, a princípio interpretadas como sendo derivadas de deleções independentes, pode significar que o polimorfismo de tamanho aqui descrito se deva a um padrão bem mais complexo de pequenas repetições altamente variáveis, algo já descrito para grupos próximos de animais.

Espera-se que o seqüenciamento desta região do mtDNA das espécies estudadas traga um maior esclarecimento a esse respeito. Além disso, o uso desta técnica viabilizará o desenvolvimento de outras linhas de pesquisa envolvendo evolução, dinâmica de populações e conservação destas espécies.

Da mesma forma, espera-se que a obtenção de um número maior de amostras, abrangendo outras áreas da Região Neotropical, viabilize uma maior compreensão da dinâmica das variações no mtDNA destas espécies, bem como de outros aspectos relacionados à evolução e biogeografia deste grupo.

6. Conclusions and Summary

Knowledge as to the biology, ecology and genetics of neotropical felid species is still very scarce, so that a wider understanding of their evolutionary history and systematic organization cannot be fully achieved. Besides that, lack of information on these areas makes it difficult to propose adequate conservation strategies for these species.

The present study aimed at: (1) building a bank of samples of biological material from neotropical cats, for use in evolutionary and populational studies; (2) developing efficient protocols for DNA extraction and PCR amplification of two regions of the mitochondrial DNA (mtDNA) from the obtained samples; (3) describing and characterizing a size polymorphism identified in the control region of the mtDNA of these species.

Samples of biological material were obtained from 47 individuals belonging to eight species of neotropical cats, and also from two individuals belonging to related species. This represents a meaningful source of information for evolutionary and populational studies of this group, especially concerning southern Brazil.

DNA extraction from the obtained samples was quite successful, as well as PCR amplification of the cytochrome *b* gene and the initial portion of the mtDNA control region. These results open new paths for the use of these techniques in phylogenetic, biogeographical and populational studies of the mentioned species.

The identification of a size polymorphism in the initial portion of the mtDNA control region of felids allowed the study of some aspects of the evolutionary dynamics of the mitochondrial genome in this group. It was found

that the length polymorphism detected probably results from a series of tandem repetitions of a sequence of approximately 110 bp, coupled with independent deletion events.

The location of this variable-length site is quite curious, because it is supposed to be a fairly conserved region, in terms of sequence variation. This finding would be in disagreement with trends observed in other groups, which show that size polymorphisms tend to occur in more divergent regions.

The structure of the repetitive sequences observed in the mtDNA of cats is not completely clarified. The data gathered in the present study indicate that they consist of a limited series of complete, rather long, repeated sequences, which would be in accordance to models proposed for other groups of animals. On the other hand, the occurrence of some variation that was not predicted in those models, so far interpreted as being derived from independent deletions, could mean that the size polymorphism described here is due to a more complex pattern of small and highly variable repeats, which was already described for closely related groups of animals.

It is expected that the sequencing of this region of the mtDNA of the analysed species will bring more light to this matter. Also, the use of this technique will make it possible to develop other lines of research concerning evolution, population dynamics and conservation of these species.

Likewise, it is expected that the obtention of a greater number of samples, encompassing other areas within the Neotropical Region, will lead to a better understanding of the dynamics of variation in the mtDNA of these species, as well as of other topics related to the evolution and biogeography of this group.

7. Referências Bibliográficas

- ✓ ADAMS, D.B. 1979. The cheetah: native American. *Science*, **205**: 1155-1158.
- ANDERSON, S.; A. T. BANKIER; B. G. BARREL; M. H. L. DeBRUIJN; A. R. COULSON; J. DROUIN; I. C. EPERON; D. P. NEIRLICH; B. A. ROE; F. SANGER; P. H. SCHREIER; A. J. H. SMITH; R. STADEN; I. G. YOUNG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**: 457-465.
- AVISE, J. C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **312**: 325-342.
- AVISE, J. C.; J. ARNOLD; R. M. BALL; E. BERMINGHAM; T. LAMB; J. E. NEIGEL; C. A. REEB; N. C. SAUNDERS. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **18**: 489-522.
- BECK, J. L.; B. C. HYMAN. 1988. Role of sequence amplification in the generation of nematode mitochondrial DNA polymorphism. *Current Genetics*, **14**: 627-636.
- BERMINGHAM, E.; T. LAMB; J. C. AVISE. 1986. Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. *The Journal of Heredity*, **77**: 249-252.

- ✓ BERTA, A. 1983. A new species of small cat (Felidae) from the Late Pliocene-Early Pleistocene (Uquian) of Argentina. *Jour. Mammal.*, 64 (4): 720-725.
- BLJU-DUVAL, C.; H. ENNAFAA; N. DENNEBOUY; M. MONNEROT; F. MIGNOTTE; R. C. SORIGUER; A. E. GAAÏED; A. E. HILL; J.-C. MOUNOLOU. 1991. Mitochondrial DNA evolution in lagomorphs: origin of systematic heteroplasmy and organization of diversity in European rabbits. *J. Mol. Evol.*, 33: 92-102.
- ✓ BISBAL, F. 1991. Estados de los pequeños felinos de Venezuela. pp. 83-94 in: FUDECI. *Memorias del Simposio "Felinos de Venezuela: Biología, Ecología y Conservación"*. Valencia: Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales (FUDECI).
- BROWN, G. G.; G. GADALETA; G. PEPE; C. SACCONI; E. SBISÀ. 1986. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, 192: 503-511.
- BROWN, J.R.; A. T. BECKENBACH; M. J. SMITH. 1992. Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in populations of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genetics*, 132: 221-228.
- BROWN, W. M. 1985. The mitochondrial genome of animals. pp. 95-130 in: MACINTYRE, R. J. (ed.). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Plenum Publishing Co.

- BRYANT, H.N. 1991. Phylogenetic relationships and systematics of the Nimravidae (Carnivora). *J. Mammal.* 72 (1): 56-78.
- BUROKER, N. E.; J. R. BROWN; T. A. GILBERT; P. J. O'HARA; A. T. BECKENBACH; W. K. THOMAS; M. J. SMITH. 1990. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model. *Genetics*, 124: 157-163.
- ✓ CABRERA, A. 1934. Los yaguares vivientes y extinguidos de la América Austral. *Notas Prel. Museo de La Plata*, II: 1-39.
- ✓ CABRERA, A.; J. YEPES. 1940. *Mamíferos Sud-Americanos*. Buenos Aires: Compañía Argentina de Editores. 370 pp.
- CANN, R. L.; A. C. WILSON. 1983. Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics*, 104: 699-711.
- ✓ CARMAN, R.L. 1984. Limite austral de la distribución del tigre o yaguarete (*Leopardus onca*) en los siglos XVIII y XIX. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" e Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales - Zoología*, XIII (30): 293-296.
- COLLIER, G.E.; S.J. O'BRIEN. 1985. A molecular phylogeny of the Felidae: immunological distance. *Evolution*, 39: 473-487.

- ✓ CRAWSHAW, P. G., Jr., 1991. Recommendations for study design on research projects on Neotropical felids. pp 187-222 in: FUDECI. **Memorias del Simposio "Felinos de Venezuela: Biología, Ecología y Conservación"**. Valencia: Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales (FUDECI).
- CUSHWA, W. T.; J. F. MEDRANO. 1993. Effects of blood storage time and temperature on DNA yield and quality. **BioTechniques**, 14 (2):204-207.
- DENSMORE, L. D.; J. W. WRIGHT; W. M. BROWN. 1985. Length variation and heteroplasmy are frequent in mitochondrial DNA from parthenogenetic and bisexual lizards (Genus *Cnemidophorus*). **Genetics**, 110: 689-707.
- DILLON, M. C.; J. M. WRIGHT. 1993. Nucleotide sequence of the D-loop region of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) mitochondrial genome. **Mol. Biol. Evol.**, 10 (2): 296-305.
- EDWARDS, S. V.; A. C. WILSON. 1990. Phylogenetically informative length polymorphism and sequence variability in mitochondrial DNA of Australian songbirds (*Pomatostomus*). **Genetics**, 126: 695-711.
- ✓ EISENBERG, J.F. 1981. **The mammalian radiations**. Univ. Chicago Press, Chicago. 610 pp.

- ✓ EMMONS, L.H. 1987. Comparative feeding ecology of felids in a neotropical rainforest. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **20**: 271-283.
- ✓ _____ . 1988. A field study of ocelots (*Felis pardalis*) in Peru. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, **43**: 133-157.
- ✓ _____ . 1990. *Neotropical rainforest mammals: a field guide*. Chicago: University of Chicago Press. 281 pp.
- ✓ FERGUS, C. 1991. The Florida panther verges on extinction. *Science*, **251**: 1178-1180
- FERRIS, S. D.; A. C. WILSON; W. M. BROWN. 1981. Evolutionary tree for apes and humans based on cleavage maps of mitochondrial DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **78** (4): 2432-2436.
- GJETVAJ, B.; D. I. COOK; E. ZOUROS. 1992. Repeated sequences and large-scale size variations of mitochondrial DNA: a common feature among scallops (Bivalvia: Pectinidae). *Mol. Biol. Evol.*, **9** (1): 106-124.
- HARRISON, R. G.; D. M. RAND; W. C. WHEELER. 1985. Mitochondrial DNA size variation within individual crickets. *Science*, **228**: 1446-1448.

- HOELZEL, A. R.; J. M. HANCOCK; G. A. DOVER. 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Mol. Biol. Evol.*, **8** (3): 475-493.
- _____. 1993. Generation of VNTRs and heteroplasmy by sequence turnover in the mitochondrial control region of two elephant seal species. *J. Mol. Evol.*, **37**: 190-197.
- ✓ HONACKI, J.H.; K.E. KINMAN; J.W. KOEPL (eds.). 1982. **Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference**. Allen Press, Inc. & The Association of Systematics Collections. Lawrence, Kansas, USA.
- HYMAN, B. C.; J. L. BECK; K. C. WEISS. 1988. Sequence amplification and gene rearrangement in parasitic nematode mitochondrial DNA. *Genetics*, **120**: 707-712.
- ✓ IRIARTE, J.A.; W.L. FRANKLIN; W.E. JOHNSON; K.H. REDFORD. 1990. Biogeographic variations of food habits and body size of the American puma. *Oecologia (Heidelb)*, **85** (2): 185-190.
- IRWIN, D. M.; T. D. KOCHER; A. C. WILSON. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J. Mol. Evol.*, **32**: 128-144.
- ✓ IUCN. 1990. **1990 IUCN red list of threatened animals**. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 228 pp.

JANCZEWSKI, D.N.; N. YUHKI; D.A. GILBERT; G.T. JEFFERSON and S.J. O'BRIEN. 1992. Molecular phylogenetic inference from saber-toothed cat fossils of Rancho La Brea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 9769-9773.

✓ JOHNSON, W.E.; W.L. FRANKLIN. 1991. Feeding and spatial ecology of *Felis geoffroyi* in southern Patagonia. *J. Mamm.*, 72 (4): 815-820.

✓ KILTIE, R.A. 1988. Interspecific size regularities in tropical felid assemblages. *Oecologia* 76: 97-105.

LAHIRI, D. K.; J. I. NURNBERGER, Jr.. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, 19 (19): 5444.

LAROCHE, J.; M. SNYDER; D. I. COOK; K. FULLER; E. ZOUROS. 1990. Molecular characterization of a repeat element causing large-scale size variation in the mitochondrial DNA of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Mol. Biol. Evol.*, 7 (1): 45-64.

- ✓ MARSHALL, L.G.; S.D. WEBB; J.J. SEPKOSKI; D.M. RAUP. 1982. Mammalian evolution and the Great American Interchange. **Science**, **215**: 1351-1357.
- ✓ MARTIN, L.D. 1989. Fossil history of the terrestrial Carnivora; pp. 536-568 in: GITTLEMAN, J.L. **Carnivore Behavior, Ecology and Evolution**. New York: Cornell University Press. 620 pp.
- ✓ MAZZOLLI, M. 1992. Contribuição ao conhecimento da distribuição, identificação e conservação do puma (*Felis concolor* ssp.) no Estado de Santa Catarina. Dissertação (Bacharelado). Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. 70 pp.
- MEYER, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. pp. 1-38 in: HOCHACHKA & MOMMSEN (eds.). **Biochemistry and molecular biology of fishes**, vol. 2. Elsevier Science Publishers B. V..
- MIGNOTTE, F.; M. GUERIDE, A.-M. CHAMPAGNE; J.-C. MOUNOLOU. 1990. Direct repeats in the non-coding region of rabbit mitochondrial DNA: involvement in the generation of intra- and inter-individual heterogeneity. **Eur. J. Biochem.**, **194**: 561-571.
- MILINKOVITCH, M.C.; G. ORTI; A. MEYER. 1993. Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Nature**, **361**: 346-348.

- MITHTHAPALA, S.; J. SEIDENSTICKER; L. G. PHILLIPS; K. L. GOODROWE; S. B. U. FERNANDO; L. FORMAN; S. J. O'BRIEN. 1991. Genetic variation in Sri Lankan leopards. *Zoo Biology*, 10: 139-146.
- ✓ MOREIRA, L.E. 1970. Primeira ocorrência de *Smilodon populator* Lund, 1842 no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesquisas (Zoologia)*, 23: 25-35.
- MORITZ, C.; W. M. BROWN. 1986. Tandem duplication of D-loop and ribosomal RNA sequences in lizard mitochondrial DNA. *Science*, 233: 1425-1427.
- MORITZ, C.; T.E. DOWLING and W.M. BROWN. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-292.
- ✓ NEFF, N. A. 1986. *The big cats: the paintings of Guy Coheleach*. New York: Abradale Press/H.N. Abrams, Inc., publishers. 243 pp.
- NEWMAN, A.; M. BUSH; D. E. WILDT; D. VAN DAM; M. T. FRANKENHUIS; L. SIMMONS; L. PHILLIPS; S. J. O'BRIEN. 1985. Biochemical genetic variation in eight endangered or threatened felid species. *J. Mamm.*, 66 (2): 256-267.

✓ NOWAK, R. M. 1991. **Walker's Mammals of the World**. 5th ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. Vol. II. 1629 pp.

O'BRIEN, S. J.; M. E. ROELKE; L. MARKER; A. NEWMAN; C. A. WINKLER; D. MELTZER; L. COLLY; J. F. EVERMANN; M. BUSH; D. E. WILDT. 1985. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. **Science**, **227**: 1428-1434.

O'BRIEN, S. J.; G. E. COLLIER; R. E. BENVENISTE; W. G. NASH; A. K. NEWMAN; J. M. SIMONSON; M. A. EICHELBERGER; U. S. SEAL; M. BUSH; D. E. WILDT. 1987. Setting the molecular clock in Felidae: The great cats, *Panthera*. pp. 10-27 in: TILSON, R.L.; U.S. SEAL (eds.). **Tigers of the World: the biology, biopolitics, management and conservation of an endangered species**. Park Ridge: Noyes Publications.

✓ OLIVEIRA, T. G.. 1994. **Neotropical cats: ecology and conservation**. São Luís: EDUFMA. 244 pp.

PACKER, C.; D. A. GILBERT; A. E. PUSEY; S. J. O'BRIEN. 1991. A molecular genetic analysis of kinship and cooperation in African lions. **Nature**, **351** (6327): 562-565.

✓ PAULA-COUTO, C. 1953. **Paleontologia brasileira: mamíferos**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Livro.

_____. 1979. *Tratado de Paleomastozoologia*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. 590 pp.

PIECZARKA, J.C. 1983. Estudo citogenético em felinos sul-americanos. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Brasil. 85 pp.

POWERS, T. O.; E. G. PLATZER; B. C. HYMAN. 1986. Large mitochondrial genome and mitochondrial DNA size polymorphism in the mosquito parasite, *Romanomerms culicivora*. *Current Genetics*, 11: 71-77.

RAND, D. M.; R. G. HARRISON. 1989. Molecular population genetics of mtDNA size variation in crickets. *Genetics*, 121: 551-569.

RAND, D. M.. 1993. Endotherms, ectotherms, and mitochondrial genome-size variation. *J. Mol. Evol.*, 37: 281-295.

_____. 1994. Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *TREE*, 9 (4): 125-131.

RANDI, E.; B. RAGNI. 1991. Genetic variability and biochemical systematics of domestic and wild cat populations (*Felis silvestris*: Felidae). *J. Mamm.*, 72 (1): 79-88.

- SAIKI, R. K.; S. SCHARF; F. FALOONA; K. B. MULLIS; G. T. HORN; H. A. ERLICH; N. ARNHEIM. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**: 1350-1354.
- SAIKI, R. K.; D. H. GELFAND; S. STOFFEL; S. SCHARF; R. HIGUCHI; G. T. HORN; K. B. MULLIS; H. A. ERLICH. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
- SAITOU, N.; S. UEDA.. 1994. Evolutionary rates of insertion and deletion in noncoding nucleotide sequences of primates. *Mol. Biol. Evol.*, **11** (3): 504-512.
- ✓ SALLES, L. O. 1992. Felid phylogenetics: extant taxa and skull morphology (Felidae, Aeluroidea). *American Museum Novitates*, **3047**: 1-67.
- ✓ SAVAGE, R. J. G.; M. R. LONG. 1986. **Mammal evolution: an illustrated guide**. Oxford: Facts on File Publications. 251 pp.
- ✓ SIMPSON, G.G. 1945. The principles of classification and a classification of mammals. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, **85**: 1-350.

SLATTERY, J. P. ; W. E. JOHNSON; S. J. O'BRIEN (no prelo). Phylogenetic reconstruction of South American felids defined by protein electrophoresis. *J. Mol. Evol.*

SMITH, M. F.; W. K THOMAS; J. L. PATTON. 1992. Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of an akodontine rodent. *Mol. Biol. Evol.*, 9 (2): 204-215.

SNYDER, M.; A. R. FRASER; J. LAROCHE; K. E. GARTNER-KEPKAY; E. ZOUROS. 1987. Atypical mitochondrial DNA from the deep-sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7595-7599.

SOLIGNAC, M.; M. MONNEROT; J.-C. MOUNOLOU. 1986. Concerted evolution of sequence repeats in *Drosophila* mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 24: 53-60.

STEWART, D. T.; A. J. BAKER. 1994. Patterns of sequence variation in the mitochondrial D-loop region of shrews. *Mol. Biol. Evol.*, 11 (1): 9-21.

TZAGOLOFF, A. 1982. **Mitochondria**. New York: Plenum Press. 342 pp.

VIGILANT, L.; R. PENNINGTON; H. HARPENDING; T. D. KOCHER; A. C. WILSON. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9350-9354.

VOGLER, A. P.; C. B. KNISLEY; S. B. GLUECK; J. M. HILL; R. DESALLE. 1993. Using molecular and ecological data to diagnose endangered populations of the puritan tiger beetle *Cicindela puritana*. *Molecular Ecology*, 2: 375-383.

WARD, R. H.; B. L. FRAZIER; K. DEW-JAGER; S. PÁÁBO. 1991. Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8720-8724.

✓ WAYNE, R. K.; R.E. BENVENISTE; D.N. JANCZEWSKI; S.J. O'BRIEN. 1989. Molecular and biochemical evolution of the Carnivora; pp. 465-494 in: GITTLEMAN, J.L. *Carnivore Behavior, Ecology and Evolution*. New York: Cornell University Press. 620 pp.

WILKINSON, G. S.; A. M. CHAPMAN. 1991. Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA.. *Genetics*, 128: 607-617.

✓ WOZENCRAFT, W.C. 1989a. The phylogeny of the recent Carnivora; pp. 495-535 in: GITTLEMAN, J.L. *Carnivore Behavior, Ecology and Evolution*. New York: Cornell University Press. 620 pp.

✓ _____ . 1989b. Classification of the recent Carnivora; pp. 569-593 in: GITTLEMAN, J.L. *Carnivore Behavior, Ecology and Evolution*. New York: Cornell University Press. 620 pp.

WURSTER-HILL, D.H.; W.R. CENTERWALL. 1982. The interrelationships of chromosome banding patterns in canids, mustelids, hyena, and felids. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 34: 178-192.

✓ XIMENEZ, A. 1972. Notas sobre felidos neotropicales, V: Nueva ampliación de la distribución del gato eira en Patagonia. *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*, X (135): 1-3.

✓ _____ . 1973. Notas sobre felidos neotropicales, III: Contribución al conocimiento de *Felis geoffroyi* D'Orbigny & Gervais, 1844 y sus formas geográficas (Mammalia, Felidae). *Papeis Avulsos de Zoologia (S. Paulo)*, 27 (3): 31-43.

✓ _____ . 1975. *Felis geoffroyi*. *Mammalian Species*, 54: 1-4.

✓ _____ . 1988. Notas sobre felidos neotropicales, IX: *Felis (Leopardus) pardalis mitis* F. Cuvier, 1820 en el Uruguay (Mammalia: Carnivora: Felidae). *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*, XII (168): 1-7.

✓ZAPATA, A. R. P. 1982. Sobre el yaguarundi o gato eira, *Felis yagouaroundi ameghinoi* Holmberg y su presencia en la Provincia de Buenos Aires, Argentina (Mammalia, Felidae). *Neotropica*, 28 (80): 165-170.

ZEILLINGER, R.; C. SCHNEEBERGER; P. SPEISER. 1993. A simple method for isolation of DNA from blood clots suited for use in PCR. *Biotechniques*, 14 (2): 202-203.

8. Anexos

Anexo I : Modelo de Ficha para Coleta de Informações sobre os Animais em Estudo. (Modificado a partir de Crawshaw, Jr., 1991).

Ficha de Informações sobre Animal Coletado

ESPÉCIE: _____ ANIMAL #: _____ REGISTRO #: _____

SEXO: _____ IDADE: _____ VIVO: _____ DATA: _____

LOCAL: _____

OBS. 1: _____

OBS. 2: _____

EQUIPE: _____

COMP. TOT: _____ COMP. CORPO: _____ COMP. CAUDA: _____ PESO: _____

ALT. OMBRO: _____ CIRC. PESCOÇO: _____ CIRC. PEITO: _____

COMP. CABEÇA: _____ CIRC. CABEÇA: _____ ORELHA: _____

C. CANINO SUP: _____ C. CANINO INF: _____ DESGASTE DENTES: _____

L. CANINO SUP: _____ L. CANINO INF: _____ COR DENTES: _____

C. PATA DIANT: _____ C. ALM. DIANT: _____ C. DEDO DIANT: _____

L. PATA DIANT: _____ L. ALM. DIANT: _____ L. DEDO DIANT: _____

C. PATA POST: _____ C. ALM. POST: _____ C. DEDO POST: _____

L. PATA P.: _____ L. ALM. P.: _____ L. DEDO P.: _____ PÉ POST.: _____

CONDIÇÃO FÍSICA: _____

COMENTÁRIOS: _____

ECTOPARASITAS: _____ COLETA SANGUE: _____

ANTI-COAGULANTE: _____ OUTRAS AMOSTRAS: _____

COMENTÁRIOS: _____

Anexo II : Composição das Soluções Empregadas no Presente Estudo.

ACD (Anti-coagulante):

- Ácido Cítrico (0.8 g).
- Citrato de Sódio (2.2 g).
- Dextrose (2.45 g)
- H₂O (q.s.p. 100 ml)

TKM 1 (Extração DNA):

- 10 mM Tris-HCl pH 7.6
- 10 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 2 mM EDTA

TKM 2 (Extração DNA)

- 10 mM Tris-HCl pH 7.6
- 10 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 2 mM EDTA
- 400 mM NaCl

TE [100 X, pH 7.6] (Extração DNA):

- 10 mM Tris
- 1 mM EDTA

STE (Extração DNA):

- 10 mM Tris pH 8.0
- 1 mM EDTA
- 10 mM NaCl

Solução Diatomáceas (Extração DNA):

- 25 g de pó de diatomáceas suspensas em 100 ml de H₂O (concentração final de 250 mg/ml).

[Preparada segundo C. T. J. Chan (Dept. of Molecular Genetics, Institute of Child Health, London, UK) - comunicação pessoal via Correio Eletrônico]

Tampão PCR (10X):

- 100 mM Tris pH 8.7
- 15 mM MgCl₂
- 0.1 % Nonidet P - 40
- 0.1 % Triton X - 100
- 0.1 % Tween 20

TBE [5X, pH 8.3] (Tampão Eletroforese):

- 90 mM Tris
- 90 mM Ácido Bórico
- 12 mM EDTA (pH 8.0)

TAE [50 X, pH 7.8] (Tampão Eletroforese):

- 40 mM Tris
- 0.114 % Ácido Acético Glacial
- 1 mM EDTA (pH 8.0)