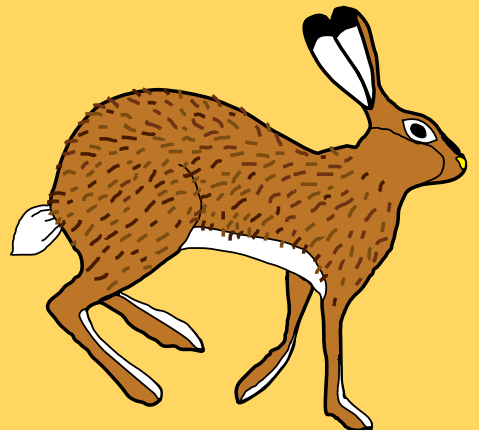
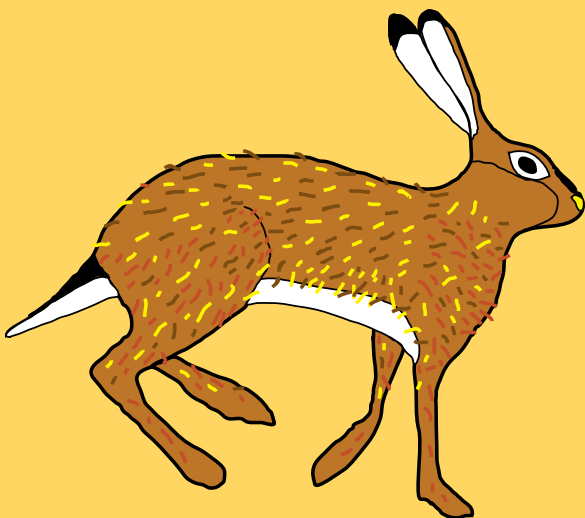


# LEBRES FANTASMAS

## A Evolução das Lebres na Península Ibérica



## EDIÇÃO

Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos  
(CIBIO/InBIO) da Universidade do Porto  
Julho de 2015

Edição simultânea em português, castelhano e inglês.

Tradução: Rita Campos e Pelayo Acevedo.

Revisão (versão em inglês): James D. Harris.

ISBN 978-989-98732-6-1

DESIGN Joana Monteiro

Sugestão de citação: Campos R; Melo-Ferreira J, Acevedo P. (2015).

Lebres fantasmas: a evolução das lebres na Península Ibérica. CIBIO,  
Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos. Porto,  
Portugal.

Este livro electrónico é distribuído gratuitamente e sem restrições ao seu  
uso desde que o seu conteúdo não seja alterado nem seja usado para fins  
comerciais.

A edição deste livro foi financiada por EcoMito (EXPL/AAG-  
MAA/1082/2013), projecto de investigação do Programa Operacional  
Potencial Humano (POPH) - Quadro de Referência Estratégico Nacional  
(QREN) do Fundo Social Europeu e do Ministério da Educação e  
Ciência do Governo Português.



# LEBRES FANTASMAS

## A Evolução das Lebres na Península Ibérica

### AUTORES

Rita Campos  
José Melo-Ferreira  
Pelayo Acevedo

Centro de Investigação  
em Biodiversidade  
e Recursos Genéticos  
(CIBIO/InBIO)  
da Universidade do Porto,  
Portugal

Instituto de Investigação  
em Recursos Cinegéticos,  
Espanha

## AGRADECIMENTOS

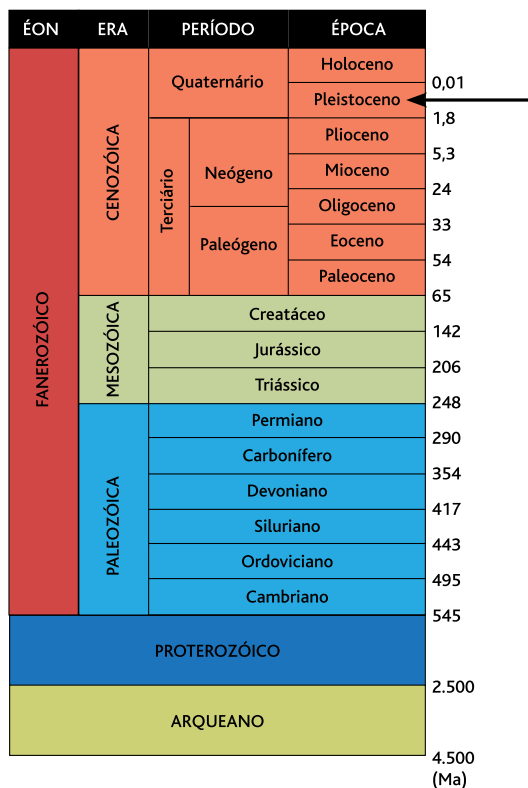
Devemos um agradecimento às sociedades de caçadores as facilidades concedidas durante todos estes anos no acesso a amostras dos animais caçados, sem os quais todos estes estudos não teriam sido possíveis. Nestes últimos tempos alguns dos mais activos foram os caçadores de Arcediano e Narros de Matalayegua (Salamanca), de Santa Marta de Magasca e Plasencia (Cáceres), de Burgos, de Villarta de San Juan (Cidade Real), e os galgheiros de Palencia, de Cuéllar y Cantimpalos (Segóvia), de Móstoles (Madrid), de Villaluenga de la Sagra (Toledo) e de Miguelturra (Cidade Real). Deixamos também um agradecimento ao Paulo Célio Alves pelas sugestões e comentários à versão final deste documento.

R. Campos e J. Melo-Ferreira são investigadores de pós-doutoramento (SFRH/BPD/64365/2009) e auxiliar (IF/00033/2014), respectivamente, da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), financiados no âmbito do QREN-POPH e participado pelo Fundo Social Europeu e pelo Ministério da Educação e Ciência. P. Acevedo tem um contrato financiado pelo Ministério da Economia e Competitividade (MINECO) e pela Universidade de Castela-Mancha, ao abrigo do programa Ramon y Cajal (RYC-2012-11970).

- *Muita, muita neve!*
- *Mesmo?*
- *E gelo. Estava tudo gelado! Ou melhor, tudo não, havia umas zonas sem neve, onde até havia comida e sítios para dormir.*
- *Refúgios?*
- *Isso! Havia refúgios. Eram bons para as que tinham frio. As outras viviam bem na neve. E olha que havia muita, muita neve!*

Há cerca de 21 mil anos a Península Ibérica estava muito gelada e grande parte da Europa estava mesmo coberta de neve! Estávamos no final do Pleistoceno, a época geológica do período Quaternário que antecedeu a actual, o Holoceno. E foi durante esta época que uma grande parte do planeta viveu muitos eventos glaciares e é por isso que o Quaternário é também conhecido como o período glacial. Período glacial moderno, porque houve outros quatro! Uma das grandes consequências destas oscilações climáticas foi a alteração da distribuição geográfica e variabilidade genética das espécies, principalmente daquelas que viviam nas regiões mais afectadas pelas glaciações.

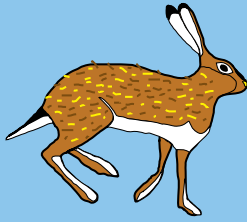
Mas porque estamos a falar em Quaternário, Pleistoceno, Península Ibérica, Europa e neve? Porque vamos falar de lebres!



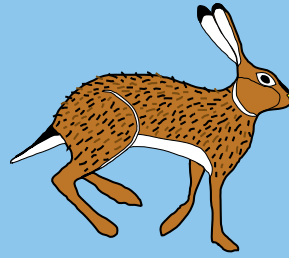
A história do planeta Terra divide-se em vários momentos. Durante o Pleistoceno, assinalado com uma seta, ocorreram profundas oscilações climáticas que influenciaram a evolução de muitos seres vivos, entre os quais as lebres ibéricas e europeias.

## DESIGNAÇÃO CIENTÍFICA DAS LEBRES

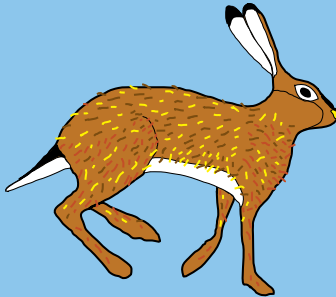
As lebres são lagomorfos, ou seja, são mamíferos que pertencem à ordem Lagomorfa. Nesta ordem reconhecem-se duas famílias: os ootonídeos (Ochotonidae) e os leporídeos (Leporidae). As lebres, assim como os coelhos, pertencem a esta última família. Esta é uma família grande: é composta por 11 géneros. As lebres pertencem ao género *Lepus*, que, por sua vez, é também bastante rico em espécies: reconhecem-se actualmente 32 espécies de lebres! As protagonistas desta história pertencem às espécies *Lepus granatensis* (a lebre ibérica), *Lepus castroviejo* (a lebre de piornal), *Lepus europaeus* (a lebre europeia) e *Lepus timidus* (a lebre variável).



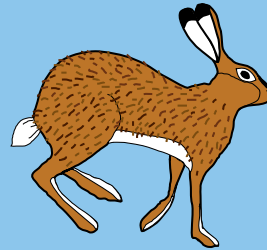
LEBRE  
IBÉRICA



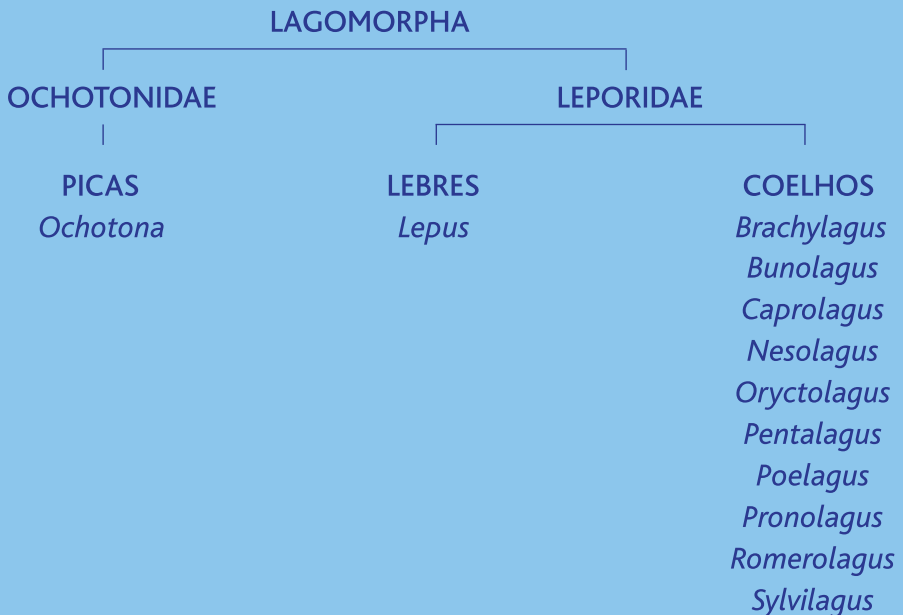
LEBRE DE  
PIORNAL



LEBRE  
EUROPEIA

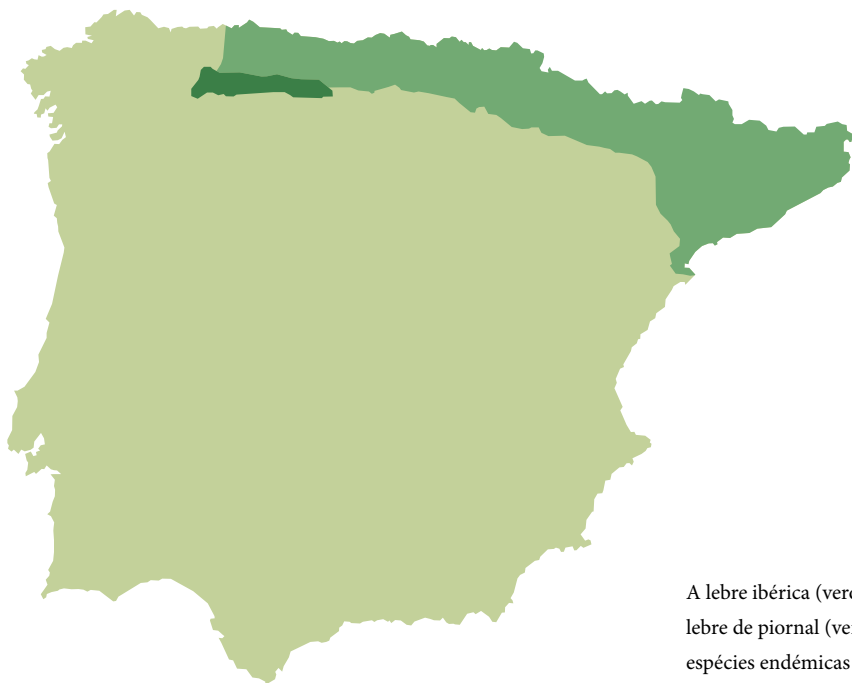


LEBRE  
VARIÁVEL



Actualmente vivem na Península Ibérica três espécies de lebre: a lebre ibérica, a lebre de piornal e a lebre europeia. A lebre europeia também existe noutros países europeus e do médio oriente, como a Alemanha ou o Iraque, mas as lebres ibérica e de piornal apenas se encontram na Península Ibérica. A lebre ibérica ocupa quase toda a Península, excepto a faixa mais a norte entre as Astúrias e a Catalunha, onde vive a lebre europeia, e a lebre de piornal apenas se encontra na cordilheira cantábrica.

Estas são as espécies que habitam a Península Ibérica nos nossos dias. Só que há muitos anos – 21 mil anos! – vivia na Península Ibérica uma outra espécie de lebre: a lebre variável.

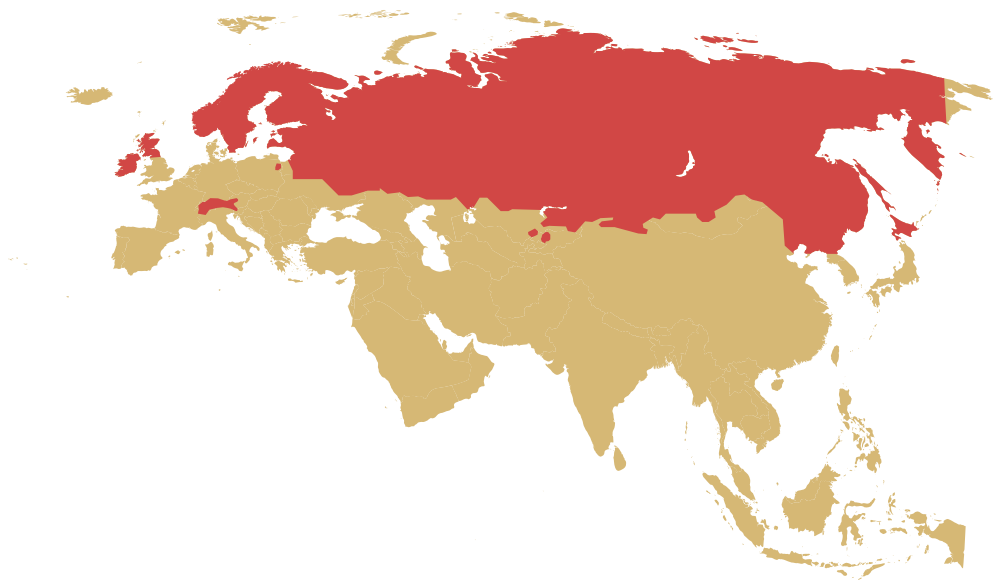


A lebre ibérica (verde claro) e a lebre de piornal (verde escuro) são espécies endémicas da Península Ibérica, ou seja, apenas habitam nesta região. A lebre ibérica encontra-se distribuída por grande parte do território da Península Ibérica, enquanto a lebre do piornal habita apenas a região dos montes Cantábricos. A lebre europeia (verde médio) ocupa a região norte da Península.



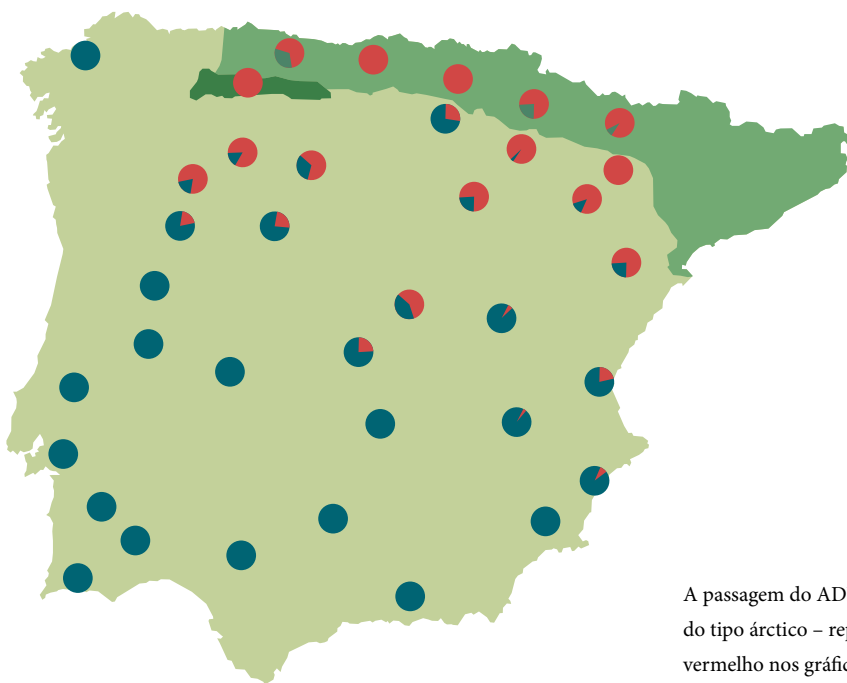
A lebre variável é uma espécie bem adaptada para viver em regiões de baixas temperaturas e com períodos prolongados de neve. E há cerca de 21 mil anos, durante as glaciações do Quaternário, a Península Ibérica oferecia essas condições. Hoje esta espécie já não pode ser encontrada na Península mas os seus vestígios sim.

Os registos fósseis mostram que durante o Pleistoceno a lebre variável viveu em zonas onde hoje não a encontramos, tais como a Península Ibérica ou o sul de França. Mostram ainda um facto curioso: as áreas onde a lebre variável viveu durante os ciclos glaciares do Pleistoceno sofreram alterações de tamanho. Porque é que este resultado é importante para esta história? Porque estas alterações permitiram que as lebres variáveis tivessem oportunidade de contactar com outras lebres, aumentando a probabilidade de cruzamentos e consequente troca de material genético entre indivíduos das diferentes espécies!



A lebre variável é uma espécie boreal/ártica que habita o norte da Eurásia; na Escócia, Polónia, Alpes e Japão encontram-se populações isoladas desta espécie.

A prova de que de facto ocorreram cruzamentos entre lebres variáveis e as espécies que hoje vivem na Península Ibérica é que, apesar de já não haver lebres variáveis nesta região, o seu ADN persistiu. A análise de muitos indivíduos das três espécies ibéricas mostrou que todos os indivíduos de lebre de piorral e quase todos os de lebre europeia que vivem na Península Ibérica têm ADN mitocondrial de lebre variável. Este ADN é também muito frequente em indivíduos de lebre ibérica que vivem na metade norte da Península.



A passagem do ADN mitocondrial do tipo ártico – representado a vermelho nos gráficos circulares – para as lebres da Península Ibérica foi um fenómeno em larga escala, que afectou as três espécies ibéricas, a lebre ibérica (a verde claro), a lebre de piorral (a verde escuro) e a lebre europeia (a verde médio). No entanto, a frequência da passagem foi superior na região norte da Península.

## LEBRES E ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS

As rápidas alterações climáticas que o planeta Terra vem sofrendo devido às acções humanas irão afectar principalmente espécies com requisitos ecológicos mais específicos, ou seja, espécies que apenas conseguem viver em locais com determinadas características. No caso das lebres, estas alterações climáticas poderão ter um grande impacto na sua sobrevivência a longo prazo. Um exemplo disso é a nossa já conhecida lebre variável. A utilização de modelos climáticos já deixou antever que esta espécie tem preferência por zonas frias, com um marcado contraste entre temperatura de dia e de noite e que tenham verões muito secos.

As espécies que têm uma maior dependência pela temperatura máxima serão as que apresentarão maior sensibilidade para as alterações climáticas porque este limite termal é altamente conservado na natureza. E isso significa o quê? Significa que as espécies que vivem em zonas com temperaturas próximas das temperaturas máximas que conseguem suportar são as que terão mais dificuldade em adaptar-se ao aquecimento do planeta.

Na verdade, o aquecimento global causado pelo Homem já está a afectar a sobrevivência da lebre variável em alguns locais, como os Alpes e no limite sul da sua distribuição. Nos dois casos, a acompanhar a diminuição do habitat para lebres variáveis dá-se a chegada e progressiva substituição desta espécie por lebre europeia.

Regressando ao passado, é possível que o aquecimento natural do planeta na era pós-glaciar tenha afectado a distribuição da lebre variável da mesma forma: diminuindo as zonas onde esta poderia viver e favorecendo a ocupação do habitat pelas restantes espécies de lebre que habitavam a Península Ibérica.

Porque é que dizemos que as espécies ibéricas têm o ADN mitocondrial da lebre variável, em vez de dizer que a lebre variável existe na Península Ibérica?

A resposta é relativamente simples: a análise do ADN nuclear das quatro espécies mostra, em geral, quatro grupos bem distintos. Ou seja, se usarmos como informação genética para classificar as espécies o ADN do núcleo estamos na presença de quatro espécies e a lebre variável não existe na Península Ibérica. Mas se usarmos apenas a informação do ADN mitocondrial, então a classificação das espécies torna-se confusa, pois algumas lebres ibéricas ou europeias serão identificadas como lebres variáveis, e passaremos a dizer que existe lebre variável na Península. O que não corresponde à verdade porque além da genética se usam outras informações para classificar e identificar as espécies. E, neste caso, estas espécies são facilmente distinguíveis do ponto de vista da morfologia e da ecologia.

## A SISTEMÁTICA DAS LEBRES

A sistemática é a ciência que se ocupa da classificação dos seres vivos tendo em conta a sua história e relações evolutivas. No caso das lebres, a sua evolução tem algumas particularidades interessantes. Por exemplo, muitas das espécies de lebre formaram-se mais ou menos na mesma altura - um tipo de evolução chamada de “radiação rápida”. É o caso das lebres da Península Ibérica, que se terão originado nos últimos 2 milhões de anos. Uma das consequências deste tipo de diversificação tão rápida e próxima no tempo é que as diferentes espécies conservam muitas das características da espécie ancestral, partilhando uma grande fracção do seu património

genético e, portanto, também muitas características (tais como a morfologia, fisiologia ou ecologia). Este motivo seria suficiente para complicar a classificação destas espécies mas no caso das lebres da Península Ibérica temos uma complicação adicional: a existência de indivíduos com um ADN mitocondrial “fantasma”, o ADN mitocondrial da lebre variável!

Qual será então a melhor maneira de classificar os seres vivos? Para qualquer caso, o melhor é usar sempre vários tipos de dados e avaliar as informações que cada um nos dá de forma crítica.

Vamos tentar? Precisaremos de:

- cartões com informação de um fragmento do ADN mitocondrial de indivíduos das 4 espécies de lebre que habitavam a Península Ibérica há cerca de 21 mil anos: lebre variável, lebre ibérica, lebre europeia e lebre de piornal
- cartões com informação de um fragmento de ADN do núcleo que codifica o gene albumina de indivíduos das mesmas 4 espécies
- cartões com imagens de indivíduos das mesmas 4 espécies

Os cartões (em anexo) com cada tipo de dado – ADN mitocondrial, AND nuclear e morfologia – devem ser distribuídos à vez por cada jogador ou equipa de jogadores. De cada vez que recebe os cartões, o jogador (ou equipa) deve formar grupos usando como critério a similaridade entre informações. Por exemplo, se recebeu os cartões com o fragmento de ADN mitocondrial, deve procurar fragmentos com o menor número de mutações – isto é, de diferenças – entre eles e agrupá-los.

Depois de ter os agrupamentos feitos de acordo com cada informação, confrontar os grupos com a identificação “real” de cada indivíduo e discutir a importância de usar vários tipos de dados para classificar a biodiversidade. Pode ainda aproveitar as informações dadas ao longo destas páginas para tornar a discussão mais complexa e discutir, por exemplo, o papel da selecção natural e as diferenças de informação que diferentes regiões genéticas nos dão.

É ainda recomendada uma discussão sobre a natureza da ciência: no exemplo das lebres, se nos primeiros trabalhos de uso de informação genética para as classificar se recorresse apenas ao ADN mitocondrial qual seria o resultado? Que há lebre variável na Península Ibérica! Mas a ciência é um processo, nunca pára e questiona-se sempre. Por isso, procuram-se mais dados e reavaliam-se as conclusões: sabemos que há realmente ADN mitocondrial de lebre variável na Península Ibérica, mas é como se fosse um fantasma, uma impressão digital molecular de uma espécie que já cá viveu mas que não vive desde o Último Máximo Glaciar, há aproximadamente 21 mil anos. O que sabemos hoje não significa que os primeiros cientistas a trabalhar neste tema estivessem errados; significa apenas que as nossas conclusões dependem dos dados e que devemos ter espírito aberto mas crítico para incorporar novos dados e reavaliar as nossas conclusões.

Há ainda um outro resultado interessante: o ADN mitocondrial ártico presente nas lebres da Península Ibérica apresenta diferenças em relação ao ADN mitocondrial ártico da lebre variável. Isto é concordante com a hipótese deste ADN mitocondrial ter sido transferido para as populações ibéricas há muito tempo - os cerca de 21 mil anos desde o Último Máximo Glaciar! - e estar a evoluir de forma independente do ADN mitocondrial da lebre variável desde essa altura.

Por fim, os dados também sugerem que houve duas alturas para a transferência de ADN mitocondrial da lebre variável para as restantes lebres da Península Ibérica: uma durante o Pleistoceno Médio, que afectou o ancestral comum da lebre de piornal e da lebre italiana (*Lepus corsicanus*; uma espécie que apenas existe no sul de Itália, Sicília e Córsega) e outra durante o Último Máximo Glaciar, que afectou as três espécies que habitam a Península Ibérica.

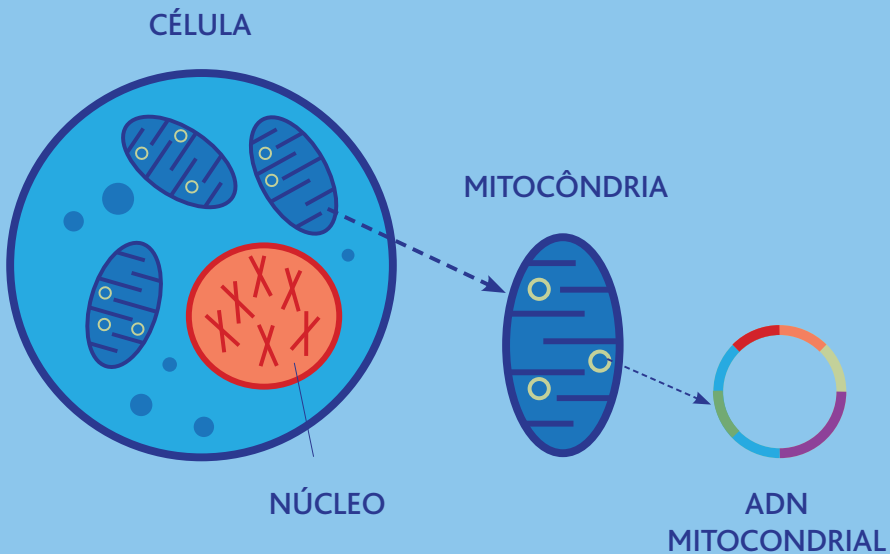
## MITOCÔNDRIAS E EVOLUÇÃO

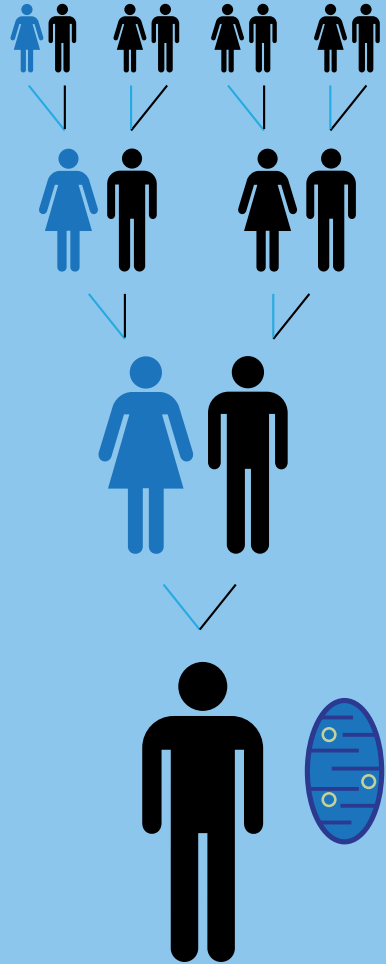
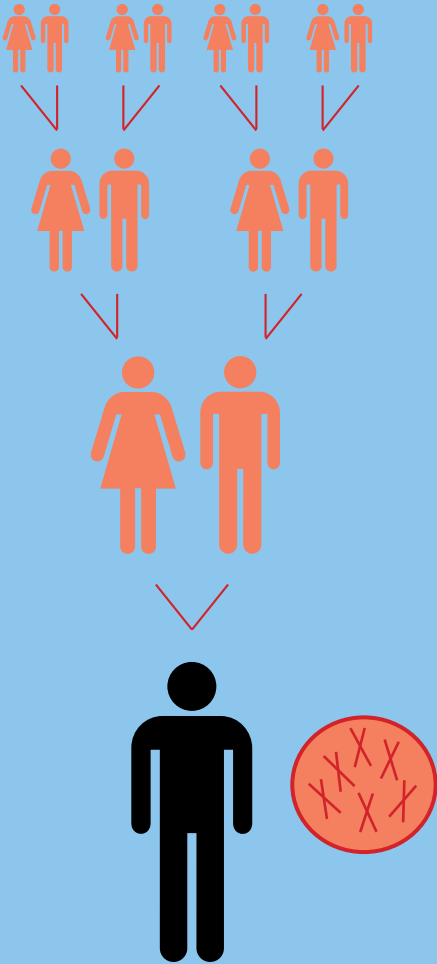
As mitocôndrias são organelos celulares encontrados num grande número de células de quase todos os eucariontes. A sua função é vital para as células. Embora mais conhecidas pelo seu envolvimento na produção de energia, as mitocôndrias participam em diversos processos celulares, tais como a diferenciação celular, a sinalização celular ou a manutenção do controlo do ciclo celular e do crescimento da célula, e há mesmo doenças mitocondriais provocadas pelo mau funcionamento das mitocôndrias.

Uma das características mais particulares deste organelo é o facto de possuir o seu próprio genoma. A esse material genético damos o nome de ADN mitocondrial – ou, abreviadamente, ADNmt. Este ADN difere do ADN do núcleo não só pela sua localização mas também porque tem uma

configuração circular e porque, ao contrário do ADN nuclear, que é herdado do pai e da mãe e por isso existem duas cópias de cada informação nas nossas células, o ADN mitocondrial apenas é transmitido pela mãe.

Estas características, juntamente com o facto de ter uma taxa de mutação média mais elevada que o ADN nuclear e ter sido inicialmente considerado livre da influência da selecção natural, tornaram o ADN mitocondrial um marcador genético muito utilizado, principalmente em estudos que pretendiam reconstruir a história evolutiva das espécies. Só que a aparente neutralidade do ADN mitocondrial tem sido desafiada: começam a aparecer muitas evidências de que este marcador também é alvo de selecção natural, incluindo o ADN ártico da lebre variável!







Então, em resumo, o que sabemos sobre a presença da lebre variável e da história das lebres na Península Ibérica? Sabemos que há mais ADN mitocondrial do tipo ártico nas lebres que vivem na metade norte da Península e que este ADN é também mais diverso nessas populações. Há ainda alguns resultados que sugerem que a transferência do ADN mitocondrial ártico para a lebre ibérica terá ocorrido quando a temperatura começou a aumentar, depois do Último Máximo Glaciar, e a lebre ibérica começou a ocupar o território que a lebre variável ocupava. Como algumas lebres ibéricas das populações mais a sul da Península têm ADN nuclear de lebre variável, é provável que as lebres ibéricas tenham sobrevivido aos períodos mais frios em refúgios localizados no centro da Península Ibérica e tenham colonizado o restante território onde hoje se encontram a partir daí.

O que ainda não se sabe bem é se a transferência de ADN mitocondrial da lebre variável para as restantes lebres da Península Ibérica foi um processo adaptativo, isto é, se houve influência da selecção natural.

Se não houve influência da selecção natural, então a transferência ocorreu apenas por uma questão de distribuição geográfica e demografia: durante uma expansão há normalmente apenas uns poucos indivíduos a liderar, a chegar aos novos sítios. E estes normalmente encontram muitos indivíduos de espécies que habitam esse sítio. No caso das lebres, como ainda terão muitas semelhanças, indivíduos da espécie que está a chegar conseguem reproduzir-se com indivíduos da espécie que lá vive. A deriva genética, que é muito eficaz em populações pequenas, faz com que a mitocôndria da espécie que já vivia consiga passar para a espécie que está a chegar e substitua a sua própria mitocôndria! Esta substituição é ainda mais eficaz se as fêmeas da espécie que se está a expandir forem filopátricas, isto é, tiverem propensão para permanecer junto ao local onde nasceram, como é o caso das lebres.

Mas devemos também considerar a hipótese de ter havido selecção natural a actuar nesta transferência. É que apesar de nos primeiros estudos de biologia evolutiva se ter considerado o ADN mitocondrial livre da acção da selecção natural, hoje há vários casos documentados da influência deste mecanismo na evolução desta informação genética. Olhando para o estranho caso do ADN mitocondrial das lebres na Península Ibérica, é bem possível pensarmos que talvez o ADN mitocondrial da lebre variável tenha passado tantas vezes para as outras lebres porque é realmente vantajoso. Ou seja, este poderá ser um caso em que o ADN mitocondrial está sob o efeito da selecção natural. E a verdade é que resultados recentes sugerem isto mesmo! Outro aspecto interessante é que proteínas que participam na cadeia respiratória – o processo

principal responsável pela produção da energia nas células – possuem subunidades codificadas tanto por genes do ADN mitocondrial como por genes do ADN nuclear. As interacções entre os dois genomas são de facto extensas e a influência da selecção natural pode ocorrer simultaneamente nos genes que interagem. Isto faz com que seja possível que a passagem do ADN mitocondrial ártico para as lebres da Península Ibérica tenha sido acompanhada por genes nucleares com os quais interagem - um processo de co-evolução! Os estudos mais recentes focam-se também neste aspecto.

## SELECÇÃO NATURAL E DERIVA GENÉTICA

Seleção natural e deriva genética são dois mecanismos que levam a uma alteração da frequência das informações genéticas das populações e, por isso, influenciam a sua evolução. A grande diferença entre estes dois mecanismos é que, enquanto a deriva genética é um fenómeno puramente neutro e afecta todas as porções do ADN, mitocondrial ou nuclear, por igual, a selecção natural actua especificamente sobre determinadas informações.

Os dois mecanismos não são mutuamente exclusivos. Pelo contrário, devemos supor que ambos actuam em simultâneo, apenas diferentes situações farão com o resultado da acção de um ou de outro se tornem mais visíveis.

Por exemplo, os homens estão continuamente a produzir espermatozoides,

cada um com uma informação genética única. No entanto, apenas um em milhares de espermatozoides fertiliza um óvulo, que crescerá para um novo bebé. E este bebé vai ter metade da sua informação genética proveniente daquele único espermatozoide. Será que essa informação genética tinha alguma característica especial? A resposta mais simples é: não! Aquele espermatozoide conseguiu fertilizar o óvulo por acaso. E a deriva genética é isso: o acaso. Mas ao mesmo tempo pode acontecer que uma porção da informação genética daquele espermatozoide confere algum tipo de vantagem ao futuro bebé. Nesse caso, essa informação será alvo da selecção natural e o bebé, entretanto adulto, terá uma maior probabilidade de sobreviver e passar essa informação aos seus descendentes, contribuindo assim para aumentar a frequência dessa informação na população.

Na maior parte das vezes, a deriva genética provoca alterações quase imperceptíveis nas frequências genéticas de uma população.

Porque na maior parte das vezes as populações são suficientemente grandes para que isso aconteça. Só que por vezes há grandes diminuições no tamanho das populações que fazem com que a deriva genética passe a ser muito eficaz a provocar alterações. No caso das nossas lebres, a expansão das lebres ibéricas e colonização dos territórios ocupados pela lebre variável terá acontecido com poucos indivíduos - um pouco à semelhança de uma maratona: estão muitos corredores juntos mas, no apito de partida, apenas algum saem destacados. Estes indivíduos terão encontrado lebres variáveis, com quem se terão reproduzido. Como as lebres fêmeas são filopátricas, isto é, tendem a ficar próximo do local onde nasceram, os cruzamentos terão sido entre machos de lebre ibérica e fêmeas de lebre variável, o que fez com que a descendência destes cruzamentos passasse a ter o ADN mitocondrial ártico. O facto de haver mais lebres variável do que lebres ibéricas fez com que o número de indivíduos com o ADN mitocondrial ártico aumentasse a cada nova geração.

Mas também pode acontecer que o ADN mitocondrial ártico tenha alguma característica que o torna especialmente vantajoso, principalmente em zonas mais frias. Nesse caso, a transmissão deste material genético de lebre variável para lebre ibérica não terá sido fruto do acaso, como falámos antes, mas sim devido à acção da selecção natural.

Vamos ver como funcionam os dois mecanismos?

Então vamos precisar de:

- duas caixas opacas
- contas coloridas
- discos coloridos (6 cores diferentes e uma das cores deve ser idêntica a uma das cores das contas)

Numa das caixas colocamos uma mistura de contas de várias cores e na outra colocamos contas de apenas uma cor (por exemplo, amarelas). As contas devem encher cerca de 2/3 da caixa. Separamos 6 discos de cada cor (não esquecer de ter discos amarelos). As contas na caixa estão a simular um determinado meio-ambiente, os discos simulam indivíduos de uma espécie de lebre da Península Ibérica - por exemplo, a lebre europeia - e as cores simulam um tipo de ADN mitocondrial.

Colocamos os discos que separámos na caixa com as contas coloridas e misturamos. Três participantes têm cinco segundos para, à vez, tentarem apanhar o maior número de discos que conseguirem. Depois, devem separar estes discos – que “morreram” – e tirar os que restam – que “sobreviveram”. Observar os dois grupos e verificar as diferenças entre eles: Houve alguma cor que foi mais vezes apanhada? As cores que “morreram” e as que “sobreviveram” têm alguma relação com as cores do meio? Será que repetindo a experiência teríamos grupos com composição semelhante? A resposta a esta última pergunta será: não. Porquê? Porque o mecanismo evolutivo que muito provavelmente está a influenciar a evolução desta população de discos é a deriva genética, o acaso. Para continuar a jogar,

simulamos a geração seguinte atribuindo 2 filhos a cada disco que “sobreviveu” e retirando estes sobreviventes do jogo. Ou seja, a segunda geração é composta apenas pelos filhos da primeira geração. Mais uma vez, apanhamos os discos, observamos os grupos dos que “morreram” e dos que “sobreviveram” e tentamos responder às mesmas questões, agora podendo também comparar as cores que foram mais e menos apanhadas nas duas gerações: Foram as mesmas? (provavelmente não!)

Para contrastar a evolução por deriva genética com a evolução por selecção natural, reiniciamos o jogo mas desta vez colocamos os discos na caixa que tem contas de uma só cor.

Repetimos a caça, a observação dos dois grupos e a simulação da segunda geração. Há diferenças em relação às cores que foram sendo apanhadas no jogo com a caixa cheia de contas coloridas? Há alguma cor que

foi menos apanhada? Provavelmente os discos amarelos foram menos apanhados. E porquê? Porque, ao contrário do jogo anterior, em que não havia nenhuma característica que parecesse ser favorável no meio colorido, aqui a cor amarela parece conferir uma vantagem, permitindo que os indivíduos sejam menos apanhados e tenham mais oportunidades para deixar filhos também amarelos - a frequência de discos amarelos aumenta a cada nova geração enquanto a frequência das outras cores diminui. Ou seja, o mecanismo evolutivo que muito provavelmente está a influenciar a evolução desta população de discos é a selecção natural.

Na história das nossas lebres, podemos então discutir se o ADN mitocondrial do tipo ártico será a “cor amarela” num meio “amarelo”, isto é, se realmente confere vantagem aos indivíduos que o transportam e que, ao se reproduzirem, o transmitem aos seus descendentes.

E agora?

Entre 2014 e 2015, um grupo de investigadores de Portugal e Espanha dedicou-se a tentar perceber o que significava este estranho fenómeno das “mitocôndrias fantasma”. Este trabalho foi uma continuação natural de estudos anteriores mas tendo como prioridade a análise biogeográfica das espécies. Isto porque, combinando a distribuição da informação genética de uma espécie com a sua distribuição espacial, conseguimos compreender melhor a história evolutiva dessa espécie - a esta análise conjunta da genética e da geografia dá-se o nome de filogeografia.

## BIOGEOGRAFIA E EVOLUÇÃO

Ao ramo da ciência que estuda e procura interpretar a distribuição - passada, presente e futura - das espécies na Terra dá-se o nome de Biogeografia. Uma componente importante dos estudos biogeográficos é a análise das características físicas do ambiente e a forma como estas influenciam as espécies e moldam a sua distribuição no espaço.

Alfred Russel Wallace, o naturalista que apresentou com Charles Darwin a teoria da evolução por selecção natural, foi um dos primeiros a utilizar dados da geografia e ecologia para, em conjunto com os conceitos da teoria da evolução, caracterizar os padrões de distribuição das espécies. Ao contrário da ideia predominante, de que as espécies são criadas de acordo com o ambiente onde vivem, Wallace percebeu que a geografia tem um papel importante na distribuição das espécies, criando barreiras que influenciam a evolução de espécies diferente em regiões climáticas idênticas. As observações de Wallace sobre a forma como o clima, a geografia e a ecologia influenciam a evolução e distribuição das espécies no espaço são ainda hoje aceites como válidas.

Mas Wallace, como Darwin, teve oportunidade de viajar por várias regiões da Terra e era muito minucioso nas suas observações. E foi assim que percebeu que a Terra tem seis grandes regiões ecológicamente distintas. Por exemplo, durante a sua estadia na Indonésia encontrou grandes diferenças entre as espécies que viviam na região mais asiática e as que viviam na região mais próxima da Austrália, tendo definido uma linha que divide esta duas regiões. Esta linha é conhecida por “linha de Wallace” e Wallace é hoje reconhecido como o “pai da biogeografia”.

As regiões biogeográficas reconhecidas por Wallace correspondem aproximadamente aos seis continentes do globo. E, juntamente com o que sabemos da deriva continental e tectónica de placas, foram um importante contributo para percebermos as dinâmicas de ocupação do espaço pelas espécies ao longo do tempo e as suas relações evolutivas. E assim, entre outros resultados, sabemos que espécies de continentes que se separaram há menos tempo têm também menos diferenças genéticas entre elas.

Ao estudar a estreita relação que existe entre as espécies e as regiões onde se encontram, bem como as relações que estabelecem com as restantes espécies que habitam a mesma região, a biogeografia é fundamental para percebermos a capacidade das espécies se manterem em casos de rápidas mudanças no clima, como a que vivemos actualmente, e para podermos definir medidas de conservação adequadas a cada espécie e a cada região.

Para iniciar este trabalho, a equipa fez duas grandes perguntas:

- 1) Porque é tão comum a transmissão do ADN mitocondrial de uma lebre ártica para espécies de climas temperados?
- 2) Será que este ADN ártico confere uma vantagem adaptativa às espécies afectadas nas zonas a norte da sua distribuição?

A primeira coisa que verificaram foi que, de facto, as populações de lebres ibéricas que têm mais indivíduos com a mitocôndria ártica ficam em zonas que teriam tido um clima bom para as lebres variável viverem quando estas habitavam a Península Ibérica. Ou seja, parece que os locais onde hoje encontramos lebres da Península Ibérica com ADN mitocondrial do tipo ártico são quase os mesmos locais onde poderíamos mesmo ter visto lebres variáveis se lá tivéssemos estado durante o Último Máximo Glaciar! Este resultado é interessante pois sugere que talvez a passagem da mitocôndria ártica para lebres ibéricas nestas zonas possa estar relacionada com uma adaptação local, ou seja, dá algumas pistas que favorecem a hipótese de que esta passagem foi alvo de selecção natural. E é também um resultado importante para ficarmos a perceber melhor a relação entre o clima e a evolução das lebres.

Depois de ficarem com esta sugestão dos locais onde terá habitado a lebre variável quando viveu na Península Ibérica, olharam com mais atenção para os locais onde hoje vivem lebres com o ADN mitocondrial da lebre variável. E viram que o número de indivíduos de lebre ibérica com o ADN ártico aumenta para norte e que há sinais de que este aumento está relacionado com uma expansão de lebre ibérica para as zonas onde vivia a lebre variável.

O que provavelmente aconteceu foi que, no final do Último Máximo Glaciar, quando as temperaturas começaram a aumentar, indivíduos de lebre ibérica que viviam num refúgio localizado no centro da Península Ibérica invadiram as zonas onde vivia a lebre variável, entrando em competição com esta e substituindo-a. É ainda possível que alguns dos indivíduos de lebre ibérica tenham saído do refúgio para ocupar outras zonas da Península Ibérica, onde hoje encontramos o ADN ártico mas em menor frequência.

Como sabemos de outros trabalhos que mesmo durante o Último Máximo Glaciar a Península Ibérica tinham regiões a norte e a sul que seriam boas para a lebre ibérica mas que esta espécie sobreviveu em refúgios na zona central, a explicação mais provável para esta expansão territorial da lebre ibérica apenas no final do Último Máximo Glaciar terá a ver com a presença da lebre variável por toda a Península. Ou seja, quando as temperaturas estavam muito baixas, a lebre variável estaria melhor adaptada e impedia a lebre ibérica de

viver nesses locais; quando a temperatura começou a aumentar, a lebre ibérica conseguiu invadir e expulsar a lebre variável da Península - mas não sem antes se reproduzir e permitir a passagem do ADN mitocondrial da lebre variável para a lebre ibérica! O mesmo poderá ter-se passado com a lebre europeia, que deverá ter chegado à Península Ibérica depois do Último Máximo Glaciar e ocupou a faixa mais a norte da Península, onde ainda hoje vive.

Mas e então, as lebres com o ADN ártico terão mesmo alguma vantagem em relação às outras? Possivelmente sim.

E como sabemos isso?

Primeiro, tentou-se perceber se o ADN mitocondrial do tipo ártico está mais presente em determinados ambientes ou se a sua distribuição é apenas resultado da geografia. Estas análises mostram que os indivíduos de lebre ibérica com ADN mitocondrial do tipo ártico estão em ambientes significativamente diferentes dos dos indivíduos sem este ADN. Ou seja, há concordância entre a distribuição do ADN mitocondrial ártico e algumas variáveis ambientais, o que é mais um resultado a favor da possível vantagem adaptativa do ADN mitocondrial ártico.

A seguir, para ter uma ideia sobre uma possível vantagem conferida pelo ADN ártico, determinaram-se alguns parâmetros que ajudam a caracterizar a capacidade reprodutiva e a condição física das lebres com e sem esse tipo de ADN. A análise de quase 200 indivíduos do limite sul da distribuição do ADN mitocondrial do tipo ártico mostrou que há uma forte associação entre a capacidade reprodutiva e a presença deste ADN. Os dados também sugerem que estes indivíduos têm uma dieta de melhor qualidade, o que, por sua vez, sugere que terão uma melhor condição física. Ou seja, os primeiros resultados de uma análise que testa explicitamente uma associação entre ser portador de ADN mitocondrial ártico e ter vantagem na sobrevivência e reprodução parecem indicar que esta de facto existe, que a selecção natural parece ter tido influência sobre a evolução deste ADN nas lebres ibéricas!

Como podemos confirmar estes primeiros resultados?

Bom, por um lado, há outros indicadores de condição física, como os níveis de leptina ou a carga parasitária, que podem ajudar a confirmar a existência de uma relação entre ter o ADN mitocondrial do tipo ártico e ter melhor aptidão física. A actividade das diferentes mitocôndrias também pode dar uma pista sobre a possível vantagem da mitocôndria ártica.

Por outro lado, sabemos que as expansões populacionais e os cruzamentos entre as diferentes espécies deixam sinais na variação genética das populações ibéricas actuais. Um desses sinais foi a passagem de ADN mitocondrial de lebres variáveis para indivíduos das três espécies ibéricas. Mas poderá ter também havido passagem de outras porções do genoma nuclear - a informação contida em todo o material genético que se pode encontrar no núcleo das células.

Se a passagem de material genético da espécie ártica para as espécies ibéricas resultou numa maior aptidão e capacidade de sobrevivência e reprodução, então a transferência do ADN nuclear deverá ocorrer preferencialmente em porções do genoma envolvidas nessas funções e a passagem do ADN mitocondrial poderá ter influenciado a passagem de outras partes do genoma - porque as proteínas que resultam das informações contidas no ADN mitocondrial e nuclear trabalham em conjunto em muitas funções fundamentais da célula, como a produção de energia. Estas questões estão a ser investigadas usando novas tecnologias de sequenciação de ADN, que permitem olhar para toda a informação genética de um indivíduo e não apenas para uma pequena parte. E assim, a comparação dos genomas das lebres da Península Ibérica e da lebre variável irá ajudar a revelar situações de adaptação e co-evolução entre o ADN mitocondrial e nuclear!



## SUGESTÕES DE RECURSOS EDUCATIVOS

Para saber mais sobre o projecto:  
<https://pelayoacevedo.wordpress.com/projects/ecomito/>

Para uma descrição mais detalhada das actividades sobre deriva genética e selecção natural:

Campos R, Sá-Pinto A (2013). Early evolution of evolutionary thinking: teaching evolutionary biology in elementary schools. *Evolution: Education and Outreach* 6:25. [o artigo está disponível em:  
<http://www.evolution-outreach.com/content/6/1/25>]

Sá-Pinto X, Campos R (2012). *As borboletas da floresta amarela*. CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos. Porto, Portugal. [o livro está disponível em:  
[https://dl.dropboxusercontent.com/u/206969216/As\\_Borboletas\\_da\\_Floresta\\_Amarela.pdf](https://dl.dropboxusercontent.com/u/206969216/As_Borboletas_da_Floresta_Amarela.pdf)]

Para exemplos sobre a influência da deriva genética e da selecção natural sobre a evolução de características humanas: Campos et al. (2014). *Somos mutantes!* [Cartazes disponíveis em:  
[http://cibio.up.pt/upload/filemanager/somos-mutantes\\_cartazes.pdf](http://cibio.up.pt/upload/filemanager/somos-mutantes_cartazes.pdf)]

Para pequenas “histórias” sobre evolução e biodiversidade e sugestões de como corrigir algumas das concepções alternativas mais frequentes sobre evolução: Campos et al. (2013). *Um livro sobre evolução*. CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos. Porto, Portugal. [o livro está disponível em:  
<https://www.dropbox.com/s/t2iw0czeobtid5g/Um%20livro%20sobre%20evolucao.pdf>]

## BIBLIOGRAFIA

- Acevedo P, Melo-Ferreira J, Farello L, Beltran-Beck B, Real R, Campos R, Alves PC (2015). Range dynamics driven by Quaternary climate oscillations explain the distribution of introgressed mtDNA of *Lepus timidus* origin in hares from the Iberian Peninsula. *Journal of Biogeography* 42:1727-1735.
- Acevedo P, Melo-Ferreira J, Real R, Alves PC (2012) Past, present and future distributions of an Iberian endemic, *Lepus granatensis*: ecological and evolutionary clues from species distribution models. *PLoS ONE* 7(12): e51529
- Acevedo P, Jiménez-Valverde A, Melo-Ferreira J, Real R, Alves PC (2012) Parapatric species and the implications for climate change studies: a case study on hares in Europe. *Global Change Biology* 18:1509-1519
- Altuna J (1970). Hallazgo de una liebre artica (*Lepus timidus*) en el yacimiento prehistorico de Urtiga (Guipuzcoa). *Munibe* 22:165-168.
- Alves PC, Ferrand N, Suchentrunk F, Harris DJ (2003). Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:70-80.
- Alves PC, Harris DJ, Melo-Ferreira J, Branco M, Suchentrunk F, Boursot P, Ferrand N (2006) Hares on thin ice: introgression of mitochondrial DNA in hares and its implications for recent phylogenetic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40:640-641.
- Alves PC, Melo-Ferreira J, Freitas H, Boursot P (2008). The ubiquitous mountain hare mitochondria: multiple introgressive hybridization in hares, genus *Lepus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363:2831-2839.
- Alves PC, Hackländer K (2008). Lagomorph species: geographical distribution and conservation status. In *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology, and Conservation* (Alves PC, Ferrand N, Hackländer K, eds.), Springer-Verlag. Pp 395-405.
- Araújo MB, Ferri-Yáñez F, Bozinovic F, Marquet PA, Valladares F, Chown SL (2013). Heat freezes niche evolution. *Ecology Letters* 16(9):1206–1219.
- Avice JC (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Chapman JA, Flux JEC (2008). Introduction to the Lagomorpha. In *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology, and Conservation* (Alves PC, Ferrand N, Hackländer K, eds.), Springer-Verlag. Pp 1-9.
- Lopez-Martinez N (1980). Les lagomorphs (Mammalia) du pléistocène supérieur de Jaurens. *Nouvelles Archives du Museum d'Histoire Naturelle de Lyon* 18:5-16.
- Melo-Ferreira J, Boursot P, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC (2005). Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology* 14:2459-2464.
- Melo-Ferreira J, Boursot P, Randi E, Kryukov A, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC (2007). The rise and fall of the mountain hare (*Lepus timidus*) during Pleistocene

glaciations: expansion and retreat with hybridization in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* 16:605-618.

Melo-Ferreira J, Alves PC, Freitas H, Ferrand N, Boursot P (2009). The genomic legacy from the extinct *Lepus timidus* to the three hare species of Iberia: contrast between mtDNA, sex chromosomes and autosomes. *Molecular Ecology* 18(12): 2643-2658.

Melo-Ferreira J, Alves PC, Rocha J, Ferrand N, Boursot P (2011). Interspecific X-chromosome and mitochondrial DNA introgression in the Iberian hare: selection or allele surfing? *Evolution* 65:1956-1968.

Melo-Ferreira J, Boursot P, Carneiro M, Esteves PJ, Farello L, Alves PC (2012). Recurrent introgression of mitochondrial DNA among hares (*Lepus* spp.) revealed by species-tree inference and coalescent simulations. *Systematic Biology* 61: 367-381.

Melo-Ferreira J, Farello L, Freitas H, Suchentrunk F, Boursot P, Alves PC (2014). Home-loving boreal hare mitochondria survived several invasions in Iberia: the relative roles of recurrent hybridisation and allele surfing. *Heredity* 112: 265-273.

Melo-Ferreira J, Vilela J, Fonseca MM, da Fonseca R, Boursot P, Alves PC (2014). The elusive nature of adaptive mitochondrial DNA evolution of an arctic lineage prone to frequent introgression. *Genome Biology and Evolution* 6(4): 886-896.

Rand DM (2001). The units of selection on mitochondrial DNA. *Annual Review in Ecology and Systematics* 32: 415-448.

Smith AT, Johnston CH (2008). *Lepus timidus*. In: *IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2013.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Consultado em Abril 2015.

Thulin CG (2003). The distribution of mountain hares *Lepus timidus* in Europe: a challenge from brown hares *L. europaeus*? *Mammal Review* 33: 29-42.



# Anexos



## CLASSIFICAR AS ESPÉCIES DE LEBRE – INFORMAÇÃO DO ADN NUCLEAR, FRAGMENTO DO GENE ALBUMINA (INTRÃO)

A informação fornecida nos cartões é uma sequência com 15 nucleótidos que foram retirados da informação completa. A eliminação de nucleótidos da sequência completa é feita apenas para facilitar as comparações.

A informação completa, sequências com 611 nucleótidos, está publicada no artigo Melo-Ferreira J, Alves PC, Freitas H, Ferrand N, Boursot P. (2009). The genomic legacy from the extinct *Lepus timidus* to the three hare species of Iberia: contrast between mtDNA, sex chromosomes and autosomes. *Molecular Ecology* 18(12): 2643-2658.

Esta informação poderá ser usada para, por exemplo, discutir a existência de ambiguidades relacionadas com o facto de se tratar de um gene nuclear – se um indivíduo recebe duas informações diferentes de cada progenitor para uma dada posição na sequência, as duas informações são registadas de acordo com o código definido pela IUPAC – ou a existência de outro tipo de informações – as sequências completas dos indivíduos de lebre do piornal tem menos 4 nucleótidos que as dos restantes indivíduos, o que sugere que ocorreu uma delecção de 4 pares de bases, nessa posição do fragmento, nesta espécie.

A identificação dos indivíduos nos cartões corresponde às seguintes espécies: L1 a L8 - Lebre ibérica; L9 a L16 - Lebre europeia; L17 a L23 - Lebre de piornal; L24 a L29 - Lebre variável.







L1 - TAAACCTAATGTGCT

L2 - TAAACCTAATGTGCT

L3 - TAAACCTAATGTGCT

L4 - TAAACCTAATGTGCT

L5 - TAAACCTAATGTGCT

L6 - TAAACCTAATGTGCT

L7 - TAAACCTAATGTGCT

L8 - TAAACCTAATGTGCT

L9 - TCGATCTAGTGTGTT

L10 - TCGATCTAGTGTGTT

L11 - TCGATCTAGTGTGTT

L12 - TCGATCTAGTGTGTT

L13 - TCGATCTAGTGTGTT

L14 - TCGATCTAGTGTGTT

L15 - TCGATCTAGTGTGTT

L16 - TCGATCTAGTGTGTT

L17 - TCGATCAAATGTGTC

L18 - TCGATCAAATGTGTC





L19 - TCGATCAAATGGGTC

L20 - TCGATCAAATGTGTC

L21 - TCGATCAAATGTGTC

L22 - TCGATCAAATGTGTC

L23 - TCGATCAAATGTGTC

L24 - TCGATCTAATGTGTT

L25 - TCGATCTAATGTGTT

L26 - TCGATCTAATGTGTT

L27 - TCGATCTAATGTGTT

L28 - TCGATCTAATGTGTT

L29 - TCGATCTAATGTGTT



## CLASSIFICAR AS ESPÉCIES DE LEBRE – INFORMAÇÃO DO ADN MITOCONDRIAL, FRAGMENTO DO GENE CITOCROMO B

A informação fornecida nos cartões é uma sequência com 15 nucleótidos que foram retirados da informação completa. A eliminação de nucleótidos da sequência completa é feita apenas para facilitar as comparações.

A informação completa, sequências com 616 nucleótidos, está publicada no artigo Melo-Ferreira J, Boursot P, Randi E, Kryukov A, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC. (2007). The rise and fall of the mountain hare (*Lepus timidus*) during Pleistocene glaciations: expansion and retreat with hybridization in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* 16(3): 605-618.

Esta informação poderá ser usada para, por exemplo, discutir a existência de evidências de diferentes tipos de ADN mitocondrial do tipo ártico nas lebres ibéricas, o que sugere que houve contacto entre lebre variável e as espécies ibéricas em diferentes alturas – a hipótese mais parcimoniosa diz-nos que quanto mais parecido com o ADN mitocondrial de indivíduos de lebre variável for o ADN mitocondrial do tipo ártico encontrado nas espécies ibéricas mais recente terá sido o contacto e a introgressão (ou seja, a transferência do ADN mitocondrial).

A identificação dos indivíduos nos cartões corresponde às seguintes espécies: L1 a L6 - Lebre variável; L7 a L13 - Lebre de piornal; L14 a L21 - Lebre europeia; L22 a L29 - Lebre ibérica. Logo, de acordo com as sequências dos cartões, os indivíduos L8, L20, L21, L22 e L26 têm ADN mitocondrial do tipo ártico.





L1 - AAGTCGAATCCCGTT

L2 - AAGTCGAATCCCGTT

L3 - AAGTCGAATCCCGTT

L4 - AAGTCGAATCCCGTC

L5 - AAGTCGAATCCCGTT

L6 - AAGTCGAATCCCGTT

L7 - AAGTCAAACCTCCGTT

L8 - AAGTCGAATCCCGTT

L9 - AAGTCAAACCTCCGTT

L10 - AAGTCAAACCTCCGTT

L11 - AAGTCAAACCTCCGTT

L12 - AAGTCAAACCTCCGTT

L13 - AAGTCAAACCTCGTT

L14 - AGGCTAAACCCTATT

L15 - AGGCTAAACCCTATT

L16 - AGGCTAAACCCTATT

L17 - AGGCTAAACCCTACT

L18 - AGGCTAAACCCTATT







L19 - AGGCTAAACCCTATT

L20 - AAGTCGAATCCCGTT

L21 - AAGTCGAATCCCGTT

L22 - AAGTCGAATCCCGTT

L23 - TAGCCGAGCCCCATT

L24 - TAACCGAGCCCCATT

L25 - TAGCCGAGCCCCATT

L26 - AAGTCGGATCCCGTT

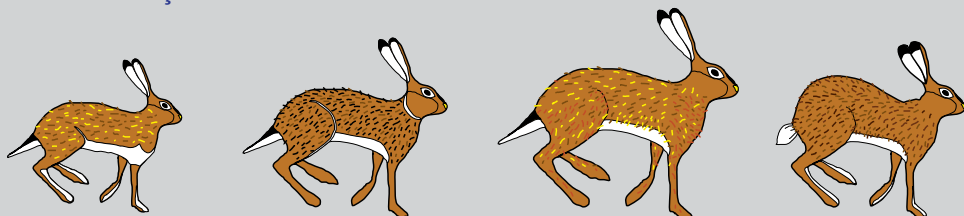
L27 - TAGCCGAGCCCCATT

L28 - TAGCCGAGCCCCATT

L29 - TAGCCGAGCCCCATT



## CLASSIFICAR AS ESPÉCIES DE LEBRE – INFORMAÇÃO DA MORFOLOGIA



<b>Lebre ibérica</b> <i>Lepus granatensis</i>	<b>Lebre de piornal</b> <i>Lepus castrovieji</i>	<b>Lebre europeia</b> <i>Lepus europaeus</i>	<b>Lebre variável</b> <i>Lepus timidus</i>
De menor tamanho	Grande mas menor que a europeia	De grande tamanho	Grande mas menor que a europeia, com corpo mais arredondado
Pelo castanho-amarelado	Pelo castanho e preto	Pelo castanho-amarelado, avermelhado no pescoço e zona superior das patas	Pelo em vários tons de castanho (pelagem de Verão; a maior parte dos indivíduos muda para uma pelagem toda branca no Inverno)
Partes superiores das extremidades com manchas brancas	Partes superiores das extremidades sem manchas brancas	Partes superiores das extremidades sem manchas brancas	Partes superiores das extremidades com manchas brancas
Sem banda facial	Com banda facial branco-acinzentado	Sem banda facial	Sem banda facial
Pelagem ventral branca muito extensa, chegando à zona superior das patas dianteiras, e com contraste nítido entre pelagem ventral e dorsal	Pelagem ventral branca menos extensa, e com contraste nítido entre pelagem ventral e dorsal	Pelagem ventral branca pouco extensa, e com zona de transição entre pelagem ventral e dorsal	Pelagem ventral branca pouco extensa, e com zona de transição entre pelagem ventral e dorsal
Cauda preta em cima, branca em baixo	Cauda preta em cima, branca em baixo	Cauda preta em cima, branca em baixo	Cauda toda branca
Orelhas com ponta pretas	Orelhas com ponta pretas	Orelhas com ponta pretas	Orelhas com ponta pretas e rebordo branco





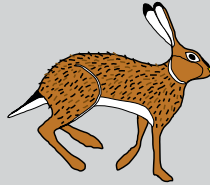
L1



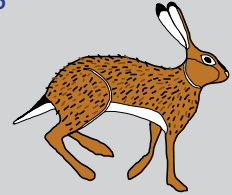
L5



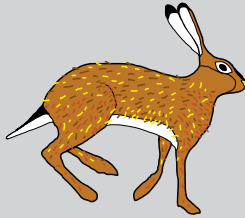
L2



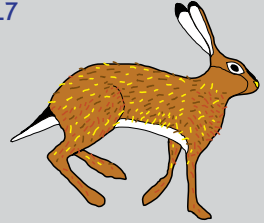
L6



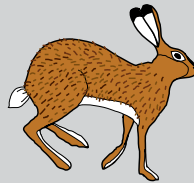
L3



L7



L4



L8

