

Vanessa Roma Moreno Cotulio

**“GENE DA LIPOPROTEÍNA LIPASE (LPL)
E AUSÊNCIA DA MUTAÇÃO Gly412Arg
EM DUAS ESPÉCIES DE FELINOS
NEOTROPICAIS”**

BOTUCATU – SP

2007

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências

Campus de Botucatu

**“Gene da Lipoproteína Lipase (LPL) e Ausência da
Mutação Gly412Arg em Duas Espécies de Felinos
Neotropicais”**

VANESSA ROMA MORENO COTULIO

Orientadora: Prof^a. Dra. Edislane Barreiros de Souza

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu-SP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Genética)

**Botucatu – SP
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Cotulio, Vanessa Roma Moreno.

Gene da Lipoproteína Lipase (LPL) e ausência da mutação Gly412Arg em duas espécies de felinos neotropicais / Vanessa Roma Moreno Cotulio. – 2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2007.

Orientadora: Edislane Barreiros de Souza
Assunto CAPES: 20205007

1. Genética molecular 2. Reação em cadeia de polimerase 3. Felino - Genética

CDD 574.87328

Palavras-chave: Genética molecular; *Herpailurus yagouaroundi*; Mutação *Leopardus tigrinus*; Lipoproteína lipase(LPL)

Vanessa Roma Moreno Cotulio

**“Gene da Lipoproteína Lipase (LPL) e Ausência da
Mutação Gly412Arg em Duas Espécies de Felinos
Neotropicais”**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientador:

2º Examinador:

3º Examinador:

4º Examinador:

5º Examinador:

Botucatu, de de 2007.

“Se Deus é por nós, quem será contra nós?”

(Romanos 31,8b)

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante.”

(Albert Schweitzer - Nobel da Paz - 1952)

Dedico esse trabalho com todo o meu amor, carinho e gratidão...

Aos meus pais, Marco e Eloiza, e à minha irmã, Larissa, família maravilhosa que Deus me deu... pelos ensinamentos, apoio, carinho e amor incondicionais em todos os momentos da minha vida... A vocês todo o meu amor e minha admiração...

Ao meu esposo, Juninho, pelo seu amor, carinho, compreensão e apoio sem medidas em todos os instantes... A você o meu amor eterno...

*Vocês foram fundamentais para a realização desse trabalho...
Essa vitória também é de vocês...*

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e pela sua criação, e a Nossa Senhora pela sua intercessão. Mas, no decorrer desse trabalho, várias pessoas passaram pela minha vida e contribuíram de várias maneiras para que isso se concretizasse. A todos, a minha mais sincera gratidão, o meu carinho e o meu respeito... Que Deus abençoe e ilumine sempre os seus caminhos...

À Profa. Dra. Edislane Barreiros de Souza;

Ao Prof. Dr. José Eduardo Garcia pela sua amizade, disponibilidade, paciência e por todos os ensinamentos;

À Kátia Cassaro e Mara Cristina Marques da Fundação Parque Zoológico de São Paulo;

À amiga-irmã Aline Miyuki Fujikawa, pela amizade e companheirismo de valores inestimáveis;

À amiga Fábria Prates de Oliveira pela amizade, apoio e por me escutar em todos os momentos;

Aos amigos Ana Carolina Basílio Palmieri e Darío Abel Palmieri pelo apoio incondicional, mesmo estando (agora) à distância;

À Raquel Aparecida Ronqui e Vincent Louis Vialla pelas viagens e pela amizade;

À Alexéia Barufatti Grisolia, pela sua amizade e auxílio;

Às colegas de Pós-Graduação Renata Canevari, Edna e Paula Nóbile pelo apoio e pela amizade;

Aos biólogos, “ex-estagiários” do Laboratório de Genética da FCL – UNESP – Assis/SP, Leandro, Marcela, Adriana, Giselli, Roberta, Bruna e Gabriel pelos momentos compartilhados;

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Ciências Biológicas da FCL – UNESP – Assis/SP, especialmente os Professores Dr. João Tadeu Ribeiro Paes e Dr. Carlos Camargo Alberts, e aos Técnicos Gilberto e Maria Amábile;

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Genética do IB – UNESP – Botucatu/SP;

Aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação do IB – UNESP – Botucatu/SP, Luciene, Maria Helena e Sérgio pela paciência, atenção e disponibilidade;

Aos Estagiários e Funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da UEL – Londrina/PR;

Aos amigos do Grupo de Oração “Água Viva” de Assis/SP, especialmente o Ministério de Música “Estrela Maria” pelas orações e momentos compartilhados;

A todos que torceram por essa conquista e me apoiaram, Vô Roma, Vó Dila, Tios e Tias, Primos e Primas, e minha sogra Carminha;

A todos os meus amigos pelos momentos de descontração;

Aos Felinos por terem cedido as amostras para a realização desse trabalho;

À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 – Conservação da Biodiversidade	02
1.2 – Estudos genéticos em felinos neotropicais	03
1.3 – Biologia das espécies de felinos analisadas	07
1.4 – Aspectos estruturais, funcionais e genéticos da lipoproteína lipase (LPL)	15
1.5 – Mutações relacionadas ao gene LPL	16
2. OBJETIVOS	21
3. ARTIGO	
3.1 – Gene da Lipoproteína Lipase (LPL) e Ausência da Mutação Gly412Arg em duas Espécies de Felinos Neotropicais	23
3.2 – The Lipoprotein Lipase Gene (LPL) and the absence of its Gly412Arg mutation in two Neotropical feline species	51
4. CONCLUSÕES	76
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICES	85

LISTA DE FIGURAS

- Introdução:

- Figura 1: Foto de um exemplar de *Leopardus tigrinus* (tigrina). Fonte:
<http://www.sueza.com.br/felinosselvagens/> 09
- Figura 2: Foto de um exemplar de *Leopardus tigrinus* (tigrina). Fonte:
<http://www.zoologico.sp.gov.br/mamiferos/gatodomato.htm> 09
- Figura 3: Mapa da distribuição geográfica de *Leopardus tigrinus*. Fonte:
http://www.nex.org.br/extincao_gato_pequeno.htm 10
- Figura 4: Foto de um exemplar de *Herpailurus yagouaroundi* (jaguarundi).
Fonte: <http://www.cathouse-fcc.org/images/maya5hmon.jpg> 13
- Figura 5: Foto de um exemplar de *Herpailurus yagouaroundi* (jaguarundi).
Fonte: <http://www.paginadogaucho.com.br/faun/mami.htm> 13
- Figura 6: Mapa da distribuição geográfica de *Herpailurus yagouaroundi*.
Fonte: http://www.nex.org.br/extincao_jaguarundi.htm. 14

- Artigo:

Figura 1: Amplificação do gene LPL via PCR para <i>H. yagouarundi</i> .	44
Figura 2: Amplificação do gene LPL via PCR para <i>L. tigrinus</i> .	46
Figura 3: Amplificação (<i>PCR 1 a 7</i>) e digestão dos produtos de PCR (<i>Dig. 1 a 7</i>) com enzima BstNI de algumas amostras de <i>L. tigrinus</i> .	48
Figura 4: Amplificação (<i>PCR 1 a 7</i>) e digestão dos produtos de PCR (<i>Dig. 1 a 7</i>) com enzima BstNI de algumas amostras de <i>Herpailurus yagouarundi</i> .	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de *Leopardus tigrinus* estudados no presente trabalho. 40

Tabela 2: Exemplos de *Herpailurus yagouaroundi* estudados no presente trabalho. 42

COTULIO, V. R. M. **Gene da lipoproteína lipase (LPL) e ausência da mutação Gly412Arg em duas espécies de felinos neotropicais.** 2007. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

RESUMO

A lipoproteína lipase LPL é uma das enzimas cruciais na regulação do metabolismo de lipídios e lipoproteínas. Está presente principalmente nos tecidos adiposo e muscular, mas também pode ser encontrada, por exemplo, nos pulmões e glândulas mamárias. O gene da LPL foi descrito em várias espécies incluindo os seres humanos e os gatos. Entre essas duas espécies, há uma grande similaridade na seqüência de nucleotídeos desse gene. Além disso, tanto numa espécie quanto na outra, há mutações importantes envolvendo o gene LPL. Em gatos, a mutação Gly412Arg é uma das mais importantes, podendo desencadear uma deficiência da atividade da LPL nos indivíduos homozigotos, com conseqüências diversas para os animais. O objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência dessa mutação em duas espécies de felinos neotropicais mantidos em cativeiro: *Herpailurus yagouaroundi* e *Leopardus tigrinus*. A região de interesse foi amplificada via PCR e os produtos submetidos à digestão com enzima de restrição BstNI e visualizados em gel de agarose. Para todos os indivíduos os produtos de PCR foram do mesmo tamanho, em torno de 150pb. A digestão aconteceu em todos os fragmentos, identificando, assim, todos os indivíduos analisados como homozigotos normais para a mutação Gly412Arg. Dessa forma, nosso trabalho contribuiu na identificação do gene LPL nessas duas espécies de felinos silvestres estudados e na determinação de um método simples que poderá ser utilizado em planos de manejo desses animais em cativeiro, no sentido de determinar a presença ou ausência da mutação estudada nos animais.

Palavras-chave: *Herpailurus yagouaroundi*, *Leopardus tigrinus*, lipoproteína lipase (LPL), mutação, genética molecular

COTULIO, V. R. M. **The lipoprotein lipase gene (LPL) and the absence of its Gly412Arg mutation in two neotropical feline species.** 2007. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

ABSTRACT

The lipoprotein lipase LPL is a crucial enzyme in the regulation of lipids and lipoproteins metabolism. It is mainly present in adipose and muscular tissue but also in others tissues as lungs and mammal glands for example. The LPL gene was described in many species including humans and cats. The gene nucleotide sequence is very similar between cats and humans. Moreover, there are important mutations in the LPL gene in both species. One of the most important mutations in cats is the Gly412Arg mutation, which can induce an LPL activity deficiency with several consequences to homozygous individuals. The purpose of this work was check the presence of this particular mutation in captive individuals of two Neotropical feline species: *Herpailurus yagouaroundi* and *Leopardus tigrinus*. The concerned site was amplified by PCR; the amplification products were submitted to the BstNI restriction enzyme digestion and than visualized in agarose gel. For all individuals, the PCR products size was the same (± 150 bp). The enzymatic digestion occurred in all fragments identifying all individuals as normal homozygous for the Gly412Arg mutation. Therefore, this work contributed to assess the LPL gene in these two wild cat species and to present a simple method to detect the presence or the absence of this mutation, which can be used in management plans of these captive animals.

Key words: *Herpailurus yagouaroundi*, *Leopardus tigrinus*, lipoprotein lipase (LPL), mutation, molecular genetics

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Conservação da Biodiversidade

No mundo inteiro, programas para maximizar a preservação da biodiversidade têm sido discutidos exaustivamente. Para o manejo adequado de recursos que ocorrem na natureza, é necessário entender como a variação genética é distribuída e quais as características do meio ambiente ou das espécies que influenciam na sua distribuição (Foose, 1983).

A melhor estratégia para proteção a longo prazo da diversidade biológica é a preservação de comunidades naturais e populações no ambiente selvagem, conhecida como preservação *in situ* ou preservação local. Somente na natureza as espécies são capazes de continuar o processo de adaptação evolucionária para um ambiente em mutação, dentro de suas comunidades naturais. Porém, para alguns grupos com poucas espécies e grandes exigências de espaço, como os grandes vertebrados, é provável que a única maneira de se evitar que as espécies se tornem extintas seja manter os indivíduos em condições artificiais sob a supervisão humana, como, por exemplo, em zoológicos. Esta estratégia é conhecida como preservação *ex situ* (Primack e Rodrigues, 2001).

Os esforços de conservação *ex situ* são parte importante de uma estratégia de conservação integrada para proteger as espécies ameaçadas. Pesquisas sobre populações em cativeiro podem fornecer idéias para a biologia básica de uma espécie e sugerir novas estratégias de conservação para populações *in situ*. As populações *ex situ* que são sustentáveis podem reduzir a necessidade de se retirar indivíduos do ambiente selvagem, para serem colocados à mostra ou para fins de pesquisa. Finalmente, os indivíduos criados em cativeiros que estão à mostra podem ajudar a educar o público sobre a necessidade de preservar as espécies, e desta

forma, proteger outros membros das espécies que se encontram no mundo selvagem (Primack e Rodrigues, 2001).

Com a crescente destruição da vida selvagem, as populações de cativeiro tornaram-se uma estratégia para a conservação de espécies, apesar de ainda existirem algumas discussões a respeito de como as populações cativas e seus programas podem maximizar a preservação da biodiversidade (Foose, 1983).

A diversidade da fauna brasileira é substancialmente enriquecida pela Família Felidae (Mammalia – Carnivora), composta de 37 espécies (Nowak, 1991) e todas elas encontram-se ameaçadas de extinção, exceto o gato doméstico (*Felis catus*). Os felinos estão distribuídos mundialmente, à exceção de regiões insulares como Austrália, Nova Guiné, Nova Zelândia, Madagascar, certa ilhas do Caribe, Japão, Ilhas oceânicas e pólos. Do total das espécies de felinos existentes, 10 encontram-se na região neotropical, incluindo o gato do mato (*Leopardus tigrinus*) e a gato mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*).

1.2 - Estudos genéticos em felinos neotropicais

Estudos de genética molecular têm importante papel em projetos de preservação de espécies em extinção em decorrência da expansão industrial e territorial humana. Graças à agilidade com que é permitida a análise de amostras e a precisão de seus processos, somados aos dados de fisiologia reprodutiva, de biogeografia, de ecologia, entre outros, as estratégias de preservação e manejo de espécies ameaçadas tornaram-se muito mais precisas. Com o rápido avanço das técnicas de genética molecular nos últimos anos percebeu-se que muitas podem

contribuir consideravelmente para o manejo das espécies ameaçadas de extinção e para a conservação da biodiversidade (Neigel, 1996).

Em 1990, O' Brien et al. realizaram estudos com populações da pantera da Flórida (*Puma concolor coryi*), um animal altamente ameaçado de extinção. Utilizando técnicas de eletroforese de isoenzimas, DNA mitocondrial e marcadores nucleares, eles relataram a existência de dois grupos geneticamente distintos: um grupo descendente de ancestrais de *P. c. coryi*, filogeneticamente próximo a outras subespécies da América do Norte, e o outro grupo, assemelhando-se a pumas da América Central ou América do Sul e que deve ter sido introduzido na Flórida, num passado recente.

A análise concluiu que, apesar das diferenças genéticas apresentadas pelas duas subpopulações da Flórida, elas possuem em sua separação histórica, um ancestral comum suficientemente recente para eliminar o desenvolvimento de mecanismos de isolamento reprodutivo, ou seja, para permitir o cruzamento entre os indivíduos das duas populações. Além disso, segundo O' Brien et al. (1990), a formação de híbridos poderia até mesmo aumentar as chances de sobrevivência da pantera da Flórida, que tem sofrido fortemente as conseqüências do endocruzamento.

Um estudo realizado por Menotti-Raymond e O'Brien (1995) envolveu a análise de 10 locos de microssatélites desenvolvidos para gato doméstico (*Felis catus*), mas que também amplificavam para outras espécies de felinos, tais como: puma (*Puma concolor*), leão (*Panthera leo*), cheta (*Acinonyx jubatus*), gato leopardo (*Prionailurus bengalensis*) e gato geofroy (*Oncifelis geoffroyi*). Os produtos de PCR de tamanho similar foram amplificados para cada loco nas seis espécies e exibiram um alto polimorfismo, sugerindo a conservação evolutiva desses locos nos

felinos. O exame dos locos individuais revelou ampla heteroziguidade, mesmo nas chetas, mostrando-se, portanto, marcadores moleculares informativos. Foi observado que a heteroziguidade média era maior nas espécies que sofrem menos endocruzamento, como leões e pumas que apresentaram 86% e 79%, respectivamente, da heteroziguidade observada no gato doméstico, enquanto que as chetas apresentaram 51%.

Os padrões de RAPD foram avaliados nos leões e tigres usando 30 iniciadores randômicos, dos quais quatro produziram padrão polimórfico e foram usados para estudos populacionais. Foi analisado um total de 38 indivíduos e uma média de heteroziguidade de 25.82% foi observada, variando de 16.71% a 34.39% na análise individual dos iniciadores. Os iniciadores que apresentaram polimorfismo nos leões não revelaram polimorfismo algum nos tigres (Shankaranarayanan et al., 1997).

Menotti-Raymond et al. (1999) desenvolveram um mapa de ligação genético em felinos usando 253 locos de microssatélites. Foram identificados e genotipados 235 locos de repetição dinucleotídeo $(dC \cdot dA)_n \cdot (dG \cdot dT)_n$ e 18 tetranucleotídeo, em duas famílias, com 108 membros resultantes do cruzamento de linhagens entre o gato doméstico (*Felis catus*) e gato leopardo (*Prionailurus bengalensis*). Duzentos e vinte e nove locos foram ligados, identificando 34 grupos de ligação, e dos 19 pares de cromossomos, 16 foram mapeados. Segundo os autores, o genoma mede aproximadamente 2900 cM, e eles estimam o comprimento genético do mapa em 3300 cM.

O estudo realizado por Eizirik et al. (2001) teve por objetivo investigar a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das onças através de toda sua distribuição geográfica. Foram analisadas 715 pb da região

controle de DNA mitocondrial e 29 locos de microssatélite em aproximadamente 40 indivíduos amostrados do México ao Sul do Brasil. Os resultados revelaram níveis de diversidade baixo a moderado para o mtDNA e médio a alto para os microssatélites, e ainda evidenciaram uma recente expansão demográfica. Nenhuma estrutura geográfica bem definida foi observada, mas algumas barreiras geográficas como o rio Amazonas e o estreito de Darien entre o norte da América do Sul e América Central, parecem ter restringido o fluxo gênico histórico nessas espécies, produzindo diversidade genética mensurável. Os representantes de *Panthera onca* estudados puderam ser divididos em quatro grupos filogeográficos isolados incompletamente.

Para a caracterização da variabilidade genética de três espécies de pequenos felinos brasileiros mantidos em cativeiro (*Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii* e *Leopardus tigrinus*), Grisolia et al. (no prelo) utilizou 4 locos de microssatélite que amplificavam para o gato doméstico (*Felis catus*). A heterozigosidade média observada foi de 0,64 para *Leopardus pardalis*, 0,66 em *Leopardus tigrinus* e 0,78 em *Leopardus wiedii*. Segundo a autora, tais resultados indicam valores de heterozigosidade médios e altos. Neste trabalho, os animais eram provenientes de vários Zoológicos brasileiros, com exceção do Zoológico de São Paulo.

Visando o estudo da variabilidade genética em *Herpailurus yagouaroundi*, *Puma concolor* e *Panthera onca*, Moreno et al. (2006) utilizaram marcadores microssatélites em amostras desses animais provenientes de diversos zoológicos brasileiros (exceto Zoológico de São Paulo). Os 4 locos de microssatélites analisados revelaram uma média de heterozigosidade em *Herpailurus yagouaroundi* de 0.86, em *Puma concolor*, de 0.71 e *Panthera onca* de 0.73, evidenciando um nível de diversidade genética relativamente alto para todas as espécies estudadas.

1.3 - Biologia das espécies de Felinos analisadas

1.3.1 – *Leopardus tigrinus* (*Felis tigrinus*; Schreber, 1775)

Os animais pertencentes a essa espécie são popularmente chamados de onçila, gato-do-mato, gato tigre, tigrina ou gato onça.

A onçila (Figuras 1 e 2) é um felino de pequeno porte e como a maioria dos felinos neotropicais, todas as informações sobre a sua biologia baseiam-se em observações realizadas em indivíduos mantidos em cativeiro (Oliveira, 1994). O padrão de coloração da pelagem é similar ao da jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e ao gato maracajá (*Leopadus wiedii*), com presença de estrias transversais escuras na cauda e rosetas com manchas circulares na porção lateral do corpo (Nowak, 1991). O seu tamanho médio assemelha-se ao do gato doméstico, entre 60 e 85cm. Os machos podem pesar em média 2,750Kg e as fêmeas pesam cerca de 1,750Kg. Segundo Mondolfi (1986), as tigrinas preferem regiões secas, tais como o cerrado e florestas decíduas (Oliveira, 1994). O habitat da tigrina não é muito conhecido (Mattern e McLennan, 2000) e segundo Oliveira (1994), esse animal provavelmente mantenha uma atividade noturna. A sua alimentação básica consiste em pequenos mamíferos, pássaros, lagarto e grandes insetos. As fêmeas geram um ou no máximo dois filhotes, com uma gestação de 73 a 78 dias. Trata-se de um animal solitário e utiliza árvores caídas como abrigo (Green, 1991).

Essa espécie encontra-se distribuída desde a Costa Rica, região ocidental andina na Venezuela, Colômbia, Equador, possivelmente no norte do Peru, regiões ocidentais do Peru e da Venezuela, Guianas, Brasil, Paraguai, norte da Argentina

(Cabrera, 1957; Hall, 1981 *apud* Oliveira, 1994). A distribuição geográfica dessa espécie no continente americano pode ser observada na Figura 3.

A caça ilegal tem sido uma das principais causas da redução das populações. A supressão das florestas na Região da Mata Atlântica contribuiu para o quase total desaparecimento da espécie neste bioma. Daí a importância do levantamento das coleções mantidas em cativeiro, de modo a avaliarem-se as oportunidades para o incentivo a programas de propagação em cativeiro (Fonseca et al., 1994).

Segundo a IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) a tigrina é considerada uma espécie Vulnerável e enquadra-se ao Anexo da Cites II (O'Brien, 1996; Fonseca et al., 1994).



Figura 1: Foto de um exemplar de *Leopardus tigrinus* (tigrina). Fonte: <http://www.sueza.com.br/felinosselvagens/>



Figura 2: Foto de um exemplar de *Leopardus tigrinus* (tigrina). Fonte: <http://www.zoologico.sp.gov.br/mamiferos/gatodomato.htm>



Figura 3: Mapa da distribuição geográfica de *Leopardus tigrinus*. Fonte: http://www.nex.org.br/extincao_gato_pequeno.htm

1.3.2 - *Herpailurus yagouaroundi* (*Felis yagouaroundi*, E. Geoffroy, 1803)

Herpailurus yagouaroundi é popularmente conhecida como jaguarundi, gato mourisco, gato vermelho, gato preto, jagua-rundi e maracajá-una.

Segundo Oliveira (1994), os felinos neotropicais, em geral, são solitários, interagindo com outros indivíduos somente para reprodução. O jaguarundi é uma espécie de felino impossível de ser confundida com qualquer outra, devido a sua coloração uniforme, sem manchas. A maioria tem coloração marrom escura ou cinza; além disso, seu corpo é alongado, as patas curtas e a cabeça achatada (Figuras 4 e 5). Possui tamanho médio de 60cm de corpo e 40cm de cauda, pesando em torno de 9Kg.

O gato mourisco tem uma distribuição geográfica semelhante a outros felinos neotropicais, estendendo-se do Texas às planícies orientais e ocidentais do México, o Peru, Brasil (com exceção do sul do Rio Grande do Sul), Paraguai até as províncias de Buenos Aires e Rio Negro na Argentina (Figura 6) (Oliveira, 1994; Oliveira e Cassaro, 1999). Embora tenha sido informada a presença do felino no Arizona, essa espécie freqüentemente não ocorre nesse Estado. Não há registro desse felino no Uruguai e Chile (Oliveira, 1994).

A espécie vive principalmente em bosques e campinas, onde costuma caçar aves. Pode subir em árvores para caçar macacos e também caça pequenos veados. Produz uma ninhada por ano de dois a três filhotes (Fonseca et al., 1994). Segundo a IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza e Recursos Naturais), a espécie encontra-se na categoria de Indeterminada, ou seja, sabe-se que é

ameaçada de extinção, mas não a extensão dessa ameaça
(<http://m1.aol.com/cattrust/wildcats.htm>).



Figura 4: Foto de um exemplar de *Herpailurus yagouaroundi* (jaguarundi). Fonte: <http://www.cathouse-fcc.org/images/maya5hmon.jpg>



Figura 5: Foto de um exemplar de *Herpailurus yagouaroundi* (jaguarundi). Fonte: <http://www.paginadogaucho.com.br/faun/mami.htm>



Figura 6: Mapa da distribuição geográfica de *Herpailurus yagouaroundi*. Fonte: http://www.nex.org.br/extincao_jaguarundi.htm.

1.4 - Aspectos estruturais, funcionais e genéticos da lipoproteína lipase (LPL)

A síntese e o catabolismo de triglicerídeos (TGs) envolvem um grande número de enzimas hidrolíticas e apolipoproteínas, e os genes que codificam essas proteínas são, por esta razão, candidatos para determinar a presença de TGs no plasma sanguíneo (Talmud e Stephens, 2004). A lipoproteína lipase (LPL) é uma dessas enzimas cruciais na regulação do metabolismo de lipoproteínas e lipídios (Ginzinger et al., 1996).

LPL é a principal enzima envolvida na hidrólise de TG componentes de quilomícrons (lipoproteínas ricas em TG formadas pelas células da mucosa intestinal durante a absorção da gordura dos alimentos) e VLDL – lipoproteínas de densidade muito baixa (*“very low density lipoprotein”*), permitindo que o interior das células seja livre de ácidos graxos, já que tal hidrólise resulta na formação de resíduos de quilomícrons, IDL - lipoproteínas de densidade intermediária (*“intermediary density lipoprotein”*), resíduos de VLDL e lipoproteínas de baixa densidade. Os resíduos de lipoproteína derivados das VLDL e dos quilomícrons são importantes contribuintes para a formação de HDL – lipoproteínas de alta densidade (*“high density lipoprotein”*), e como resultado, níveis de colesterol HDL estão diretamente relacionados com a atividade da LPL do plasma em humanos. Além disso, a LPL tem uma função molecular não enzimática de “ponte”, atuando como ligante nas interações de superfície entre células e lipoproteínas, desse modo mediando as junções celulares e a adesão de lipoproteínas (Ginzinger et al., 1996; Ginzinger et al., 1999; Savonen et al., 1999; Reginato et al, 2002; Talmud e Stephens, 2004).

Primeiramente identificada como o “fator clareador” no plasma que reduzia a hipertrigliceridemia, a lipoproteína lipase tem sido de grande interesse no campo da

pesquisa sobre metabolismo. Esta enzima é produzida nas células parenquimais e então secretada para o endotélio capilar. Está presente em muitos tecidos, incluindo o adiposo, coração, músculo esquelético, pulmões e glândulas mamárias (Reginato et al., 2002). Quantitativamente, mais LPL é encontrada no tecido adiposo e músculo, onde os ácidos graxos livres liberados são degradados e também estocados ou oxidados, respectivamente. Há a hipótese de que níveis relativos da atividade de LPL no tecido adiposo e no músculo determinam como as calorias provenientes da gordura são separadas para estocagem ou utilização, e que desequilíbrios de expressão no tecido podem conseqüentemente levar à obesidade ou perda de peso (Weinstock et al., 1997).

Em humanos, o gene LPL está localizado no cromossomo 8p22, com tamanho aproximado de 30kb e está dividido em 10 éxons, e tem uma homologia substancial na seqüência entre a maior parte das espécies que têm sido examinadas. O cDNA codifica para uma proteína de 475 aminoácidos incluindo um peptídeo sinal com 27 aminoácidos. O centro catalítico é formado por três aminoácidos: Ser132, Asp156 e His241 (Merkel et al., 2002).

1.4 - Mutações relacionadas ao gene LPL

Na espécie humana, há 61 mutações de sentido errado relacionadas ao gene da LPL, maior parte das quais está localizada nos éxons 5 e 6; 12 mutações sem sentido, 10 mutações na estrutura de leitura do mRNA ou pequenas inserções/deleções, 3 grandes mutações, 8 mutações de *splicing*, e 4 variantes no

sítio promotor (Merkel et al., 2002). Algumas dessas mutações podem levar à perda de atividade enzimática da LPL.

A frequência das mutações LPL difere totalmente entre populações. Por exemplo, *Ser447stop* é encontrada em mais de 20% da população geral e esta variante está somente associada com o aumento na atividade de LPL. Das mutações que levam à redução da atividade enzimática, *Asn291Ser* é a mais comum, e *Asp9Asn* e *Gly188Glu* são as menos comuns.

As mutações LPL heterozigotas associadas com a redução ou perda de atividade da enzima podem aumentar o risco de hiperlipidemia familiar combinada (FCH) e aterosclerose prematura. Embora seja óbvio que uma redução da atividade de LPL deva levar ao aumento de TGs, decréscimo de HDL e, ainda, aterosclerose prematura, somente alguns estudos mostram essa conexão. Outros genes ou fatores podem influenciar ou modificar os efeitos das mutações LPL (Merkel et al., 2002).

A deficiência completa de LPL é uma séria desordem autossômica recessiva, com uma frequência de aproximadamente $1/10^6$ na população geral, e resulta em uma elevação drástica de quilomícrons e um decréscimo concomitante das LDL – lipoproteínas de baixa densidade (*“low density lipoprotein”*) e nas concentrações de colesterol HDL. Os sintomas clínicos muitas vezes aparecem prematuramente na infância incluindo pancreatite aguda, quilomicronemia, falha no crescimento, xantoma eruptivo, e lipemia retinal (Savonen et al., 1999; Ginzinger et al., 1996 e 1999).

As mutações no gene LPL têm sido relacionadas a outras doenças em humanos: indivíduos portadores da mutação *Asn291Ser* tiveram risco aumentado para a doença de Alzheimer, enquanto que aqueles com a mutação *Ser447stop*

tinham o risco diminuído ou não eram afetados (Baum et al., 1999; Fidani et al., 2002). Somente em alguns estudos, constatou-se a ligação do loco gênico LPL com a hipertensão (Wu et al., 1996; Sprecher et al., 1996). Na deficiência LPL heterozigota, pode ocorrer hipertrigliceridemia severa e pancreatite durante a gravidez e naqueles com diabetes (Henderson et al., 1998; Keilson et al., 1996). Portadores da mutação Asn291Ser ou das mutações combinadas Asp9Asn/T-93G podem ter um risco aumentado de pré-eclampsia (Hubel et al., 1999).

Há poucos estudos sobre o metabolismo de lipídios em gatos. Eles mostram que esses animais têm muitas similaridades com os humanos no que diz respeito ao metabolismo de lipídios e também na seqüência de nucleotídeos do gene para LPL, havendo 90% de similaridade entre as seqüências gênicas de LPL nas duas espécies (Ginzinger et al., 1999). As mutações no gene da enzima, assim como em humanos, podem levar à desordens referentes ao metabolismo de lipídios também em gatos.

Ginzinger et al. (1996) relatam em seu trabalho a ocorrência natural de uma colônia de gatos apresentando quilomicronemia, sugerindo que eles sofram de deficiência de LPL. Os autores descrevem a clonagem do cDNA LPL em gatos e a identificação de uma transição de G para A no nucleotídeo 1234 no éxon 8 resultando em uma substituição de arginina por glicina no resíduo 412. Pesquisando a relação dessa substituição na mutação com o fenótipo "gato afetado", os autores confirmaram que Gly412Arg era a causa da deficiência de LPL na colônia de gatos estudada e, ainda, observaram que nos gatos homozigotos para a mutação, ocorria redução da massa corporal, alteração do padrão de crescimento e aumento do padrão de filhotes natimortos.

Em outro de seus estudos, Ginzinger et al. (1999) analisaram gatos com deficiência de LPL, fazendo uma análise dos lipídios e das lipoproteínas nesses animais, com seus diferentes genótipos, e comparando-os com gatos normais para LPL. Nesse trabalho, os autores narram que, em geral, as partículas lipoprotéicas dos gatos demonstram propriedades semelhantes às daquelas dos humanos. A deficiência de LPL em gatos, tal como em humanos, está associada com maiores concentrações plasmáticas de TGs e colesterol, e baixas concentrações de colesterol HDL. Os gatos homozigotos para a deficiência apresentaram um aumento significativo na lipemia pós-refeição, enquanto que nos heterozigotos, os efeitos da deficiência também se tornaram mais pronunciados quando eles recebiam uma alta carga de gordura via oral, realçando a liberação diminuída dos TGs nesses animais.

Reginato et al. (2002), estudando a influência da dieta em gatos que possuíam a mutação Gly412Arg, a qual elimina a atividade catalítica da LPL, reportam que os sinais clínicos incluindo lipemia retinal, xantomas, e hiperlipidemia profunda ocorreram em gatos homozigotos que foram alimentados com comida contendo mais de 10% de gordura, inferindo que a composição da dieta para esses gatos ou para seus genitores pode influenciar no seu crescimento e padrão de massa corporal.

Um estudo envolvendo 12 gatos domésticos sem mutações no gene da LPL e 23 gatos que eram heterozigotos ou homozigotos portadores da mutação LPL Gly412Arg, revelou que a massa de gordura corporal e a porcentagem de gordura corporal de homozigotos foram significativamente menores que naqueles animais clinicamente normais e os heterozigotos. Ainda, o estudo mostrou que os indivíduos homozigotos nascidos de fêmeas homozigotas tiveram significativamente menos massa de gordura corporal e porcentagem de gordura que os homozigotos nascidos

de mães heterozigotas. A massa corporal magra não diferiu significativamente entre os grupos. Todas essas observações levaram os pesquisadores a concluir, entre outras coisas, que a deficiência de atividade da LPL em gatos diminui os estoques de gordura corporal (Backus et al., 2001).

Em animais da fauna neotropical, especialmente nos representantes da família dos felinos selvagens, nada se sabe a respeito da atividade da LPL e das possíveis mutações no gene dessa enzima que possam levar, por exemplo, à obesidade, perda de peso ou outros distúrbios relacionados ao metabolismo de lipídios. A busca dessa mutação, utilizando os mais variados recursos da biologia molecular, pode ser útil em programas de manutenção de populações desses animais em cativeiro. Os dados assim obtidos poderiam, por exemplo, contribuir na definição de uma dieta adequada desses animais em cativeiro de acordo com o seu genótipo para a LPL, por meio da identificação do genótipo de cada animal para as mutações no gene LPL.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos:

- Caracterizar o gene da LPL em duas espécies de felinos neotropicais (*Leopardus tigrinus* e *Herpailurus yagouaroundi*);
- Verificar a ocorrência da mutação Gly412Arg no gene LPL em *Leopardus tigrinus* e *Herpailurus yagouaroundi*;
- Criar uma ferramenta para contribuir com informações para o manejo desses animais em cativeiro.

3. ARTIGO

**Gene da lipoproteína lipase (LPL) e ausência da mutação
Gly412Arg em duas espécies de felinos neotropicais**

Vanessa Roma Moreno Cotulio¹, José Eduardo Garcia², Kátia Cassaro³, Edislane Barreiros de Souza⁴

¹ Departamento de Genética, Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu – São Paulo, Brasil

² Departamento de Bioquímica E Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, UEL, Londrina – Paraná, Brasil

³ Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo – São Paulo, Brasil

⁴ Departamento de Ciências Biológicas, FCL – UNESP, Assis – São Paulo, Brasil

ESTUDO GENÉTICO DA LIPOPROTEÍNA LIPASE (LPL) EM FELINOS

Vanessa Roma Moreno Cotulio, Avenida Walter Antonio Fontana, nº 825, apto 611, Vila Cláudia, CEP 19815-340, Assis – São Paulo, Brasil. Telefone: (18)3324-4753, E-mail: bio_vanessa@hotmail.com

RESUMO

A lipoproteína lipase LPL é uma das enzimas cruciais na regulação do metabolismo de lipídios e lipoproteínas. Está presente principalmente nos tecidos adiposo e muscular, mas também pode ser encontrada, por exemplo, nos pulmões e glândulas mamárias. O gene da LPL foi descrito em várias espécies incluindo os seres humanos e os gatos. Entre essas duas espécies, há uma grande similaridade na seqüência de nucleotídeos desse gene. Além disso, tanto numa espécie quanto na outra, há mutações importantes envolvendo o gene LPL. Em gatos, a mutação Gly412Arg é uma das mais importantes, podendo desencadear uma deficiência da atividade da LPL nos indivíduos homocigotos, com conseqüências diversas para os animais. O objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência dessa mutação em duas espécies de felinos neotropicais mantidos em cativeiro: *Leopardus tigrinus* e *Herpailurus yagouaroundi*. A região de interesse foi amplificada via PCR e os produtos submetidos à digestão com enzima de restrição BstNI e visualizados em gel de agarose. Para todos os indivíduos os produtos de PCR foram do mesmo tamanho, em torno de 150pb. A digestão aconteceu em todos os fragmentos, identificando, assim, todos os indivíduos analisados como homocigotos normais para a mutação Gly412Arg. Dessa forma, nosso trabalho contribuiu na identificação do gene LPL nessas duas espécies de felinos silvestres estudados e na determinação de um método simples que poderá ser utilizado em planos de manejo desses animais em cativeiro, no sentido de determinar a presença ou ausência da mutação estudada nos animais.

Palavras-chave: *Herpailurus yagouaroundi*, *Leopardus tigrinus*, lipoproteína lipase (LPL), mutação, genética molecular

INTRODUÇÃO

Muitos fatores genéticos e ambientais controlam os níveis plasmáticos de triglicerídeos (TGs) e de colesterol nos mamíferos. A influência dos genes nos níveis de TGs inclui, por exemplo, os fatores que controlam a síntese e a secreção de lipoproteínas ricas em TGs tais como quilomícrons e VLDL – lipoproteínas de densidade muito baixa (*“very low density lipoproteins”*); e as enzimas envolvidas na lipólise tais como a lipoproteína lipase (LPL) e seu ativador (apolipoproteína C-II), e a lipase hepática (Ma et al., 1994).

A enzima LPL é predominantemente encontrada nos tecidos adiposo e muscular, onde está limitada ao endotélio dos capilares pela sua interação com as glicosaminoglicanas. No tecido adiposo, os ácidos graxos liberados são absorvidos e reesterificados, e os TGs são estocados no interior de gotas de lipídios (Goldberg, 1996; Zechner, 1997). A completa ausência de LPL que ocorre em humanos, felinos e mustelídeos que são homozigotos para mutações no gene LPL (Murthy et al., 1996; Savonen et al., 1999), resulta em um maciço acúmulo de TGs no plasma, coincidindo com a visão de que a ausência de LPL impede a liberação normal de TGs circulantes (Kratky et al., 2005).

Na espécie humana, várias mutações relacionadas ao gene LPL são descritas, algumas das quais estão envolvidas com a deficiência de atividade da enzima LPL, e cujos sintomas costumam aparecer logo na infância (Merkel et al., 2002; Ginzinger, 1996). Em gatos, há também mutações semelhantes que levam à perda de atividade enzimática. Uma delas envolve uma substituição de arginina por glicina no resíduo 412 (Gly412Arg) do gene LPL, causando sintomas parecidos com àqueles encontrados nos seres humanos portadores da deficiência de LPL (Ginzinger et al., 1996; 1999).

26 O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar a região
27 gênica envolvida com a mutação Gly412Arg no gene LPL em duas espécies de
28 felinos neotropicais (*Herpailurus yagouaroundi* e *Leopardus tigrinus*) mantidos em
29 cativeiro, tentando desenvolver mais uma ferramenta para auxiliar na manutenção
30 de populações silvestres em cativeiro.

31 Esse é o primeiro trabalho relacionado ao gene LPL em gatos silvestres, já
32 que não há nenhum relato desse tipo de estudo na literatura.

33

34

35

36

MATERIAL E MÉTODOS

37 Foram utilizadas amostras de tecido dérmico de 25 indivíduos da espécie
38 *Leopardus tigrinus* e 15 de *Herpailurus yagouaroundi* (Tabelas 1 e 2), coletadas por
39 pesquisadores do Parque Fundação Zoológico de São Paulo e enviadas ao
40 Laboratório de Genética – UNESP – Assis/SP em tubos contendo álcool etílico
41 100%. Também foram usadas duas amostras de sangue fresco de *Felis catus* (um
42 gato persa e outro siamês) cedidas pelo Hospital Veterinário da Universidade
43 Estadual de Londrina/PR (UEL). A extração de DNA dessas amostras foi feita
44 usando-se o *kit* de extração “*DNeasy Tissue Kit*” – Qiagen de acordo com a
45 recomendação do fabricante, e a quantificação realizada em gel de agarose corado
46 com brometo de etídio.

47 A amplificação da região gênica da LPL envolvendo a mutação Gly412Arg foi
48 realizada de acordo com as condições descritas por Ginzinger et al. (1999),
49 utilizando o “*primer*” I8 (5'-ACCTGAACGTTGAAGGCTCCAAGAGTACCC-3') e um
50 “*mismatch primer*” MM-SB (5'-GGTTTACTATTGAGAAGA-TCAGAGTAA-AACCA-3')

51 que criou um novo sítio de restrição, reconhecido pela enzima de restrição BstNI,
52 somente no alelo normal. As condições de amplificação foram: 1.5 mM de MgCl₂, 1.5
53 µl de Tampão PCR 10X, 200 µM de dNTP's, 100 pmol de cada "primer" I8 e MM-
54 SB, 1.5 U de Taq DNA polimerase e 30ng de DNA em um volume final de 25 µl.

55 Os parâmetros para a reação de PCR usados no termociclador Biômetra
56 (modelo T1, Alemanha) foram: 94°C por 2 min; 35 ciclos a 94° por 1 min, 60°C por 1
57 min e 72°C por 45 s; 72°C por 5 min; 4°C por 10 min. Os produtos obtidos pela
58 amplificação foram visualizados em gel de agarose 3% e fotografados com filme
59 Polaroid 667.

60 Após confirmação da amplificação via PCR do DNA genômico dos felinos
61 analisados, cada produto foi submetido à digestão com a endonuclease de restrição
62 BstNI, permanecendo a 60°C por 1 hora, conforme especificação do fabricante
63 (BioLabs). A reação de digestão foi realizada nas seguintes condições: 1.5 µl de 1X
64 NEBuffer 2, 1.5 µl de BSA, 5 U da enzima e 10 µl de produtos de PCR em um
65 volume final de 15 µl. Os fragmentos obtidos após a digestão foram visualizados em
66 gel de agarose 3% e fotografados.

67

68

69

70

RESULTADOS

71

72 - **Extração de DNA**

73 Utilizando o método de extração descrito anteriormente, foi possível extrair
74 DNA de boa qualidade e em quantidade suficiente para as reações de PCR.

75 Dessa forma, a extração de DNA foi realizada para todas as amostras
76 disponíveis em nosso laboratório das espécies *L. tigrinus* (25 amostras) e *H.*
77 *yagouaroundi* (15 amostras), além de duas amostras de gato doméstico (gato persa
78 e gato siamês), que serviram como controle da análise.

79 A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose e posteriormente
80 fotografada e analisada. Para cada amostra, obteve-se duas alíquotas contendo
81 DNA diluído em 200µl e 100µl de tampão, um rendimento bastante satisfatório, já
82 que se obteve grande quantidade de DNA com baixo índice de contaminação
83 protéica, resultando em bons padrões de amplificação.

84

85

86 - **Amplificação do gene LPL**

87 A amplificação do gene LPL foi realizada para as amostras de DNA de *F.*
88 *catus* (para padronização e como controle), *L. tigrinus* e *H. yagouaroundi*, e os
89 resultados visualizados em gel de agarose estão representados nas Figuras 1 e 2.

90 Para todas as espécies analisadas ocorreu a amplificação do fragmento
91 relativo ao gene LPL em gatos. Nos 25 indivíduos estudados de *L. tigrinus*, a
92 amplificação resultou em uma banda no gel de aproximadamente 150 pb, não
93 havendo nenhuma variação no tamanho do fragmento entre os indivíduos. Da
94 mesma forma, em todas as 15 amostras de DNA de *H. yagouaroundi*, a banda
95 resultante da amplificação do gene LPL também apareceu em torno de 150 pb, sem
96 alteração nos diferentes indivíduos.

97 As amostras de DNA dos gatos persa e siamês também amplificaram para o
98 gene LPL, mas o tamanho dos produtos de PCR foi um pouco diferente daquele
99 encontrado para os felinos selvagens, em torno de 130pb.

100 - **Análise da mutação Gly412Arg por “mismatch” PCR**

101 A digestão dos produtos de PCR ocorreu para todos os indivíduos nas duas
102 espécies, ou seja, os felinos estudados apresentaram o sítio de restrição para a
103 enzima, indicando que eles possuem uma região idêntica à dos gatos domésticos.
104 Esses resultados podem ser visualizados nas Figuras 3 e 4.

105

106

107

108

DISCUSSÃO

109 A lipoproteína lipase é uma enzima chave no metabolismo de lipídios, que
110 catalisa a hidrólise de triglicerídeos (TGs) de lipoproteínas ricas nesses
111 componentes, e que também tem uma função como ligante aumentando a adesão
112 celular de lipoproteínas (Wung et al., 2006).

113 Baseados na semelhança da seqüência de nucleotídeos do gene LPL entre
114 gatos e humanos, Ginzinger et al. (1996) desenharam “*primers*” que pudessem ser
115 utilizados na amplificação de uma região desse gene envolvida com uma mutação
116 relacionada à atividade de LPL em gatos e que, em seguida, fosse possível uma
117 investigação a respeito dos genótipos dos gatos para essa mutação. Segundo os
118 autores, os genótipos podem ser definidos como homozigotos normais (412 +/+ ou
119 *LL*), heterozigotos (412 +/- ou *Ll*) e homozigotos portadores da mutação (412 -/- ou
120 *ll*).

121 No seu trabalho, Ginzinger et al. (1996) reconheceram uma região amplificada
122 de tamanho em torno de 135pb. No presente trabalho, utilizando os mesmos
123 “*primers*”, foi possível verificar, por meio da ocorrência de um único produto de
124 amplificação, a presença da mesma região gênica da LPL em duas espécies de
125 felinos neotropicais: *H. yagouaroundi* e *L. tigrinus*. Estima-se que os padrões de
126 amplificação, para ambas as espécies, apresentou-se com aproximadamente 150pb,
127 baseado nos marcadores de peso molecular conhecido, utilizados como referência
128 no gel de agarose.

129 Até o momento, nenhum trabalho havia sido publicado, no sentido de avaliar a
130 presença do gene LPL em gatos selvagens. Nosso trabalho contribui no sentido de
131 identificar a presença desse gene nos animais estudados, via amplificação por PCR,
132 e, posteriormente, analisar a presença ou não de uma mutação nesse mesmo gene.

133 Há várias mutações na espécie humana relacionadas ao gene LPL e,
134 conseqüentemente, ao metabolismo de lipídios. Cada tipo de mutação pode estar
135 relacionado a uma manifestação clínica diferente nos pacientes que as possuem e,
136 ainda, cada mutação pode ocorrer com maior ou menor freqüência em humanos
137 (Merkel et al., 2002). Embora mutações que levem à deficiência completa de LPL em
138 humanos não sejam muito comuns (aproximadamente uma em um milhão no mundo
139 inteiro), indivíduos com uma mutação no gene LPL, resultando numa redução parcial
140 da atividade lipolítica, são comuns (Jukema et al., 1996; Reymer et al., 1995).

141 Em seu estudo, Ginzinger et al. (1996) propõem um método baseado na
142 técnica de “*mismatch*” PCR e digestão com enzima de restrição para a identificação
143 do genótipo em gatos para a mutação Gly412Arg, que possuem deficiência de LPL.
144 Com base nesse estudo, nosso trabalho foi realizado no sentido de caracterizar essa
145 mesma região nas duas espécies de felinos silvestres, abrindo assim a possibilidade

146 de identificar a mutação quando necessário (no caso da constatação da doença em
147 algum animal).

148 O presente estudo revelou ausência da mutação em todos os indivíduos
149 analisados, sendo todos homozigotos normais (*LL*), uma vez que a enzima só
150 reconhece o sítio de restrição nos alelos que não portam a mutação, resultando num
151 fragmento de tamanho menor que o do produto de PCR.

152 Em geral, gatos com a mutação LPL Gly412Arg são saudáveis. Mas há dois
153 problemas para a produção desses animais, um é a baixo desempenho reprodutivo
154 nas fêmeas reprodutoras deficientes para LPL, e o outro é o baixo padrão de
155 crescimento dos filhotes com a mesma deficiência (Reginato et al., 2002).

156 Os estudos de Jones et al. (1986) e de Ginzinger et al. (1996),
157 simultaneamente indicam que a deficiência de LPL nas fêmeas reprodutoras pode
158 influenciar no crescimento de sua prole. Filhotes nascidos de mães heterozigotas
159 (*Ll*), que têm de 31 a 70% de atividade normal da LPL, podem ser grandes e ter
160 melhor desempenho de crescimento que aqueles nascidos de gatas homozigotas
161 (*ll*), que não têm LPL ativa.

162 As análises da composição corporal suportam a possibilidade de que a
163 deficiência maternal de LPL afeta o desempenho dos filhotes. Segundo Backus et al.
164 (2001), gatos adultos *ll* apresentam aproximadamente metade da massa de gordura
165 corporal que os gatos com LPL funcional, enquanto que a massa magra corporal
166 desses gatos não é significativamente diferente do normal. O grau de magreza entre
167 os gatos *ll* varia com o genótipo da mãe. Na maioria, gatos *ll* nascidos de mães *ll*
168 têm substancialmente menos gordura corporal que gatos nascidos de mães *Ll*. O
169 mecanismo a respeito desse efeito maternal é desconhecido.

170 Segundo Reginato et al. (2002), a composição dos alimentos ingeridos pelos
171 filhotes contendo a mutação Gly412Arg no gene LPL e conseqüentemente uma
172 deficiência de LPL pode influenciar na taxa de crescimento desses animais. Seu
173 trabalho indica que a massa de gordura corporal em gatos deficientes de LPL pode
174 ser aumentada com alimentos contendo preferencialmente mais carboidratos que
175 proteínas e que, além disso, a massa de gordura corporal subnormal tipicamente
176 observada em fêmeas reprodutoras com deficiência de LPL, e um estoque de
177 gordura diminuído reduzem o seu desempenho reprodutivo. Assim, a seleção de
178 uma dieta adequada ao genótipo do animal para a mutação Gly412Arg pode
179 contribuir sobremaneira com a manutenção e reprodução dos felinos silvestres
180 vivendo em cativeiro. Nosso trabalho abre caminho para essa possibilidade
181 apresentando um método eficiente na detecção do gene LPL e da mutação
182 Gly412Arg em felinos.

183 Desse modo, apesar de nossos estudos terem resultado em ausência da
184 mutação no gene LPL para todas as 25 tigrinas e 15 jaguarundis analisadas, a
185 possibilidade de identificação dessa mutação nos animais mantidos em cativeiro por
186 meio de um método simples, colabora para a tentativa de manutenção de
187 populações geneticamente sadias dessas espécies e de outros felinos nesse local,
188 podendo ser feito manejo adequado dos indivíduos. Por exemplo, indivíduos que
189 apresentarem sinais clínicos de uma patologia associada a uma mutação no gene
190 LPL ou, ainda, fraco desempenho dos filhotes, poderão se identificados por um
191 único e simples teste de PCR.

192 Devido a diversos fatores, todas as espécies de felinos estão em algum nível
193 ameaçadas de extinção, exceto os gatos domésticos, e a conservação desses
194 animais *ex situ* tem sido uma estratégia importante na tentativa de preservação das

195 espécies de felinos. Toda e qualquer informação a respeito das características
196 genéticas desses animais pode auxiliar pesquisadores de criadouros e zoológicos,
197 por exemplo, a conduzir a reprodução e desenvolvimento desses animais em
198 cativeiro da melhor maneira possível, visando sua preservação.

199

200

AGRADECIMENTOS

201

202 Agradecemos à Mara Cristina Marques (Fundação Parque Zoológico de São
203 Paulo) pela coleta das amostras, e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de
204 Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACKUS, R.C., D.G. GINZINGER, K.J. EXCOFFON, S.M. CLEE, M.R. HAYDEN, R.H. ECKEL, M.A. HICKMAN AND Q.R. ROGERS. 2001. Body fat mass and condition scores of mature cats with lipoprotein lipase deficiency vary with maternal expression of functional lipoprotein lipase. *American Journal of Veterinary Research* 62(2): 264-269.

GINZINGER, D.G., M.E. LEWIS, Y. MA, B.R. JONES, G. LIU AND S.D. JONES. 1996. A mutation in the lipoprotein lipase gene is the molecular basis of chylomicronemia in a colony of domestic cats. *The Journal of Clinical Investigation* 97(5): 1257-1266.

GINZINGER, D.G., S.M. CLEE, J. DALLONGEVILLE, M.E.S. LEWIS, H.E. HENDERSON, E. BAUJE, Q.R. ROGERS, D.R. JENSEN, R.H. ECKEL, R. DYER, S. INNIS, B. JONES, J.C. FRUCHART AND M.R. HAYDEN. 1999. Lipid and lipoprotein analysis of cats with lipoprotein lipase deficiency. *European Journal of Clinical Investigation* 29: 17-26.

GOLDBERG, I.J. 1996. Lipoprotein lipase and lipolysis: central role in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of Lipid Research* 37: 693-707.

JONES, B.R., A.C. JON=HNSTONE, J.L. CAHILL AND W.S. HANCOCK. 1986. Peripheral neuropathy in cats with inherited primary hyperchylomicronemia. The Veterinary Record 119: 268-272.

JUKEMA, J.W., A.J. VAN BOVEN, B. GROENEMEIJER, A.H. ZWINDERMAN, J.H. REIBER, A.V. BRUSCHKE, J.A. HENNEMAN, G.P. MOLHOEK, T. BRUIN, H. JANSEN, E. GAGNE, M.R. HAYDEN AND J.J. KASTELEIN. 1996. The Asp9 Asn mutation in the lipoprotein lipase gene is associated with increased progression of coronary atherosclerosis. REGRESS Study Group, Interuniversity Cardiology Institute, Utrecht, The Netherlands. Regression Growth Evaluation Statin Study. Circulation 94(8): 1913-1918.

KRATKY, D., R. ZIMMERMANN, E.M. WAGNER, J.G.STRAUSS, W. JIN, G.M. KOSTNER, G. HAEMMERTE, D.J. RADER AND R. ZECHNER. 2005. Endothelial lipase provides an alternative pathway for FFA uptake in lipoprotein lipase-deficient mouse adipose tissue. The Journal of Clinical Investigation 115(1): 161-167.

MA, Y., T.C. OOI, M-S LIU, H. ZHANG, R. McPHERSON, L. EDWARDS, I.J. FORSYTHE, J. FROHLICH, J.D. BRUNZELL AND M.R. HAYDENT. 1994. High frequency of mutations in the human lipoprotein lipase gene in pregnancy-induced chylomicronemia: possible association with apolipoprotein E2 isoform. Journal of Lipid Research 35: 1006-1075.

MERKEL, M., R.H. ECKEL AND I.J. GOLDBERG. 2002. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake and regulation. *Journal of Lipid Research* 43(12): 1197-2006.

MURTHY, V., P. JULIEN AND C. GAGNE. 1996. Molecular pathology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacology and therapeutics* 70(2): 101-135.

REGINATO, C.F., R.C. BACKUS AND Q.R. ROGERS. 2002. Improved growth of lipoprotein lipase deficient kittens by feeding a low-fat, highly digestible diet. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 149-156.

REYMER, P.W., E. GAGNE, B.E. GROENEMEYER, H. ZHANG, I. FORSYTH, H. JANSEN, J.C. SEIDELL, D. KROMHOUT, K.E. LIE, J. KASTELEIN *et al.*. 1995. A lipoprotein lipase mutation (Asn291Ser) is associated with reduced HDL cholesterol levels in premature atherosclerosis. *Nature Genetics* 10(1): 28-34.

SAVONEN, R., K. NORDSTOGA, B. CHRISTOPHERSEN, A. LINDBERG, Y. SHEN, M. HULTIN, T. OLIVECRONA AND G. OLIVECRONA. 1999. Chylomicron metabolism in an animal model for hyperlipoproteinemia type I. *Journal of Lipid Research* 40(7): 1336-1346.

WUNG, S.F., M.V. KULKARNI, C.R. PULLINGER, M.J. MALLOY, J.P. KANE AND B.E. AOUIZERAT. 2006. The lipoprotein lipase gene in combined hyperlipidemia: evidence of a protective allele depletion. *Lipids in health and disease* 5; 5:19.

ZECHNER, R. 1997. The tissue-specific expression of lipoprotein lipase implications for energy and lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology* 8(2): 77-88.

Tabela 1: Exemplos de *Leopardus tigrinus* estudados no presente trabalho.

Espécie	Código do Laboratório	Nº de Registro no Zôo de São Paulo	Procedência
<i>Leopardus tigrinus</i>	Lt 1	22170	São Francisco Xavier/SP
	Lt 2	22111	Socorro/SP
	Lt 3	22727	Zôo Bauru/SP
	Lt 4	24348	Nasc/ Zôo SP
	Lt 5	23957	Nasc/ Zôo SP
	Lt 6	25246	Nasc/ Zôo SP
	Lt 7	27670	Nasc/ Zôo SP
	Lt 8	20251	Calcaia do Alto – Cotia/SP
	Lt 9	22641	Zôo Belo Horizonte/MG
	Lt 10	22101	Bragança Paulista/SP
	Lt 11	21500	Brusque/SC
	Lt 12	21292	desconhecida
	Lt 13	20287	Zôo Camburiú/SC
	Lt 14	27612	Nasc/ Zôo SP
	Lt 15	21537	Bauru/SP
	Lt 16	26435	Nasc/ Zôo SP
	Lt 17	26106	Nasc/ Zôo SP
	Lt 18	26107	Nasc/ Zôo SP
	Lt 19	19156	Zôo Americana/SP
	Lt 20	22728	Zôo Bauru/SP
	Lt 21	22347	Zôo São Carlos/SP
	Lt 22	24069	desconhecida
	Lt 23	18781	desconhecida
	Lt 24	23275	desconhecida
	Lt 25	21809	Altinópolis – Rib. Preto/SP

Tabela 2: Exemplos de *Herpailurus yagouaroundi* estudados no presente trabalho.

Espécie	Código do Laboratório	Nº de Registro no Zôo de São Paulo	Procedência
<i>Herpailurus yagouaroundi</i>	Hy 1	25847	Nasc/ Zôo SP
	Hy 2	20761	Nasc/ Zôo SP
	Hy 3	24226	Nasc/ Zôo SP
	Hy 4	22096	Nasc/ Zôo SP
	Hy 5	21810	Mogi-Guaçu/SP
	Hy 6	23911	Nasc/ Zôo SP
	Hy 7	29189	Nasc/ Zôo SP
	Hy 8	23851	Nasc/ Zôo SP
	Hy 9	21566	Limeira/SP
	Hy 10	27088	Nasc/ Zôo SP
	Hy 11	24227	Nasc/ Zôo SP
	Hy 12	27165	Nasc/ Zôo SP
	Hy 13	23956	Nasc/ Zôo SP
	Hy 14	27689	Nasc/ Zôo SP
	Hy 15	24958	Nasc/ Zôo SP

Figura 1: Amplificação do gene LPL via PCR para *H. yagouaroundi*.

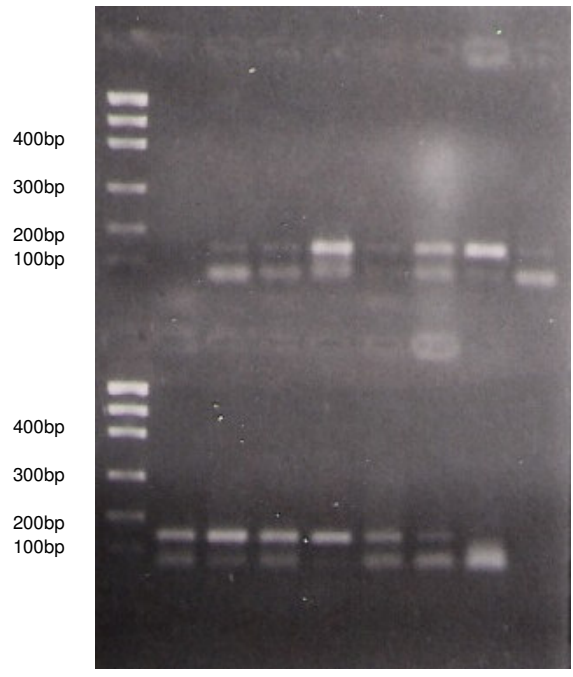


Figura 2: Amplificação do gene LPL via PCR para *L. tigrinus*.

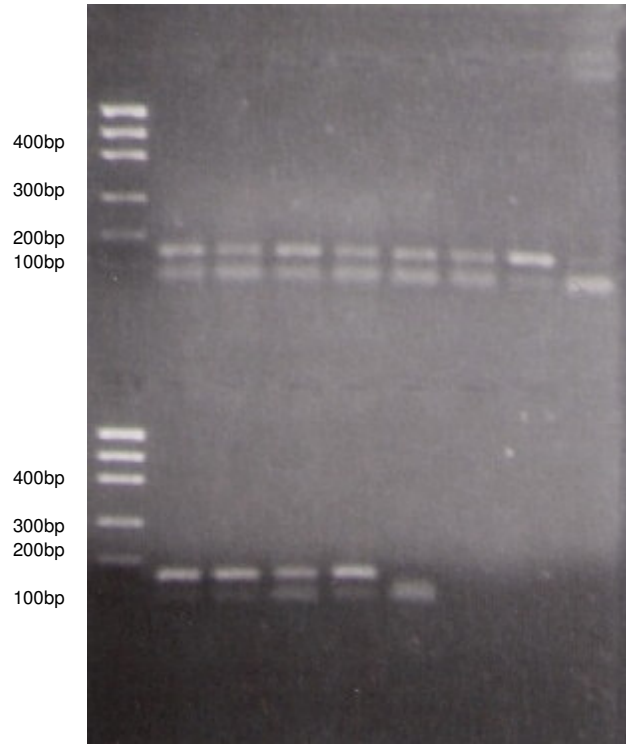


Figura 3: Amplificação (*PCR 1 a 7*) e digestão dos produtos de PCR (*Dig. 1 a 7*) com enzima BstNI de algumas amostras de *L. tigrinus*.

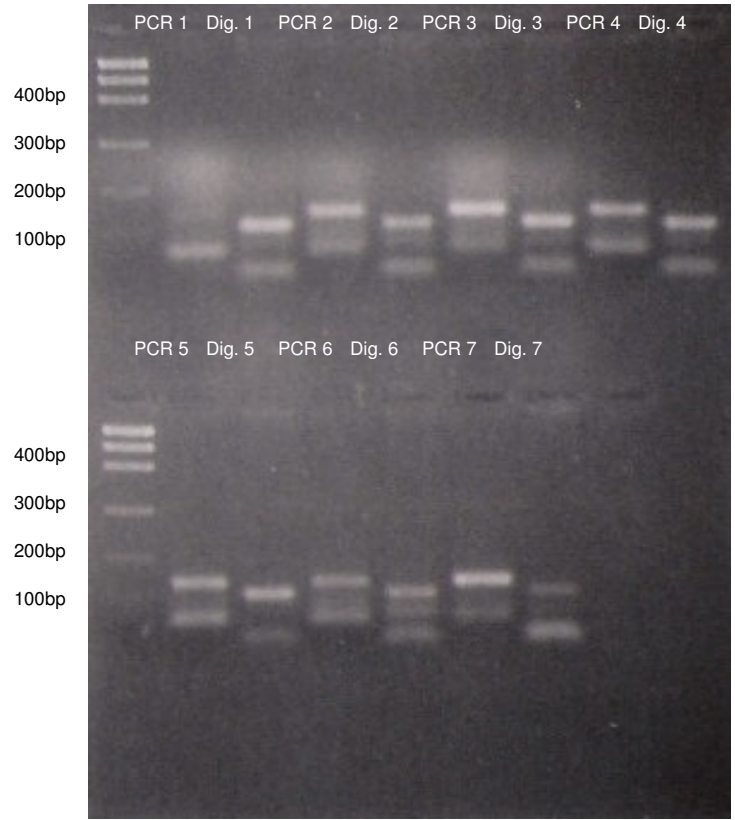
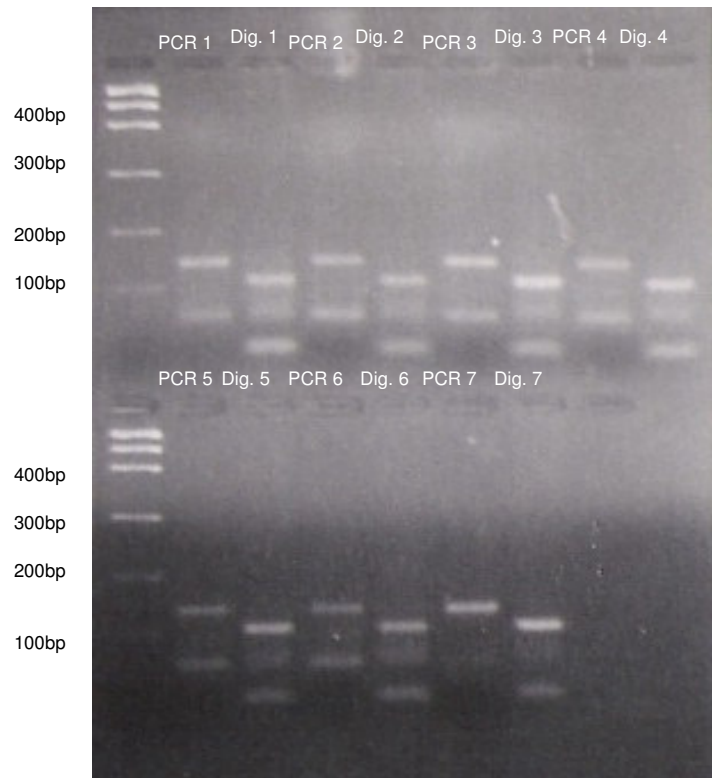


Figura 4: Amplificação (*PCR 1 a 7*) e digestão dos produtos de PCR (*Dig. 1 a 7*) com enzima BstNI de algumas amostras de *Herpailurus yagouaroundi*.



**The Lipoprotein Lipase Gene (LPL) and the absence of its Gly412Arg mutation in
two Neotropical feline species**

Vanessa Roma Moreno Cotulio¹, José Eduardo Garcia², Kátia Cassaro³, Edislane Barreiros de Souza⁴

¹ Departamento de Genética, Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu – São Paulo, Brasil

² Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, UEL, Londrina – Paraná, Brasil

³ Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo – São Paulo, Brasil

⁴ Departamento de Ciências Biológicas, FCL – UNESP, Assis – São Paulo, Brasil

GENETICS STUDY OF LIPOPROTEIN LIPASE (LPL) IN FELINES

Vanessa Roma Moreno Cotulio, Avenida Walter Antonio Fontana, nº 825, apto 611, Vila Cláudia, CEP 19815-340, Assis – São Paulo, Brasil. Telefone: (18)3324-4753, E-mail: bio_vanessa@hotmail.com

ABSTRACT

The lipoprotein lipase LPL is a crucial enzyme in the regulation of lipids and lipoproteins metabolism. It is mainly present in adipose and muscular tissue but also in others tissues as lungs and mammal glands for example. The LPL gene was described in many species including humans and cats. The gene nucleotide sequence is very similar between cats and humans. Moreover, there are important mutations in the LPL gene in both species. One of the most important mutations in cats is the Gly412Arg mutation, which can induce an LPL activity deficiency with several consequences to homozygous individuals. The purpose of this work was check the presence of this particular mutation in captive individuals of two Neotropical feline species: *Herpailurus yagouaroundi* and *Leopardus tigrinus*. The concerned site was amplified by PCR; the amplification products were submitted to the BstNI restriction enzyme digestion and than visualized in agarose gel. For all individuals, the PCR products size was the same (\pm 150bp). The enzymatic digestion occurred in all fragments identifying all individuals as normal homozygous for the Gly412Arg mutation. Therefore, this work contributed to assess the

LPL gene in these two wild cat species and to present a simple method to detect the presence or the absence of this mutation, which can be used in management plans of these captive animals.

Key words: *Herpailurus yagouaroundi*, *Leopardus tigrinus*, lipoprotein lipase (LPL), mutation, molecular genetics

INTRODUCTION

Many genetics and environmental factors control the mammal's triglyceride (TGs) and cholesterol plasmatic levels. The genetic influence on TGs levels includes, for example, the production and secretion control of TGs-rich lipoproteins as chylomicrons and VLDL - Very Low Density Lipoproteins; and lipolysis enzymes as the lipoprotein lipase (LPL), its activator (apolipoprotein C-II), and the hepatic lipase (Ma et al., 1994).

LPL enzyme is present predominantly in adipose and muscular tissues limited to vascular endothelium by interacting with glucosaminoglycans. In the adipose tissue, the released fatty acids are absorbed and reesterified and the TGs stocked into lipid drops (Goldberg, 1996; Zechner, 1997). The complete privation LPL, wich occurs in human, cats, and minks that are homozigous for mutations in the LPL gene (Murthy et al., 1996; Savonen et al., 1999), results into a plasmatic massive TGs accumulation, in agreement with the fact that LPL absence prevents the normal liberation of circulating TGs (Kratky et al., 2005).

Several mutations related to LPL gene are described in humans, some of them involved with the insufficiency of the LPL enzyme activity, whose symptoms are used to

18 appear soon in the childhood (Merkel et al., 2002; Ginzinger, 1996). There are similar
19 mutations in cats that result into the enzymatic loss of activity. One of them involves the
20 substitution of arginine for glycine at residue 412 (Gly412Arg) of LPL gene, resulting in
21 symptoms similar to those presents in LPL deficient humans (Ginzinger et al., 1996;
22 1999).

23 The purpose of this work was assess the genetic region involving the Gly412Arg
24 mutation at LPL gene in captive individuals of two Neotropical feline species
25 (*Herpailurus yagouaroundi* and *Leopardus tigrinus*) to develop another tool to manage
26 captive populations of wild species.

27 This is the first study related to LPL gene in wild cats, since there is any report of
28 this kind in the literature.

29
30
31

32 MATERIAL AND METHODS

33

34 For the present study, dermal tissue samples from 25 captive individuals of the
35 *Leopardus tigrinus* species and from 15 captive individuals of the *Herpailurus*
36 *yagouaroundi* species (Table 1 and 2) were collected by researchers from the Parque
37 Fundação Zoológico de São Paulo and stored in 100% ethanol for the analysis at the
38 Laboratório de Genética – UNESP – Assis/SP. Two fresh blood samples from *Felis*
39 *catus* cats (one Persian and the other Siamese) collected by the Hospital Veterinário of
40 the Universidade Estadual de Londrina/PR (UEL) were also used in this study. Total
41 DNA samples was isolated using Qiagen “DNeasy Tissue Kit” according to the

42 manufacturer procedure. The DNA quantification was made in agarose gel stained with
43 EtBr.

44 The LPL gene site involving the Gly412Arg mutation was amplified according to
45 conditions described by Ginzinger et al. (1999), using the I8 primer (5'-
46 ACCTGAACGTTGAAGGCTCCAAGAGTACCC-3') and the MM-SB mismatch primer (5'-
47 GGTTTACTATTGAGAAGA-TCAGAGTAA-AACCA-3') which creates a new restriction
48 site recognized by the BstNI restriction enzyme only at normal alleles. The amplification
49 were performed in 25 µl reaction containing 1,5 mM MgCl₂, 1.5 µl PCR 10X Buffer, 200
50 µM of dNTP, 100 pmol of each primer, 1.5 U Taq DNA Polymerase and 30 ng of
51 template DNA.

52 The PCR was performed in a Biometra Thermocycler (T1, Germany) at the
53 following conditions: 2 min at 94°C; 35 cycles - 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 45 s at
54 72°C; a final extension step for 5 min at 72°C; and finally, 10 min at 4°C. The
55 amplification products were visualized in 3% agarose gels and than photographed with a
56 Polaroid 667.

57 After checking the amplification products, 10 µl of each sample were submitted to
58 one hour of digestion using BstNI restriction endonuclease (BioLabs) at 60°C, according
59 to the manufacturer procedure: 1.5 µl 1X *NEBuffer* 2, 1.5 µl BSA and 5 U of enzyme in
60 15 µl final volume. The fragments obtained by digestion were separated by
61 electrophoresis than visualized and photographed in 3% agarose gel.

62

63

64

RESULTS

65

66

67 - **DNA extraction**

68 Using the method described above, the total DNA isolation yielded good quality
69 and sufficient amount for the PCR reactions of all 25 *L. tigrinus* and 15 *H. yagouaroundsi*
70 available samples, as well as two domestic cats samples used for analysis control.

71 The DNA quantification, made on agarose gels, was photographed and analyzed.
72 Each tissue sample resulted in one 200µl and one 100µl quota with a satisfactory yield
73 since there was a great amount of DNA and a low protein contamination, resulting in
74 good amplification patterns.

75

76

77 - **LPL gene amplification**

78 LPL gene amplification was performed with *F. catus* (standardizing and control),
79 *L. tigrinus* e *H. yagouaroundsi* DNA samples. The results visualized in agarose gels are
80 presented in Figures 1 and 2.

81 The fragment related to the LPL gene in cats was amplified in all species. In the
82 25 *L. tigrinus* samples, the amplification resulted in ± 150 bp fragments with no size
83 variation between the studied individuals. In the 15 *H. yagouaroundsi* samples, the
84 resulting amplification fragments were also ± 150 bp without size variation among
85 individuals.

86 LPL gene also amplified in Persian and Siamese domestic cats samples but the
87 amplification product size was a little smaller (± 130 bp).

88

89 - **Gly412Arg mutation analysis by “mismatch” PCR**

90 PCR products of all samples were digested at the enzyme restriction site,
91 indicating that wild cats have an identical region to the domestic cats. The digestion
92 results are presented in Figures 3 and 4.

93

94

DISCUSSION

95

96 Lipoprotein lipase is a key enzyme for lipids metabolism. It catalyzes the
97 triglycerids (TGs) hydrolysis of rich-TGs lipoproteins and acts increasing the lipoproteins
98 cellular binding (Wung et al., 2006).

99 Based on nucleotides sequence similarity between human and cat LPL gene,
100 Ginzinger et al. (1996) developed primers that might amplify a mutation site related to
101 LPL activity in cats and than study the cats genotype for this mutation. According to
102 these authors, the genotypes are defined as normal homozygotes (412 +/+ or *LL*),
103 heterozygotes (412 +/- or *Ll*) and homozygotes for the mutation (412 -/- or *ll*).

104 In their study, Ginzinger et al. (1996) recognized a 135bp-amplified region. In the
105 present study, using the same primers, the same LPL genetic region was detected as a
106 single amplification product in two Neotropical wild cats species: *H. yagouaroundi* and *L.*
107 *tigrinus*. Based on molecular weight markers used as size reference in agarose gels, the
108 amplification product size has ± 150 bp in this two species.

109 Until now, there isn't any published study reporting the assessment of the LPL
110 gene in wild cats. Our study contributes by identifying the presence of this gene in the
111 studied animals via PCR and analyzing the presence or not of its mutation.

112 There are several mutation related to LPL human gene, and consequently to the
113 lipids metabolism. Each mutation can be related to a different clinical manifestation in
114 patients and can occur in higher or lower frequency in humans (Merkel et al., 2002).
115 Although complete LPL deficiency mutations are not common in humans (one in a
116 million in the whole world), people carrying an LPL gene mutation are common (Jukema
117 et al., 1996; Reymer et al., 1995).

118 Ginzinger et al. (1996) propose a method based on mismatch PCR and restriction
119 enzyme digestion to detect the Gly412Arg mutation in genotypes of LPL deficient cats.
120 Based on this study, our work was realized to assess the same genetic site in this two
121 wild felines species, making possible the identification of the mutation when necessary
122 (in case the decease is reported in some animal).

123 The present study revealed the absence of the mutation in all analyzed
124 individuals characterizing them as normal homozygotes (*LL*), since the enzyme only
125 recognize the restriction site in alleles without the mutation, resulting in a fragment
126 smaller than the PCR amplification product.

127 Generally, cats with the Gly412Arg mutation are healthy. But there are two
128 problems for these animals production: the low reproduction performance of LPL
129 deficient females and the slow growth of LPL deficient kitten (Reginato et al., 2002).

130 Jones et al. (1986) and Ginzinger et al. (1996) studies simultaneously indicate that LPL
131 deficiency in reproductive females can influence in the offspring growth. Younglings born
132 from heterozygotes mothers (*Ll*) and who have 31 to 70% of normal activity of the LPL, can
133 be bigger and have a better growth performance that those born from homozygotes (*ll*) ones
134 who do not have active LPL.

135 The corporal composition analyses support the possibility that the maternal
136 deficiency of LPL affects the performance of the younglings. According to Backus et al.
137 (2001), *ll* adult cats present approximately half corporal fat mass comparing to cats with
138 functional LPL, whereas the corporal thin mass of these cats is not significantly different
139 from the normal one. The thinness degree between *ll* cats varies with the genotype of
140 the mother. In majority, *ll* cats born from *ll* mothers have substantially less corporal fat
141 than cats born from *Ll* mothers. The mechanism regarding this maternal effect is
142 unknown.

143 According to Reginato et al. (2002), the food composition ingested by the younglings with the
144 Gly412Arg mutation, and consequently an LPL deficiency, can influence the growth rate of
145 these animals. Their work indicates that the corporal fat mass in LPL deficient cats can be
146 increased with foods containing preferentially more carbohydrates than proteins. Moreover, the
147 subnormal corporal fat mass typically observed in reproductive LPL deficient females and a
148 reduced fat supply reduces its reproductive performance. Thus, the election of an adequate diet
149 to the animal possessing the Gly412Arg mutation genotype can greatly contribute with
150 management and reproduction of captive populations of wild cats. Our work breaks the path to
151 this possibility presenting an efficient method to detect the LPL gene and the Gly412Arg
152 mutation in felines.

153 Thus, although our studies evidences the absence of the mutation at the LPL
154 gene for all the 25 oncillas analyzed and the 15 jaguarundis, the identification possibility
155 of this mutation in captive animals using a simple method, collaborate for the attempt to
156 maintain genetically healthy populations of these species and other felines, making
157 possible the adequate management of the individuals. For example, individuals who
158 present clinical signals of pathology associated to the LPL gene mutation or a weak
159 performance of the younglings will be identified with a unique and simple PCR test.

160 Due to diverse factors, all the feline species are, in some level, threatened,
161 except the domestic cats, and the *ex situ* conservation of these animals has been an
162 important strategy in the attempt to preserve these feline species. Any information

163 regarding the genetic characteristics of these animals can help breeders and zoos
164 researchers, for example, to manage the reproduction and development of these
165 animals in captivity in the best way, aiming its preservation.

166

167

168

169

170

ACKNOWLEDGMENTS

171

172 We would like to show our appreciation to Mara Cristina Marques from Fundação
173 Parque Zoológico de São Paulo for the samples collect and to CAPES (Coordenação de
174 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support.

REFERENCES

BACKUS, R.C., D.G. GINZINGER, K.J. EXCOFFON, S.M. CLEE, M.R. HAYDEN, R.H. ECKEL, M.A. HICKMAN AND Q.R. ROGERS. 2001. Body fat mass and condition scores of mature cats with lipoprotein lipase deficiency vary with maternal expression of functional lipoprotein lipase. *American Journal of Veterinary Research* 62(2): 264-269.

GINZINGER, D.G., M.E. LEWIS, Y. MA, B.R. JONES, G. LIU AND S.D. JONES. 1996. A mutation in the lipoprotein lipase gene is the molecular basis of chylomicronemia in a colony of domestic cats. *The Journal of Clinical Investigation* 97(5): 1257-1266.

GINZINGER, D.G., S.M. CLEE, J. DALLONGEVILLE, M.E.S. LEWIS, H.E. HENDERSON, E. BAUJE, Q.R. ROGERS, D.R. JENSEN, R.H. ECKEL, R. DYER, S. INNIS, B. JONES, J.C. FRUCHART AND M.R. HAYDEN. 1999. Lipid and lipoprotein analysis of cats with lipoprotein lipase deficiency. *European Journal of Clinical Investigation* 29: 17-26.

GOLDBERG, I.J. 1996. Lipoprotein lipase and lipolysis: central role in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of Lipid Research* 37: 693-707.

JONES, B.R., A.C. JON=HNSTONE, J.L. CAHILL AND W.S. HANCOCK. 1986. Peripheral neuropathy in cats with inherited primary hyperchylomicronemia. *The Veterinary Record* 119: 268-272.

JUKEMA, J.W., A.J. VAN BOVEN, B. GROENEMEIJER, A.H. ZWINDERMAN, J.H. REIBER, A.V. BRUSCHKE, J.A. HENNEMAN, G.P. MOLHOEK, T. BRUIN, H. JANSEN, E. GAGNE, M.R. HAYDEN AND J.J. KASTELEIN. 1996. The Asp9 Asn mutation in the lipoprotein lipase gene is associated with increased progression of coronary atherosclerosis. REGRESS Study Group, Interuniversity Cardiology Institute, Utrecht, The Netherlands. Regression Growth Evaluation Statin Study. *Circulation* 94(8): 1913-1918.

KRATKY, D., R. ZIMMERMANN, E.M. WAGNER, J.G. STRAUSS, W. JIN, G.M. KOSTNER, G. HAEMMERTE, D.J. RADER AND R. ZECHNER. 2005. Endothelial lipase provides an alternative pathway for FFA uptake in lipoprotein lipase-deficient mouse adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation* 115(1): 161-167.

MA, Y., T.C. OOI, M-S LIU, H. ZHANG, R. McPHERSON, L. EDWARDS, I.J. FORSYTHE, J. FROHLICH, J.D. BRUNZELL AND M.R. HAYDENT. 1994. High frequency of mutations in the human lipoprotein lipase gene in pregnancy-induced chylomicronemia: possible association with apolipoprotein E2 isoform. *Journal of Lipid Research* 35: 1006-1075.

MERKEL, M., R.H. ECKEL AND I.J. GOLDBERG. 2002. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake and regulation. *Journal of Lipid Research* 43(12): 1197-2006.

MURTHY, V., P. JULIEN AND C. GAGNE. 1996. Molecular pathology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacology and therapeutics* 70(2): 101-135.

REGINATO, C.F., R.C. BACKUS AND Q.R. ROGERS. 2002. Improved growth of lipoprotein lipase deficient kittens by feeding a low-fat, highly digestible diet. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 149-156.

REYMER, P.W., E. GAGNE, B.E. GROENEMEYER, H. ZHANG, I. FORSYTH, H. JANSEN, J.C. SEIDELL, D. KROMHOUT, K.E. LIE, J. KASTELEIN *et al.*. 1995. A lipoprotein lipase mutation (Asn291Ser) is associated with reduced HDL cholesterol levels in premature atherosclerosis. *Nature Genetics* 10(1): 28-34.

SAVONEN, R., K. NORDSTOGA, B. CHRISTOPHERSEN, A. LINDBERG, Y. SHEN, M. HULTIN, T. OLIVECRONA AND G. OLIVECRONA. 1999. Chylomicron metabolism in an animal model for hyperlipoproteinemia type I. *Journal of Lipid Research* 40(7): 1336-1346.

WUNG, S.F., M.V. KULKARNI, C.R. PULLINGER, M.J. MALLOY, J.P. KANE AND B.E. AOUIZERAT. 2006. The lipoprotein lipase gene in combined hyperlipidemia: evidence of a protective allele depletion. *Lipids in health and disease* 5; 5:19.

ZECHNER, R. 1997. The tissue-specific expression of lipoprotein lipase implications for energy and lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology* 8(2): 77-88.

Table 1: Analyzed individuals of *Leopardus tigrinus*.

Specie	Laboratory Code	São Paulo Zoo Register nº	Origin
<i>Leopardus tigrinus</i>	Lt 1	22170	São Francisco Xavier/SP
	Lt 2	22111	Socorro/SP
	Lt 3	22727	Zôo Bauru/SP
	Lt 4	24348	Born at SP Zoo
	Lt 5	23957	Born at SP Zoo
	Lt 6	25246	Born at SP Zoo
	Lt 7	27670	Born at SP Zoo
	Lt 8	20251	Calcaia do Alto – Cotia/SP
	Lt 9	22641	Zôo Belo Horizonte/MG
	Lt 10	22101	Bragança Paulista/SP
	Lt 11	21500	Brusque/SC
	Lt 12	21292	Unknown
	Lt 13	20287	Zôo Camburiú/SC
	Lt 14	27612	Born at SP Zoo
	Lt 15	21537	Bauru/SP
	Lt 16	26435	Born at SP Zoo
	Lt 17	26106	Born at SP Zoo
	Lt 18	26107	Born at SP Zoo
	Lt 19	19156	Zôo Americana/SP
	Lt 20	22728	Zôo Bauru/SP
	Lt 21	22347	Zôo São Carlos/SP
	Lt 22	24069	Unknown
	Lt 23	18781	Unknown
	Lt 24	23275	Unknown
	Lt 25	21809	Altinópolis – Rib. Preto/SP

Table 2: Analyzed individuals of *Herpailurus yagouaroundi*.

Specie	Laboratory Code	São Paulo Zoo Register nº	Origin
<i>Herpailurus yagouaroundi</i>	Hy 1	25847	Born at SP Zoo
	Hy 2	20761	Born at SP Zoo
	Hy 3	24226	Born at SP Zoo
	Hy 4	22096	Born at SP Zoo
	Hy 5	21810	Mogi-Guaçu/SP
	Hy 6	23911	Born at SP Zoo
	Hy 7	29189	Born at SP Zoo
	Hy 8	23851	Born at SP Zoo
	Hy 9	21566	Limeira/SP
	Hy 10	27088	Born at SP Zoo
	Hy 11	24227	Born at SP Zoo
	Hy 12	27165	Born at SP Zoo
	Hy 13	23956	Born at SP Zoo
	Hy 14	27689	Born at SP Zoo
	Hy 15	24958	Born at SP Zoo

Figure 1: PCR amplification of the LPL gene in *H. yagouaroundi*.

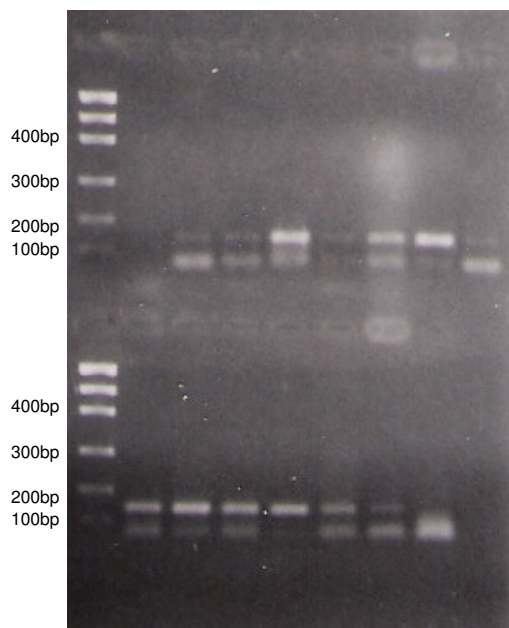


Figure 2: PCR amplification of the LPL gene in *L. tigrinus*.

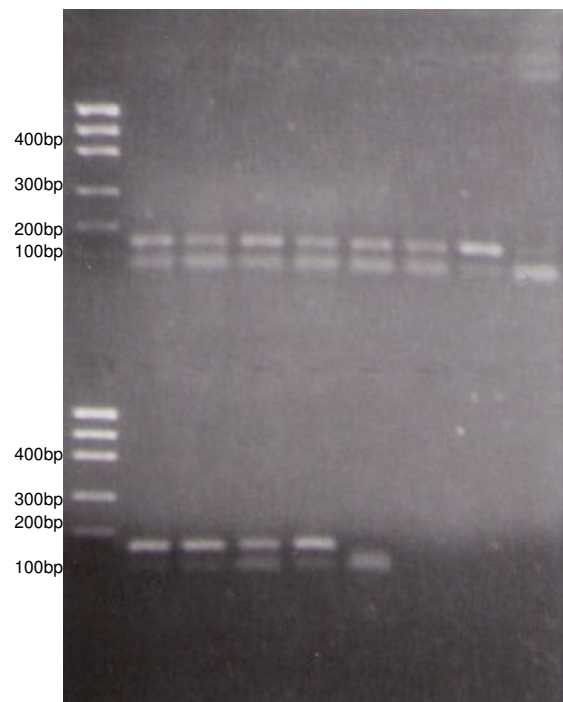


Figure 3: PCR amplification (*PCR 1 a 7*) and PCR products digestion (*Dig. 1 a 7*) with the BstNI enzyme in some *L. tigrinus* samples.

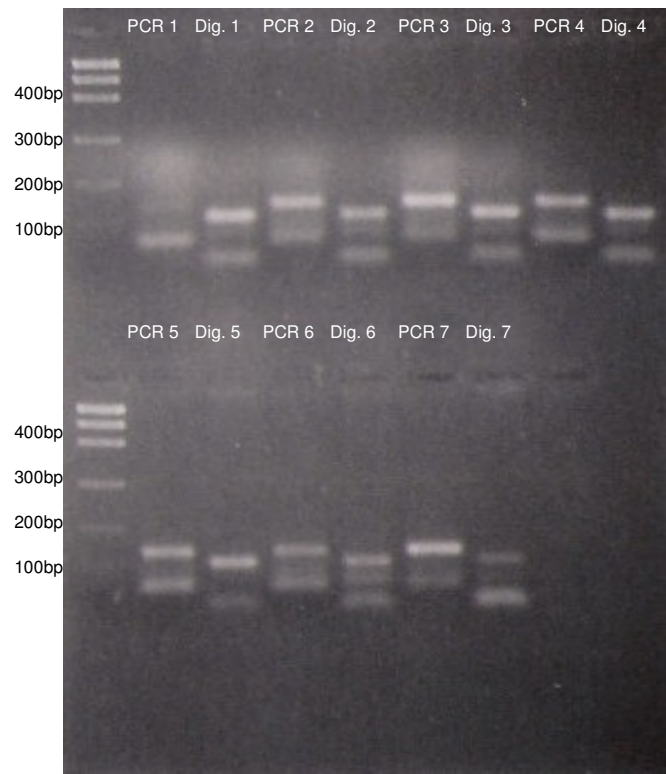
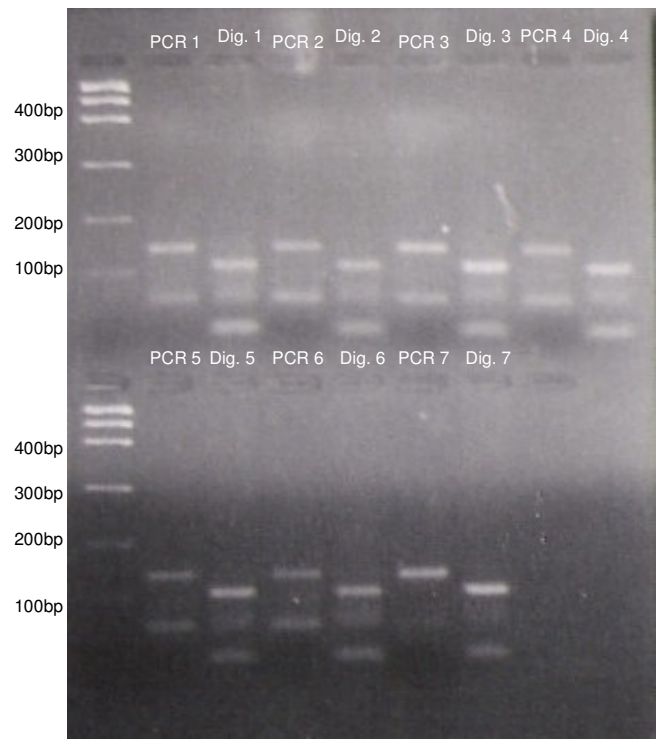


Figure 4: PCR amplification (*PCR 1 a 7*) and PCR products digestion (*Dig. 1 a 7*) with the BstNI enzyme in some *H. yagouaroundi* samples.



4. CONCLUSÕES

- ❖ As espécies de felinos analisadas (*L. tigrinus* e *H. yagouaroundi*) apresentam a mesma região gênica para a lipoproteína lipase (LPL) encontrada nos gatos domésticos.

- ❖ A técnica de PCR utilizando “*primers*” específicos, seguida do uso de digestão com a enzima BstNI é uma técnica simples e eficiente na caracterização da região do gene LPL e na identificação da mutação Gly412Arg tanto em gatos domésticos como em *L. tigrinus* e *H. yagouaroundi*.

- ❖ A caracterização do gene LPL e da mutação Gly412Arg em felinos silvestres mantidos em cativeiro fornece dados importantes que podem contribuir com preservação desses animais.

5. REFERÊNCIAS **BIBLIOGRÁFICAS**

BACKUS, R.C., D.G. GINZINGER, K.J. EXCOFFON, S.M. CLEE, M.R. HAYDEN, R.H. ECKEL, M.A. HICKMAN AND Q.R. ROGERS. Body fat mass and condition scores of mature cats with lipoprotein lipase deficiency vary with maternal expression of functional lipoprotein lipase. **American Journal of Veterinary Research** 62(2): 264-269, 2001.

BAUM, L.L. et al. Lipoprotein lipase mutations and Alzheimer's disease. **Am. J. Med. Genet.**, 88: 136-139, 1999.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – GATO DO MATO PEQUENO. Disponível em <http://www.nex.org.br/extincao_gato_pequeno.htm>. Acesso em Jan. 2007.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – JAGUARUNDI. Disponível em <http://www.nex.org.br/extincao_jaguarundi.htm>. Acesso em Jan. 2007.

EIZIRIK, E. et al. Conservation Genetics of Jaguars: Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). **Molecular Ecology**, v. 10, 65–79, 2001.

FELINOS SELVAGENS. Disponível em:
<<http://www.sueza.com.br/felinosselvagens/>>. Acesso em Dez. 2006.

FIDANI, L.D. et al. No association between the lipoprotein lipase S447X polymorphism and Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.**, 322: 192-194, 2002.

FONSECA, G.A.B. et al. (Eds.) **Livro vermelho dos mamíferos brasileiros ameaçados de extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1994. 479p.

FOOSE, T.J. The relevance of captive populations to the conservation of biotic diversity. In: SCHONEWALD-COX, C. M. *et al.* (Eds.), **Genetics and conservation**, Benjamin/ Cimmings, Menlo Park, CA, 1983, p. 104–85.

GATO DO MATO. Disponível em:
<<http://www.zoologico.sp.gov.br/mamiferos/gatodomato.htm>> Acesso em Dez. 2006.

GINZINGER, D.G., M.E. LEWIS, Y. MA, B.R. JONES, G. LIU AND S.D. JONES. A mutation in the lipoprotein lipase gene is the molecular basis of chylomicronemia in a colony of domestic cats. **The Journal of Clinical Investigation**, 97(5): 1257-1266, 1996.

GINZINGER, D.G., S.M. CLEE, J. DALLONGEVILLE, M.E.S. LEWIS, H.E. HENDERSON, E. BAUJE, Q.R. ROGERS, D.R. JENSEN, R.H. ECKEL, R. DYER, S. INNIS, B. JONES, J.C. FRUCHART AND M.R. HAYDEN. Lipid and lipoprotein analysis of cats with lipoprotein lipase deficiency. **European Journal of Clinical Investigation**, 29: 17-26, 1999.

GREEN, R. **Wild cats species of the world**. Basset Publications, Plymouth, U.K., 1991, 163p.

GRISOLIA, A.B. et al. Genetic diversity of microsatellite loci in *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii* and *Leopardus tigrinus*. **Genetics and Molecular Research**. In press.

HENDERSON, H. et al. A novel Glu421Lys substitution in the lipoprotein lipase gene in pregnancy-induced hypertriglyceridemic pancreatitis. **Clin. Chim. Acta**, 269: 1-12, 1998.

HUBEL, C.A., ROBERTS, J.M., FERREL, R.E. Association of pre-eclampsia with common coding sequence variations in the lipoprotein lipase gene. **Clin. Genet.**, 56:289-296, 1999.

JAGUARUNDI. Disponível em <<http://www.cathouse-fcc.org/images/maya5hmon.jpg>>. Acesso em Dez. 2006.

JAGUARUNDI. Disponível em <<http://www.paginadogaicho.com.br/faun/mami.htm>>. Acesso em Dez. 2006.

KEILSON, L.M. et al. Hyperlipidemia and pancreatitis during pregnancy in two sisters with a mutation in the lipoprotein lipase gene. **Intern. Med.**, 124: 425-428, 1996.

MATTERN, M.Y., McLENNAN, D.A. Phylogeny and Speciation of Felids. **Cladistics**, 16: 232–253, 2000.

MENOTTI-RAYMOND, M. et al. A Genetic Linkage Map of Microsatellites in the Domestic Cat (*Felis catus*). *Genomics*, 57, 9 – 23, 1999.

MENOTTI-RAYMOND, M.A.; O'BRIEN, S.J. Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. **The Journal of Heredity**, 86(4): 319–322, 1995.

MERKEL, M., R.H. ECKEL AND I.J. GOLDBERG. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake and regulation. **Journal of Lipid Research**, 43(12): 1197-2006, 2002.

MONDOLFI, E. Notes on the biology and status of the small wild cats in Venezuela. In: MILLER, S.D., EVERET, D.D. **Cats of the world: biology, conservation and management**. Natl. Wild. Fed., Washington, p.125-146, 1986.

MORENO, V.R. et al. Genetic variability of *Herpailurus yagouaroundi*, *Puma concolor* and *Panthera onca* (Mammalia – Felidae) studied using *Felis catus* microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29(2): 290-293, 2006.

NEIGEL, J.E. Estimation of effective population size and migration parameters from genetic data. In: SMITH, T. B.; WAYNE, R. K. (Eds.), **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. New York: Oxford University Press, 1996, pp. 329–346.

NOWAK, R.M. **Walker's Mammals of the World**, 5 ed., vol. II, Baltimore and London, The Johns Hopkins University Presser, 1991, 1630p.

O'BRIEN, S.J. Genetic introgression within the Florida panther *Felis concolor coryi*. **National Geographic Research**, 6 (4): 485–494, 1990.

O'BRIEN, S.J. Conservation genetics of Felidae. In: AVISE, J.C., HAMRICK, J.L. (eds.) **Conservations genetics: case histories from nature**. New York: Chapman & Hall, New York, 1996, 512p.

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

OLIVEIRA, T.G., CASSARO, K. **Guia de identificação dos felinos brasileiros**. 2. ed. São Paulo: Sociedade Zoológicos do Brasil, 1999. 60p.

PRIMACK, R.B., RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**, 1. ed, Midiograf, Londrina, 2001, 328p.

REGINATO, C.F., R.C. BACKUS AND Q.R. ROGERS. Improved growth of lipoprotein lipase deficient kittens by feeding a low-fat, highly digestible diet. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 13: 149-156, 2002.

SAVONEN, R., K. NORDSTOGA, B. CHRISTOPHERSEN, A. LINDBERG, Y. SHEN, M. HULTIN, T. OLIVECRONA AND G. OLIVECRONA. Chylomicron metabolism in an

animal model for hyperlipoproteinemia type I. **Journal of Lipid Research**, 40(7): 1336-1346, 1999.

SHANKARANARAYANAN, P. et al. Genetic variation in asiatic lions and indian tigers. **Electrophoresis**, 18:1693–1700, 1997.

SPRECHER, D.L. et al. Higher triglycerides, lower high-density lipoprotein cholesterol, and higher systolic blood pressure in lipoprotein lipase-deficient heterozygotes. A preliminary report. **Circulation**, 94: 3239-3245, 1996.

TALMUD, P.J., STEPHENS, J.W. Lipoprotein lipase gene variants and the effect of environmental factors on cardiovascular disease risk. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 6(1): 1-7, 2004.

WEINSTOCK, P.H. et al. Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 94: 10261-10266, 1997.

WILDCATS. Disponível em <<http://m1.aol.com/cattrust/wildcats.htm>>. Acesso em Dez. 2006.

WU, D.A. et al. Quantitative trait locus mapping of human blood pressure to a genetic region at or near the lipoprotein lipase gene locus on chromosome 8p22. **J. Clin. Invest.**, 97: 2111-2118, 1996.

APÊNDICES

RELAÇÃO DOS APÊNDICES

APÊNDICE 1: Normas para publicação na *Journal of Wildlife Diseases*.

APÊNDICE 2: Artigo publicado na *Genetics and Molecular Biology*.

APÊNDICE 1:

Normas para publicação na *Journal of Wildlife Diseases*.

JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

A copy of the Submission Form from the most recent January issue of the Journal or from www.wildlifedisease.org must be completed, signed, and included with the submitted manuscript. Ethical Guidelines to Publication in the Journal of Wildlife Diseases are printed in the January 1996 issue of the Journal and are posted at our web site. Manuscripts submitted to the Journal generally receive two or more evaluations from external reviewers and an appropriate Assistant Editor. Although the review process for most manuscripts is handled through Assistant Editors, all correspondence is to be through the office of the Editor. If you have questions during the preparation of a manuscript please feel free to contact the Editor at jwd@uwyo.edu.

Preparation of Manuscripts

The manuscript should be in Journal format because this greatly facilitates the review and editorial process. See below and consult a recent issue of the Journal for details. Manuscripts submitted in hard copy should be on white paper and submitted in quadruplicate; include four copies of all illustrations. Keep a copy of the manuscript and all illustrations in your files. Manuscripts submitted electronically must be in WordPerfect, MS Word, or compatible format. The manuscript text, tables, and figures should be submitted as separate files.

General Instructions

Each manuscript should have >25 mm margins all around and be typed in 12 point font (Times New Roman, Courier, or Arial preferred). Lines of type should not be justified to the right and contain no end-of-the line hyphens. Double-space (three lines per 25 mm) all parts of the manuscript, including the title page, Literature Cited, and tables. Please use the American form of English for spelling. Number all pages in the upper right corner, starting with the title page. Lines should be numbered in initial submission because this facilitates the review process.

For full-length manuscripts the first page should be a title page containing a Running Heading consisting of authors' last names and an abbreviated title consisting

of < 75 characters (including spaces), the full title, the authors' names, the authors' affiliations and the name, address, phone and fax numbers, and email address of the corresponding author. The next pages should contain the Abstract, four to eight Key Words (or phrases) for indexing, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, Literature Cited, tables (each table on a separate page), and the Legend for Figures (also on a separate page).

Shorter manuscripts such as research notes and case reports are published under Short Communications; these are usually about 2000 words in length, including the Literature Cited. Their first (title) page should have a Running Heading entitled "Short Communications," the full title, the authors' names and affiliations, and the name, address, phone and fax numbers, and email address of the corresponding author. The following page should contain a short Abstract (< 5% of the length of the paper), four to eight Key Words (or phrases) for indexing, and then continue right on with the main body of the paper without subheadings, Literature Cited, tables (each table on a separate page) and the Legend for Figures (also on a separate page).

All manuscripts should provide a clear statement of the objective(s), such as the hypothesis tested or the question addressed. Degrees and minutes for latitude and longitude of all study areas should be identified. Give the inclusive dates of the study, both in the Abstract and the main body of the text. Provide enough detail or documentation of the materials and methods so that a skilled worker could repeat the study. The manufacturer's name and address for each specialized chemical and specialized item of equipment mentioned should be identified in the text. Provide the genus and species of each organism the first time it is given in the Abstract, and again in the text. Write out acronyms and genera the first time they are used, and when they are used as the first word of a sentence. Write out all numbers under ten unless they are associated with units of measure. Give references for all factual statements, and for all statistical tests used in the study. Provide a standard error or standard deviation measure for all mean values reported. Use no more than two significant digits in reporting percent and probability values. Metric and SI units should be used. Avoid lengthy descriptions of individual animals or lesions; summarize the findings to highlight the significant points. Write the paper in a past-tense style, unless a generalization is presented. As a rule, please use only one literature citation to make each point in the text; omit redundant citations; if multiple citations are required in the text, list them in chronological order, from oldest to most recent. Meeting abstracts,

unpublished materials, and non-peer reviewed materials generally are not acceptable as citable materials; exceptions must be justified by the authors. Theses and dissertations, state and federal documents intended for professional distribution, and peer-reviewed proceedings of meetings generally are acceptable citations. If personal communications are used they must be verified by enclosing a copy of the manuscript page on which the citation occurs with the person's signature of approval on the same page. The signed manuscript page should then be submitted to the Editor along with the manuscript. Proof of acceptance for all "in press" manuscripts cited must accompany the submitted manuscript; this may include a letter of acceptance from the editor of the publication in which the "in press" manuscript will appear. Authors are encouraged to address the management implications of their findings.

Tables

For tables, omit all vertical lines: place single horizontal lines under the title, under the column headings, and at the bottom of the table, just above any foot notes. Do not enclose tables or figures with lines or other borders. Footnotes in the table should be identified by superscript lower case letters. Use the table functions on your word processor if preparing manuscripts electronically.

Figures

If you are submitting in hard copy, four sets of high contrast glossy prints or high quality prints from a laser printer of all figures must be submitted. These must be in sharp focus. Mount a scale bar directly on all photomicrographs; the metric equivalent of the scale bar may be given directly on the figure or defined in the figure legend. Maps require both a scale bar and a north directional arrow. Mark each figure on the back with the figure number and author's name. The top of each figure must be indicated by the word "top" on the back along with an arrow pointing to the top as it should be printed. Trim each figure to remove extraneous material and to emphasize the significant features. You may submit your manuscript in electronic format and the figures in hard copy if you wish.

Figures submitted electronically must be prepared as described above. They should be submitted in tagged image file format (.tiff); files in JPEG, CorelDraw, and PowerPoint are usually NOT acceptable (the quality is just not adequate for acceptable reproduction). Resolution should be 1,200 dpi for line art (drawings and

graphs) and 300-600 dpi for half-tones; combinations should be at 600 dpi. Color figures are acceptable, but the additional printing costs will be borne by the authors. Files may be compressed for submission.

The Journal prints high quality black and white figures on the cover each issue. These are drawn from photographs published in the issue or of related subjects. Authors are encouraged to submit suitable photographs to be considered for the Journal cover.

Literature Cited

See General instructions (above) for style of citation (author, year) in the body of the text. The Literature Cited section of the manuscript should be prepared in appropriate Journal style. Please refer to the following examples or to a recent issue of the Journal:

Article in a journal:

- SMITH, A. B., AND C. D. JONES. 1994. Hepatitis of viral origin in Leporidae: Introduction and etiological hypotheses. *Journal of Wildlife Diseases* 25: 000-000.
- _____, _____, AND, E. F. GARWIN. 1995. An outbreak of cowpox in captive cheetahs: Virological and epidemiological studies. *Journal of Hygiene* 89: 000-000.

Chapter in an book or edited book:

- SMITH, A. B. 1998. The insects of Australia. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of Entomology, 2nd Edition, Melbourne University Press, Melbourne, Victoria, Australia, 542 pp.
- JONES, C. D. 1997. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 153 pp.
- JORDAN, F. T. 1996. Avian mycoplasmosis. *In* Poultry diseases, F. T. Jordan and M. Pattison (eds.). W. B. Sanders Company Ltd., Philadelphia, Pennsylvania, pp. 81-93.

Proceedings:

- CHRISTOPHER, M. M., K. A. NAGY, I. WALLIS, J. K. KLASSEN, AND K. H. BERRY. 1997. Laboratory health profiles of desert tortoises in the Mojave Desert: A model for health status evaluation of chelonian populations. *In* Proceedings:

Conservation, Restoration, and Management of Tortoises and Turtles - an International Conference, J. Van Abbema (ed.). New York Turtle and Tortoise Society, New York, New York, pp. 76-82.

SCHUBERT, B. 1995. Quantitative determination of methylxanthines and methyluric acids in urine from horse and dog by solid phase extraction - HPLC. *In* Proceedings of Racing Analysts and Veterinarians, Stockholm, Sweden, P. Kallings, U. Bondesson and E. Houghton (eds.). R&W Publications, Newmarket, UK, pp. 364-366.

Dissertation/Thesis:

HOOPER, T. R. 1967. An urban environment as an ecological trap for Cooper's hawks. Ph.D. Dissertation, University of Arizona, Tucson, Arizona, 85 pp.

HATHAWAY, S. C. 1978. Leptospirosis in free living animals in New Zealand, with particular reference to the possum (*Trichosurus vulpecula*). Ph.D. Thesis, Veterinary Pathology and Public Health, Massey University, Palmerston North, New Zealand, 434 pp.

Submission of Manuscripts

Send four copies of the manuscript (if submitted as hard copy) or an electronic version of the manuscript by email and a completed copy of the Submission Form to: Drs. Elizabeth Howerth and David Stallknecht, Co-Editors, Journal of Wildlife Diseases, c/o Ms. Louise Smithson, Department of Veterinary Sciences, University of Wyoming, 1174 Snowy Range Road, Laramie, Wyoming 82070, USA; Tel. (307)742-6638; FAX (307)721-2051, email (preferred) jwd@uwyo.edu. Following the review process, manuscripts will be forwarded to the Editor from the Assistant Editors for final consideration, editing, and further correspondence with the authors. A diskette or email file containing the final revised manuscript (in WordPerfect, MS Word, or compatible formats) must be submitted to the Editor. Accepted manuscripts are subject to editing by the Editor and the Printer.

Any similarities between data in the manuscript and those in other publications or concurrent manuscripts by the same author(s) must be explained and copies of such publications or manuscripts must be provided. The Journal of Wildlife Diseases, as the primary publication of the Wildlife Disease Association subscribes to the rules, regulations, and laws pertaining to endangered species and humane treatment of

animals as established by national and international agencies of all countries represented by WDA membership.

Publication charges are \$65.00 (US) for each page of printed material when submitted by a member (corresponding author) of the Wildlife Disease Association. Non-members are charged at the rate of \$120.00 per printed page. Non-members may apply for membership at www.wildlifedisease.org Charges for reprints depend upon the number of pages the article contains and the number of copies ordered. A reprint schedule and order form normally is mailed to authors with the page proofs. Authors are expected to assume full responsibility for all page charges (including color figures, if applicable) and reprint costs.

The following guidelines for authors are drawn from the Ethical Guidelines to Publication in the Journal of Wildlife Diseases, published in the Journal of Wildlife Diseases (Vol. 32, pp. 163-167, 1996) and at www.wildlifedisease.org they are reprinted here for your information.

RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

1. The ultimate responsibility for all material published in the manuscript lies with the author(s). An author is obligated to present an accurate account of the research performed as well as an objective discussion of its significance. All work must be free of any plagiarism, falsification, fabrications, or omission of significant material.
2. Because journal space is limited and costly, an author has an obligation to use it wisely and economically.
3. A primary research report should contain sufficient detail and reference to public sources of information to permit the evaluation and repetition of the study by skilled workers.
4. An author should cite those publications that have been influential in determining the nature of the reported work and that will guide the reader quickly to the earlier work that is essential for understanding the present investigation. Conflicting evidence from the work of others should be included to help readers judge the soundness of the conclusions presented in the manuscript. Except in a review, citation of work that is not essential to building a foundation or interpreting the reported research should be avoided.
5. Any previously unrecognized and unusual hazards identified in an investigation should be clearly noted in a manuscript in which that work is reported.

6. Authors are responsible to be aware of, and adhere to, all laws, treaties, and regulations currently applying to their work. This includes the review and approval of the research protocol by an institutional animal care and use committee, where applicable, and the acquisition of all appropriate permits.
7. Fragmentation of research reports should be avoided. A scientist who has done extensive work on a system or group of related systems should organize the publications so that each report gives a well-rounded account of a particular aspect of the general study. Fragmentation excessively consumes journal space and unduly complicates literature searches. The convenience of readers is served if reports on related studies are published in the same journal, or a small number of journals.
8. Research findings should not be presented as original material in more than one scientific publication. It is inappropriate for an author to submit manuscripts describing essentially the same research to more than one journal, except for the resubmission of a manuscript rejected by, or withdrawn from, another journal.
9. In submitting a manuscript for publication, an author should inform the editor of related manuscripts that the author has under editorial consideration or in press. The relationships of such manuscripts to the one submitted should be clarified, and copies of the related manuscripts should be included with the manuscript submission.
10. An author should identify the source of all information quoted or offered, except that which is common knowledge. Information obtained privately, as in conversation, correspondence, or discussion with third parties, should not be used or reported in the author's work without explicit permission from the investigator with whom the information originated, usually by a personal communication. Information obtained in the course of professional services, such as reviewing manuscripts or grant applications, should also be treated as confidential.
11. Strong criticism of the work of another scientist may be given. However, in no case is sarcasm or criticism of a personal nature appropriate. Authors of a criticized work will have the opportunity to respond.
12. The co-authors of a paper should be those persons who have made significant scientific contributions to the work reported and who share responsibility and accountability for the results. Other contributions should be indicated in the Acknowledgments section. Deceased persons who meet the criterion for inclusion

as co-authors should be so included, with a footnote indicating their death. No fictitious name should be included as an author or co-author. The author who submits a manuscript for publication accepts the responsibility of having included as co-authors all persons appropriate and none inappropriate. The submitting author should have sent each co-author a draft copy of the manuscript and have obtained the co-author's assent to co-authorship of it.

13. All funding sources should be identified in the manuscript. Authors should disclose to the editor any potential conflict of interests, such as consulting or financial interest in a company, that might be affected by publication of the results contained in a manuscript. Authors should ensure that no contractual relations or proprietary considerations exist that would affect the publication of information in a submitted manuscript.
14. When appropriate, representative biological material should be deposited in a nationally or internationally recognized professional museum. Accession numbers should be reported in the manuscript.

APÊNDICE 2:

Artigo publicado na *Genetics and Molecular Biology*.