



UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

RAYANA BEATRIZ TÁVORA

**DE VOLTA PARA O FUTURO:
SEQUÊNCIAS INÉDITAS DE DNA MITOCONDRIAL GERADAS NA DÉCADA
DE 1990 PARA CETÁCEOS DO ATLÂNTICO OESTE**

FORTALEZA

2023

RAYANA BEATRIZ TÁVORA

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas modalidade Bacharelado do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Vicente Vieira Faria

Coorientador: Dr. João Eduardo Pereira de Freitas

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T237v Távora, Rayana Beatriz.

De volta para o futuro : sequências inéditas de DNA mitocondrial geradas na década de 1990 para cetáceos do Atlântico Oeste / Rayana Beatriz Távora. – 2023.
40 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Vicente Vieira Faria.

Coorientação: Prof. Dr. João Eduardo Pereira de Freitas.

1. Citocromo b. 2. Citocromo oxidase I. 3. Cetáceos. 4. Baleia. 5. Golfinho. I. Título.

CDD 570

RAYANA BEATRIZ TÁVORA

DE VOLTA PARA O FUTURO: SEQUÊNCIAS INÉDITAS DE DNA MITOCONDRIAL
GERADAS NA DÉCADA DE 1990 PARA CETÁCEOS DO ATLÂNTICO OESTE

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas modalidade Bacharelado do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 07/12/2023.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Vicente Vieira Faria (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. João Eduardo Pereira de Freitas (Coorientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Larissa Rosa de Oliveira

Universidade do Vale do Rio dos Sinos (Unisinos)

Dr. Rodrigo Maggioni

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho ao meu pai que, em vida, incentivou
inúmeras vezes a conclusão da minha formação,
acreditando que eu seria capaz.

We're not alone on this journey, baby

Calm Waters - Edson Távora

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Raimundo Edson Santos Távora Filho, minha maior inspiração acadêmica, educativa e artística; à minha mãe, Ana Lúcia Canário, que me apoiou como mãe, amiga e parceira; e à minha irmã, Gabriela Elizabeth Távora, que me inspirou e motivou inúmeras vezes a seguir meus sonhos.

Ao Dr. Vicente Vieira Faria, que me orientou e impulsionou, se fazendo sempre presente e disponível em todo o processo. Tenho uma infinita admiração por seu trabalho e conduta profissional.

Ao Dr. João Eduardo Pereira de Freitas pelo suporte e coorientação neste trabalho, contribuindo grandemente para o meu aprendizado.

Aos professores participantes da Banca Examinadora, Dra. Larissa Rosa de Oliveira e Dr. Rodrigo Maggioni, pelo tempo e pelas valiosas contribuições.

À Ana Caroline M. V. de Andrade Furtado pela disponibilização de cadernos de laboratório do Dr. Manuel Furtado-Neto que foram essenciais à elaboração deste trabalho.

Expresso também a minha admiração ao Dr. Manuel A. A. Furtado Neto (in memoriam) que ainda em vida compartilhou e estimulou a pesquisa científica a partir de sequências de DNA geradas por ele em seu doutorado.

A Universidade Federal do Ceará foi minha casa durante os anos de graduação e me proporcionou crescimento intelectual, social e pessoal. A UFC me apoiou financeiramente durante o semestre de desenvolvimento do presente Trabalho de Conclusão de Curso (bolsa de monitoria em Genética).

Por último, e mais importante, à Deus.

RESUMO

Sequências de DNA parciais dos genes citocromo b (cyt b) e citocromo oxidase I (COI) que foram geradas na década de 1990 a partir de exemplares de cetáceos encalhados no Canadá (Atlântico) e Brasil e nunca disponibilizadas no GenBank foram compiladas, caracterizadas e analisadas comparativamente a material disponível por espécie no GenBank. A partir do acesso a arquivos pertencentes ao Dr. Antonio Manuel de Andrade Furtado Neto (1963 – 2019), um total de 28 sequências foram obtidas: cinco de COI (495 pares de base) e 23 de cyt b (362 a 365 pares de base) de 16 espécies pertencentes a cinco famílias. Tanto as sequências de COI quanto de cyt b, apresentaram percentuais de identidade altos (entre 96,77 e 100%), com demais parâmetros excelentes (*query cover* e *E-value*). As sequências foram caracterizadas quanto ao percentual de composição de bases. Realizou-se um levantamento do número de sequências disponíveis por gene e por espécie no GenBank a fim de inferir o grau de ineditismo das sequências ainda não depositadas. Dentre outros resultados relevantes destaca-se que, para *Stenella frontalis*, as sequências ainda não depositadas equivalem a 57% de todo o material disponível para citocromo b da espécie no GenBank e para *Mesoplodon bidens*, a sequência única ainda não depositada equivale à 25% de todo o material disponível para COI. Ainda, aspectos potencialmente relevantes para os estudos populacionais foram observados para três espécies, *Steno bredanensis*, *Stenella longirostris* e *Pontoporia blainvillei*.

Palavras-chave: citocromo b; citocromo oxidase I; cetáceos; baleia; golfinho;

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
2.	MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1.	Sequências de DNA	10
2.2.	Identidade de espécies, grau de ineditismo e caracterização das sequências	14
2.3.	Aspectos de genética populacional	15
3.	RESULTADOS	16
3.1.	Citocromo oxidase I (COI): Identidade de espécies, grau de ineditismo e caracterização das sequências	16
3.2.	Citocromo b (cyt b)	18
3.2.1.	Identidade de espécies, grau de ineditismo e caracterização das sequências	18
3.2.2.	Aspectos de genética populacional	24
4.	DISCUSSÃO	29
5.	CONCLUSÕES	32
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

Os cetáceos incluem 89 espécies de baleias, golfinhos e botos globalmente distribuídos em oceanos, mares e rios, incluindo regiões tropicais, temperadas e circumpolares. No Brasil são encontradas 47 espécies de cetáceos (MIRANDA, 2020; ZERBINI, 2004) enquanto mais ao norte, na costa leste do Canadá, ocorrem 23 delas (REEVES, 2022). Algumas espécies possuem ampla distribuição mundial (e.g., golfinho-de-dentes-rugosos, *Steno bredanensis*, diversos países e oceanos abertos) enquanto outras possuem faixa de distribuição mais restrita (e.g. franciscana, *Pontoporia blainvillei*, costa brasileira). Algumas espécies habitam apenas um hemisfério (e.g. beluga, *Delphinapterus leucas*, hemisfério norte), enquanto outras transitam livremente entre hemisférios ao longo de seu ciclo de vida (e.g., baleia jubarte, *Megaptera novaeangliae*).

Quando se analisam os aspectos evolutivos de cetáceos, ainda persistem muitas lacunas quanto à complexa natureza evolutiva deste grupo (LEDUC *et al.*, 1999; MCGOWEN *et al.*, 2009; MCGOWEN, 2011; MILMANN, 2021). Com isso, ressalta-se a necessidade da criação de um banco de dados genético robusto para cetáceos (CABRERA, 2021). Ainda, levando-se em consideração a urgência desses conhecimentos em função das diversas ameaças que o táxon enfrenta, é sugerido concentrar esforços e priorizar espécies em risco de extinção (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Espécies como a vaquita (*Phocoena sinus*) e a franciscana (*Pontoporia blainvillei*) são espécies de toninhas endêmicas em risco de extinção, sendo a primeira, o cetáceo mais ameaçado do mundo, classificada como Criticamente Ameaçada pela Lista Vermelha da IUCN (ROJAS-BRACHO, 2022). A principal ameaça à vaquita é a pesca ilegal por redes de emalhe, sendo que, assim como outros cetáceos, a espécie é afetada também pela poluição das águas, a caça e até mesmo a poluição sonora advinda de embarcações (NOWACEK, 2007). No cenário brasileiro, a franciscana também se encontra sujeita consideráveis riscos de extinção, sendo classificada como espécie Vulnerável pela IUCN (ZERBINI, 2017), enfatizando a urgência na implementação de estratégias de conservação eficazes para mitigar essas ameaças e garantir a preservação dessas espécies de cetáceos.

A pesquisa sobre cetáceos, no entanto, enfrenta inúmeros desafios, dada a considerável proporção dessas espécies que são em sua maioria de grande porte e de difícil acesso, com habitats extensos. O estudo taxonômico dos misticetos, subgrupo que compreende as baleias de barbatanas,

é particularmente desafiador devido ao tamanho corporal desses animais, o que dificulta coletas e o armazenamento adequado de material para análises e comparações morfológicas (DIAS, 2015). Outros habitam principalmente o alto mar e zonas de alta profundidade (e.g. *Steno bredanensis*), de maneira que o acesso a amostras por pesquisadores depende majoritariamente de encalhes que, por muitas vezes, não apresentam boas condições para determinados tipos de análise. Espécies como *S. bredanensis* possuem muitas lacunas em aspectos da sua ecologia social, comportamental e alimentar, preferências por habitat e até mesmo a que ameaças estão sujeitas (HETZEL; LODI, 1998).

Nesse contexto, os marcadores moleculares representam ferramentas valiosas para a conservação de cetáceos marinhos (LOZAIGA *et al.*, 2023). O uso de marcadores como o gene citocromo c oxidase I (COI) e o citocromo b (cyt b) tem se destacado, fornecendo informações genéticas essenciais para avaliar a diversidade, estrutura populacional e dinâmica evolutiva desses mamíferos. O sequenciamento destes genes tem sido fundamental para compreender e desenvolver estratégias eficazes de conservação para cetáceos, orientando esforços de preservação e promovendo a sustentabilidade dessas espécies essenciais para os ecossistemas marinhos. O gene citocromo b tem taxa evolutiva adequada para diferenciar espécies de vertebrados marinhos (ARNASON; GULBERG, 1994), enquanto o gene COI é amplamente usado para DNA *barcoding*, apresentando resultados eficientes de identificação para a maioria dos cetáceos (SILVA *et al.*, 2021; mas ver também AMARAL *et al.*, 2007; VIRICEL, 2011; ALFONSI *et al.*, 2013 sobre a dificuldade em diferenciar delfinídeos). O presente trabalho teve como objetivo apresentar e caracterizar sequências de DNA dos genes cyt b e COI geradas na década de 1990 de exemplares de cetáceos encalhados na costa do Canadá e do Brasil, no Atlântico Oeste.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Sequências de DNA

O presente estudo analisou 28 sequências parciais de DNA nunca disponibilizadas no GenBank de dois genes mitocondriais, citocromo oxidase I (COI; n = 5, com 495 pares de base) e citocromo b (cyt b; n = 23, com 362 a 365 pares de base), obtidas de 26 exemplares de cetáceos encalhados no litoral do Canadá (n = 6) e do Brasil (n = 20) (sequências referidas como ‘não depositadas’ ao longo do texto). Todas estas sequências foram geradas por Antonio Manuel Andrade de Furtado Neto durante o seu doutorado em Biologia na *Memorial University of Newfoundland* (Canadá) e sob a orientação do Dr. Steven M. Carr (FURTADO-NETO, 1998; FURTADO-NETO *et al.*, 1998a; FURTADO-NETO *et al.*, 1998b; cadernos de laboratório e arquivos pessoais de Furtado Neto). Após mais de uma década mantidas arquivadas, foi iniciado um esforço para uso destas sequências em novas análises, com sua concomitante disponibilização para a comunidade científica. A partir disso, foram gerados estudos voltados para identificação molecular de espécies, quando então as primeiras seis sequências de cyt b (FALCÃO *et al.*, 2014) e sete de COI (FALCÃO *et al.*, 2017) foram então depositadas no GenBank. No entanto, esse esforço foi interrompido pelo prematuro falecimento de Furtado Neto em dezembro de 2019 (VETORAZZI; FARIA, 2020).

Posteriormente, este esforço foi retomado a partir de um inventário de arquivos digitais pessoais e de cadernos de laboratório originais de Furtado Neto (BELÉM, 2021). Este esforço resultou nas sequências já mencionadas acima, que nunca foram disponibilizadas ao GenBank. Estas sequências permaneceram por mais de duas décadas armazenadas na forma de arquivos do tipo Nexus. Inicialmente, estes arquivos estavam mantidos em disquetes de 3 ½, como parte do acervo pessoal de Furtado Neto. Ainda em vida, ele solicitou a Vicente Faria a recuperação destes arquivos, quando então foram transferidos para armazenamento em CD e posteriormente também em nuvem/ *drive*.

Furtado-Neto gerou estas sequências de DNA a partir de amostras de tecido coletadas de cetáceos encalhados no Canadá e no Brasil entre 1986 e 1996 e que foram coletadas por ele mesmo e por vários colaboradores. As amostras coletadas no Canadá (n = 6) foram coletadas ao longo da costa de Newfoundland, região nordeste do país, ao passo que as amostras coletadas no Brasil

foram obtidas nos estados do Ceará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Tabela 1). Os códigos/identificações originais das amostras utilizadas por Furtado Neto *et al.* como descrito em seus cadernos de laboratório ou contidos em seus arquivos foram reproduzidos no presente estudo. As cinco sequências parciais de COI (495 pb) correspondem à região E3-I5 do COI (do *locus* 685 ao *locus* 1179 do gene; FALCÃO *et al.* 2017) e foram obtidas de cinco espécies (Tabela 1). Já as 23 sequências parciais de *cyt b* (362 a 365 pb) correspondem à porção inicial do gene (do *locus* 1 ao *locus* 362 ou *locus* 365) e foram obtidas de 15 espécies (Tabela 1). Os procedimentos específicos de extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento de DNA (Sanger) para COI e *cyt b* foram descritos por Furtado-Neto (1998), Furtado-Neto *et al.* (1998b), e Falcão *et al.* (2014; 2017).

Tabela 1 - Informações sobre as 26 amostras de tecido de cetáceos encalhados no Canadá e no Brasil entre 1986 e 1997 que foram utilizadas para obtenção das 28 sequências parciais não depositadas de citocromo oxidase I (COI) e citocromo b (*cyt b*).

Família/Espécie	Identificação original da amostra	Fonte	Localidade	Coletor(es)/Fornecedor(es) da amostra	DNA	
					COI	<i>cytb</i>
Balaenopteridae						
<i>Megaptera novaeangliae</i>	HW1_RJ_95	Caderno de laboratório; Furtado-Neto <i>et al.</i> (1998a)	Rio de Janeiro/RJ, Brasil, 01/1995	Tony Dickinson/Colaboradores*		X
<i>Megaptera novaeangliae</i>	HW2_CE_97	Caderno de laboratório; Furtado-Neto <i>et al.</i> (1998a)	Praia de Tabuba, Caucaia/CE, Brasil, 11/1997	Colaboradores*		X
<i>Megaptera novaeangliae</i>	HW3_NF_90	Caderno de laboratório; Furtado-Neto <i>et al.</i> (1998a)	Frenchnois Cove, Newfoundland, Canadá, 21/06/1990	Jon Lien		X
Delphinidae						
<i>Delphinapterus leucas</i>	Delphinapterus	Furtado-Neto (1998)	Chance Cove (05/1989) ou St. Anthony (06/1990), Newfoundland, Canadá	Jon Lien		X

Família/Espécie	Identificação original da amostra	Fonte	Localidade	Coletor(es)/Fornecedor(es) da amostra	DNA	
					COI	cytb
<i>Lagenorhynchus acutus</i>	WS1_NF_95	Furtado-Neto <i>et al.</i> (1998b)	Newfoundland, Canadá, 05/1995	Jon Lien		X
<i>Lagenorhynchus acutus</i>	L. acutus	Furtado-Neto (1998)	Arnold's Cove, Newfoundland, Canadá, 10/1994	Jon Lien	X	
<i>Orcinus orca</i>	OR1_RS_95	Caderno de laboratório; manuscrito não publicado	Rio Grande/RS, Brasil, <1995	Colaboradores*		X
<i>Peponocephala electra</i>	PE1d_CE_94	Caderno de laboratório; manuscrito não publicado	Praia do Pecém, São Gonçalo do Amarante/CE, Brasil, 06/1994	Manuel Furtado Neto/ Colaboradores*		X
<i>Steno bredanensis</i>	ST1b_CE	Caderno de laboratório; manuscrito não publicado	Ceará, Brasil, 1994 - 1996	Manuel Furtado Neto/ Grupo de Estudos de Cetáceos do Ceará (GECC)		X
<i>Steno bredanensis</i>	S. bredanensis	Furtado-Neto <i>et al.</i> (1998b)	Ceará, Brasil, 1994 - 1996	Manuel Furtado Neto/ GECC		X
<i>Sotalia guianensis</i> **	S. fluviatil ou SO1b_CE_95	Furtado-Neto <i>et al.</i> (1998b) Caderno de laboratório; manuscrito não publicado	Ceará, Brasil, 1995 - 1996	GECC		X
<i>Stenella frontalis</i>	S. frontalis	Furtado-Neto <i>et al.</i> (1998b)	Ceará, Brasil, 1995 - 1996	GECC		X
<i>Stenella frontalis</i>	SFr1_CE_96	Caderno de laboratório; manuscrito não publicado; Furtado-Neto (1998)	Icarai do Norte (Icarai de Amontada), Amontada/CE, Brasil, 26/04/1996	Manuel Furtado Neto/ Colaboradores*	X	X
<i>Stenella frontalis</i>	SFr2_SP_98	Caderno de laboratório; manuscrito não publicado; Furtado-Neto (1998)	São Paulo/SP, Brasil, <1998	Colaboradores*		X
<i>Stenella frontalis</i>	SFr3_SC_97	Caderno de laboratório; manuscrito não publicado	Florianópolis/SC, Brasil, 1997	Colaboradores*		X
<i>Stenella longirostris</i>	Stenella sp. ou St1	Furtado-Neto <i>et al.</i> (1998b)	Bahia, Brasil, 07/05/1995	Grupo de Estudo de Cetáceos da Bahia (GECET)		X

Família/Espécie	Identificação original da amostra	Fonte	Localidade	Coletor(es)/Fornecedor(es) da amostra	DNA	
					COI	cytb
<i>Stenella longirostris</i>	S. longi-FN	Furtado-Neto <i>et al.</i> (1998b)	Fernando de Noronha/PE, Brasil, 04/1997	José Martins da Silva Júnior - Projeto Golfinho Rotador		X
<i>Stenella clymene</i>	S. clymene	Sequência descrita em um manuscrito não publicado/ arquivo de computador pessoal de Furtado-Neto. Dados do exemplar de onde a amostra foi obtida disponíveis em Parente <i>et al.</i> (1999)	Ceará, Brasil, entre 01/1992 e 07/1996	Manuel Furtado Neto/ Colaboradores*		X
<i>Tursiops truncatus</i>	TT1_CE_96	Caderno de laboratório; manuscrito não publicado.	Almofala, Itarema/CE (16/03/1996) ou Fortaleza/CE (22/11/1996), Brasil	Manuel Furtado Neto/ Colaboradores*		X
<i>Tursiops truncatus</i>	T. truncatus	Furtado-Neto <i>et al.</i> (1998b)	Newfoundland, Canadá, 05/1995	Jon Lien		X
Physeteridae						
<i>Physeter macrocephalus</i>	SW1_CE_95	Caderno de laboratório; manuscrito não publicado	Paracuru/CE, Brasil, 05/1995	Manuel Furtado Neto/ Colaboradores*		X
Pontoporiidae						
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PB1_RS_94	Caderno de laboratório; manuscrito não publicado	Rio Grande/RS, Brasil, 31/10/1994	Colaboradores*	X	X
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PB_RJ_95	Caderno de laboratório; manuscrito não publicado	Praia de Iquipari (02/1995), ou Grussaí ou Atafona (03/1995), São João da Barra/RJ, Brasil	Colaboradores*		X
Ziphiidae						
<i>Ziphius cavirostris</i>	Z. cavirostris	Sequência descrita em um manuscrito não publicado/ arquivo de computador pessoal de Furtado-Neto. Dados do exemplar de onde a amostra foi obtida	Ceará, Brasil, entre 01/1992 à 07/1996	Manuel Furtado Neto/ Colaboradores*		X

Família/Espécie	Identificação original da amostra	Fonte	Localidade	Coletor(es)/Fornecedor(es) da amostra	DNA	
					COI	cytb
		disponíveis em Parente et al. (1999)				
<i>Mesoplodon densirostris</i>	MD1_RS_93	Caderno de laboratório; manuscrito não publicado	Rio Grande - RS, Brasil, 02/1993	Colaboradores*		X
<i>Mesoplodon bidens</i>	Mesoplodon	Furtado-Neto (1998)	Newfoundland, Canadá, 1986	Jon Lien	X	

*Colaboradores: Alexandre Zerbini, Ana Paula Di Benedetto, Eduardo Secchi, Everaldo Queiroz, Francisco Ávila, José Lailson Brito Jr., José Silva Jr., Marcus Santos, Paulo Flores, Renata Ramos, Salvatori Siciliano e Vera da Silva. **Originalmente identificada como *Sotalia fluviatilis*. *** A data de coleta e procedência da amostra foram informadas por Furtado-Neto (1998) como “Mar 95” (março de 1995) e “Rio de Janeiro-RJ”. No entanto, informações mais detalhadas quanto a data e localidade se encontram descritas em seu caderno de laboratório, tal qual descrito nesta tabela. Fonte: Elaborado pela autora.

2.2. Identidade de espécies, grau de ineditismo e caracterização das sequências

A identidade da espécie associada a cada sequência de DNA foi verificada usando-se a análise BLASTn (Ferramenta Básica de Busca por Alinhamento Local; ALTSCHUL *et al.*, 1990), disponível no site do Centro Nacional de Informações em Biotecnologia - NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; NCBI, 2016). As análises foram realizadas seguindo parâmetros padrão. As variáveis percentual de identidade, *query cover* e *E-value* foram analisadas em relação à uma sequência referência disponível no GenBank, onde *query cover* (percentual de cobertura da amostra) indica se as duas sequências comparadas apresentam o mesmo tamanho e *E-value* (valor E), indica a chance do alinhamento em questão ter ocorrido ao acaso.

Para compreender a originalidade ou grau de ineditismo dessas sequências não depositadas, o número de sequências analisadas no presente estudo para cada gene/espécie foi comparado ao número de sequências respectivas disponíveis no GenBank para qualquer região do COI e cyt b. Os números obtidos foram dispostos em tabela e um percentual foi calculado para expressar o quanto as sequências analisadas no presente estudo são ‘raras’ ou ‘comuns’ no GenBank, para uma dada combinação de espécie e gene. É importante ressaltar que a região E3-I5 do gene COI difere da região *folmer*, normalmente utilizada para *barcoding*, e, portanto, as sequências COI aqui analisadas não foram comparadas ao material disponível no *software* BOLD Systems.

Finalmente, para caracterização das sequências, cada uma delas foi utilizada para compor arquivos para COI e cyt b utilizando-se o *software Molecular Evolutionary Genetic Analysis* - MEGA 11 (TAMURA, 2021). Para cada gene, foi realizado um alinhamento. Cada sequência foi então caracterizada quanto à sua composição de bases (%). Valores médios da composição de bases para cada gene foram gerados.

2.3. Aspectos de genética populacional

Esta abordagem foi aplicada apenas para sequências de cyt b de três espécies - *Steno bredanensis*, *Stenella frontalis* e *Pontoporia blainvillei* - com duas sequências cada. Para cada uma dessas espécies, as respectivas sequências foram alinhadas usando o MEGA 11. Em seguida, cada haplótipo foi identificado com base na inspeção visual de mutações. Cada haplótipo foi rotulado com as iniciais do nome da espécie seguido por 'cytb' e uma numeração iniciada a partir de '1' (por exemplo, 'Pbcytb1' para um haplótipo de *Pontoporia blainvillei*). Cada haplótipo foi caracterizado pela diferença de base observada em relação à(s) outra(s) sequência(s), considerando-se um mesmo *locus*. Além disso, o alinhamento resultante também foi traduzido para um aminoácido inferido, seguindo-se o código de uma letra da União Internacional de Bioquímicos. Para isso, foi também utilizado o *software* MEGA 11, considerando-se o código genético de DNA mitocondrial de vertebrados.

Para fins de visualização da relação entre haplótipos em uma maior escala geográfica, análises de distância genética (vizinho mais próximo/*neighbor-joining*) foram realizadas para duas destas três espécies, *Steno bredanensis* e *Pontoporia blainvillei*. A matriz de distância é ajustada para diferenças nas taxas de evolução de cada táxon (ramo), sendo apropriada para análises quando as sequências analisadas são de tamanho limitado (LACEY *et al.*, 2006). Em ambos os casos, sequências de citocromo b de cada espécie disponíveis no GenBank foram adicionadas ao alinhamento de cada respectiva espécie. As partes da sequência que não eram homólogas à porção inicial do gene cyt b foram removidas. O conjunto de dados resultante foi submetido à análise mencionada, incluindo teste de *bootstrap* com 10000 pseudoreplicações e utilizando o modelo distância p, onde infere-se a distância evolutiva entre as sequências sendo proporcional à quantidade de nucleotídeos em que elas diferem. Os demais parâmetros, seguiram as configurações padrão do MEGA 11.

3 RESULTADOS

3.1. Citocromo oxidase I (COI): Identidade de espécies, grau de ineditismo e caracterização das sequências

O percentual de identidade para cada uma das cinco sequências de COI variou de 96,77 a 99,60% em relação a sequências disponíveis no GenBank. Todas as análises tiveram *E-value* igual a 0,0. Já o *query cover* variou entre 99 e 100% (Tabela 2).

Tabela 2 - Percentual de identidade de sequências de citocromo oxidase I (COI) obtidas após análise BLASTn na plataforma GenBank.

Família/Espécie (ID da amostra)	Sequência referência no GenBank	Query Cover	E-value	Percentual de identidade
Delphinidae				
<i>Stenella frontalis</i> (S. frontalis)	<i>Stenella frontalis</i> (NC_060612.1)	100%	0,0	99,19%
<i>Lagenorhynchus acutus</i> (L. acutus)	<i>Lagenorhynchus acutus</i> (NC_050265.1)	100%	0,0	99,60%
Monodontidae				
<i>Delphinapterus leucas</i> (Delphinapterus)	<i>Delphinapterus leucas</i> (MW316272.1)	99%	0,0	99,60%
Pontoporiidae				
<i>Pontoporia blainvillei</i> (Pontoporia)	<i>Pontoporia blainvillei</i> (NC_005277.1)	100%	0,0	96,77%
Ziphiidae				
<i>Mesoplodon bidens</i> (Mesoplodon)	<i>Mesoplodon bidens</i> (NC_042218.1)	99%	0,0	97,57%

Fonte: Elaborado pela autora.

Quanto ao grau de ineditismo das sequências de COI de cada espécie, relativo ao número de sequências atualmente disponível no Genbank para a mesma espécie e gene, pode-se destacar o seguinte: (a) a sequência não depositada de *Mesoplodon bidens* equivale a 25%; (b) a de *Lagenorhynchus acutus* equivale a 11%; e (c) a de *Pontoporia blainvillei* equivale a 7% (Tabela 3).

Tabela 3 - Grau de novidade das sequências não depositadas do gene citocromo oxidase I (COI) em relação a sequências de mesma espécie e gene disponíveis no GenBank.

Família/Espécie	Disponibilidade no GenBank	
	Qualquer região COI	
		Sequências não depositadas de COI (495 pb)
Delphinidae		
<i>Delphinapterus leucas</i>	218	1
<i>Lagenorhynchus acutus</i>	9	1
<i>Stenella frontalis</i>	26	1
Pontoporiidae		
<i>Pontoporia blainvillei</i>	14	1
Ziphiidae		
<i>Mesoplodon bidens</i>	4	1

Fonte: Elaborado pela autora.

Quanto à composição de bases, o percentual de cada nucleotídeo do COI foi relativamente estável entre as espécies. Considerando-se o comprimento da sequência (495 pb), o percentual médio de nucleotídeos foi: T = 32,7%, C = 22,2%, A = 27,4%, G = 17,7% (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição de bases das sequências não depositadas do gene citocromo oxidase I (COI)

Família/Espécie	Id. da amostra	Nº pb	T%	C%	A%	G%
Delphinidae						
<i>Stenella frontalis</i>	Stenella	495	34,7	20,4	27,9	17,0
<i>Lagenorhynchus acutus</i>	L. acutus	495	33,9	20,6	27,9	17,6
Monodontidae						
<i>Delphinapterus leucas</i>	Delphinapterus	495	30,3	24,0	27,5	18,2
Pontoporiidae						
<i>Pontoporia blainvillei</i>	Pontoporia	495	32,1	22,8	27,1	18,0
Ziphiidae						
<i>Mesoplodon bidens</i>	Mesoplodon	495	31,7	24,2	26,1	18,0
<i>Média</i>		495	32,7	22,2	27,4	17,7

analisadas no presente estudo.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.2. Citocromo b (cyt b)

3.2.1 Identidade de espécies, grau de ineditismo e caracterização das sequências

O percentual de identidade de cada sequência variou de 97,26% e 100% em relação a sequências disponíveis no GenBank. O *E-value* foi igual a 0,0 para todas as sequências. Já o *query cover* variou de 98 a 100% (Tabela 5).

Tabela 5 - Percentual de identidade de sequências de citocromo b (cyt b) obtidas após análise BLASTn na plataforma GenBank.

Família/Espécie (ID da amostra)	Sequência referência no GenBank	Query Cover	E-value	Percentual de identidade
Balaenopteridae				
<i>Megaptera novaeangliae</i> (HW1_RJ_95)	<i>Megaptera novaeangliae</i> (MF409246.1)	100%	0,0	99,50%
<i>Megaptera novaeangliae</i> (HW2_CE_97)	<i>Megaptera novaeangliae</i> (MF409246.1)	100%	0,0	99,50%
<i>Megaptera novaeangliae</i> (HW3_NF_90)	<i>Megaptera novaeangliae</i> (MF409246.1)	100%	0,0	100%
Delphinidae				
<i>Delphinus delphis</i> (D. delphis)	<i>Delphinus delphis</i> (MF669498.1)	99%	0,0	99,75%
<i>Lagenorhynchus acutus</i> (WS1_NF_95)	<i>Lagenorhynchus acutus</i> (NC_050265.1)	100%	0,0	99,50%
<i>Orcinus orca</i> (OR1_RS_95)	<i>Orcinus orca</i> (KR180366.1)	100%	0,0	100%
<i>Peponocephala electra</i> (PE1d_CE_94)	<i>Peponocephala electra</i> (ON652905.1)	100%	0,0	100%
<i>Steno bredanensis</i> (ST1b_CE)	<i>Steno bredanensis</i> (NC_042761.1)	98%	0,0	98,23%
<i>Steno bredanensis</i> (S. bredanensis)	<i>Steno bredanensis</i> (NC_042761.1)	98%	0,0	97,7%
<i>Sotalia guianensis</i> (S. fluviatil ou SO1b_CE_95)	<i>Sotalia guianensis</i> (KY236019.1)	100%	0,0	98,50%
<i>Stenella frontalis</i> (S. frontalis)	<i>Stenella frontalis</i> (EU517714.1)	99%	0,0	99,75%
<i>Stenella frontalis</i> (SFr2_SP_98)	<i>Stenella frontalis</i> (AF084090.1)	99%	0,0	99,50%
<i>Stenella frontalis</i> (SFr1_CE_96)	<i>Stenella frontalis</i> (EU517714.1)	99%	0,0	99,75%
<i>Stenella frontalis</i> (SFr3_SC_96)	<i>Stenella frontalis</i> (EU517713.1)	100%	0,0	100%
<i>Stenella longirostris</i> (Stenella sp. ou St1)	<i>Stenella longirostris</i> (KX857461.1)	100%	0,0	99,75%
<i>Stenella longirostris</i> (S. longi-FN)	<i>Stenella longirostris</i> (KX857459.1)	100%	0,0	99,25%

Família/Espécie (ID da amostra)	Sequência referência no GenBank	Query Cover	E-value	Percentual de identidade
<i>Stenella clymene</i> S. clymene	<i>Stenella clymene</i> (NC_060611.1)	100%	0,0	100%
<i>Tursiops truncatus</i> (TT1_CE_96)	<i>Tursiops truncatus</i> (MG762991.1)	99%	0,0	98,99%
<i>Tursiops truncatus</i> (T. truncatus)	<i>Tursiops truncatus</i> (MG762990.1)	99%	0,0	98,49%
Physeteridae				
<i>Physeter macrocephalus</i> (SŪ1_CE_95)	<i>Physeter catodon</i> (NC_002503.2)	100%	0,0	97,26%
Pontoporiidae				
<i>Pontoporia blainvillei</i> (PB1_RS_94)	<i>Pontoporia blainvillei</i> (AF304069.1)	100%	0,0	100%
<i>Pontoporia blainvillei</i> (PB_RJ_95)	<i>Pontoporia blainvillei</i> (AF229170.1)	100%	0,0	100%
Ziphiidae				
<i>Ziphius cavirostris</i> (Z. cavorostris)	<i>Ziphius cavirostris</i> (KC776715.1)	100%	0,0	100%
<i>Mesoplodon densirostris</i> (MD1_RS_93)	<i>Mesoplodon densirostris</i> (KF032875.2)	100%	0,0	98,00%

Fonte: Elaborado pela autora.

Quanto ao grau de ineditismo das sequências de cyt b de cada espécie, relativo ao atualmente disponível no Genbank para a mesma espécie e gene, pode-se destacar o seguinte: (a) as quatro sequências não depositadas de *Stenella frontalis* equivalem a 57%; (b) as duas de *Pontoporia blainvillei* equivalem a 33%; e (c) a única de *Lagenorhynchus acutus* equivale a 11% (Tabela 6).

Tabela 6 - Grau de novidade das sequências não depositadas do gene citocromo b (cyt b) estudo em relação a sequências de mesma espécie e gene disponíveis no GenBank.

Família/Espécie	Disponibilidade no GenBank	
	Qualquer região cyt b	
		Sequências não depositadas de cyt b (362 - 365 pb)
Balaenopteridae		
<i>Megaptera novaeangliae</i>	47	3
Delphinidae		
<i>Lagenorhynchus acutus</i>	9	1
<i>Orcinus orca</i>	231	1
<i>Peponocephala electra</i>	38	1
<i>Steno bredanensis</i>	26	2
<i>Sotalia guianensis</i>	30	1
<i>Stenella frontalis</i>	7	4
<i>Stenella longirostris</i>	221	2
<i>Stenella clymene</i>	27	1
<i>Tursiops truncatus</i>	330	2
Physeteridae		
<i>Physeter macrocephalus</i>	138	1
Pontoporiidae		
<i>Pontoporia blainvillei</i>	6	2
Ziphiidae		
<i>Ziphius cavirostris</i>	33	1
<i>Mesoplodon densirostris</i>	63	1

Fonte: Elaborado pela autora.

O percentual de cada nucleotídeo do cyt b variou consideravelmente entre as espécies, tomando-se como parâmetro o observado neste estudo para COI. De todo modo, considerando-se

o comprimento de 362 a 365 pares de base, o percentual médio de nucleotídeos foi: T = 29,4%, C = 29,3%, A= 27,2% e G = 14,1% (Tabela 7).

Tabela 7 - Composição de bases das sequências não depositadas do gene citocromo b (cyt b) analisadas no presente estudo.

Família/Espécie	Id. da amostra	Nº pb	T%	C%	A%	G%
Balaenopteridae						
<i>Megaptera novaeangliae</i>	HW1_RJ_95	365	26,8	30,4	29,0	13,7
<i>Megaptera novaeangliae</i>	HW2_CE_97	365	26,8	30,4	29,0	13,7
<i>Megaptera novaeangliae</i>	HW3_NF_90	365	26,8	30,7	28,8	14,0
Delphinidae						
<i>Delphinus delphis</i>	D. delphis	365	30,1	28,8	26,6	14,5
<i>Lagenorhynchus acutus</i>	WS1_NF_95	365	30,1	29,0	27,1	13,7
<i>Orcinus orca</i>	OR1_RS_95	365	28,8	30,4	26,6	14,2
<i>Peponocephala electra</i>	PE1d_CE_94	365	29,6	29,3	27,1	14,0
<i>Steno bredanensis</i>	ST1b_CE	365	30,0	28,9	26,7	14,3
<i>Steno bredanensis</i>	S. bredanensis	364	29,4	29,7	26,6	14,3
<i>Sotalia guianensis</i>	S. fluviatil ou SO1b_CE_95	362	29,0	30,4	27,1	13,5
<i>Stenella frontalis</i>	S. frontalis_BR	365	31,0	28,2	27,1	13,7
<i>Stenella frontalis</i>	SFr1_CE_96	365	31,0	28,2	27,1	13,7
<i>Stenella frontalis</i>	SFr2_SP_98	365	31,2	27,9	27,1	13,7
<i>Stenella frontalis</i>	SFr3_SC_97	365	31,0	27,9	27,1	14,0
<i>Stenella longirostris</i>	Stenella sp. ou St1	364	30,2	28,8	26,6	14,3
<i>Stenella longirostris</i>	S. longi-FN	364	30,8	28,8	26,1	14,3
<i>Stenella clymene</i>	S. clymene	365	30,7	28,2	26,6	14,5
<i>Tursiops truncatus</i>	TT1_CE_96	365	30,1	28,8	26,6	14,5
<i>Tursiops truncatus</i>	T. truncatus	363	29,5	28,9	27,3	14,3
Physeteridae						
<i>Physeter macrocephalus</i>	SW1_CE_95	362	25,4	31,2	28,5	14,9
Pontoporiidae						
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PB1_RS_94	365	28,8	30,1	27,1	14,0
<i>Pontoporia blainvillei</i>	PB_RJ_95	365	28,8	30,1	27,1	14,0

Ziphiidae

<i>Ziphius cavirostris</i>	Z. cavirostris	365	28,2	30,4	26,8	14,5
<i>Mesoplodon densirostris</i>	MD1_RS_93	365	31,5	26,8	27,9	13,7
<i>Média</i>		364,5	29,4	29,3	27,2	14,1

Fonte: Elaborado pela autora.

3.2.2 Aspectos de genética populacional

As duas sequências de *Steno bredanensis* representam cada uma um haplótipo. Ambos os haplótipos são provenientes do Ceará. O grau de diferença entre estes haplótipos é incerto, podendo diferir de duas a quatro mutações (T>C e C>T) em dois a quatro *loci* (48, 70, 73 e 147). Independente da dúvida na composição de bases, as mutações são silenciosas (Tabela 8).

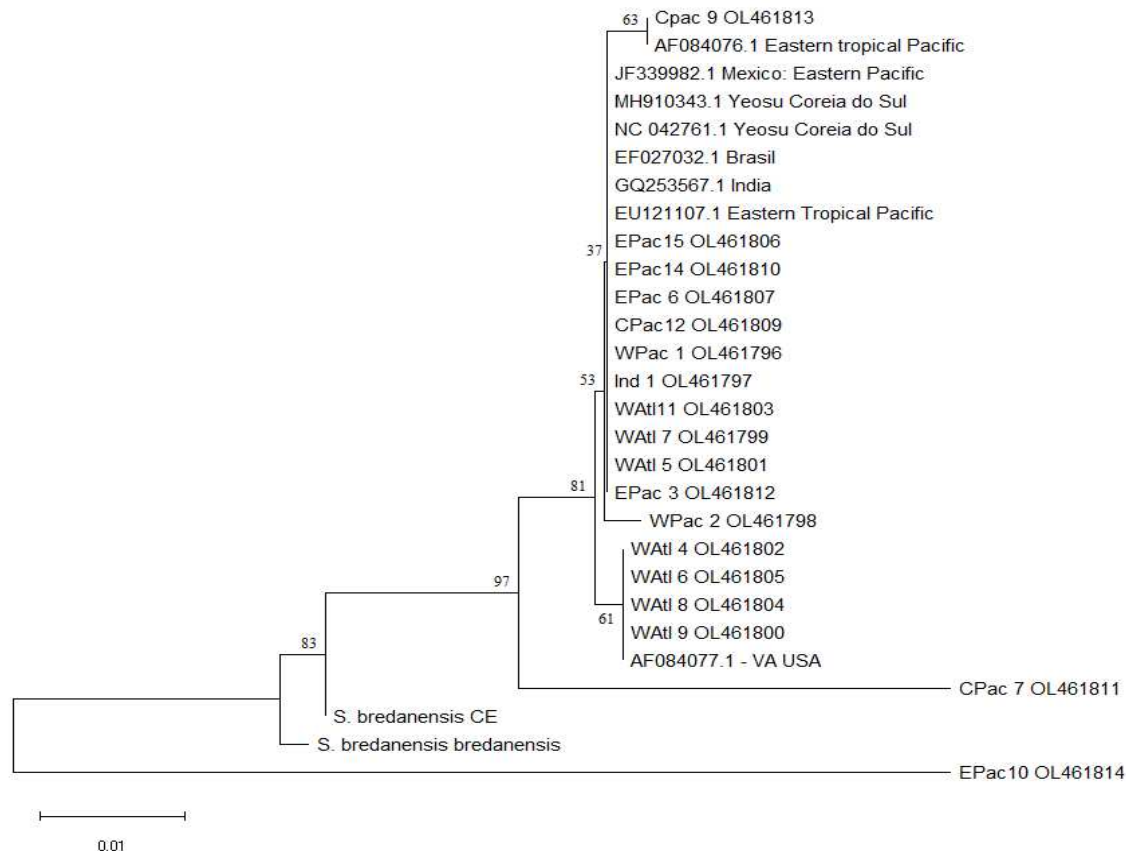
Tabela 8 - Caracterização de haplótipos para as sequências não depositadas de citocromo b (cyt b) de *Steno bredanensis*.

Amostra	Localidade	Nº bp	Haplótipo	Posição da base				Aminoácido inferido				
				48	70	73	147	16	24	25	49	
ST1b_CE	Ceará - Brasil	365	Sbcytb1	T	T	Y	Y		S	L	L	T
S. bredanensis	Ceará - Brasil	364	Sbcytb2	C	C	C	□		□	□	□	□

A representação Y indica que o nucleotídeo em questão pode ser C ou T. Fonte: Elaborado pela autora.

Quando analisadas por meio de distância genética, as duas sequências do Ceará se mostraram consideravelmente distantes de sequências desta mesma espécie geradas a partir de exemplares de outras partes do Brasil e do mundo (Figura 1).

Figura 1 - Análise de distância genética (vizinho mais próximo) mostrando a relação entre as sequências não publicadas ST1bCE e *S. Bredanensis* com sequências obtidas no GenBank, cujo número de identificação encontra-se associado ao nome da sequência.



Fonte: Elaborado pela autora.

As duas sequências de *Stenella longirostris* representam cada uma um haplótipo. Um haplótipo foi obtido a partir de amostra de um exemplar da Bahia, ao passo que o segundo haplótipo foi obtido de amostras de um exemplar de Fernando de Noronha (PE). O grau de diferença entre estes haplótipos é incerto, podendo diferir de uma a três mutações (T>G, G>T e A>T) em dois a quatro *loci* (258, 315, 321). A mutação expressa no *locus* 258 pode ser do tipo silenciosa (M>M ou I>I) ou não-sinônima do tipo conservativa (M>I ou I>M), uma vez que os aminoácidos metionina e isoleucina são apolares com cadeias laterais alifáticas. As referidas mutações para os *loci* 315 e 321 foram silenciosas (Tabela 11).

Tabela 11 - Caracterização de haplótipos sequências de citocromo b (cyt b) de *Stenella longirostris* analisadas no presente estudo.

Amostra	Localidade	Nº bp	Haplótipo	Posição da base			Aminoácido inferido		
				258	315	321	86	105	107
Stenella sp.	Bahia - Brasil	364	S1cytb1	K	A	A	M/I	V	L
S. longi-FN	Fernando de Noronha-PE - Brasil	364	S1cytb2	□	T	T	□	□	□

A representação K indica que o nucleotídeo em questão pode ser T ou G. Fonte: Elaborado pela autora.

As duas sequências de *Pontoporia blainvillei* representam cada uma um haplótipo. Um haplótipo foi obtido a partir de amostra de um exemplar do Rio Grande do Sul, ao passo que o segundo haplótipo foi obtido de amostra de um exemplar do Rio de Janeiro. Estes haplótipos diferem por duas mutações (G>A e A>G) em dois *loci* (204 e 349). A mutação do *loci* 204 foi silenciosa. Por sua vez, a mutação do *loci* 349 foi do tipo não-sinônima conservativa, uma vez que a mudança de A>G em 349 leva à alteração do aminoácido metionina para valina, ambos apolares de cadeia lateral alifática (Tabela 13).

Tabela 13 - Caracterização de haplótipos sequências não depositadas de citocromo b (cyt b) de *Pontoporia blainvillei*.

Amostra	Localidade	Nº bp	Haplótipo	Posição da base		Aminoácido inferido	
				204	349	68	117
PB1_RS_94	Rio Grande-RS - Brasil	365	Pb1cytb1	G	A	R	M
PB_RJ_95	Rio de Janeiro-RJ - Brasil	365	Pb1cytb2	A	G	□	V

Fonte: Elaborado pela autora.

Para além das duas sequências de *P. blainvillei* do presente estudo, sequências de diferentes localidades disponíveis no GenBank (N=5) foram incluídas no alinhamento. Dessa forma, a partir de um *dataset* composto de sequências de sete exemplares (dois do presente estudo + cinco do GenBank), foi obtido o seguinte: (a) As sete sequências podem ser agrupadas em três haplótipos;

(b) foram identificados três sítios de mutação nos *loci* 204, 349 e 350; (c) os *loci* 349 e 350 compõem uma única trinca de nucleotídeos, exercendo influência conjunta no aminoácido codificado. A mutação em 204 é silenciosa, no entanto, as mutações em 349 e 350 são não-sinônimas. Entre Pbcytb1 e Pbcytb2 o aminoácido metionina é substituído pelo aminoácido valina, conforme discutido previamente. Pbcytb3 por sua vez apresenta uma mutação de sentido trocado não conservativa em relação à Pbcytb1 e Pbcytb2, uma vez que o aminoácido triptofano (W) possui cadeia lateral aromática (Tabela 14).

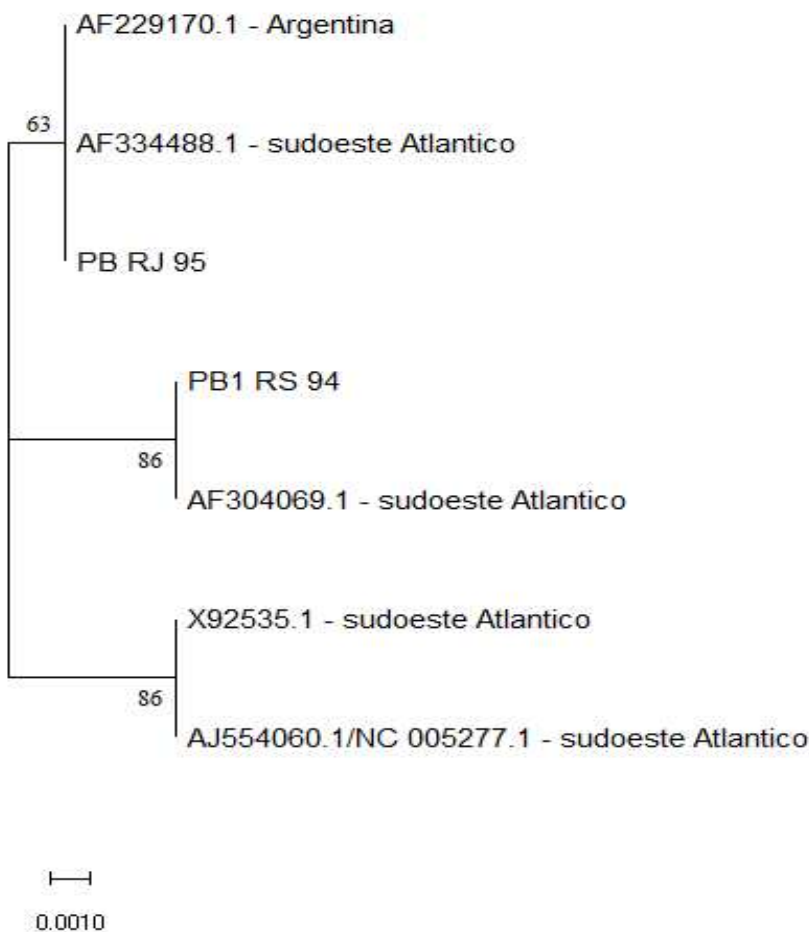
Tabela 14 - Caracterização adicional de haplótipos das sequências não depositadas de citocromo b (cyt b) de *Pontoporia blainvillei* em comparação à outras sequências da mesma espécie e gene disponíveis no GenBank.

Amostra	Localidade	Nº bp	Haplótipo	Posição da base			Aminoácido inferido	
				204	349	350	68	117
PB1_RS_94	Rio Grande-RS - Brasil	365	Pbcytb1	G	A	T	R	M
AF304069.1	sudoeste Atlântico	365	Pbcytb1	□	□	□	□	□
PB_RJ_95	Rio de Janeiro-RJ - Brasil	365	Pbcytb2	A	G	A	□	V
AF229170.1	Argentina	365	Pbcytb2	□	□	□	□	□
AF334488.1	sudoeste Atlântico	365	Pbcytb2	□	□	□	□	□
AJ554060.1/ NC_005277	sudoeste Atlântico	365	Pbcytb3	□	T	G	□	W
X92535.1	sudoeste Atlântico	365	Pbcytb3	□	T	G	□	□

AF304069.1: Cassens et al. (2000); AF229170.1: Yang et al.(2006); AF334488.1: Hamilton et al. (2001); AJ554060.1/NC_005277: Arnason et al.(2004); X92535.1: Arnason e Gullberg (1996). Fonte: Elaborado pela autora.

Quando analisadas por meio de distância genética, as duas sequências do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul se agruparam com outras sequências em clados diferentes. Pode-se destacar que a sequência oriunda de exemplar do Rio de Janeiro se agrupou em um clado que contém uma sequência obtida de exemplar amostrado na Argentina (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Análise de distância genética (vizinho mais próximo) mostrando a relação entre sete exemplares de *Pontoporia blainvillei*. A análise foi baseada em sequências de DNA parciais do gene citocromo b (365 pares de base). Números em cada ramo indicam valores de *bootstrap* após 10000 pseudoreplicatas. Sequências geradas por Furtado-Neto (1998) e ainda não depositadas no Genbank: PB RJ 95, obtida de exemplar amostrado no Rio de Janeiro-RJ; e PB RS 94, obtida de exemplar amostrado em Rio Grande-RS. Sequências obtidas pelo GenBank: AF304069.1, Cassens *et al.* (2000); AF229170.1, Yang *et al.* (2006); AF334488.1, Hamilton *et al.* (2001); AJ554060.1/NC_005277, Arnason *et al.* (2004); X92535.1: Arnason e Gullberg (1996).



Fonte: Elaborado pela autora.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos de percentual de identificação via BLASTn sugerem uma segurança na identificação das espécies de cetáceos estudadas, baseado em sequências de citocromo b (cyt b) e de citocromo oxidase I (COI). Os valores obtidos para *query cover* e *E-value* também atestam para a qualidade da metodologia empregada no presente estudo, uma vez que mostram, respectivamente, que as sequências foram comparadas com sequências-referência de tamanho correspondente e que a probabilidade de as correspondências terem ocorrido ao acaso pode ser considerada nula. Os valores de composição de nucleotídeos (ATCG) também reforçam a qualidade dos *datasets* analisados, visto que refletem uma taxa de variação esperada onde a composição de bases de COI foi mais conservada entre as espécies. Em comparação, observou-se maior variabilidade na região estudada do cyt b (respeitadas as diferenças de tamanho e composição de espécies entre os *datasets*). Ainda, neste último gene, a inferência de mutações não silenciosas a partir de haplótipos obtidos de indivíduos coletados em localidades relativamente distantes entre si (potencialmente refletindo maior isolamento geográfico) também sugere a qualidade do *dataset* baseado em sequências de cyt b. Exemplos disto incluem, pelo menos, *Megaptera novaeangliae* do Canadá e Brasil e *Pontoporia blainvillei* do Rio de Janeiro-RJ e do Rio Grande-RS. Dessa forma, os dados utilizados no presente estudo podem ser considerados confiáveis.

Apesar de as sequências de DNA ainda não depositadas analisadas no presente estudo terem sido geradas faz pelo menos ¼ de século, elas ainda detêm considerável potencial como novidade científica. Isto porque, para algumas espécies, como por exemplo *Mesoplodon bidens* e *Lagenorhynchus acutus*, o número de sequências disponíveis no GenBank é relativamente baixo, fazendo com que as sequências não depositadas possam ter um impacto real ao serem registradas no GenBank. Das 28 sequências não depositadas no GenBank analisadas no presente estudo (ver Tabela 1), oito já haviam sido descritas na forma de tabelas de haplótipos por Furtado-Neto (1998; cinco COI e três cyt b) e por Furtado-Neto *et al.* (1998b; seis cyt b). Embora nenhum uso subsequente destas sequências tenha sido encontrado, um cientista interessado poderia digitar manualmente essas sequências diretamente em algum *software*. No entanto, 10 sequências analisadas no presente estudo (todas cyt b) estavam apenas em arquivos pessoais e, portanto, se encontram ainda indisponíveis para a comunidade científica e correram real risco de serem

perdidas antes de terem seu uso público. Por fim, cabe ressaltar que a abrangência geográfica (procedência) e taxonômica das sequências analisadas no presente estudo reforçam a sua relevância: elas abrangem 27% das espécies que ocorrem no Brasil e 25% das espécies que ocorrem no Canadá, sendo sete delas espécies comuns aos dois países.

Com relação aos cetáceos da costa brasileira, os resultados obtidos reforçam que a situação de *Steno bredanensis* carece de investigação adicional. Embora os resultados de BLASTn a partir de sequências de cyt b tenham corroborado de forma inequívoca a identificação desta espécie para exemplares amostrados no Ceará e no Rio de Janeiro, os valores obtidos foram os menores dentre todos os exemplares do presente estudo. O peso das mutações responsáveis por esse valor de BLASTn mais baixo ficou evidente na análise filogenética que posicionou os exemplares em questão como basais em relação a representantes desta espécie amostrados em todas as oceanos, incluindo o próprio Brasil (a única exceção foi um exemplar do Pacífico Central que se agrupou com espécies de outros gêneros da família Delphinidae). A visualização por meio de rede de haplótipos reforça esse distanciamento entre os haplótipos obtidos no presente estudo e os demais. Aparentemente, este padrão se assemelha a um previamente detectado através de estudos da região controle do DNA mitocondrial desta espécie. Um haplótipo obtido de um exemplar amostrado no Ceará (CABALLERO et al., 2008) quando inserido em um estudo realizado a partir de amostragens em uma escala global se agrupou em análises com exemplares do oceano Índico (SILVA et al. 2015; H13). Esse comportamento anômalo do referido haplótipo se repetiu em pelo menos dois outros estudos (KEREM et al. 2016; ALBERTSON et al. 2022). Dessa forma, o padrão obtido no presente estudo a partir de sequências de cyt b reforçam que o padrão previamente observado a partir da região controle é considerado anômalo.

Uma das sequências de cyt b de *Stenella longirostris* analisadas no presente estudo tem potencial para ajudar a preencher uma lacuna geográfica do conhecimento da genética da espécie. Esta espécie que possui distribuição global e tem sido alvo de estudos de estruturação populacional na costa e ilhas oceânicas brasileiras a partir de dados de sequências de COI, cytb, região controle (FARIA et al., 2020; 2022). Neste último estudo, exemplares destas espécies foram amostrados na costa brasileira nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Espírito Santo e ao largo de uma porção da costa que incluiu do Rio de Janeiro até Santa Catarina (FARIA et al., 2022). Considerando que o presente estudo descreve uma sequência inédita obtida de exemplar amostrado

na Bahia, tem-se então um primeiro dado de sequência de DNA para uma localidade situada em uma lacuna de conhecimento de mais de 1.500 km da costa brasileira (entre Pernambuco e Espírito Santo).

Sobre *Pontoporia blainvillei*, esta espécie tem um número relativamente baixo de sequências COI e cyt b disponíveis no GenBank, o que torna ainda mais relevante a análise e disponibilização das sequências não depositadas aqui reportadas para os respectivos genes para esta espécie. Como já demonstrado a partir de sequências da região controle do mtDNA, *P. blainvillei* está estruturada geograficamente em diferentes unidades e subunidades de manejo (e.g., SECCHI *et al.* 1998; LÁZARO *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Os resultados obtidos para cyt b no presente estudo reforçam essa estruturação, destacando a presença de haplótipos distintos do Rio de Janeiro (RJ) e do Rio Grande do Sul (RS). A observação de uma mudança de aminoácido inferida a partir de uma das mutações que diferenciam estes dois haplótipos é sugestivo do grau de isolamento genético. De fato, a comparação com as escassas sequências de citocromo b disponíveis no GenBank revelou, mesmo com um conjunto de dados tão reduzido, composto por apenas sete sequências e de tamanho relativamente pequeno (365 pares de base), a identificação de um novo haplótipo e uma mutação adicional. Assim sendo, o agrupamento dessas sete sequências em três clados reforça, pela primeira vez para citocromo b, um padrão já amplamente demonstrado pela região controle, tal como citações acima.

Levando-se em conta a coerência das análises do presente estudo para cyt b de *P. blainvillei*, pode-se então destacar que uma evidência obtida no presente estudo potencialmente corrobora uma análise prévia da região controle desta espécie que foi considerada anômala. De um modo geral, análises baseadas na região controle mostram que, dentro de sua faixa de distribuição, *P. blainvillei* é consideravelmente estruturada geograficamente. Nesse sentido, o trabalho seminal é o desenvolvido por Secchi *et al.* (1998). Este trabalho gerou uma sequência de região controle que, em um subsequente estudo conduzido por Cunha *et al.* (2014), aparentemente violou o padrão que estruturação genética da espécie. Nas análises conduzidas por Cunha *et al.* (2014), o H14 se mostrou mais próximo de um haplótipo encontrado do estado de São Paulo até a Argentina, do que de outros haplótipos do Espírito Santo e do próprio norte do estado do Rio de Janeiro. Esse resultado chamou a atenção de Cunha *et al.* (2014) porque a conclusão destes apontou uma divisão populacional de *P. blainvillei* em duas unidades significativas evolutivamente (ESUs): (a) do

Espírito Santo até o norte do estado do Rio de Janeiro; e (b) do sul do estado do Rio de Janeiro até a Argentina (CUNHA *et al.*, 2014). Estes autores então questionaram a confiabilidade da localidade de coleta da amostra. O presente estudo, pela primeira vez, mostra por um outro marcador (cyt b), este mesmo padrão onde uma sequência obtida de um exemplar amostrado no litoral norte do Rio de Janeiro é o mesmo obtido para um exemplar amostrado na Argentina. A diferença na taxa de evolução da região controle e cyt b poderia, em princípio, sugerir se tratar de um haplótipo ancestral presente em ambas as subpopulações. Esta possibilidade não pode ser descartada, porém o relativamente alto grau de estruturação observado no presente estudo sugere que o cyt b preserve resolução suficiente para se investigar estruturação populacional desta espécie. Uma outra possibilidade seria considerar esses resultados como evidência de fluxo gênico (histórico ou atual) entre indivíduos da ESUs I e II.

5. CONCLUSÕES

Todas as 28 sequências analisadas e caracterizadas no presente estudo apresentaram resultados satisfatórios quanto a sua identidade e gene sequenciado e, juntamente com os seus dados de coleta e localidade, são consideradas aptas ao depósito em bancos de dados públicos.

As sequências não depositadas, ainda que sequenciadas na década de 1990, apresentam grau de ineditismo considerável por gene e espécie.

Sobre *Steno bredanensis*, o sequenciamento do gene citocromo b aparentemente corrobora evidência previamente existente, baseada na região controle, de indivíduo amostrado no Ceará que se mostrou fora do padrão esperado para a estruturação populacional espécie.

Sobre *Stenella longirostris*, a sequência de citocromo b de exemplar da Bahia ajuda a preencher uma lacuna de informação geográfica significativa (cerca de 1500 km entre PE e ES)

Sobre *Pontoporia blainvillei*, o citocromo b aparentemente corrobora evidência previamente existente, baseada na região controle, sobre indivíduo que se mostrou fora do padrão esperado para a estruturação populacional espécie.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As novas (antigas) sequências analisadas no presente estudo ampliam o conhecimento sobre a genética das espécies de cetáceos do Atlântico Oeste, ao mesmo tempo em que chamam a atenção para a importância de se tornar público resultados que correm o risco de permanecerem armazenados indefinidamente ou serem simplesmente perdidos. Ao preencherem lacunas e expandirem o conjunto de dados genéticos disponíveis, elas podem ajudar a pavimentar uma base científica para a conservação de espécies ameaçadas. Cada sequência de DNA representa uma valiosa peça de um ‘quebra-cabeça’, contribuindo para a compreensão cada vez mais completa da história evolutiva de um grupo e, conseqüentemente, potencialmente contribuindo para a formulação de estratégias mais eficazes de preservação e gestão.

REFERÊNCIAS

ALBERTSON, G. R. *et al.* **Worldwide phylogeography of rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) provides evidence for subspecies delimitation.** *Marine Mammal Science*, v. 38 n. 4, p. 1371–1397, 2022.

ALFONSI, E. *et al.* **The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast.** *ZooKeys*, n. 365, p. 5-24, 2013. DOI: 10.3897/zookeys.365.5873. PMID: 24453548; PMCID: PMC3890668.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* **Basic Local Alignment Search Tool.** *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.

AMARAL A. R. M. *et al.* **A first approach to the usefulness of cytochrome c oxidase I barcodes in the identification of closely related delphinid cetacean species.** *Marine and Freshwater Research*, v. 58, p. 505, 2007.

ARNASON U.; GULLBERG A. **Cytochrome-b nucleotide sequences and the identification of five primary lineages of extant Cetaceans.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 13, n. 2, p. 407–417, 1996.

ARNASON U. *et al.* **Mitogenomic analyses provide new insights into cetacean origin and evolution.** *Gene*, v. 333, p. 27-34, 2004.

ARNASON, U.; GULLBERG, A. **Relationship of baleen whales established by cytochrome b gene sequence comparison.** *Nature*, v. 367, p. 726–728, 1994.

BAIRD R. W. *et al.* **Site fidelity and association patterns in a deep-water dolphin: Rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) in the Hawaiian Archipelago.** *Marine Mammal Science*, v. 24, p.535-553, 2008.

BAKER C. S. *et al.* **Influence of seasonal migration on geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales.** *Nature*, v. 344, p. 238–240, 1990.

BAKER C. S. *et al.* **Strong maternal fidelity and natal philopatry shape genetic structure in North Pacific humpback whales.** *Marine Ecology Progress Series*, v. 494, p. 291-306, 2013.

BELÉM, E. R. **O início da era genética de cetáceos do Brasil: sequências de DNA geradas por Manuel Furtado Neto.** Trabalho de conclusão de curso - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 2021.

BENSON D. A. *et al.* **GenBank.** *Nucleic Acids Research*, v. 41, p. 36-42 2013.

CASSENS I. *et al.* **Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 21, p. 11343-11347, out. 2000.

CABALLERO, S. *et al.* **Molecular systematics of South American dolphins *Sotalia*: sister taxa determination and phylogenetic relationships, with insights into a multilocus phylogeny of the Delphinidae.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 46, p. 252-268, 2008.

CABRERA A. A. *et al.* **A genetic perspective on cetacean evolution.** *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 52 (1), p. 131-151, 2021.

CRESPO, E. A. **Franciscana Dolphin: *Pontoporia blainvillei*.** In: WÜRSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M.; KOVACS, K. M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. 3rd ed. Academic Press, 2018. p. 388-392.

CUNHA, H. A. *et al.* **Population structure of the Endangered Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*): Reassessing Management Units.** PLOS One, v. 9, n. 1, e85633, 2014.

DALEBOUT M. L. *et al.* **Worldwide structure of mtDNA diversity among Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*): implications for threatened populations.** Molecular Ecology, v. 14, p. 3353–3371, 2005.

DIAS C. P. **Taxonomia molecular e estruturação genética populacional das baleias-de-Bryde e baleias-fin (Cetartiodactyla: Balaenopteridae).** 2015. 123 f. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Evolução - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

FALCÃO, L. *et al.* **Prospective molecular markers for the identification of illegally traded angelsharks (*Squatina*) and dolphin (*Sotalia guianensis*).** Genetics and Molecular Research, v. 13, p. 9710-9717, 2014.

FALCÃO L. *et al.* **Molecular identification of cetaceans from the West Atlantic using the E3-I5 region of COI.** Genetics and Molecular Research, v. 16, n. 2, 2017.

FARIA D. M. *et al.* **Mitochondrial diversity and inter-specific phylogeny among dolphins of the genus *Stenella* in the Southwest Atlantic Ocean.** PLOS One, v. 17, n. 7, e0270690, 2022.

FARIA, D. M. *et al.* **Low mtDNA diversity in a highly differentiated population of spinner dolphins (*Stenella longirostris*) from the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil.** PLOS One, v. 15, n. 4, e0230660, 2020.

FURTADO NETO, M. A. A., *et al.* **Are northern-hemisphere humpback whales stranding in South Atlantic beaches? Answers from mitochondrial DNA sequences.** In: Congresso da Sociedade Latino-Americana de Especialistas em Mamíferos Aquáticos, 2., Olinda, PE. Anais [...] Olinda, PE, Brasil, 1998.

FURTADO-NETO, M. A. A. *et al.* **Uso de sequências do mtDNA para identificação de um exemplar de golfinho rotador, *Stenella longirostris* (Gray, 1828), encalhado no estado da Bahia, Brasil.** Arquivos de Ciências do Mar, Fortaleza, v. 31, n. 1-2, p. 83-91, 1998.

FURTADO-NETO, M. A. A. **Molecular systematics and population genetics of marine vertebrates from Brazil.** Tese de doutorado. St. John's, Newfoundland: Memorial University of Newfoundland, 1998.

HAMILTON, H. *et al.* **Evolution of river dolphins.** Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, v. 268, p. 549–556, 2001.

HETZEL, B.; LODI, L. O. **O golfinho de dentes rugosos (*Steno bredanensis*) no Brasil.** Revista Bioikos, PUC-Campinas, v. 12, n. 1, p. 29-45, 1998.

JACKSON, J. A. *et al.* **Global diversity and oceanic divergence of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*).** Proceedings of the Royal Society B, Biological Science, v. 281, e0133222, 2014.

LACEY, M. R.; CHANG, J. T. **A signal-to-noise analysis of phylogeny estimation by neighbor-joining: Insufficiency of polynomial length sequences.** Mathematical Biosciences, v. 199, n. 2, 2006.

LEDUC, R. G.; PERRIN, W. F.; DIZON, A. E. **Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome b sequences.** Marine Mammal Science, v. 15, p. 619-648, 1999.

LOIZAGA, R. *et al.* **Latin American aquatic mammals: an overview of 20 years focusing on molecular techniques applied to conservation.** Latin American Journal of Aquatic Mammals, v. 18, n. 1, p. 66-95, 2023.

KEREM, D. *et al.* **The rough-toothed dolphin, *Steno bredanensis*, in the eastern Mediterranean Sea.** *Advances in Marine Biology*, v. 75, p. 233–258, 2016.

LÁZARO, M.; LESSA, E. P.; HAMILTON, H. **Geographic genetic structure in the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*).** *Marine Mammal Science*, v. 20, n. 2, p. 201–214, 2004.

MAYR, I.; RITTER, F. **Photo-identification of rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) off La Gomera (Canary Islands) with new insights into social organization.** In: *Proceedings of the European Cetacean Society Annual Meeting*, La Rochelle, France, 2005.

MCGOWEN, M. R.; SPAULDING, M.; GATESY, J. **Divergence date estimation and a comprehensive molecular tree of extant cetaceans.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 53, n. 3, p. 891–906, 2009.

MCGOWEN, M. R. **Toward the resolution of an explosive radiation—A multilocus phylogeny of oceanic dolphins (Delphinidae).** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 60, p. 345–357, 2011.

MILMANN L. *et al.* **New genetic evidence for distinct populations of the common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) in the Southern Hemisphere.** *Polar Biology*, v.44, p. 1575–1589, 2021.

MIRANDA, A. V. *et al.* **Guia Ilustrado de Identificação de Cetáceos e Sirênios do Brasil.** 2^a ed. Brasília, DF: ICMBio/CMA, 2020.

NOWACEK D P. *et al.* **Responses of cetaceans to anthropogenic noise.** *Mammal Review*, v. 37, n. 2, p. 81–115, 2007.

OLIVEIRA L. R. *et al.* **Conservation genetics of South American aquatic mammals: an overview of gene diversity, population structure, phylogeography, non-invasive methods and forensics.** *Mammal Review*, v. 42, n.4, p. 275 - 303, 2012.

OLIVEIRA, V. K. M. *et al.* **Low genetic diversity of the endangered franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in its Northernmost, isolated population (FMAIa, Espírito Santo, Brazil).** *Frontiers in Marine Science*, v. 7, ISSN 2296-7745, 2020.

OLIVEIRA, R. O. *et al.* **Integrating morphology and DNA barcoding to assess cetacean diversity in Brazil.** *Mammal Research*, v. 66, p. 349–369, 2021.

OREMUS, M. *et al.* **Pelagic or insular? Genetic differentiation of rough-toothed dolphins in the Society Islands, French Polynesia.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 432-433, p. 37-46, 2012.

PARENTE, C. L. *et al.* **Estudo da morfologia dos ossos tímpano-periódicos de cetáceos da sub-ordem odontoceti.** *Arquivos de Ciências do Mar*, v. 32, p. 103-110, Fortaleza, 1999.

PÉREZ-ALVAREZ, M. J. *et al.* **Contrasting phylogeographic patterns among Northern and Southern hemisphere fin whale populations with new data from the Southern Pacific.** *Frontiers in Marine Science*, v. 8, ISSN 2296-7745, 2021.

REEVES, R. **Whale Species in Canada.** *The Canadian Encyclopedia*. Publicado em 7 de novembro de 2006. Atualizado em 24 de maio de 2022. Disponível em: <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/en/article/whale>. Acesso em 25 nov. 2023.

ROJAS-BRACHO, L.; TAYLOR, B. L.; JARAMILLO-LEGORRETA, A. ***Phocoena sinus*.** *The IUCN Red List of Threatened Species 2022*: e.T17028A214541137. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2022-1.RLTS.T17028A214541137.en>. Acesso em 02 dez. 2023.

SECCHI, E. R. *et al.* **Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences.** *Canadian Journal of Zoology*, v. 76, n. 9, p. 1622-1627, 1998.

SILVA D. M. P. *et al.* **Molecular taxonomy and population structure of the rough-toothed dolphin *Steno bredanensis* (Cetartiodactyla: Delphinidae).** Zoological Journal of the Linnean Society, v. 175, p. 949-962, 2015.

SILVA V. S. *et al.* **Integrating morphology and DNA barcoding to assess cetacean diversity in Brazil.** Mammal Research, v. 66, p. 349–369, 2021.

SREMBBA L. A. *et al.* **Diversity of mitochondrial DNA in 3 species of great whales before and after modern whaling.** Journal of Heredity, v. 114, n. 6, 2023.

TAMURA K.; STECHER G.; KUMAR S. **MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11.** Molecular Biology and Evolution, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.

VIRICEL A.; ROSEL, P. E. **Evaluating the utility of *cox1* for cetacean species identification.** Marine Mammal Science, v. 28, n. 37–62, 2011.

VETTORAZZI M.; FARIA V. **Manuel Antonio De Andrade Furtado Neto 1963 - 2019.** Arquivos de Ciências do Mar, v. 53, p. 7-23, 2020.

YANG G. *et al.* **Molecular systematics of river dolphins inferred from complete mitochondrial cytochrome-b gene sequences.** Marine Mammal Science, volume 18, p. 20-29, 2006.

ZERBINI, A. N. *et al.* ***Pontoporia blainvillei*.** The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T17978A123792204. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T17978A50371075.en>. Acesso em: 30 de novembro de 2023.

ZERBINI, A. *et al.* **Distribuição e abundância relativa de cetáceos na plataforma continental externa e talude da Zona Econômica Exclusiva no Sul e Sudeste do Brasil: Resultados**

preliminares e perspectivas futuras. Ministério do Meio Ambiente. Editor: Séries Documentos REVIZEE - Score Sul, 2004.