

Boletim de Pesquisa 27 **e Desenvolvimento** ISSN 1981 - 609X Dezembro, 2010

Padrões Eletroforéticos de Marcadores Proteicos de Lobos- guarás (*chrysocyon brachyurus*).

ISSN 1981 - 609X
Dezembro, 2010

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Roraima
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 27

Padrões Eletroforéticos de Marcadores Proteicos de Lobos-guarás (*chrysocyon brachyurus*).

Paulo Sergio Ribeiro de Mattos

Keiko Kusamura de Mattos

Embrapa Roraima
Boa Vista, RR
2010

Embrapa Roraima, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento,
Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Roraima

Rodovia BR-174, km 8 - Distrito Industrial

Cx. Postal 133 –CEP. 69.301-970

Boa Vista- Roraima-Brasil

Telefax: (95) 4009.7125

Home page: www.cpafr.embrapa.br

E-mail: sac@cpafr.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Marcelo Francia Arco-Verde

Secretário-Executivo: Everton Diel Souza

Membros: Alexandre Matthiensen

Antônio Carlos Centeno Cordeiro

Carolina Volkmer de Castilho

Edvan Alves Chagas

Helio Tonini

Kátia de Lima Nechet

Paulo Sérgio Ribeiro de Mattos

Normalização Bibliográfica: Jeana Garcia Beltrão Macieira

Editoração Eletrônica: Vera Lúcia Alvarenga Rosendo

Revisão Gramatical: Ilda Maria Sobral de Almeida e Luiz Edwilson Frazão

1ª edição

1ª impressão (2010): 300 exemplares

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação – CIP
Embrapa Roraima

Mattos, Paulo Sergio Ribeiro de.
Padrões Eletroforéticos de Marcadores Proteicos
de Lobos-guarás (*chrysocyon brachyurus*). Paulo Sergio
Ribeiro de Mattos e Keiko Kusamura de Mattos. - Boa
Vista, RR: Embrapa Roraima, 2010.
15p. (Boletim de Pesquisa e desenvolvimento / Embrapa
Roraima, 27).

1. Eletroforese. 2. isozimas. I. Mattos, Keiko Kusama de.
II. Título.

CDD: 636.08

SUMÁRIO

Resumo	04
Introdução	05
Referências Bibliográficas	12

Padrões Eletroforéticos de Marcadores Proteicos de Lobos-guarás (*chrysocyon brachyurus*).

Paulo Sergio Ribeiro de Mattos ¹

Keiko Kusamura de Mattos ²

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de apresentar os padrões eletroforéticos de isozimas de lobos-guarás, indicando que esta metodologia pode ser utilizada também para outras espécies. Foram estudados os padrões eletroforéticos de marcadores genéticos, dos seguintes sistemas proteicos: hemoglobina (Hb), haptoglobina (Hp), albumina, proteínas séricas inespecíficas (Ptn-x), fosfoglicose isomerase (Pgi), lactato desidrogenase (Ldh), superóxido dismutase (Sod), malato desidrogenase (Mdh), peptidase B (Pep-B), 6-fosfogluconato desidrogenase (Pgd), fosfatase ácida (PAc), anidrase carbônica II (AC II) e glioxalase (Glo). Os padrões eletroforéticos da Hb, Hp, Ptn 1-4, Pgi, Ldh e Sod, Mdh, Pep-B e Pgd. Destes marcadores genéticos proteicos estudados (compreendendo 20 locos), apenas a fosfoglicose-isomerase (Pgi), a peptidase B (Pep-B), a proteína inespecífica 4 (Ptn-4) e a glioxalase (Glo) apresentaram variação. Os estudos de marcadores proteicos podem apresentar uma grande rapidez na obtenção de resultados em laboratórios que já apresentam a rotina de estudar estes marcadores em outros animais. Isto se dá pelo fato de que as técnicas de coloração costumam detectar a atividade enzimática, que é semelhante entre as espécies, sendo bastante úteis para espécies silvestres, em que os marcadores nucleares e mitocondriais ainda não foram padronizados.

Palavras chave: Eletroforese, lobo-guará, isozimas.

¹

Médico Veterinário, Pesquisador Embrapa Roraima

²

Médica Veterinária, pesquisadora da Fundação Estadual de Meio Ambiente, Ciência e Tecnologia do Estado de Roraima.

Introdução

O lobo-guará é considerado como uma espécie ameaçada de extinção pela lista oficial do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, pelo decreto nº 1210 de 12 de abril de 1939 e pela Portaria nº 1511, de 22 de maio de 2003 (IBAMA, 2003), sendo classificado como vulnerável pela Internacional Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN, 1994). Estudos de genética de populações podem fornecer estimativas importantes para a conservação de carnívoros silvestres, como os valores de heterozigidade, endogamia e estruturação populacional. As populações de animais ameaçados de extinção, que apresentam um tamanho reduzido, são mais sujeitas à deriva genética, que é a flutuação aleatória das frequências gênicas da população (BURNS, 1983). Uma maior ocorrência de cruzamentos de animais aparentados pode ocorrer em populações com pequeno número de indivíduos e em áreas com barreiras ao fluxo gênico. Estes cruzamentos consanguíneos podem levar a um aumento da ocorrência de características deletérias nas populações naturais (WOODROFFE; GINSBERG, 1998). Em lobos cinzentos (*Canis Lupus*) em cativeiro, submetidos a acasalamentos consanguíneos, foram detectadas ocorrências de cegueira, redução de peso de animais jovens, diminuição da longevidade e da eficiência reprodutiva (LAIKRE; RYMAN, 1991). Como medida de preservação da diversidade alélica em populações naturais, Stockwell et al. (1996) discutem a utilização de translocamentos de animais.

Os estudos genéticos de estruturação populacional podem contribuir para a avaliação do impacto que o isolamento populacional, por acidentes geográficos ou atividade antrópica podem estar criando nos padrões de migração e reprodução da espécie. A análise eletroforética de marcadores proteicos tem se mostrado como uma ferramenta útil para o conhecimento da genética de populações de lobos-guarás e outros canídeos silvestres (FERREL et al., 1980; KENNEDY et al., 1991; MOREIRA et al., 1998; MATTOS et al., 2008).

O objetivo do trabalho foi o de disponibilizar os registros dos géis de eletroforese de isozimas de lobos guarás, para dar suporte aos estudos de genética de populações para a espécie, assim como para outras espécies filogeneticamente similares.

Procedimentos para o estudo

Para obtenção de amostras, foram colocadas armadilhas de captura modificadas das descritas por Dietz (1984). O manejo dos animais capturados foi realizado através da

contenção anestésica, coleta de sangue, marcação por tatuagem e com coleiras comuns de cães domésticos. Os animais (n=28) foram capturados na Região Nordeste do estado de São Paulo e só foram liberados para retorno à natureza quando totalmente recuperados da exposição anestésica. A sedação foi realizada pela aplicação intramuscular de Tiletamina associada ao Zolazepam (Zoletil- laboratório Virbac), na dose de 7,0 mg/kg, através de um dardo medicamentoso projetado por zarabatana, conforme prescrito por Novaes (1997).

No laboratório as amostras de sangue heparinizado foram centrifugadas para a obtenção do plasma e o precipitado (papa de hemácias), foi lavado três vezes em solução de cloreto de sódio a 0,9% antes do congelamento (a -20°C). Após o descongelamento, as amostras foram misturadas em uma solução de mercaptoetanol 0,2% e centrifugadas. Papéis Whatman número 3 foram completamente embebidos com a solução, e após este procedimento, as amostras foram aplicadas nos géis, em cortes transversais, feitos previamente a uma distância de 5 cm da extremidade catódica. Estas amostras foram então submetidas a eletroforese sendo que a voltagem, tempo de corrida, tipos de géis e tampões utilizados estão indicados na tabela 1. Após a corrida, os géis foram submetidos à coloração específica, sendo que as proteínas com atividade peroxidásica (Hb e Hp) foram coradas com benzidina ou orto-dianisidina (SCHWANTES; TONDO, 1969; SCHWANTES, 1976), a albumina e as proteínas inespecíficas com o corante Coomassie blue e as enzimas segundo metodologias descritas em Harris e Hopkinson (1978). Assim foi realizado o estudo dos padrões de migração de cada sistema para as amostras obtidas. Com esta metodologia, foram estudados os seguintes sistemas proteicos: hemoglobina (Hb), haptoglobina (Hp), albumina, proteínas séricas inespecíficas (Ptn-x), fosfoglicose isomerase (Pgi), lactato desidrogenase (Ldh), superóxido dismutase (Sod), malato desidrogenase (Mdh), peptidase B (Pep-B), 6-fosfogluconato desidrogenase (Pgd), fosfatase ácida (PAc), anidrase carbônica II (AC II) e glioxalase (Glo).

Tabela 1 – Condições eletroforéticas em que foram genotipados os sistemas proteicos de lobos-guarás. As siglas TC, TB, EBT e TEMM significam tris-citrato, tris-borato, tris-borato-EDTA e tris-EDTA anidrido maleico MgCl₂ respectivamente. Os géis do tipo “A” são constituídos por amido hidrolisado de milho a 14%, do tipo “B” amido hidrolisado de milho a 2% e agarose a 0,8% e do tipo “C” de poliacrilamida a 10%.

Sistemas	Condições			Ponte	Gel	
	Volts	Amperes	Tempo	Tampão	Tampão	Tipo
AcP e Mdh	220	50	5 horas	TC	TC	A
Pep-B, ACII e Hp	160	30	5 horas	pH 8,0	PH 8,0	
				Borato	TC	
Pgi, Sod, Est-D, Pgd e Ldh	150	50	5 horas	pH 8,3	pH 8,0	
				TC	Histidina	
Hb	400	Variável	45 minutos	PH 6,6	pH 6,0	
				EBT	EBT	
Glo	80	40	4 horas	pH 8,9	pH 8,9	B
				TEMM	TEMM	
Alb, Ptn 1-4	2500	70	2 horas	pH 7,4	pH 7,4	C
				TB	TC	
				pH 8,0	pH 8,7	

Os padrões eletroforéticos da Hb, Hp, Ptn 1-4, Pgi, Ldh e Sod, Mdh, Pep-B e Pgd estão representados nas figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 respectivamente. Como os padrões eletroforéticos de lobo-guará não eram conhecidos, utilizou-se como controle, amostras com padrão de migração conhecida de outros mamíferos. A haptoglobina foi detectada como complexo hemoglobina de lobo-guará com haptoglobina humana por apresentar uma dissociação com a banda de hemoglobina humana, com uma resolução melhor do que quando utilizada a hemoglobina de lobo-guará (figura 1). Destes marcadores genéticos proteicos estudados (compreendendo 20 locos), apenas a fosfoglico-isomerase (Pgi), a peptidase B (Pep-B), a proteína inespecífica 4 (Ptn-4) e a glioxalase (Glo) apresentaram variação.

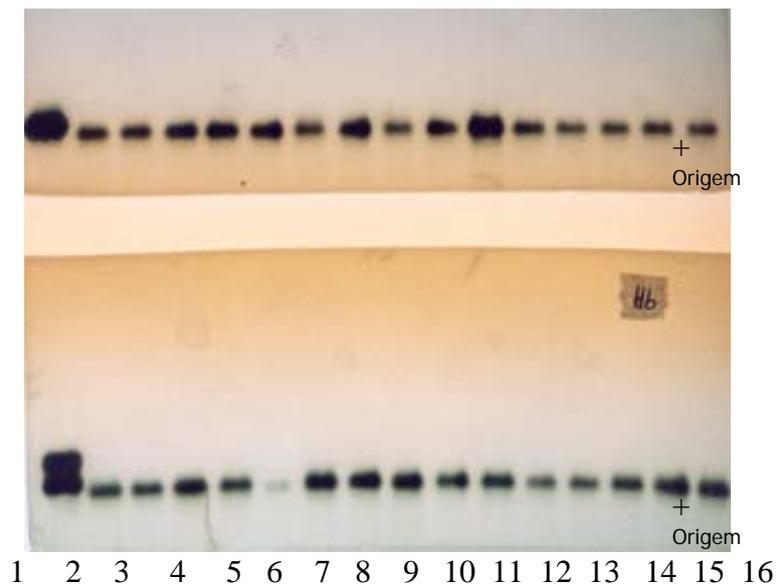


Figura 1- Eletroforese com coloração específica para hemoglobina. 1 – bovino, 2-16 – lobo-guará

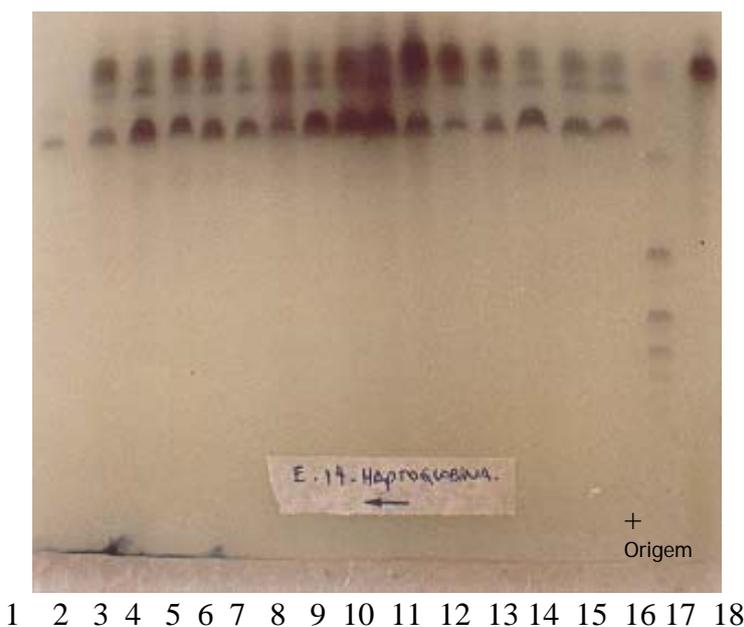


Figura 2 - Eletroforese com coloração específica para proteínas com atividade peroxidásica, objetivando o estudo da haptoglobina. 1 – soro de lobo-guará, 2-16 – soro de lobo-guará e hemoglobina humana, 17 – soro humano, 18 – hemoglobina humana.

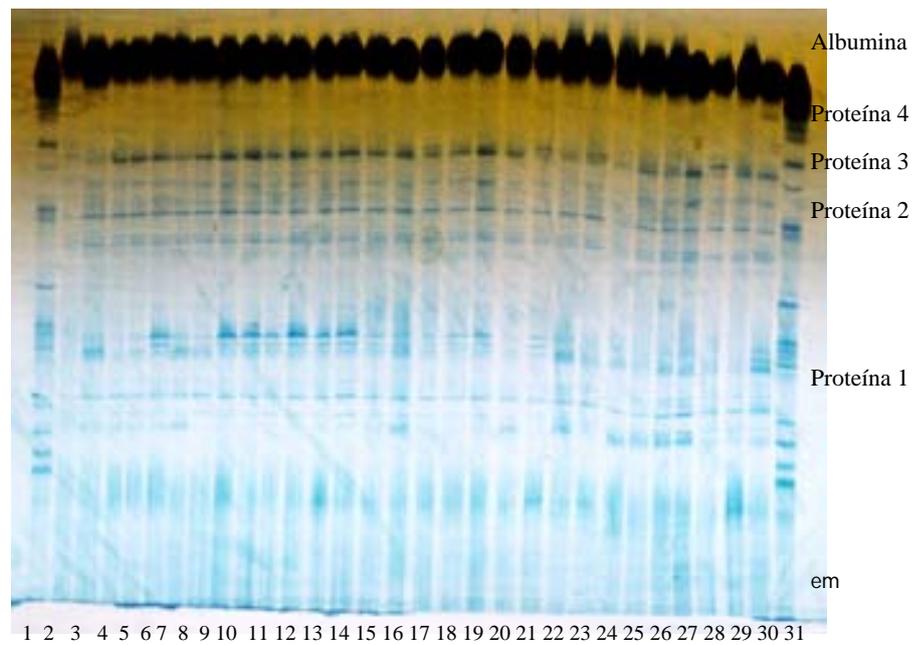


Figura 3 - Eletroforese de proteínas gerais do plasma. 1 e 31 equino, 2 a 30 lobo-guará

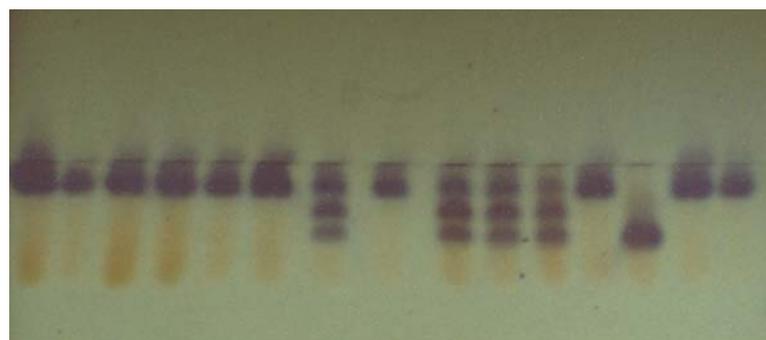


Figura 4- Eletroforese com coloração específica para fosfoglicoseisomerase (Pgi) em amostras de lobos-guarás

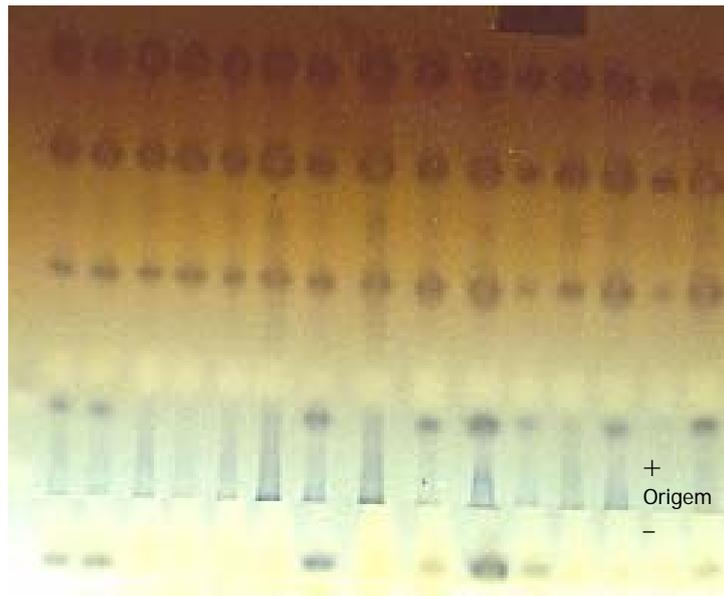
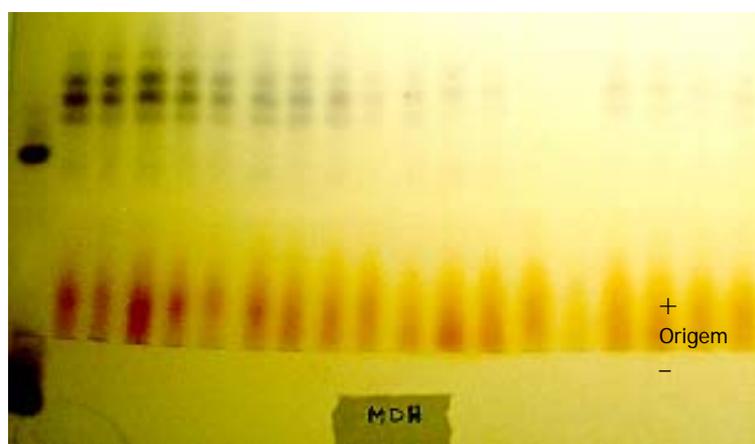


Figura 5- Eletroforese com coloração específica para lactato desidrogenase (Ldh) de lobos- guarás, a superóxido dismutase (Sod) também pode ser visualizada.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Figura 6 - Eletroforese com coloração específica para malato desidrogenase (Mdh). 1- abelha, 2 a 19 lobo-guará.

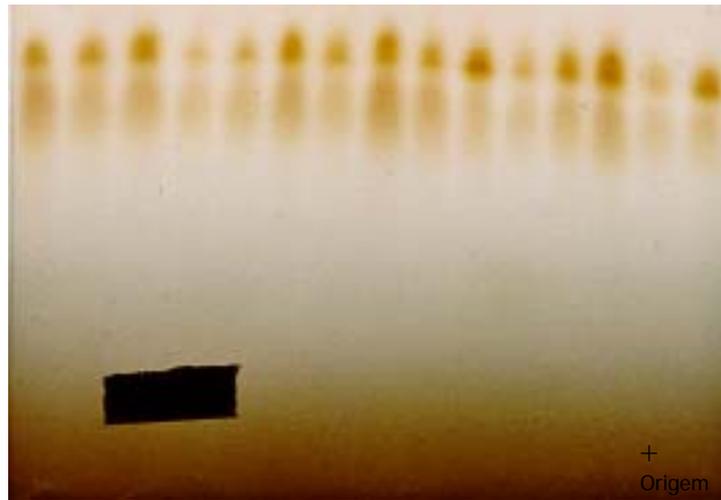


Figura 7 - Eletroforese com coloração específica para peptidase B (Pep-B) de lobos-guarás.

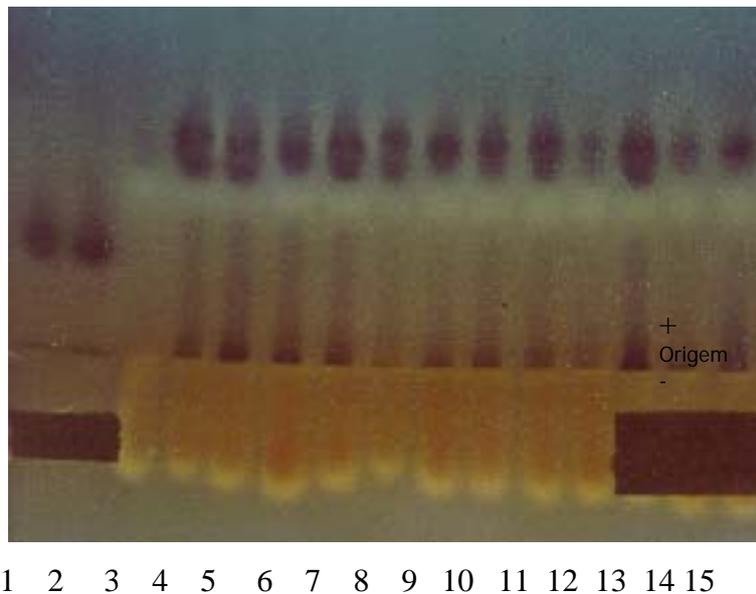


Figura 8 - Eletroforese com coloração específica para 6 fosfogluconato desidrogenase (Pgd), a superóxido dismutase (Sod) também pode ser visualizada. 1 e 2 – abelha, 3 a 15 lobo-guará.

Estudos de genética de populações com marcadores nucleares e mitocondriais foram realizados em canídeos silvestres (WAYNE et al., 1991; GARCIA-MORENO et al., 1996; GIRMAN et al., 1993) e em outros carnívoros de vida livre (EIZIRIK et al., 1998; EIZIRIK et al., 2001). Estes estudos indicaram que estes marcadores podem ser uma importante ferramenta de estudo de genética populacional do lobo-guará. Apesar de ser uma

metodologia mais antiga, os estudos de marcadores proteicos podem apresentar uma grande rapidez na obtenção de resultados em laboratórios que já apresentam a rotina de estudar estes marcadores em outros animais. Isto se dá pelo fato de que as técnicas de coloração costumam detectar a atividade enzimática, que é semelhante entre as espécies. Porém, os estudos de um maior número de marcadores se tornam limitados quando se tem apenas amostras de sangue, devido ao fato de que o metabolismo das células vermelhas é constituído primordialmente pela via glicolítica de Embden-Meyerhoff e do "shunt" alternativo da hexose monofosfato (BEUTLER, 1975), o que limita o estudo apenas às enzimas destas vias metabólicas. O plasma e as células brancas apresentam um número limitado de componentes protéicos com concentrações compatíveis para o estudo eletroforético. Níveis de variabilidade genética mensurada através de marcadores protéicos foram realizados em lobos-guarás por Moreira et al. (1998) e Mattos (2008). Estes estudos e apontam para a importância do estudo de marcadores genéticos, como ferramenta útil no diagnóstico da diminuição de variabilidade genética em populações isoladas de canídeos silvestres ameaçados de extinção.

REFERÊNCIAS

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York : Ed. Grune & Stratton, 1975. 160p.

BURNS, G. V. **Genética: uma introdução à hereditariedade**. 4.ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 1983. 558p.

DIETZ, J. M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Smithsonian Contributions Ecology**, v. 392, p.1-24, 1984.

EIZIRIK E. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two neotropical cats (Mammalia, Felidae). **Journal of Molecular Evolution**, v. 47, p. 613-624, 1998.

EIZIRIK E. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). **Molecular Ecology**, v. 10, p. 65-79, 2001.

FERREL, R. E.; MORIZOT, D. C.; HORN, J.; CARLEY, C. J. Biochemical markers in a species endangered by introgression: the red wolf. **Biochemical Genetics**, v.18, p.39-49, 1980.

GARCIA-MORENO, J. Relationship and genetic purity of the endangered Mexican Wolf based on analysis of microsatellite loci. **Conservation Biology**, v 10, n. 2, p. 376-387, 1996.

GIRMAN D.J. et al. Molecular-genetic and morphological analyses of the african wild dog (*Lycaon pictus*). **Journal of Heredity**, v.84, n.6, p. 450-459, 1993.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D. A. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. Amsterdam : North Holland, 1978. 670p.

IBAMA. Portaria nº 1511, de 22 de maio de 2003

IUCN – **Red list of threatened animals**. IUCN. Gland, Switzerland and Cambridge. 1994. 286 p.

KENNEDY, P. K.; KENNEDY, M. L.; CLARKSON, P. L.; LIEPINS, I. S. Genetic variability in natural populations of the gray wolf, *Canis lupus*. **Canids Journal of Zoology**, v. 69, p. 1183-1188, 1991

LAIKRE, L.; RYMAN, N. Inbreeding depression in a captive wolf (*Canis lupus*) population. **Conservation Biology**, v. 5, n.1. p. 33-40, 1991

MOREIRA, J.R.; GUIMARAES, N. K.; PILLA, E. J. S.; CONTEL, E. P. B.; BEM, A. R. de. **Estudo preliminar da variabilidade genetica do lobo-guara (*Chrysocyon brachyurus*)**. Brasilia: Embrapa Recursos Geneticos e Biotecnologia, 1998. 10p. Embrapa Recursos Geneticos e Biotecnologia. Comunicado Tecnico, 30).

MATTOS, P. S. R.; LAMA, M. A.; TOPPA, R. H.; SCHWANTES, A. R. Populational genetic structure of free-living maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) determined by proteic markers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 3A, p. 639-644, 2004.

NOVAES, A. P. **Contenção farmacológica de animais**. 2. ed. São Carlos: EMBRAPA-CPPSE, 1997. 106 p.

SCHWANTES, A. R. Haptoglobins in snakes. **Comparative Biochemical Physiology**, v. 55(B), p. 235-238, 1976.

SCHWANTES, A. R.; TONDO, C. V. Preliminary data on haptoglobins in vertebrates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 2, n. 2, p. 105-108, 1969.

STOCKWELL, C. A.; MULVEY, M.; VINYARD, G. L., , Translocations and preservation of allelic diversity. **Conservation Biology**, v.10,n.1, p.1133-1141, 1996.

WAYNE, R. K.; GILBERT, D. A.; LEHMAN, N.; HANSEN, K., EISENHAWER, A.; GIRMAN, D.; PETERSON, R. O.; MECH, L. D.; GOGAN, P. J. P.; SEAL, U. S. ; KRUMENAKER, R. J. Conservation genetics of endangered Isle Royale gray wolf. **Conservation biology**, v.5, n.1, p.41-51, 1991.

WOODROFFE, R. ; GINSBERG, J. R. Edge effects and the extinction of populations inside protected areas. **Science**, v.280, n.1, p.2126-2128, 1988.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

