

## VARIABILIDADE GENÉTICA EM CERVÍDEOS DO GÊNERO *MAZAMA* BASEADA NO POLIMORFISMO DA TRANSFERRINA, ALBUMINA SÉRICA E HEMOGLOBINA

JOSÉ EDUARDO GARCIA<sup>1\*</sup>, PAULO ROBERTO R. RAMOS<sup>1</sup>, JEHUD BORTOLOZZI<sup>2</sup> &  
JOSÉ MAURÍCIO B. DUARTE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências /UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências, UNESP, Bauru, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, FCAVJ /UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil

\*Address for correspondence: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná, Brasil (jegarcia30@gmail.com)

**(Variabilidade genética em cervídeos do gênero *Mazama* baseada no polimorfismo da transferrina, albumina sérica e hemoglobina)** – O gênero *Mazama* é atualmente representado no Brasil por cinco espécies: *M. nana*, *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. bororo* e *M. nemorivaga*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as características eletroforéticas das transferrinas, albuminas séricas e hemoglobinas em cervídeos do gênero *Mazama* no que diz respeito ao polimorfismo entre as diferentes espécies brasileiras. Foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida amostras de plasma sanguíneo e hemoglobina de 138 animais, mantidos em cativeiro, com origem conhecida na natureza e provenientes de todas as regiões do país. O sistema das transferrinas apresentou variabilidade crescente nas espécies *M. nana*, *M. americana* e *M. gouazoubira*, variando do monomorfismo na primeira espécie à ocorrência de seis diferentes fenótipos na última. As albuminas séricas apresentaram-se monomórficas, porém o perfil eletroforético observado em *M. gouazoubira* foi diferente das outras espécies. As hemoglobinas apresentaram três fenótipos, aparentemente compostos por dois alelos A e B, não sendo observadas diferenças significativas em relação às frequências fenotípicas.

**Palavras-chave:** Cervidae, *Mazama*, cervídeos neotropicais.

**(Genetic variability in *Mazama* genus based on transferrin, seric albumin, and hemoglobin polymorphism)** – The genus *Mazama* is currently represented in Brazil by five species: *M. nana*, *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. bororo*, and *M. nemorivaga*. The objective of the present study was to determine the electrophoretic characteristics of transferrin, serum albumin, and hemoglobin in the genus *Mazama* in order to evaluate the polymorphism among different species in Brazil. Blood samples from 138 animals, kept in captivity and with a known origin in nature and coming from all regions of the country, were studied by polyacrylamide gel electrophoresis. Variability for the transferrin locus ranged from monomorphism in *M. nana* and *M. bororo* to six different electromorphs in *M. gouazoubira*. Monomorphism was found at the serum albumin locus but two alleles were observed in *M. gouazoubira*. Hemoglobin presented three phenotypes but no significant differences in gene frequencies were observed.

**Key words:** Cervidae, *Mazama*, Neotropical deer.

### INTRODUÇÃO

Os cervídeos do gênero *Mazama* ocorrem em toda a América tropical e subtropical, desde o México até o Paraguai (ALLEN, 1915; CABRERA, 1960). Alguns trabalhos tentaram esclarecer as dúvidas taxonômicas no gênero (ALLEN, 1915; RIBEIRO, 1919; CABRERA, 1960, CZERNAY, 1987), porém ainda hoje existe muita controvérsia sobre a distribuição geográfica e a classificação de suas espécies. A classificação atualmente aceita para as espécies que ocorrem no Brasil (DUARTE & MERINO, 1997) divide o gênero *Mazama* em cinco espécies: *M. gouazoubira*, *M. americana*, *M. nana*, *M. bororo* e *M. nemorivaga*.

No único estudo realizado em genética bioquímica do gênero *Mazama*, SMITH *et al.* (1986) observaram polimorfismo em 50% dos locos estudados em *M. gouazoubira* e *M. americana*. Além das análises eletroforéticas, estudos morfométricos foram realizados, contradizendo as evidências morfológicas, uma vez que *M. americana* mostrou-se mais estreitamente relacionada a *Odocoileus virginianus* que a *M. gouazoubira*.

Comparando duas populações de *Rangifer tarandus*, uma continental e outra introduzida numa ilha há

aproximadamente 200 anos, R□ED *et al.* (1985) observaram uma baixa variabilidade genética no locus das transferrinas, além de desvio das frequências alélicas na população insular, quando comparada à continental, estando essa baixa variabilidade associada à perda de alelos por deriva genética ou endocruzamentos sucessivos. As espécies generalistas ou “oportunistas” (estrategistas r), ou seja, que se adaptam com facilidade em ambientes degradados ou áreas cultivadas e que mesmo nestas condições apresentam alta fertilidade, têm maior diversidade genética no nível molecular. Já as espécies especialistas (estrategistas k), que exploram ambientes estáveis, geralmente florestas antigas ou ecossistemas conservados, exibem a tendência de ser menos variáveis geneticamente (NEVO *et al.*, 1983). HARTL & REIMOSER (1988) corroboram estas observações em estudos de genética bioquímica em cervídeos, afirmando que em espécies estrategistas r muitos polimorfismos podem ser preservados e a ocorrência de alelos raros pode ser freqüente, em contraste com as perdas alélicas sofridas por espécies estrategistas k.

STRATIL *et al.* (1990) estudaram 112 animais da espécie *Cervus elaphus* e observaram monomorfismo no loco das albuminas séricas. As mesmas observações foram

feitas por CAMERON & VYSE (1978). A observação do monomorfismo intra-específico caracteriza esta proteína como um bom marcador bioquímico a ser utilizado na diferenciação interespecífica em indivíduos deste gênero, sendo que a heterozigiosidade no loco da albumina pode ser utilizada para a avaliação da hibridação entre estas espécies.

EMERSON & TATE (1993) utilizaram a hemoglobina, juntamente com outras proteínas e enzimas, com o objetivo de estabelecer relações evolutivas entre dez diferentes espécies de cervídeos da subfamília Cervinae. As relações bioquímicas entre as espécies contrastam com as observações de caracteres morfológicos, fazendo com que, por exemplo, *Cervus unicolor* e *C. timorensis*, muito semelhantes morfológicamente, sendo inclusive considerados da mesma espécie por alguns zoólogos, apresentaram distância genética estimada em  $D=0.54$ , praticamente a mesma estimada para *C. nippon* e *C. timorensis*, espécies morfológicamente muito distintas.

O objetivo do presente trabalho foi determinar o perfil eletroforético das transferrinas, albuminas séricas e hemoglobinas em cervídeos do gênero *Mazama* de diversas localidades no Brasil, visando à busca de marcadores protéicos específicos que possam contribuir com o entendimento das relações filogenéticas e a história evolutiva das espécies desse gênero.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de plasma sanguíneo e produto de hemólise de 138 cervídeos do gênero *Mazama* provenientes de todas as regiões do Brasil (Tabela 1). Os animais, de ambos os sexos, eram mantidos em cativeiros particulares ou zoológicos, porém todos com a origem conhecida na natureza. De cada animal, foram obtidos 5ml de sangue através de venopunção da jugular, em tubos estéreis contendo EDTA. O plasma sanguíneo foi obtido através de centrifugação do sangue total a 120 G por 10 minutos. O hemolisado foi obtido após três lavagens consecutivas das hemácias em solução fisiológica de NaCl 0,9% através de centrifugação a 120 G e posterior tratamento com água destilada e clorofórmio 1:1 e centrifugação a 120 G por 10 minutos.

Tabela 1. Número de indivíduos e região de coleta de cada espécie do gênero *Mazama*.

Espécies	N	Regiões
<i>Mazama gouazoubira</i>	66	Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste
<i>Mazama americana</i>	26	Sul, Centro-Oeste e Norte
<i>Mazama nana</i>	35	Sul
<i>Mazama bororo</i>	02	Sudeste
<i>Mazama nemorivaga</i>	09	Norte

A metodologia de eletroforese empregada tanto na separação das transferrinas e albuminas séricas quanto na separação da hemoglobina foi a mesma (HAMES & RICKWOOD, 1990), havendo variação apenas na concentração do gel e tempo de corrida utilizado para cada proteína. A eletroforese foi realizada em sistema descontínuo de tampões (Tris-Glicina pH 8,6 na cuba e Tris HCl pH 6,8 no gel), em gel de poliacrilamida, em placas de 18 X 16 cm. Para a separação das transferrinas utilizou-se gel de separação a 6% de concentração durante seis horas em 200V e 20mA. A separação das albuminas séricas foi realizada em gel de concentração 10%, por 16h a 150V e 5mA. A eletroforese das hemoglobinas foi realizada em gel de concentração 7,5%, durante seis horas com 200V e 20mA. Todas as eletroforeses foram realizadas à temperatura constante de 4°C. As colorações foram realizadas em solução corante de Comassie Blue Brilliant (R250) a 0,04% (W/V), por aproximadamente seis horas (DIEZEL *et al.*, 1972).

Os fenótipos observados para os três loci foram classificados segundo sua frequência e distribuição geográfica.

## RESULTADOS

Após as análises eletroforéticas, ficaram definidos doze diferentes fenótipos para o sistema das transferrinas no gênero *Mazama* (Fig. 1-A; Tabela 2). As espécies *M. nana* e *M. bororo* apresentaram-se monomórficas com um fenótipo comum às duas espécies, de apenas duas bandas (fenótipos I e II). Na espécie *M. americana*, dois fenótipos (denominados III e IV) ficaram evidentes, um com duas e outro com três bandas. Os padrões obtidos nesta espécie diferiram dos observados nas espécies *M. nana* e *M. bororo*. *Mazama gouazoubira* apresentou-se como a mais polimórfica das espécies para o sistema das transferrinas. Seis diferentes fenótipos (denominados V, VI, VII, VIII, IX e X) foram observados, variando os padrões de duas a quatro bandas. Dois desses fenótipos (V e VI) estão amplamente distribuídos no Brasil. Os demais estão restritos às regiões Sul e/ou Sudeste (Tabela 3). *Mazama nemorivaga* apresentou dois diferentes fenótipos (denominados XI e XII) para as transferrinas, sendo estes também identificados em *M. gouazoubira*, apresentando mobilidade relativa semelhantes aos fenótipos V e X (Fig. 1-A).

No locus das albuminas uma única banda foi detectada em todos os animais estudados, porém a mobilidade relativa observada em *M. gouazoubira* foi diferente das observadas nas demais espécies, as quais se mantiveram constantes. As espécies *M. nana*, *M. americana*, *M. bororo* e *M. nemorivaga* apresentaram mobilidade eletroforética semelhante. Em *M. gouazoubira*, a banda referente à albumina mostrou migração eletroforética maior (Fig. 1-B).

Foram observados três diferentes fenótipos para o sistema das hemoglobinas em todas as espécies do gênero (Fig. 1-C). Dois deles formados por apenas uma banda de diferentes padrões de migração, denominados AA e BB, os de menor e maior migração respectivamente. Um terceiro

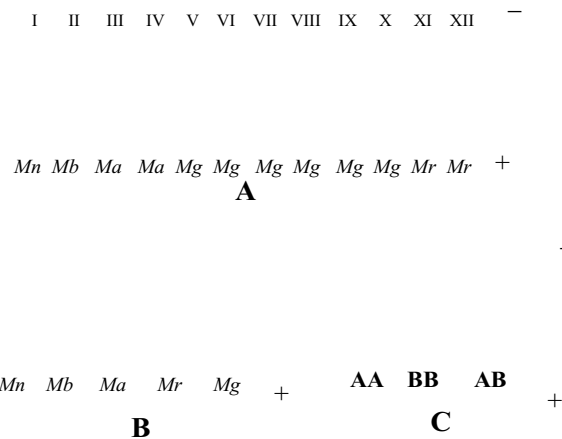


Fig. 1. Representação esquemática dos padrões de transferrina (A), albuminas séricas (B) e hemoglobinas (C) obtidos em eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 6%, 10% e 7,5%, respectivamente, em sistema descontinuo de tampões alcalinos pH 8,6 para cervídeos do gênero *Mazama*. Mn: *M. nana*, Mb: *M. bororo*, Ma: *M. americana*, Mg: *M. gouazoubira*, Mr: *M. nemorivaga*.

Tabela 2. Frequência dos fenótipos de transferrina observados no gênero *Mazama*.

Espécie	Fenótipo	Frequência
<i>M. nana</i>	I	100%
<i>M. bororo</i>	II	100%
<i>M. americana</i>	III	78,5%
	IV	21,5%
<i>M. gouazoubira</i>	V	49,3%
	VI	26,1%
	VII	10,8%
	VIII	9,3%
	IX	1,5%
	X	3%
<i>M. nemorivaga</i>	XI	75%
	XII	25%

Tabela 3. Distribuição dos fenótipos (%) de transferrina observados em *M. gouazoubira* encontrada nas regiões do Brasil.

Fenótipos	S	SE	C-O	NE	Total
V	26,7%	17,8%	24,4%	31,1%	45
VI	40%	20%	30%	10%	10
VII	100%	0	0	0	4
VIII	66,7%	33,3%	0	0	3
IX	0	100%	0	0	1
X	100%	0	0	0	3
	25	12	14	15	66

fenótipo formado por duas bandas constituiu um provável heterozigoto dos dois primeiros, denominado AB. *Mazama nana*, *M. americana* e *M. gouazoubira* apresentaram os três

fenótipos; *M. gouazoubira*, os fenótipos AA e AB; e *M. bororo*, o fenótipo AB (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência dos fenótipos de hemoglobina no gênero *Mazama*.

Espécie	Fenótipos		
	AA	AB	BB
<i>M. nana</i>	50%	35%	15%
<i>M. americana</i>	51,9%	40,7%	7,4%
<i>M. nemorivaga</i>	66,7%	33,3%	-
<i>M. bororo</i>	-	100%	-
<i>M. gouazoubira</i>	46,5%	35,2%	18,3%

## DISCUSSÃO

A observação do monomorfismo para o locus das transferrinas em *M. nana*, a ocorrência de apenas dois fenótipos em *M. americana* e o alto polimorfismo em *M. gouazoubira* talvez possam ser entendidos pelo fato de *M. nana* e *M. americana* serem altamente especialistas (estrategistas k), ou seja, sobrevivem somente em ambientes preservados. As observações realizadas em relação a estas espécies, por ocasião das coletas, mostraram que realmente elas não se adaptam com facilidade a ambientes degradados e utilizados para agricultura ou pecuária. Em contrapartida, *M. gouazoubira* apresenta maior facilidade de adaptação a tais ambientes (DUARTE, 1992), podendo ser considerada uma espécie "oportunista" (estrategista r). Em relação à variabilidade apresentada nestas espécies, tomando-se por base tais características ecológicas, as observações deste estudo concordam com as inferências feitas por HARTL & REIMOSER (1988).

Outra hipótese para os dados obtidos em termos de variabilidade das transferrinas talvez possa ser entendida pela alta variabilidade numérica e morfológica dos cromossomos, característica do gênero *Mazama*. O grau de polimorfismo protéico observado neste estudo é inversamente proporcional ao cromossômico, descrito por DUARTE (1992) e DUARTE & MERINO (1997), onde *M. nana* e *M. americana* apresentam alta variabilidade cariotípica, variando tanto no conjunto diplóide quanto no número fundamental de braços. Já *M. gouazoubira* apresenta os números diplóide e fundamental de braços estáveis, com seu cariótipo podendo ser considerado como ancestral exatamente pelas suas características cromossômicas particulares (2n:70, sendo todos acrocêntricos). A associação da alta variabilidade cromossômica observada nas duas primeiras espécies, com sua reduzida distribuição geográfica, talvez seja responsável por uma diminuição do tamanho efetivo das populações, uma vez que o desbalanço cromossômico se traduz muitas vezes em infertilidade ou subfertilidade, incrementando uma futura perda de variabilidade genética. Já em *M. gouazoubira*, a estabilidade cromossômica contri-

bui para que mais produtos férteis sejam obtidos através de cruzamentos na natureza, contribuindo para a manutenção da variabilidade das populações.

Uma outra possível explicação para a observação de apenas homozigotos para o locus das transferrinas em *M. nana* pode se basear no fato de que as populações desta espécie, de ocorrência exclusiva no Sul do país, tenham sofrido uma fragmentação e que as subpopulações estariam sofrendo acentuado aumento na frequência de homozigotos devido à grande incidência de acasalamentos consanguíneos. Efeito semelhante foi proposto por GYLLENSTEN *et al.* (1980) para explicar a baixa heterozigosidade em uma população de *Cervus elaphus*. Outros marcadores, tais como microssatélites ou DNA mitocondrial, poderão futuramente ser aplicados nas mesmas amostras, visando corroborar essa idéia.

A observação dos fenótipos V, VI e VII em maior frequência e sob ampla distribuição sugere que estes sejam derivados dos ancestrais, uma vez que fenótipos semelhantes já foram descritos para espécies do Velho Mundo e América do Norte (EMERSON & TATE, 1993; GYLLENSTEN *et al.*, 1980; STRATIL *et al.*, 1990). Já a ocorrência de fenótipos exclusivos na Região Sul corrobora a hipótese de que os cervídeos entraram na América do Sul via Panamá no Plioceno (EISENBERG, 1987) e sugere que estes fenótipos sejam mais recentes evolutivamente.

A observação do monomorfismo intra-específico

em relação ao locus das albuminas séricas concorda com a maioria dos dados obtidos na literatura para outras espécies de cervídeos (MANLOVE *et al.*, 1975; McCLYMONT *et al.*, 1982; RØED, 1985, 1986; STRATIL *et al.*, 1990; BALLINGER *et al.*, 1992). Uma possível explicação para a mobilidade eletroforética diferente apenas em *M. gouazoubira* pode se basear no fato de que tal espécie foi a primeira a divergir na evolução do gênero. A ocorrência de um único fenótipo em todas as outras espécies pode representar uma sinapomorfia daquele grupo.

Os dados obtidos no sistema das hemoglobinas concordam com os descritos para outras espécies de cervídeos do Velho Mundo e América do Norte (MAUGHAN & WILLIAMS, 1964; EMERSON & TATE, 1993; HERZOG & KRABEL, 1993). A mobilidade eletroforética, diferentemente das outras proteínas estudadas, mostrou-se idêntica em todas as espécies do gênero, o que pode representar que este sistema vem se mantendo conservado no decorrer do processo evolutivo que envolve este grupo.

#### AGRADECIMENTOS

J. E. Garcia recebeu bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para a realização deste trabalho. Esse projeto recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. n° 94/2441-1). As amostras foram coletadas sob autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Agradecemos ao Sr. Edson Marcelo Bruder pelo auxílio técnico laboratorial.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN JA. 1915. Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bull. Am. Museum Nat. Hist.** 34: 521-553.
- BALLINGER SW, LH BLAKENSHIP, JW BICKHAM & SM CARR. 1992. Allozyme and mitochondrial DNA analyses of a hybrid zone between white-tailed deer and mule deer (*Odocoileus*) in West Texas. **Biochem Genet** 30: 1-11.
- CABRERA A. 1960. Catalogo de los mamíferos de America del Sur. **Rev. Museo Arg. Ciências Nat. Bernardino Rivadavia** 4: 309-732.
- CAMERON DG & ER VYSE. 1978. Heterozigosity in Yellowstone Park elk, *Cervus canadensis*. **Biochem Genet** 16: 651-657.
- CZERNAY S. 1987. Die spießhirsche und Pudus. **Die neue Brehm Bucherei** 581: 1-84.
- DIEZEL W, G KOPPERSCHLÄGER & E HOFMANN. 1972. An improved procedure for protein staining in polyacrilamide gels with a new type of Comassie Brilliant Blue. **Analyst. Biochem.** 48: 617-620.
- DUARTE JMB. 1992. **Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Dissertação de Mestrado. Jaboticabal: UNESP.
- DUARTE JMB & ML MERINO. 1997. Taxonomia e evolução, p. 2-20. In: JMB DUARTE (ed.). **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. Jaboticabal: FUNEP.
- EISENBERG JF. 1987. The evolutionary history of the Cervidae with special reference to the South America radiation, p. 60-64. In: CM Wemmer (ed.). **Biology and management of the Cervidae**. Washington: Research Symposia of the National Zoological Park Smithsonian Institution.
- EMERSON BC & ML TATE. 1993. Genetic analysis of evolutionary relationships among deer (subfamily Cervinae). **J. Hered.** 84: 266-273.
- GYLLENSTEN U, C REUTERWALL, N RYMAN & G STÄHL. 1980. Geographical variation of transferrin allele frequencies in three deer species from Scandinavia. **Hereditas** 92: 237-241.
- HAMES BD & D RICKWOOD. 1990. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. Oxford: IRL.
- HARTL GB & F REIMOSER. 1988. Biochemical variation in Roe deer (*Capreolus capreolus*): are r-strategists among deer genetically less variable than k-strategists? **Hereditas** 60: 221-227.
- HERZOG S & D KRABEL. 1993. Haemoglobin variants within the genus *Cervus*. **Small Ruminant Research** 11: 187-192.
- MANLOVE MN, JC AVISE, HO HILLESTAD, PR RAMSEY, MH SMITH & DO STRANEY. 1975. Starch gel electrophoresis for the study of population genetics in White-Tailed Deer. **Proc. Ann. Conf. Southeast. Game Fish Comm.** 29: 392.
- MAUGHAN E & JRB WILLIAMS. 1964. Haemoglobin types in deer. **Nature** 215: 404-405.
- McCLYMONT RA, M FENTON & JR THOMPSON. 1982. Identification of cervid tissues and hybridization by serum albumin. **J. Wildl. Manage.** 46: 540-544.
- NEVO E, A BEILES & R BEN-SHLOMO. 1983. The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates, p. 13-213. In: GS MANI (ed.). **Evolutionary dynamics of genetic diversity. Lecture notes in biomathematics**. New York: Springer Verlag.
- RØED K, AV SOLDAL & S THØRISSEN. 1985. Transferrin variability and founder effect in Iceland reindeer, *Rangifer tarandus* L. **Hereditas** 103: 161-164.
- RØED KH. 1985. Genetic variability in Norwegian semi-domestic reindeer (*Rangifer tarandus*). **Hereditas** 102: 177-184.
- RØED KH. 1986. Genetic variability in Norwegian wild reindeer. **Hereditas** 104: 293-298.
- RIBEIRO AM. 1919. Veados do Brasil segundo as colleções Rondon e de vários museus nacionaes e estrangeiros. **Rev. Museu Paulista** 11: 213-308.
- SMITH MH, WV BRANAN, L MARCHINTON, PE JOHNS & MC WOOTEN. 1986. Genetic and morphologic comparisons of red brocket, brown brocket and white tailed deer. **J. Mammal.** 67(1): 103-111.
- STRATIL A, P GLASNÁK, D BOBÁK, E CIZOVÁ, E GABRIZOVÁ & P KALÁB. 1990. Variation of some serum proteins in red deer, *Cervus elaphus* L. **Anim. Genet.** 21: 285-293.