



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

Isabel Luiza de Melo Nunes Freire Lima

**Variabilidade genética e evolução do gene PRNP em veados cinzas
(Mammalia; Cervidae; *Mazama*)**

**Vitória de Santo Antão
2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE –
PPGSHMA

Isabel Luiza de Melo Nunes Freire Lima

**Variabilidade genética e evolução do gene PRNP em veados cinzas
(Mammalia; Cervidae; *Mazama*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Genética da Conservação.

Orientador: Prof. Drº. José Eduardo Garcia

Vitória de Santo Antão

2016

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4: 2018

- L732v Lima, Isabel Luiza de Melo Nunes Freire.
Variabilidade genética e evolução do gene PRNP em veados cinzas
(Mammalia; Cervidae; *Mazama*) / Isabel Luiza de Melo Nunes Freire Lima. Vitória
de Santo Antão, 2016.
62 folhas: il.; color.
- Orientador: José Eduardo Garcia
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV,
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2017.
Inclui referências e anexo.
1. Veados cinzas – evolução. 2. Genética. I. Garcia, José Eduardo
(Orientador). II. Título.

599.65 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-082/2017

ISABEL LUIZA DE MELO NUNES FREIRE LIMA

**Variabilidade genética e evolução do gene PRNP em veados cinzas
(Mammalia; Cervidae; *Mazama*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Genética da Conservação.

Orientador: Prof. Dr^o. José Eduardo Garcia

Aprovado em: 10 / 08 / 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^o. José Eduardo Garcia (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^a. Ana Lauer Garcia (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Artur Maia Wanderley (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha saudosa avó Maria dos Prazeres,
a qual foi minha maior incentivadora pelo aprofundamento na área da Biologia,
assim como no viver digno, harmonioso e perseverante.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o amor real e incondicional que nos une e que nos mantém de pé. Por todo o apoio dos meus pais, Eliane e Clovis, em toda a minha formação desde os jalecos lavados às ajudas financeiras.

Ao meu noivo, Aderbal, por todo o apoio, companheirismo, equilíbrio e amor. Por sempre ser um atento e fiel parceiro, por toda a compreensão quando o tempo ou a distância não nos permitiu contato, por me fazer sempre acreditar que vale à pena.

Ao meu bom Deus por me dar vida todos os dias e me permitir todas as vivências de aprendizado e enriquecimento espiritual.

A todos os poucos e bons amigos, que colaboraram de diferentes e valiosas maneiras para o meu crescimento e equilíbrio. Alguns, desde muito antes desta recente jornada.

Ao Prof^o. Dr^o. José Eduardo Garcia pelos 7 anos de parceria e confiança culminantes à oportunidade deste momento, além da amizade e torcida recíproca pelo real crescimento.

Ao Prof^o. Dr^o. José Maurício Barbanti Duarte por toda colaboração imprescindível à esta pesquisa, e o acolhimento nos momentos presenciais.

Ao Prof^o. Dr^o. Artur Maia Wanderley por todo o apoio direto no desenvolvimento deste trabalho, com toda compreensão e camaradagem.

À Prof^a. Dr^a. Liliane Dantas pelo apoio ao meu sucesso e evolução profissional.

Aos professores da UFPE/CAV, pela formação desde a graduação. Em especial, à Prof^a. Dr^a Claudia Rohde pela amizade ao longo dos anos.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, onde dividi 7 anos de bom convívio, experiências e boas histórias.

Às colegas da turma de mestrado 2014.2, pelas trocas e amparos nesses 2 anos.

Aos amigos feitos no NUPECCE pela acolhida, contribuição profissional e amizade.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) por todo o apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 Indivíduo da espécie *Mazama gouazoubira*.
- Figura 1.2 Indivíduo da espécie *Mazama nemorivaga*.
- Figura 1.3 Ilustração de distribuição das espécies de *Mazama nemorivaga* e *Mazama gouazoubira*.
- Figura 1.4 Estrutura do gene PRNP.
- Figura 2.1 Mapa ilustrativo dos pontos de coleta das amostras de *Mazama* cinzas.
- Figura 2.2 Recorte do alinhamento geral das 42 sequências da Família Cervidae trabalhadas.
- Figura 2.3 Matriz do Teste de Neutralidade.
- Figura 2.4 Árvore filogenética das espécies trabalhadas com indicações dos valores de dN-dS resultantes dos valores gerados da matriz do Teste de Neutralidade.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1 Sequências nucleotídicas de cervídeos do Novo Mundo e do Velho Mundo obtidas do GenBank utilizadas nas análises.
- Anexo 1.1 Lista das espécies de *Mazama* cinzas trabalhadas

LISTA DE SÍMBOLOS

ω	Razão de substituição nucleotídica sinônima e não sinônima
H_0	Hipótese nula $dN = dS$.
dN	Abundâncias relativas das substituições não sinônimas em sítios não sinônimos.
dS	Abundâncias relativas das substituições sinônimas em sítios sinônimos.

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR	Polimerase Chain Reaction
SNP	Single Nucleotide Polymorfism
EET	Encefalopatia Espongiforme Transmissível
ORF	Open Reading Frame
CJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob
CWD	Chronic Wasting Disease
GSS	Síndrome de Gerstmann Sträussler-Scheinker (GSS)
FFI	Insônia familiar Fatal

RESUMO

O gênero *Mazama* é constituído por cervídeos sul-americanos e se divide, de acordo com a cor da pelagem, em veados vermelhos e veados marrons ou cinzas. Este segundo grupo é formado por *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*. O gene PRNP codifica a proteína *Príon* envolvida, quando em sua forma patogênica, na susceptibilidade a um conjunto de doenças neurológicas fatais e incuráveis. A *Doença da Debilidade Crônica em Cervídeos* (CWD) é um dos males neurológicos associados aos *Príons*, sendo epidêmica na América do Norte, porém nunca relatada em indivíduos Sul-americanos. A fim de entender qual curso evolutivo que esse gene percorreu nas espécies da família Cervidae, realizou-se uma análise de quais os mecanismos evolutivos que ele vem sendo submetido. Para tanto, foram analisadas as sequências de nucleotídeos do éxon 3 do gene PRNP em amostras de 42 espécimes do gênero *Mazama* (*M. gouazoubira* - n: 36; *M. nemorivaga* - n: 06) de diversas regiões do Brasil, em comparação com outras espécies da família Cervidae. A inferência do mecanismo evolutivo do PRNP entre os cervídeos analisados neste estudo através do Teste de Neutralidade (dN-dS) sugere que nos Veados do Velho Mundo o gene vem passando por deriva genética. Já nos Veados do Novo Mundo a evolução ocorre em alternância de processos de deriva genética e seleção positiva.

Palavras-Chave: Cervídeos Neotropicais. CWD. *Mazama*. *Prion*.

ABSTRACT

The Mazama Genus consists of South American deer and is divided, according to the fur color in red deer and brocket deer. This second group is formed by *M. gouazoubira* and *M. nemorivaga*. The PRNP gene encoding the prion protein involved when the pathogenic form in susceptibility to a group of incurable and fatal neurological diseases. The Chronic Wasting Disease (CWD) is one of these neurological malady associated with prions and epidemic in North America, but never reported in South American individuals. In order to understand which evolutionary course that ran gene in the species of the Cervidae family was held an analysis of which of the possible evolutionary mechanisms that it are being submitted. Therefore, we analyzed the sequences of nucleotides of exon 3 of the PRNP gene in samples from 42 specimens of the genus *Mazama* (*M. gouazoubira* - n: 36; *M. nemorivaga* - n: 06) from different regions of Brazil. In comparison with other species of the Cervidae family, the conservation of the gene was observed in aligning sequences. The inference of the evolutionary mechanism of PRNP among cervids analyzed in this study through the Neutrality Test (dN-dS) suggests that Old World Deer in the gene has undergone genetic drift. Already in the evolution of New World deer occurs in alternation of positive selection and genetic drift processes.

Keywords: CWD. *Mazama*. Neotropical Cervids. *Prion*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1.1 Introdução	13
1.2 Objetivos	15
1.2.1 Objetivo Geral	15
1.2.2. Objetivos Específicos	15
1.3 Revisão da Literatura	16
CAPÍTULO 2	26
Evidências de deriva genética e seleção positiva como principais mecanismos evolutivos do gene PRNP em Cervídeos	
2.1. Resumo	26
2.2 Abstract	26
2.3 Introdução	27
2.4 Material e Métodos	29
2.5 Resultados	32
2.6 Discussão	35
2.7 Conclusões	37
2.8 Referências Bibliográficas	37
REFERÊNCIAS	42
ANEXOS	54

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Mazama é a denominação dada ao gênero de um extenso grupo de cervídeos de tamanho pequeno a médio, variando de 15 a 30 quilos, os machos apresentam chifres curtos, simples e pontiagudos com 6 a 12 centímetros. Apresenta distribuição ao longo da América tropical e subtropical desde o Estado de Veracruz, no México, até a Argentina Central (ALLEN, 1915). Este gênero é constituído por cervídeos sul-americanos caracterizados pela rápida diversificação iniciada há $\cong 1,6$ Ma, o que acarretou em diversos fenômenos evolutivos, especialmente a convergência morfológica, deixando inúmeras lacunas em sua sistemática (FIGUEIRÊDO, 2014). Atribui-se às mudanças climáticas ocorridas no Pleistoceno, a manutenção da grande diversidade do grupo de cervídeos neotropicais onde o gênero se insere (RULL, 2008). De acordo com a cor da pelagem, o grupo divide-se em *Mazama* vermelhos e *Mazama* marrons ou cinzas.

O gene PRNP codifica a proteína *Príon* e possui dois genes parálogos, o SPRN (shadoo) e o PRND (doppel) (PREMZL *et al.*, 2007; PASSET *et al.*, 2013) que integram uma família gênica em expansão (WATTS; WESTAWAY, 2007). Surgiram por duplicação durante a divergência dos mamíferos eutérios. É sugerido que, de maneira conjunta, modulem a susceptibilidade às doenças causadas por mutações no gene PRNP, por mais que camundongos “PRNP-knockout” apresentem resistência ao desenvolvimento da doença (PASSET *et al.*, 2013).

Alguns polimorfismos de base única na sequência nucleotídica do éxon 3 do gene PRNP estão associados ao desenvolvimento de doenças neurológicas fatais à partir da conversão da proteína priônica em sua forma patogênica (PRUSINER, 1996). Essa alteração causa doenças em diversos mamíferos onde o gene é altamente conservado, e uma de suas manifestações acomete cervídeos na denominada Chronic Wasting Disease (CWD) ou Doença da Debilidade Crônica em Cervídeos (JOHNSON *et al.*, 2003, 2006).

Alguns genótipos resistentes ao desenvolvimento da doença ou que provém prolongados períodos de incubação além dos comuns já são demonstrados em alguns trabalhos com cervídeos norte-americanos (JOHNSON *et al.*, 2011; ROBINSON *et al.*, 2012; BRANDT *et al.*, 2015).

Esta informação levanta a curiosidade de qual processo evolutivo rege o gene PRNP, seja por meio de um mecanismo aleatório ou que confira valor adaptativo aos indivíduos da família Cervidae.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Inferir os padrões evolutivos do gene PRNP em *Mazama cinza*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Sequenciar o éxon 3 do gene PRNP em veados cinza de várias regiões do Brasil;
- Selecionar sequências do gene PRNP de cervídeos do Velho Mundo e do Novo Mundo no GenBank;
- Inferir os mecanismos evolutivos do gene PRNP em cervídeos do Velho Mundo e do Novo Mundo através de comparações das abundâncias relativas de substituições sinônimas e não sinônimas neste gene;

1.3 Revisão da Literatura

O Gênero *Mazama*

Durante o fenômeno geológico denominado “Great American Interchange” ($\cong 2,5$ MA), Duarte *et al.* (2008) supõe ter ocorrido a entrada dos primeiros cervídeos vindos da América do Norte no Hemisfério Sul, através do soerguimento do istmo do Panamá que teria formado uma ponte na América Central entre os continentes anteriormente separados. O sucesso da permanência dos cervídeos pode estar atribuído à ausência de outros ruminantes na região acessada, onde pelo menos oito espécies de veados ancestrais de diferentes morfologias externas, tiveram uma rápida radiação (WEBB, 2000; GILBERT *et al.*, 2006).

Com baixa plasticidade ecológica os *Mazama* vermelhos tiveram dificuldade em seu deslocamento geográfico, resultando em isolamento e diversificação genética (DUARTE, 1996). Por outro lado, os *Mazama* cinzas apresentaram maior plasticidade ecológica (PINDER; LEEUWENBERG, 1997), tendo boa movimentação e, redução dos níveis de diferenciação geográfica e especiação. A orelha grande e arredondada e os chifres não ramificados são uma característica de todos os animais do gênero *Mazama* (DUARTE, 1996, 2008), e que influenciam na adaptação a movimentar-se em ambientes de florestas densas e vegetações fechadas (EISENBERG, 2000; MERINO *et al.*, 2005). Estas espécies possuem certas variações intra e interpopulacionais que refletem em seus aspectos ecológicos e no comportamento social.

Os níveis de diferenciação cariotípica dentre as espécies de *Mazama* caracterizadas até o momento são elevados (DUARTE; JORGE, 2003), definindo algumas espécies como crípticas (*M. americana*, *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*) (DUARTE *et al.*, 2008; FIGUERÊDO, 2014). A evolução cariotípica deste gênero se baseia em fusões cêntricas ou em tandem com decréscimo no número cromossômico (DUARTE; MERINO, 1997), dado reforçado por Gustavsson e Sundt (1969) quando indicam que estes tipos de fusões acarretam valor adaptativo aos indivíduos do gênero.

Atualmente, das dez espécies existentes no gênero (DUARTE; GONZÁLEZ, 2010) cinco delas - *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. americana*, *M. nana*, *M. bororo* - estão presentes em território brasileiro (MERINO; ROSSI, 2010).

Mazama cinzas

O veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) (Figura 1.1) é o cervídeo brasileiro em maior abundância (Duarte, 1996), sendo uma espécie facilmente encontrada, ocupando a partir do cerrado ao sul do rio Amazonas, e por todo o Brasil, até o norte da Argentina

(AVILA-PIRES, 1959; DUARTE, 1996) (Figura 1.3). Ele tem porte de pequeno a médio, com peso entre 11-25 kg e altura média de 50 cm (ROSSI, 2000). A coloração geral dos indivíduos é variável, podendo ir do cinza escuro até o marrom avermelhado (PINDER e LEEUWENBERG, 1997). A espécie teve sua primeira descrição realizada por Fisher (1814) que o denominou como *Cervus gouazoubira* baseado em De Azara (1801). Já no ano seguinte os estudos em sistemática entre os indivíduos de veados marrons se desenvolviam quando Illiger (1815) o considerou como *Mazama simplicicornis*. E assim, os seguintes 90 anos levantaram discussões sobre sua nomenclatura. Até que em 2001, Gardner propõe votação do proposto em seu trabalho recente na época (GARDNER, 1999), e é firmado o nome atual (BLACK-DECIMA *et al.*, 2010).

Figura 1.1 – Indivíduo da espécie *Mazama gouazoubira*.



Fonte: González (2010).

A espécie *Mazama nemorivaga*, ou veado-da-amazônia (Figura 1.2), possui pequeno porte, com aproximadamente 15 kg de peso em média e 48 cm de altura. Apresenta coloração cinza, misturada com pelos amarelados principalmente nas laterais. Os machos apresentam chifres geralmente delgados e bastante inclinados póstero-dorsalmente. Esta espécie parece estar restrita à Região Amazônica, incluindo o Estado do Maranhão (ROSSI, 2000; ROSSI *et al.* 2010) (Figura 1.3). Primeiramente descrito no Estado de Rondônia por Ribeiro (1919) como *Mazama rondoni*, a espécie teve sua denominação alterada por estudo

taxonômico promovido por Cabrera (1960) sobre os cervídeos sul-americanos denominando-a como *M. gouazoubira superciliaris* (Duarte, 1992). Baseando-se nas diferenças morfológicas e cariotípicas encontradas entre as duas espécies de *Mazama* cinzas, Duarte (1998) propôs separar *M. rondoni* de *M. gouazoubira*. Entretanto, Rossi (2000) considerou que *M. rondoni* era sinonímia de *M. nemorivaga*, e confirmou a proposta de Duarte (1998).

Figura 1.2 – Indivíduo da espécie *Mazama nemorivaga*.



Fonte: González (2010).

A diferença entre as espécies destaca-se pelas orelhas pequenas e afiladas, mufla grande e olhos proeminentes com respeito à linha do crânio, além da região branca na parte inferior da cauda como características existentes em *M. nemorivaga* (DUARTE, 1996; ROSSI *et al.*, 2010).

Figura 1.3 – Ilustração de distribuição das espécies de *Mazama nemorivaga* (traçado vermelho) e *Mazama gouazoubira* (traçado amarelo).



Fonte: Duarte e Reis (2012).

Vários estudos caracterizaram o cariótipo de *M. gouazoubira* com $2n=70$ e $NF=70$, com todos os cromossomos acrocêntricos, sendo o cromossomo X o maior do lote e o Y o menor lote (NEITZEL, 1979; NEITZEL, 1987; DUARTE, 1992; DUARTE; JORGE, 1996; DUARTE; MERINO, 1997; DUARTE, 1998). Este cariótipo tem sido considerado como ancestral aos demais integrantes da família Cervidae (NIETZEL, 1987; FONTANA e RUBINI, 1990; ABRIL, 2009). A fragilidade cariotípica da espécie gera rearranjos que indicam este fato. O *M. nemorivaga* tem cariótipo variável entre $2n=67/70$ e $FN=69/72$ com a presença de cromossomos B (2 a 8) (DUARTE; JORGE, 1998).

A não monofilia dos *Mazama* cinzas indica a necessidade de revisão taxonômica, além de apresentarem filogeneticamente um complexo de espécies crípticas para cada espécie

(FIGUEIRÊDO, 2014). Esta situação é reforçada por Cursino (2014) através da diferença da morfometria espermática e das proteínas identificadas no plasma seminal.

Estas espécies estão classificadas pela IUCN Red List como LC ('Least Concern': não sofre ameaça imediata à sobrevivência) (BLACK e VOGLIOTI, 2008; ROSSI e DUARTE, 2008).

O gene PRNP

O gene PRNP (sigla referente à proteína que codifica "**Príon Protein**") é conservado em todos os vertebrados, e tem sido estudado de maneira abrangente visto a necessidade de entendimento sobre suas funções e desenvolvimento, além de estar ligado a doenças fatais que acometem humanos e outros animais.

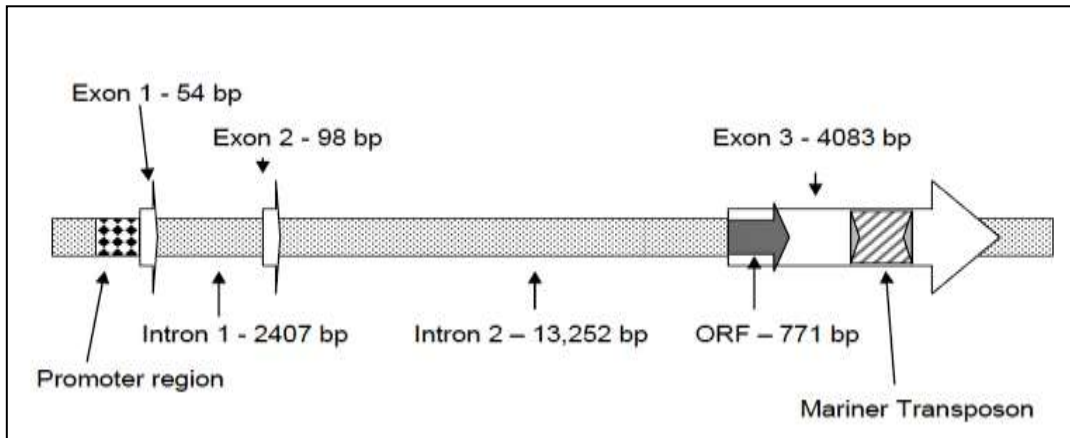
De acordo com Ehsani *et al.* (2011a) o surgimento do gene PRNP ocorreu à partir de dois rearranjos genômicos que teriam acontecido há centenas de milhões de anos atrás. O primeiro ocorreu no ectodomínio N-terminal de um gene ZIP antecessor, resultando no rearranjo de uma região central cisteína-flanqueadora (CFC); o segundo teria ocorrido em torno da explosão cambriana, permitindo o desenvolvimento de uma aparente retro-inserção genômica de um transcrito do gene ZIP e C-terminal truncada, indicando que o gene fundador da proteína do *Príon* equivale a um retrogene (EHSANI *et al.*, 2011b). O comprimento da sequência de codificação do PRNP para todas as espécies analisadas varia entre 567-825 pb, fato principalmente devido à inserção ou deleção na região de repetição dentro e entre as espécies (RONGYAN *et al.*, 2008).

Manson *et al.* (1992) demonstra a presença de transcritos de PRNP em ratos, antes mesmo de completar 15 dias do desenvolvimento cerebral e do cordão espinhal, como também no sistema nervoso central periférico. Estes achados foram evidenciados em células não-neuronais específicas (lâmina dentária e rins), e em tecidos extraembrionários sugerindo uma função pleiotrópica para PRNP durante a embriogênese. Além disso, há evidências de que o fator de crescimento nervoso aumenta o nível de mRNA do gene PRNP, o que pode indicar um papel importante na sobrevivência e diferenciação neuronal (MOBLEY *et al.*, 1988; WION *et al.*, 1988).

Em cervo-mula (*Odocoileus hemionus*) o gene funcional possui 19,9 kb de comprimento e três éxons semelhantes aos de bovinos, ovinos e humanos, sendo o terceiro éxon o detentor da ORF (*Open Reading Frame*) do gene com 4.083 nucleotídeos (BRAYTON *et al.*, 2004) (Figura 1.4). Os principais códons de parada no gene PRNP são TGA e TAG. Na extremidade 3' está presente o transposón Mariner, um elemento genético móvel que tem seu funcionamento na retirada e recolocação em outra região do genoma,

funcionando de forma diferente dos transposons retrovirais (KAZAZIAN, 2004). Na extremidade 5' está a região promotora (Figura 1.4).

Figura 1.4 – Estrutura do gene PRNP (imagem adaptada de BLAIR, 2007).



No gênero *Odocoileus* (*O. hemionus* e *O. virginianus*) existe um pseudogene processado (ψ PRNP), que se caracteriza numa sequência de nucleotídeos não-funcionais com características retrotransponíveis de uma cópia do mRNA (VANIN, 1985; BRAYTON *et al.*, 2004). Este pseudogene processado (ψ PRNP) não possui íntrons nem a sequência promotora da extremidade 5', mas contém cauda Poli-A flanqueando repetições diretas. Entretanto ele não é transcrito já que não foi detectado no cDNA montado com leucócitos periféricos de cervo-mula (*O. hemionus*) (BRAYTON *et al.*, 2004).

Uma conclusão interessante acerca dos pseudogenes aborda o fato de que em veados do Velho Mundo eles não estão presentes. Brayton *et al.* (2004) trazem possíveis opções para este quadro: 1) que o deslocamento da sequência pode ter ocorrido em "primer sites" no pseudogene que os impediu de detectá-lo; 2) baixa frequência do pseudogene nestas espécies; ou 3) estabelecimento do pseudogene após a divergência entre os veados do Velho Mundo e do Novo Mundo há mais de cinco milhões de anos atrás.

O Príon

A proteína codificada pelo gene PRNP, o *Príon*, é uma glicoproteína da membrana celular de função pouco conhecida. Entretanto, a conservação estrutural da proteína em diferentes organismos denota uma importante função da proteína no metabolismo celular (MANSON *et al.*, 1992). Pesquisadores consideram que por ser encontrado na membrana celular neuronal, assim como as N-CAMs e as cadedrinas, o Príon pode funcionar como um receptor de células neurais, tal qual uma molécula de adesão celular dirigindo e/ou mantendo a arquitetura do sistema nervoso (HOPE; MANSON, 1991).

A forma normal da proteína (PrP^{C}) ocorre no sistema nervoso central e em tecidos linforreticulares (PRUSINER, 2001; WEISSMANN, 2004; ZOMOSA-SIGNORET *et al.*, 2008). Sua cadeia com aproximadamente 250 aminoácidos, tem afinidade principal às células nervosas pressupondo sua participação nas atividades sinápticas (COLLING *et al.*, 1996), no metabolismo do cobre (PAN *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1997; VILES *et al.*, 1999; HOPE, 2000) e no controle do ritmo circadiano (PRUSINER, 1996), estando presente ainda em outros tecidos (BROWN *et al.*, 1998; COHEN; PRUSINER, 1999; MANSON, 1999; GABUS *et al.*, 2001).

Prusiner (1982) desenvolveu um conceito pelo qual uma proteína do próprio hospedeiro torna-se infecciosa por mudar sua configuração espacial, tendo sua função natural alterada, já que a conformação estrutural de uma molécula está diretamente ligada à sua atividade biológica. O termo *Príon* vem de "proteinaceous and infectious" e indica a natureza proteinácea e infecciosa da molécula.

Essas alterações podem ter origem genética, por via infecciosa ou até mesmo esporádica a partir da mutação da proteína priônica celular (PrP^{C}). O estabelecimento da doença se mantém à medida que sua forma patogênica (PrP^{Sc}) age como moldes que reformulam as formas naturais não-patogênicas (PrP^{C}) em novas moléculas PrP^{Sc} , em um processo contínuo de infecção (PRUSINER, 1998). Esta modificação é causada pela remoção de um peptídeo de sinal amino-terminal, uma clivagem de uma sequência de sinal do terminal carboxila após a adição de uma âncora de GPI, e uma adição de duas ou três cadeias de açúcar ligados à aspargina (STAHL *et al.*, 1987; GABRIEL *et al.* 1992).

Em suas análises, Pereda (2007) demonstra a ocorrência de interações do PrP^{C} com a proteína de matriz celular Laminina (LN) (indução de neuritogênese), com a cochaperonina ST11 ("Stress inducible protein 1") (induz efeito protetor contra apoptose neuronal), e com a proteína vitronectina (Vn) (crescimento axonal de gânglios da raiz dorsal). Entretanto, todas essas interações são afetadas pela mutação na proteína priônica (PEREDA, 2007).

Essas proteínas patogênicas se acumulam em células cerebrais, causando a morte celular e abrindo vacúolos no cérebro pela agregação de fibrilas amilóides que parecem desencadear vacúolos intraneuronais provocando, em última instância, o aspecto esponjoso das lesões ao sistema nervoso central, que podem ser visualizados na microscopia óptica (CORREIA e CORREIA, 2001). Doenças priônicas causam desordens neurodegenerativas fatais e incuráveis que estão classificadas como *Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis* (EET) (BOURNE, 2004; AGUZZI *et al.*, 2009). Essas enfermidades acometem humanos como, por exemplo, a *Doença de Creutzfeldt-Jakob* (CJD), o *Kuru*, a *Síndrome de Gerstmann Sträussler-Scheinker* (GSS) e a *Insônia Familiar Fatal* (FFI), como também a outros mamíferos como *Scrapie* em ovinos; *Encefalopatia Espongiforme Bovina* e na *Encefalopatia Felina*.

Inclusive, estudos baseados na produção de um fator estimulador de GFAP em células cultivadas de cérebros infectados com CJD (OLESZAK et al., 1988), e na gliose que ocorre durante o desenvolvimento de doenças transmissíveis neurodegenerativas (DEARMOND et al., 1987), sugerem que PrP^C pode ser um fator de proliferação de células astrogliais. Além disso, Wang et al. (2012) propõem que a Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI), uma chaperona enzimática envolvida na reconstrução da proteína mal dobrada no lúmen do retículo endoplasmático, esteja envolvida na regulação da progressão da doença priônica. Isso ocorre quando determinado aumento da expressão de PDI alivia o estresse causado pela citotoxicidade do PrP mutante no retículo endoplasmático, retardando a ocorrência de apoptoses neuronais (WANG et al., 2012).

Existe uma grande preocupação e recorrente busca ao entendimento da possibilidade de transmissão da doença priônica entre espécies diferentes (THIRY et al., 2004; PERROTT et al., 2013). Porém, esta situação requer um longo período de incubação, diferentemente da infecção intraespecífica que ocorre através de *Prions* homólogos (PRUSINER et al., 1990). Isso é condicionado pela chamada barreira interespecífica (LIEMANN e GLOCKSHUBER, 1998), por mais que a diferença na sequência de aminoácidos tenha variação de seus componentes em pequenos números. Um exemplo é visto nos 7 aminoácidos que divergem as proteínas priônicas de bovinos e ovinos. Entretanto, um elevado grau de similaridade de sequência entre os ungulados parece ter facilitado a transmissão de ovinos para o gado (WILESMITH et al., 1991).

Chronic Wasting Disease

A *Chronic Wasting Disease* (CWD) ou *Doença da Debilidade Crônica em Cervídeos* é uma enfermidade classificada no grupo das EET's que afeta espécies da família Cervidae. O primeiro registro de CWD foi feito em cervos-mula em cativeiro de um centro de pesquisa no estado do Colorado, Estados Unidos, em 1967. Somente em 1978, com base nas lesões neuropatológicas características, a patologia foi reconhecida como pertencente ao grupo das EET's (WILLIAMS e YOUNG, 1980). Quatorze anos mais tarde aconteceu o primeiro registro de CWD para animais selvagens, em um alce das montanhas rochosas, também no Colorado (WILLIAMS et al., 2002b). Atualmente a doença é considerada epidêmica em cervídeos norte-americanos.

A transmissão entre os indivíduos ocorre horizontalmente por diversas vias, incluindo saliva, excretas, carcaças em decomposição, leite e chifres (ANGERS et al., 2006, 2009; MATHIASON et al., 2006; GONZALEZ-ROMERO et al., 2008; TAMGUNEY et al., 2009; GOUGH et al., 2010; HALEY et al., 2011), ou como também no nascimento da prole (NALLS et al., 2013; BRANDT et al., 2015), em cativeiro ou vida livre. Algumas teorias pressupõem

alternativas ao surgimento da doença, tais como: a partir do contato entre animais infectados com o *scrapie* (WILLIAMS; MILLER, 2002); ou através de uma mutação espontânea do gene PRNP ocorrida em cervos-mula (*Odocoileus hemionus*) com posterior disseminação pelos demais animais (WILLIAMS; MILLER, 2003) e, ainda, devido a uma alteração conformacional, não induzida, da proteína priônica natural (PrP^C) para sua forma patogênica (PrP^{Sc}) (SALMAN, 2003).

Polimorfismos de base única (SNP's) estão presentes na origem das variações genéticas entre indivíduos da mesma espécie (JORDAN *et al.*, 2001), fornecendo um embasamento confiável para a avaliação da diversidade genética de uma espécie ou população. No caso do CWD, os SNP's apresentam associação à suscetibilidade da doença priônica. Falcão (2012) demonstrou que os cervídeos neotropicais apresentam 4 genótipos susceptíveis ao CWD de um total de 16 variações existentes em cervídeos norte-americanos (BRAYTON *et al.*, 2003; JOHNSON *et al.*, 2003, 2006; HEATON *et al.*, 2003; O'ROURKE *et al.*, 2004, 2009; JEWEL *et al.*, 2005; MENG *et al.*, 2005; HUSON *et al.*, 2006; HAPP *et al.*, 2007; JEONG *et al.*, 2007; SIGURDSON; AGUZZI, 2007; KELLY *et al.*, 2008; PERUCCHINNI *et al.*, 2008; PALETTO *et al.*, 2009; WILSON *et al.*, 2009; WRITE *et al.*, 2010; RHYAN *et al.*, 2011). Outros autores destacam a ocorrência de genótipos que fornecem resistência ao desenvolvimento da doença ou que conferem maior tempo de incubação após apresentação dos primeiros sinais clínicos (JOHNSON *et al.*, 2011; ROBINSON *et al.*, 2012; BRANDT *et al.*, 2015).

Substituições nucleotídicas sinônimas e não sinônimas

As mutações e suas influências regem a evolução de espécies, seja num contexto adaptativo ou para manutenção da diversidade genética. As substituições de bases nucleotídicas podem gerar mudanças a serem fixadas que podem mudar estruturalmente a proteína codificada por determinado gene ou não. Além das alterações que dão origem aos *stop códons* (TAA, TAG, TGA), onde a transcrição gênica é interrompida, outros dois tipos de mutações são considerados: a sinônima (dS), que não altera o aminoácido a ser codificado; e a não-sinônima (dN), quando é alterado aminoácido a ser codificado. E, justamente, quando comparadas as quantidades de cada tipo de substituição pelo número de sítios sinônimos e não sinônimos obtemos a razão (ω) dessas substituições (YANG, 2006).

Assim, quando essa razão corresponde a um resultado onde a quantidade de substituições em sítios não-sinônimos está acima da quantidade de substituições em sítios sinônimos é um indicativo de seleção positiva ($\omega > 1$) - onde existe o indicativo da fixação daquela alteração por conferir vantagem seletiva (HARRIS *et al.*, 2006). Mas, a seleção atua eliminando essas mutações não sinônimas, de forma que, indiretamente, aumentam as

mutações sinônimas. Portanto, o maior acúmulo de mutações sinônimas em relação às mutações não sinônimas ($\omega < 1$) indica que a seleção atua para manter aquele organismo já adaptado a um determinado ambiente e, por isso, sofrendo sob seleção negativa ou purificadora (SUZUKI; GOJOBORI, 1999).

Entretanto, quando esta razão resulta na hipótese nula (H_0) está confirmada a Teoria Neutra da evolução molecular, onde a grande maioria das mudanças evolutivas a nível molecular são não causadas por seleção positiva, mas pela deriva aleatória de mutações seletivamente neutras ou quase neutras (KIMURA, 1983). Kimura (1968) considerou que os polimorfismos contribuem para a evolução das espécies de maneira que o processo da deriva genética ganhou destaque, juntamente à seleção natural, nesta importância. Seja em mecanismos como "efeito fundador" ou numa melhor aptidão de alguns indivíduos em relação aos outros para reprodução, a deriva genética está presente com sua dinâmica de flutuações das frequências alélicas de modo a dispor variabilidade genética de maneira aleatória, que sofrerá ação de seleção em algum momento do curso evolutivo.

Contudo, a análise envolvendo dN e dS contribui em maior ênfase na detecção de sinais de seleção positiva, porém algumas limitações são reconhecidas para tal. Isto pode ser observado quando há um excesso de substituições não-sinônimas (dN) e se conclui que a região estudada apresenta sinais de seleção positiva. Mas se estas substituições encaminham as mudanças para aminoácidos quimicamente similares, o que se apresenta de fato é a ação de seleção purificadora que para manutenção da estrutura e/ou função química da região apresenta tais mutações (CROW; KIMURA, 1970).

CAPÍTULO 2

Evidências de deriva genética e seleção positiva como principais mecanismos evolutivos do gene PRNP em Cervídeos

Lima, I.L.M.N.F¹; Wanderley, A.M.¹; Garcia, J.E².

isabel.lima.87@gmail.com; artur_mw@hotmail.com; jegarcia30@gmail.com

Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória.

R. Alto do Reservatório, S/n - Bela Vista, Vitória de Santo Antão - PE, 55608-680.

2.1 Resumo

O gene PRNP codifica a proteína *Príon* envolvida, quando em sua forma patogênica, na susceptibilidade a um conjunto de doenças neurológicas fatais e incuráveis. A *Doença da Debilidade Crônica em Cervídeos* (CWD) é uma dessas enfermidades sendo epidêmica na América do Norte, porém nunca relatada em indivíduos Sul-americanos. A fim de entender o curso evolutivo percorrido por esse gene nas espécies da família Cervidae foram analisadas as sequências de nucleotídeos do éxon 3 do gene PRNP, em amostras de 41 indivíduos da família Cervidae, entre Veados do Velho Mundo e Veados do Novo Mundo, com representantes de cervídeos neotropicais brasileiros. A comparação de suas sequências revelou a grande conservação do gene nas espécies analisadas. A inferência do mecanismo evolutivo do PRNP entre os cervídeos analisados neste estudo, feita através da variância da diferença dos valores de abundância relativa de substituição sinônimas (dS) e não-sinônimas (dN) no Teste de Neutralidade (dN-dS), sugere que nos Veados do Velho Mundo o gene vem passando por deriva genética. Já nos Veados do Novo Mundo, foi observado que a evolução ocorre tanto deriva genética como seleção positiva.

2.2 Abstract

The PRNP gene encoding the prion protein involved when the pathogenic form in susceptibility to a group of incurable and fatal neurological diseases. The Chronic Wasting Disease (CWD) is one of these neurological diseases associated with prions and epidemic in North America, but never reported in South American individuals. In order to understand the evolutionary course covered by this gene in the species of the Cervidae family analyzed the

sequences of exon nucleotides 3 PRNP gene in samples from 41 individuals Cervidae family, between the Old World Deer and New World Deer, with representatives of Brazilian neotropical deer. The comparison of their sequences revealed the great conservation of the gene in the analyzed species. Inference of evolutionary mechanism of PRNP among deer examined in this study, made through the variance of the difference of the relative abundance values synonymous substitution (DS), and non-synonymous (dN) in Neutrality Test (dN-dS) suggests that in the Old World Deer the gene is going through genetic drift. Already in the New World Deer, was observed that evolution occurs both genetic drift as positive selection.

2.3 Introdução

A família Cervidae é classificada dentro da ordem Artiodactyla, subordem Ruminantia, e que durante o Pleistoceno na América do Sul teve uma rápida radiação adaptativa, ocupando diversos nichos ecológicos (DUARTE e MERINO, 1997). Os primeiros cervídeos evoluíram de pequenos animais onívoros sem presença de chifres até animais herbívoros de grande porte com galhadas ramificadas (EISENBERG, 1987; VISLOBOKOVA, 1990). Atualmente, 55 espécies estão presentes na América, Ásia e nordeste da África (IUCN, 2016), e sua diversidade de espécies está relacionada a capacidade de habitar ambientes diversos (GEIST, 1998; COOKE, 2004).

Duarte *et al.* (2008) afirmam que os cervídeos Sul-americanos da tribo Odocoileini (inclui os gêneros *Rangifer*, *Odocoileus*, *Blastocerus*, *Ozotoceros*, *Hippocamelus*, *Pudu* e *Mazama*) são descendentes de duas linhagens ancestrais que divergiram a aproximadamente 5 Ma. Para o território brasileiro são descritas oito espécies de cervídeos neotropicais. Destes, três são classificados em gêneros distintos (*Ozotoceros bezoarticus*, *Odocoileus virginianus*, *Blastocerus dichotomus*), com machos apresentando porte médio a grande e chifres ramificados (WEBER; GONZÁLES, 2003). As outras cinco espécies estão inclusas no gênero *Mazama* (*M. americana*, *M. bororo*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. nemorivaga*) com indivíduos de porte médio a pequeno, e os machos apresentam chifres curtos, não ramificados e pontiagudos (EISENBERG; REDFORD, 1999; REIS *et al.*, 2010;). A taxonomia deste último gênero é indefinida, e demonstra estar em plena diversificação (DUARTE; MERINO, 1997; TIEPOLO; TOMAS, 2006).

A *Chronic Wasting Disease* é classificada como uma Encefalopatia Espongiforme Transmissível (EET) que acomete cervídeos, e até o momento foi notificada apenas em espécies norte-americanas. A CWD tem descrições desde 1967 de um centro de pesquisa no estado do Colorado, Estados Unidos, e até hoje ocorre em cervídeos Norte-americanos

(*Odocoileus hemionus*, *Odocoileus virginianus*, *Cervus elaphus* e *Alces alces*). A transmissão entre eles pode ocorrer de maneira horizontal (ANGERS *et al.*, 2006, 2009; MATHIASON *et al.*, 2006; GONZALEZ-ROMERO *et al.*, 2008; TAMGÜNEY *et al.*, 2009; GOUGH *et al.*, 2010; HALEY *et al.*, 2011), ou vertical (NALLS *et al.*, 2013; BRANDT *et al.*, 2015), em cativeiro ou vida livre. Para estes indivíduos com casos clínicos anotados o desenvolvimento da doença está diretamente relacionado a determinados polimorfismos, variáveis entre espécies, da sequência do éxon 3 do gene PRNP que codifica a proteína *Príon*. O gene PRNP é amplamente estudado de maneira a compreender sua estrutura e mecanismos evolutivos em diversas espécies, aliadas a uma busca no entendimento de sua função que ainda é indefinida (AGUZZI, 2004; van RHEEDE *et al.*, 2003; SLATE, 2005; LI *et al.*, 2010; EHSANI *et al.*, 2011a, 2011b).

Cervídeos neotropicais nunca foram notificados com a doença, entretanto Falcão (2012) supõe que eles possuem alguns polimorfismos de associação à susceptibilidade de desenvolvimento da enfermidade.

De acordo com a teoria neutra da evolução molecular, a maioria das substituições nucleotídicas não gerará maior nem menor aptidão ao indivíduo, sendo a fixação dessa mutação dependente do acaso, i.e., deriva genética (KIMURA, 1968; DURET *et al.*, 2008). As substituições de nucleotídeos que alteram a estrutura proteica podem repercutir no valor adaptativo da população. Se essa substituição for prejudicial, ela deve ser selecionada negativamente. Entretanto, se a substituição conferir maior aptidão ao organismo, a mesma deverá ser fixada por seleção positiva. A comparação das abundâncias relativas de mutações sinônimas (dS) e não sinônimas (dN) em um gene podem, portanto, indicar as principais forças evolutivas atuantes sobre o mesmo: deriva genética, seleção negativa ou seleção positiva (HUGHES; NEI, 1988, 1989; TSUNOYAMA; GOJOBORI, 1998).

Devido à demanda que todo esse contexto traz, temos como objetivo neste estudo investigar de que maneira estão se dando os mecanismos evolutivos atuantes sobre o gene PRNP na família Cervidae.

2.4 Materiais e Métodos

Coleta e Extração de DNA das amostras

Quarenta e duas amostras de pelo do gênero *Mazama* (Anexo 1) foram coletadas pela equipe do Núcleo de Pesquisas e Conservação de Cervídeos (NUPECCE - UNESP) em diversas regiões do Brasil (Figura 2.1), sob autorização expressa do IBAMA. Estas amostras mantidas em etanol tiveram sua extração de DNA realizada segundo protocolo adaptado de Sambrook *et al.* (1989) obtendo comprovação de qualidade através da quantificação em gel de agarose 1%, visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador, como também por meio de NanoDrop™.

Figura 2.1 – Mapa ilustrativo dos pontos de coleta das amostras de *Mazama* cinzas.



Amplificação dos fragmentos do éxon 3 do gene PRNP

As amostras foram amplificadas por meio de protocolo de PCR (Polymerase Chain Reaction) e par de primers descritos por Johnson *et al.* (2003, 2006) (CWD13 - 5' TTTTGCAGATAAGTCATCATGGTGAAA 3' ; CWD LA - 5' AGAAGATAATGAAAACAGGAAGGTTGC 3') e analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%. Os produtos de PCR foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

Sequenciamento dos produtos de PCR do gene PRNP

Os fragmentos de aproximadamente 800pb foram sequenciados utilizando os mesmos primers, em ambos os sentidos, em reação com a adição de dideoxinucleotídeos marcados com fluoróforos (ABI Prism Big Dye terminator) e os produtos das reações foram analisados em sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100. A qualidade das sequências de nucleotídeos obtidas foi verificada por meio do software PhredPhrap (www.phrap.org). Só foram utilizadas no prosseguimento do estudo sequências nas quais pelo menos 90% dos nucleotídeos foram classificados como confiáveis (Phred: 20).

Análise das sequências

Dessas 42 amostras do gênero *Mazama* (*M. gouazoubira* – n:36; *M. nemorivaga* – n:6) foram utilizadas para as análises fenéticas 12 sequências nucleotídicas (*M. gouazoubira* – n:5; *M. nemorivaga* – n:5), polimórficas pelo sucesso da leitura dos sequenciamentos através do software Trev version 1.9-r do Staden Package (STADEN *et al.*, 1998). O alinhamento em pares de cada amostra foi feito utilizando o programa PreGap 4 do Staden Package (STADEN *et al.*, 1998).

Foram utilizadas para a análise macroevolutiva três sequências do gene PRNP das espécies *Blastoceros dichotomus* (PP55, PP83 e PP137) e *Ozotoceros benzoarticus* (FN 03, FN 25 e FN 26) do trabalho de Falcão (2012). Outros indivíduos da Ordem Artiodactyla, família Cervidae, do velho e do novo mundo (Tabela 2.1), com sequências do gene PRNP disponíveis no GenBank, foram elencados para a constituição de um banco de referência para a localização dos polimorfismos bem como para análises de similaridade com as espécies neotropicais. A escolha destas sequências foi baseada nos melhores resultados de BlastX (NCBI). As 42 sequências da família Cervidae tiveram seu alinhamento geral pelo MEGA 6.0 (TAMURA K. *et al.*, 2013) formando um bloco de alinhamento final de 644 pb (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Recorte do alinhamento geral das 42 seqüências da Família Cervidae trabalhadas.

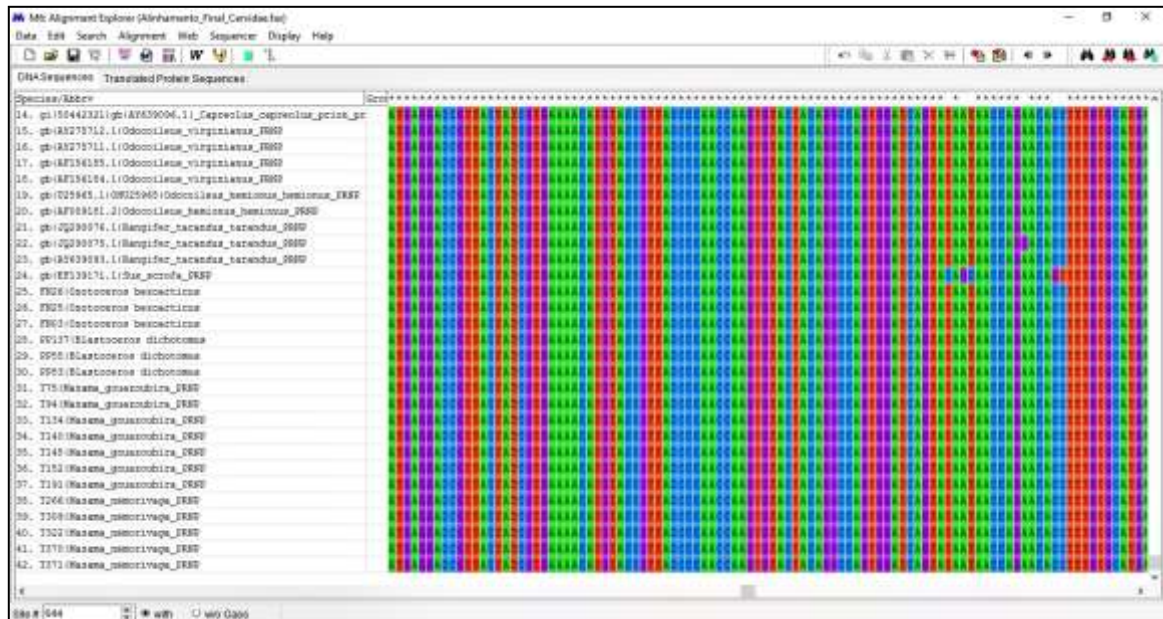


Tabela 2.1 – Sequências nucleotídicas obtidas do GenBank utilizadas nas análises. As espécies do lado esquerdo da linha preta pertencem ao grupo de cervídeos do Velho Mundo e as espécies do lado direito da linha preta pertencem ao grupo de cervídeos do Novo Mundo.

Espécie	Nº. GenBank	Espécie	Nº. GenBank
<i>Cervus dama</i>	AY639094.1	<i>Alces alces alces</i>	JQ290077.1
<i>Cervus elaphus nelsoni</i>	AF156182.1	<i>Alces alces alces</i>	AY639095.1
<i>Cervus elaphus nelsoni</i>	AF156183.1	<i>Capreolus capreolus</i>	AY639096.1
<i>Cervus elaphus nelsoni</i>	AF016227.2	<i>Odocoileus h. hemionus</i>	AF009181.2
<i>Cervus elaphus nelsoni</i>	AF016228.2	<i>Odocoileus h. hemionus</i>	U25965.1
<i>Cervus e. elaphus</i>	AY748454.1	<i>Odocoileus virginianus</i>	AY275711.1
<i>Cervus e. elaphus</i>	AY748455.1	<i>Odocoileus virginianus</i>	AY275712.1
<i>Cervus e. elaphus</i>	AY748456.1	<i>Odocoileus virginianus</i>	AF156184.1
<i>Cervus nippon</i>	EF057409.1	<i>Odocoileus virginianus</i>	AF156185.1
<i>Dama dama</i>	EF165089.1	<i>Rangifer t. tarandus</i>	JQ290075.1
<i>Muntiacus reevesi</i>	AB809458.1	<i>Rangifer t. tarandus</i>	JQ290076.1
		<i>Rangifer t. tarandus</i>	AY639093.1

Teste de Neutralidade

Para inferir sobre qual mecanismo evolutivo influencia o gene PRNP nos indivíduos estudados foi realizada a análise de Teoria Neutra (KIMURA, 1968) pelo método de Teste de neutralidade de Nei e Gojobori (1986). Nesta análise a variância da diferença dos valores de abundância relativa de substituição sinônimas (dS) e não-sinônimas (dN) (dN-dS) foram medidos pelo programa MEGA 6.0 (TAMURA K. *et al*, 2013). Um limite de $p < 0,05$ é estabelecido para o teste que também conta com aleatorização da metodologia bootstrap para robustez do resultado (NEI; KUMAR, 2000). A análise envolveu 41 sequências de nucleotídicas. Todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. A matriz do Teste de Neutralidade sofreu adaptação para melhor apresentação final do resultado. Onde foram calculadas médias dos valores de dN-dS dos indivíduos que continham mais de uma sequência em análise. De maneira equivalente, os valores de p foram considerados de acordo com a porcentagem do total de valores significativos (0-25%: 1 asterisco; 25%-50%: 2 asteriscos; 50%-75%: 3 asteriscos; 75%-100%: 4 asteriscos)

Árvore de similaridade

Para verificar relações de similaridade entre os indivíduos foi realizada a análise de Máxima verossimilhança através do programa PhyML 3.0 (GUINDON *et al.*, 2010). A análise de bootstrap foi executada para se testar a significância estatística para cada ramo da árvore gerada pela análise, com 1000 pseudo-replicações com todos os caracteres re-amostrados em cada replicação. Também foi feita a análise Bayesiana pelo programa BEAST v 1.7 (DRUMMOND *et al.*, 2012).

. Entretanto, para facilitar a visualização dos resultados foi montada uma imagem adaptada da congruência de árvores publicadas de Gilbert *et al.* (2006) e Duarte *et al.* (2008), que utilizaram marcadores moleculares nucleares e mitocondriais em suas análises para pesquisas com indivíduos da família Cervidae (Figura 2.4).

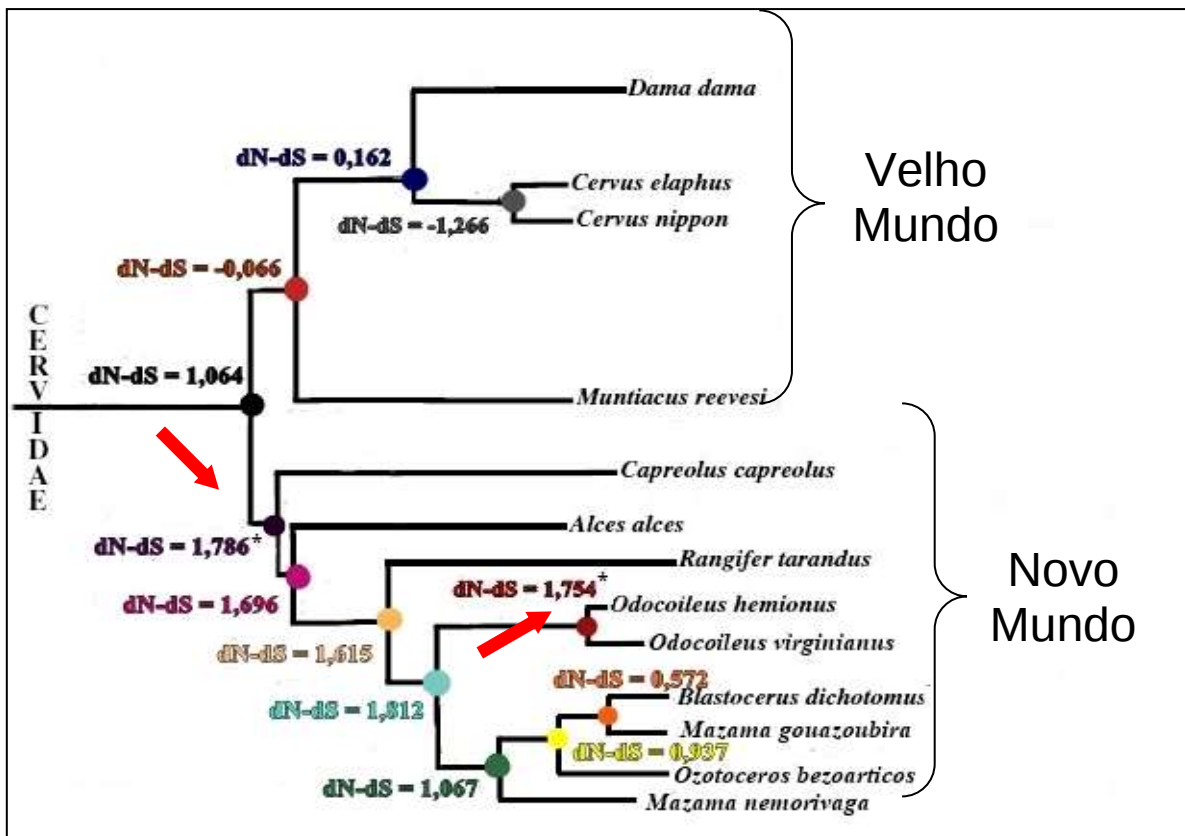
2.5 Resultados

No teste de Neutralidade, a matriz gerada apresentou um total de 206 posições no conjunto de dados final. Aqui apresentamos a versão adaptada para melhor apresentação do resultado (Figura 2.3).

Ao analisar os indivíduos da família Cervidae foi possível observar uma grande conservação do éxon 3 do gene PRNP (Anexo 2).

Com base nos resultados apresentados na matriz do Teste de Neutralidade e inseridos na árvore adaptada (Figura 2.4), podemos ver que o gene PRNP, nos indivíduos da família Cervidae analisados, sofreu mecanismos evolutivos distintos ao longo de sua trajetória. É indicado que o gene teve sua evolução guiada pela deriva genética no grupo de cervídeos do Velho Mundo. Enquanto que o gene sofreu seleção positiva no início da expansão do grupo dos cervídeos do Novo Mundo, e depois particularmente no clado do gênero *Odocoileus*.

Figura 2.4 – Árvore filogenética das espécies trabalhadas com indicações dos valores de dN-dS da matriz resultantes dos valores gerados da matriz do Teste de Neutralidade. Nos nós da árvore são indicadas as razões dN/dS entre as espécies presentes nos clados. Para consideração de significância o do valor de p na árvore foi considerado o quantitativo de porcentagem de valores totais maior ou igual a 75%. Assim, foram sinalizados na árvore com um único asterisco (*) as razões dN/dS que obedeçam essa premissa. Apontado pelas setas vermelhas estão os momentos em que é demonstrada a ocorrência de seleção positiva dentro da história evolutiva do gene PRNP na família Cervidae.



Fonte: imagem adaptada dos trabalhos de Gilbert *et al.* (2006) e Duarte *et al.* (2008)

2.6 Discussão

O *Príon*, proteína codificada pelo gene PRNP, não tem função definida por mais que esteja presente em mamíferos, que a estrutura do gene seja conservada entre as espécies. Mesmo sendo responsável por uma patologia fatal, antes de qualquer resultado, é presumida a sua importância nestes organismos. Aqui, vemos que para os indivíduos analisados a seleção positiva participa em alguns momentos do processo evolutivo do gene PRNP. Diante disso, este dado nos confirma a participação da promoção de um maior valor adaptativo gerado pelo gene no caminho evolutivo.

Brayton *et al.* (2004) tem como uma de suas sugestões que o estabelecimento do pseudogene processado (ψ PRNP) aconteceu após a divergência entre os veados do Velho Mundo e do Novo Mundo, há mais de 5 Ma atrás. E nas espécies do gênero *Odocoileus* (*O. hemionus* e *O. virginianus*) foi encontrado o pseudogene processado (ψ PRNP) (BRAYTON *et al.*, 2004). A presença de pseudogenes se deve à uma elevada expressão do seu gene de origem, o que pode aumentar a probabilidade de acumular mutações (PARK e QIAN, 2012) ou ser retro transposto, voltando para o genoma (POLISENO; SALMENA *et al.*, 2010). A respeito disso, já existiu a suspeita da influência desse pseudogene processado (ψ PRNP) na elevada taxa de casos clínicos do CWD nos indivíduos do gênero *Odocoileus*. Entretanto, O'Rourke *et al.* (2004) descarta essa influência, mantendo o foco da origem do desenvolvimento da doença priônica à determinados polimorfismos que resultam na proteína patogênica. Nossos resultados demonstram que o gene vem sofrendo seleção positiva nessas espécies. Juntamente a este dado temos a suposição de Williams e Miller (2003) de que o surgimento do CWD pode ter ocorrido por uma mutação espontânea do gene PRNP em cervos-mula (*Odocoileus hemionus*) com seguinte disseminação pelas demais espécies.

Assim, como em outros vertebrados estudados, (RONGYAN *et al.*, 2008; WOPFNER *et al.*, 1999) o gene é altamente conservado em cervídeos (LI *et al.*, 2007; WHITE *et al.*, 2010; FALCÃO, 2012). Por mais que os polimorfismos forneçam informações sobre o processo evolutivo, são alterações da sequência que ainda não têm uma definição final em relação a sua fixação ou perda, e assim se mantém sob deriva genética e seleção dentro das espécies (BEVENUTO *et al.*, 2013). Neste trabalho utilizamos sequências de espécies cervídeos neotropicais e comparamos com outros cervídeos ao redor do mundo. Com semelhante fonte amostral o trabalho desenvolvido por Falcão (2012), na busca de polimorfismos susceptíveis ao CWD, aponta que a maioria destes SNP's geram mutação silenciosa. Esse dado entra em consenso com o resultado demonstrado para os outros clados dos ramos inferiores da árvore apresentada nesse estudo, onde a ação da deriva

genética predomina já que alelos sob sua influência não sofrem alteração na aptidão dos indivíduos, num processo que pode perdurar por muitas gerações.

Como todas as outras encefalopatias espongiformes transmissíveis, CWD é caracterizada por um longo período de incubação, que pode variar entre 17 a 34 meses para início da manifestação dos sinais clínicos, dependendo da espécie avaliada (WILLIAMS e MILLER, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2002; BALACHANDRAN *et al.*, 2010). Além disso, a variação do genótipo do CWD pode conferir uma incubação ainda mais prolongada, permitindo uma vida reprodutiva maior e induzindo aumentos populacionais na frequência de genótipos de progressão mais lenta da doença em populações selvagens, semelhantes aos preditos por Robinson *et al.* (2012). Esta condição só proporciona as desvantagens da doença, provavelmente, após o indivíduo susceptível ter reproduzido. Portanto, o CWD não interferiria no valor reprodutivo dos cervídeos pois não teria, diretamente, uma forte pressão seletiva.

Leva-se em consideração que mesmo que o gene seja susceptível ao desenvolvimento da doença, ele age em pleiotropia desde o desenvolvimento embrionário (MANSON *et al.*, 1992) até interações com maquinário celular (PEREDA, 2007) envolvendo diversas respostas benéficas ao metabolismo regular. Fato este que denota a importância do gene PRNP nos indivíduos pelos quais está presente.

Gene PRNP em *Mazama* cinzas

Apesar de sua grande importância ecológica e sua ampla distribuição por praticamente todo o território nacional, a família Cervidae é um grupo pouco estudado no Brasil e diversas lacunas ainda persistem, especialmente no que diz respeito à taxonomia e evolução das espécies. Esta falta de conhecimento aumenta ainda mais a ameaça da manutenção delas na natureza.

Na família Cervidae, o gênero *Mazama* (RAFINESQUE, 1817) compreende 10 espécies neotropicais reconhecidas, sendo um dos mais numerosos em quantidade de espécies. A distribuição dos indivíduos deste gênero que domina países da América do Sul, ocupa habitats diversos desde florestas densas a savanas arbóreas (VOGLIOTI, 2003). Eisenberg (1987) sugere que as características morfológicas dos *Mazama* seja fruto de adaptação ao habitat num processo ocorrido durante a glaciação do Pleistoceno quando ocorreu o isolamento de habitats chamados refúgios. Contendo convergência morfológica em seus indivíduos (FIGUEIRÊDO, 2014), foram classificados em dois grupos: *Mazama* vermelhos e *Mazama* cinzas ou marros.

Os *Mazama* cinzas passam por problemas em sua taxonomia devido à polifilia encontrada entre as espécies do grupo (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*) (DUARTE *et al.*,

2008; HASSANIN *et al.*, 2012). Este grupo possui grande plasticidade ecológica, tendo boa movimentação por diferentes paisagens. Nos indivíduos de *M. gouazoubira* podem ser observadas inúmeras variações regionais, ecológicas e individuais na cor dos pelos (Black-Décima *et al.*, 2010). Ocupando todas as regiões do Brasil ao sul do rio Amazonas é encontrada nesta espécie uma alta diversidade haplotípica (Duarte *et al.*, 2008). Com sinonímia de *Mazama rondoni*, a espécie *M. nemorivaga* ocupa toda a região amazônica (ROSSI, 2000, 2010).

Visto que a proteína priônica é altamente conservada nos cervídeos, e em estudo prévio (FALCÃO, 2012) é indicada a presença de alterações nucleotídicas que indicam susceptibilidade ao CWD em uma das espécies de *Mazama* cinzas, dados obtidos neste estudo acrescentam informações importantes na reconstrução filogenética deste grupo.

2.7 Conclusão

De acordo com as análises desenvolvidas neste trabalho foi possível concluir que o éxon 3 do gene PRNP, em cervídeos do Velho Mundo analisados não sofrem pressão seletiva assim como algumas espécies estudadas de cervídeos do Novo Mundo, o que leva a supor que nas ocasiões demonstradas o gene estaria em deriva genética como mecanismo para seus processos evolutivos ao passar das gerações. Entretanto, em situações pontuais da evolução de cervídeos do Novo Mundo, existe a ocorrência de seleção natural positiva. Desta forma é sugerido que esta mutação no gene PRNP tenha conferido uma vantagem adaptativa no gênero *Odocoileus*, além da ocorrida no início da expansão dos cervídeos do Novo Mundo.

2.8 Referências Bibliográficas

ANGERS, Rachel C. *et al.* Prions in skeletal muscles of deer with chronic wasting disease. **Science/AAAS**, Washington, DC, v. 311, n. 5764, p. 1117-1117, 2006.

ANGERS, Rachel C. *et al.* Chronic wasting disease prions in elk antler velvet. **Other Publications in Zoonotics and Wildlife Disease**, Linconl, NE, p. 46, 2009.

BALACHANDRAN, Aru *et al.* Experimental oral transmission of chronic wasting disease to red deer (*Cervus elaphus elaphus*): early detection and late stage distribution of protease-resistant prion protein. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, ONT, v. 51, pp. 169-178, 2010.

BENEVENUTO, Juliana *et al.* Evolução molecular do gene metionina sintase em populações disjuntas de *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Viçosa, 42 p., 2013.

BLACK-DÉCIMA, PATRICIA *et al.* Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). **Neotropical Cervidology. Biology and medicine of Latin American deer**. FUNEP, Jaboticabal, SP, p. 190-201, 2010.

COOKE, F. The encyclopedia of animals: a complete visual guide. In: **Deer**. Univ of California Press, New York, NY, p. 190-195, 2004.

DRUMMOND, AJ *et. al.* Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 **Molecular Biology And Evolution**, Oxford, ENG, v. 29, p. 1969-1973, 2012.

DUARTE, J. M. B.; MERINO, M. L. Taxonomia e evolução. In: DUARTE, J. M. B. **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. FUNEP, Jaboticabal, SP, cap. 1, p. 1-21, 1997.

DURET, L. Neutral theory: the null hypothesis of molecular evolution. **Nature Education**, Cambridge, MA, v. 1, n. 1, p. 218, 2008.

ENDO, T.; IKEO, K.; GOJOBORI, T. Large-scale search for genes on which positive selection may operate. **Molecular biology and evolution**, New York, NY ,v. 13, n. 5, p. 685-690, 1996.

EISENBERG, J. F. The evolutionary history of the Cervidae with special reference to the South American radiation. **Biology and management of the Cervidae (CM Wemmer, ed.)**. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, p. 60-64, 1987.

EISEBERG, J.F.; REDFORD, K.H. Mammals of the neotropics: The central neotropics. Chicago: **The university of Chicago Press**, Chicago, IL,v. 3, 609p, 1999.

FALCÃO, C.B.R. Os cervídeos brasileiros e a doença priônica CWD (Chronic Wasting Disease): verificação de polimorfismos genéticos associados à susceptibilidade. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, 2012.

GEIST, V. Deer of the world: Their evolution, behavior and ecology. **Stackpole books**, Mechanicsburg, PA, 415p., 1998.

GONZALEZ-ROMERO, Dennisse *et al.* Detection of infectious prions in urine. **FEBS letters**, Heidelberg, DE, v. 582, n. 21, p. 3161-3166, 2008.

GUINDON, S. *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, Oxford, ENG, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

HUGHES, A L.; NEI, M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. **Nature**, London, UK, v. 335, n. 6186, p. 167-170, 1988.

KATAOKA, Natsumi *et al.* Surveillance of chronic wasting disease in sika deer, *Cervus nippon*, from Tokachi district in Hokkaido. **Journal of veterinary medical science**, Tokyo, JPN, v. 67, n. 3, p. 349-351, 2005.

KIMURA, M. *et al.* Evolutionary rate at the molecular level. **Nature**, New York, NY, v. 217, n. 5129, p. 624-626, 1968.

LI, Li *et al.* Species barriers for chronic wasting disease by in vitro conversion of prion protein. **Biochemical and biophysical research communications**, Amsterdam, NED, v. 364, n. 4, p. 796-800, 2007.

LI, J. *et al.* Darwinian evolution of prions in cell culture. **Science/AAAS**, Washington, DC, v. 327, n. 5967, p. 869-872, 2010.

MANSON, J. *et al.* The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? **Development**, Amsterdam, DEN, v. 115, n. 1, p. 117-122, 1992.

MATHIASON, Candace K. *et al.* Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. **Science/AAAS**, Washington, DC, v. 314, n. 5796, p. 133-136, 2006.

NALLS, Amy V. *et al.* Mother to offspring transmission of chronic wasting disease in Reeves' Muntjac deer. **PloS one**, Cambridge, UK, v. 8, n. 8, p. e71844, 2013.

NEI, M.; KUMAR, S. Molecular Evolution and Phylogenetics. **Oxford University Press**, Oxford, ENG, 2000.

PARK, C.; QIAN, W.; ZHANG, J. Genomic evidence for elevated mutation rates in highly expressed genes. **EMBO reports**, Heidelberg, DE, v. 13, n. 12, p. 1123-1129, 2012.

PEREDA, P.A.L. Estudo funcional de proteínas prion celular mutantes no domínio de ligação à STI1 e a vitronectina. **Dissertação (Mestrado)**. Fundação Antônio Prudente, São Paulo, 80p, 2007.

POLISENO, L. *et al.* A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. **Nature**, New York, NY, v. 465, n. 7301, p. 1033-1038, 2010.

PRUSINER, S.B. Introduction: Prion diseases. **Seminars in Virology**, Amsterdam, NED, v. 7, p. 157, 1996.

REIS, N.R. *et al.* **Mamíferos Do Brasil - Guia De Identificação**. 1ª edição, Technical Books Editora, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

SOHN, H. *et al.* A case of chronic wasting disease in an elk imported to Korea from Canada. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, JPN, v. 64, n. 9, p. 855-858, 2002.

STADEN, Rodger; BEAL, Kathryn F.; BONFIELD, James K. The staden package, 1998. In: **Bioinformatics methods and protocols**. Humana Press, p. 115-130, 1999.

TAMGÜNEY, G. *et al.* Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. **Nature**, New York, NY, v. 461, n. 7263, p. 529-532, 2009.

TAMURA, K. *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, Oxford, ENG, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TIEPOLO, L.M.; TOMAS, W.M. Ordem Artiodactyla. In: DOS REIS, N.; PERACCHI, A.L.; PEDRO W.A.; DE LIMA, I.P. (Org.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: SEMA. p.287-297, 2006.

TSUNOYAMA, K; GOJOBORI, T. Evolution of nicotinic acetylcholine receptor subunits. **Molecular biology and evolution**, Oxford, ENG, v. 15, n. 5, p. 518-527, 1998.

VAN RHEEDE, Teun *et al.* Molecular evolution of the mammalian prion protein. **Molecular biology and evolution**, New York, NY, v. 20, n. 1, p. 111-121, 2003.

WEBER, M.; GONZALEZ, S.. Latin American deer diversity and conservation: a review of status and distribution. **Ecoscience**, Washington, DC, p. 443-454, 2003.

WHITE, Stephen N. *et al.* Association analysis of PRNP gene region with chronic wasting disease in Rocky Mountain elk. **BMC research notes**, London, UK, v. 3, n. 1, p. 314, 2010.

WILLIAMS, E.S.; MILLER, M.W. Chronic wasting disease in deer and elk in North America. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, FRA, v. 21, n.2, p. 305-316, 2002.

WILLIAMS, Elizabeth S. *et al.* Chronic wasting disease of deer and elk: a review with recommendations for management. **The Journal of wildlife management**, Hoboken, NJ, p. 551-563, 2002b.

WOPFNER, Franziska *et al.* Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. **Journal of molecular biology**, Amsterdam, NED, v. 289, n. 5, p. 1163-1178, 1999.

VISLOBOKOVA, I. A. Fossil Deer of Eurasia. **Transactions of the Paleontological Institute**, Moscou, RUS, v. 240, p. 1-206, 1990.

VOGLIOTTI, Alexandre. História natural de Mazama bororo (Artiodactyla; Cervidae) através de etnozootologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria. **Tese (Doutorado)**. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 99p., 2003.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, V.V.; OLIVEIRA, E.H.C.; DUARTE, J.M.B. Evolução cariotípica no veado-mateiro (*Mazama americana*): Dados de citogenética clássica e molecular. In: Congresso Brasileiro de Genética, **Anais...** Águas de Lindoia, v. 55., p.174-174, 2009.
- ALLEN, J.A. Notes on american deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, NY, v. 34, p. 521-553, 1915.
- AGUZZI, A.; CALELLA, A. M. Prions: protein aggregation and infectious diseases. **Physiological Reviews**, Washington, DC, v. 89, n.4, p.1 05-1 52, 2009.
- ANGERS, Rachel C. *et al.* Prions in skeletal muscles of deer with chronic wasting disease. **Science/AAAS**, Washington, DC, v. 311, n. 5764, p. 1117-1117, 2006.
- ANGERS, Rachel C. *et al.* Chronic wasting disease prions in elk antler velvet. **Other Publications in Zoonotics and Wildlife Disease**, Linconl, NE, p. 46, 2009.
- AVILA-PIRES, F.D. As formas sul-americanas do veado-virá. **Anais da Academia Brasileira Ciências**, Rio de Janeiro, RJ, v. 31, n. 4, p. 547-556, 1959.
- BLACK, P.; VOGLIOTTI, A. *Mazama gouazoubira*. **The IUCN Red List of Threatened Species** 2008:e.T29620A9506233.
<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T29620A9506233.en>.
 Downloaded on 17 June 2016.
- BLACK-DÉCIMA, PATRICIA *et al.* Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). **Neotropical Cervidology. Biology and medicine of Latin American deer**, FUNEP, Jaboticabal, SP, p. 190-201, 2010.
- BLAIR, JL. Aptamer selection and cell culture model development for diagnosis of Chronic Wasting Disease of Cervidae. **Tese (Doutorado)** - Oklahoma State University, 190 p., 2007.
- BOURNE, D. Chronic wasting disease review. **Wildlife information network**, United Kingdom. 66 p, 2004.

BRANDT, Adam L. *et al.* Prion protein gene sequence and chronic wasting disease susceptibility in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Prion**, New York, NY, v. 9, n. 6, p. 449-462, 2015.

BRAYTON, K.A., *et al.*, A processed pseudogene contributes to apparent mule deer prion gene heterogeneity. **Gene**, Amsterdam, NED, v. 326, p. 167-73, 2004.

BROWN, D.R., *et al.*, The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature**, New York, NY, v. 390, n.6661, p. 684-687, 1997.

BROWN, D.R. *et al.* . Microglial expression of the prion protein. **Neuroreport**. New York, NY, v. 9, p. 1425-1429, 1998.

CABRERA, A. Catalogo de los mamíferos de America del Sur. **Revista Museo Argentino Bernardino Rivadavia**, Buenos Aires, ARG, v. 4, p. 309-732, 1960.

COHEN, F.E.; PRUSINER, S.B. Strutural studies of prion proteins. In: **Prion Biology and diseases**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, cap. 5, p. 191-228, 1999.

COLLING, S.B.; COLLINGE, J.; JEFFERYS, J.G. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. **Neurosci Lett**, Amsterdam, NED, v.3, n. 209, v. 1, p.49-52, 1996.

CORREIA, J.H.R.D.; CORREIA, A.A.D. Initiation and replication of prion pathogenic synthesis in transmissible spongiform encephalopathy. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, POR, v. 96, n. 539, p.105-112, 2001.

CROW, James F. *et al.* An introduction to population genetics theory. **An introduction to population genetics theory**, New York, NY, 1970.

CURSINO, MS. Análise comparativa de características seminais de *Mazama* cinzas brasileiros: morfometria espermática e proteômica do plasma seminal. **Tese (doutorado)** - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 82p., 2014.

DEARMOND, S. J., *et al.* Changes in the localisation of the brain prion proteins during scrapie infection. **Neurology**, Minneapolis, MN, v. 37, p.1271-1281, 1987.

DE AZARA, F. Essais sur l'histoire naturelle des quadrupèdes de la province du Paraguay. **C. Pougens**, Paris, FRA, 1801.

DINIZ-FILHO, J.A.F., TELLES, M.P.C. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation Biology**, Malden, MA v. 16, p. 924-935, 2002.

DON, R.H. *et. al.* Touchdown'PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, Oxford, ENG, v.19, n.14, 1991.

DUARTE, J. M. B. Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. **Dissertação (Mestrado)**, Jaboticabal, SP, 153p., 1992.

DUARTE, J.M.B. **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**. FUNEP, Jaboticabal, SP, 14p, 1996.

DUARTE, J. M. B. e JORGE, W. Chromosomal polymorphism in several population of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, ESP, v.45(170), p.281-287, 1996.

DUARTE, J.M.B.; MERINO, M.L. Taxonomia e Evolução. In: Duarte,J.M.B. **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. FUNEP, Jaboticabal, SP, p. 1-21, 1997.

DUARTE, J.M.B. Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)** - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Não paginado, 1998.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Análise citotaxonômica de *Mazama* cinzas do Brasil (*Mazama gouazoubira* e *Mazama rondoni*). No page in Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil (J. M. B. Duarte, author). **Ph.D. dissertation**, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil, 1998.

DUARTE, J.M.B.; GONZALEZ, S.; MALDONADO, J.E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdam, NED, v. 49, p.17-22, 2008.

DUARTE, J.M.B.; GONZALEZ, S. (Eds.). **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland, 393 p, 2010.

DOYLE, JJ E GAUT, BS. Evolution of genes and taxa: a primer. **PLANT MOL BIOL**, Dordrecht, NED, V.42, P.1-23, 2000.

EHSANI, S. *et. al.* Evidence for retrogene origins of the prion gene family. **PLoS One**, Cambridge, UK, p. 6, e26800, 2011a.

EHSANI, S. *et. al.* Family reunion—The ZIP/prion gene family. **Prog. Neurobiol**, Amsterdam, NED, p 93, 405–420, 2011b.

EISENBERG, J. F. The contemporary Cervidae of Central and South America. Antelopes deer and relatives: Fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation, ES Vrba and GB Schaller (eds.). **Yale University Press**, New Haven, CT, p. 189-202, 2000.

FALCÃO, C.B.R. Os cervídeos brasileiros e a doença priônica CWD (Chronic Wasting Disease): verificação de polimorfismos genéticos associados à susceptibilidade. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, 52p., 2012.

FIGUEIRÊDO, Marina Gomes de. Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*). **Tese (doutorado)** - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jabotibacal, SP, 57p., 2014.

FONTANA, F.; RUBINI, M. Chromosomal evolution in Cervidae. **BioSystems**, Amsterdam, NED, v.34, p.157-174, 1990.

GONZALEZ-ROMERO, Dennisse *et al.* Detection of infectious prions in urine. **FEBS letters**, v. 582, n. 21, p. 3161-3166, 2008.

GONZÁLEZ, S. Neotropical cervidology: biology and medicine of Latin American deer. Ed. José Maurício Barbanti Duarte. Funep, Jaboticabal, SP, 2010.

GUINDON, S. *et. al.* New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, Oxford, ENG, v. 59, n. 3, p.307-21, 2010.

GABRIEL, J.-M *et. al.* Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. **Proc. Natl. Acad. Sci**, Washington, DC, v. 89, p 9097–9101, 1992.

GABUS, C. *et. al.* The prion protein has RNA binding and chaperoning proprieties characteristic of nucleocapsid protein NCp7 of HIV-1. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, MD, v. 276, n. 22, p. 19301-19309, 2001.

GARDNER, A. L. *Cervus gouazoubira* Fischer, 1814 (currently *Mazama gouazoubira*; Mammalia, Artiodactyla): Proposed conservation as the correct original spelling. **Bulletin of Zoological Nomenclature**, Washington, DC, v. 56, n. 4, p. 263, 1999.

GUSTAVSSON, I.; SUNDT, C. O. Three polymorphic chromosome system of centric fusion type in a population of Manchuria Sika Deer (*Cervus Nippon hortulorum*). **Chromosoma**, New York, NY, v. 28, p. 245-254, 1969.

GOGARTEN, J.P.; LORRAINE O. Orthologs, paralogs and genome comparisons. **Curr Op Genet & Developm**, Amsterdam, DEN, v 9, p.630-636, 1999.

GONZALEZ-DUARTE, R.; ALBALAT, R. Merging protein, gene and genomic data: the evolution of the MDR-ADH family. **Heredity**, Glasgow, SCT, v. 95, p.184-97, 2005.

GOUGH KC; MADDISON BC. Prion transmission prion excretion and occurrence in the environment. **Prion**, London, ENG, v. 4, p. 275-82, 2010.

HALEY, NJ. *et. al.* Detection of chronic wasting disease prions in salivary, urinary, and intestinal tissues of deer: potential mechanisms of prion shedding and transmission. **J Virol**, Washington, DC, v, 85. p. 6309-18, 2011.

HARRIS, E. E.; MEYER, D. The molecular signature of selection underlying human adaptations. **American journal of physical anthropology**, Malden, MA v. 131, n. S43, p. 89-130, 2006.

HEATON, MP. *et al.* Prion gene sequence variation within diverse groups of US sheep, beef cattle and deer. **Mamm Genome**, Cham, SUI, v. 14, n. 11, p. 765-777, 2003.

HOPE, J.; MANSON, J. (1991). The scrapie fibril protein and its cellular isoforms. In: **Current Topics in Microbiology and Immunology**, New York, NY, v. 173, p. 51-1A, 1991.

HOPE, J. Prions and neurodegenerative diseases. **Current Opinion in Genetics & Development**, Amsterdam, DEN, v. 10, p. 568-574, 2000.

HUSON, HJ; HAPP, GM. Polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) in Alaskan moose (*Alces alces gigas*). **Anim Genet**, Malden, MA, 2006.

IUCN **Red List of Threatened Species**. Version 2015-4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 Oct 2016.

JEONG, Hyun-Jeong *et al.* Identification of single-nucleotide polymorphisms of the prion protein gene in sika deer (*Cervus nippon laiouanus*). **Journal of veterinary science**, Seoul, KOR, v. 8, n. 3, p. 299-301, 2007.

JEWELL, Jean E. *et al.* Low frequency of PrP genotype 225SF among free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. **Journal of General Virology**, London, UK, v. 86, n. 8, p. 2127-2134, 2005.

JOHNSON, C. *et al.* Prion Protein Gene Heterogeneity in Free-ranging White Tailed Deer Within The Chronic Wasting Disease Affected Region of Wisconsin. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, KS, v.39, n.3, p.576-581, 2003.

JOHNSON, C *et al.* Prion protein polymorphisms in white-tailed deer influence susceptibility to chronic wasting disease. **Journal of General Virology**, London, UK, v.87, n.7, p.2109-2114, 2006.

JOHNSON, CJ *et al.* Prion Protein Polymorphisms Affect Chronic Wasting Disease Progression. **PLoS ONE**, Cambridge, UK, v. 6, n.3, e17450, 2011.

KAZAZIAN, H.H., JR., Mobile elements: drivers of genome evolution. **Science/AAAS**, Washington, DC, v. 303, n. 5664, p. 1626-32, 2004.

KELLY, AC. *et al.* Prion sequence polymorphisms and chronic wasting disease resistance in Illinois white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Prion**, London, ENG, v. 2, n. 1, p. 28-36 2008.

LIBERLES, DA. Evaluation of methods for determination of a reconstructed history of gene sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, ENG, v.18, p.2040-2047, 2001.

MANSON, J. *et al.* The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? **Development**, Amsterdam, DEN, v. 115, n. 1, p. 117-122, 1992.

MANSON, J.C. Understanding transmission of the prion diseases. **Trends in Microbiology**, Cambridge, MA, v. 7, p. 465-467, 1999.

MATHIASON, Candace K. *et al.* Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. **Science/AAAS**, Washington, DC, v. 314, n. 5796, p. 133-136, 2006.

MERINO, M. L.; MILNE, N.; VIZCAÍNO, S.F. A cranial morphometric study of deer (Mammalia, Cervidae) from Argentina using three-dimensional landmarks. **Acta Theriologica**, Buenos Aires, ARG, v. 50, n. 1, p. 91-108, 2005.

MERINO, M.L.; ROSSI, R.V. Origin, Systematics, and Morphological Radiation. In: DUARTE, J.M.B.; GONZALEZ, S. (Eds.) **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland, p. 2-11, 2010.

MOBLEY, W. C. *et al.* Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and amyloid protein precursor in developing hamster brains. **Proc. Natl. Acad. Sci**, Washington, DC, v.85, p. 9811-9815, 1988.

NALLS, AV *et al.* Mother to offspring transmission of chronic wasting disease in *Reeves' Muntjac* deer. **Plos One**, Cambridge, UK, v. 8, e71844, 2013.

NEI, M., GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, ENG, v. 3, p.418-426, 1986.

NEITZEL, H. Chromosomen evolution in der Familie de Hirsche (Cervidae). **Bongo**, [s] v.3, p.27-38, 1979.

NEITZEL, H. Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. In: Obe, G. & Basler, A. (eds.) **Cytogenetics, basic and applied aspects**, Springer Verlag, Berlin, GER, p. 90-112, 1987.

OHTA, T. Gene families: multigene families and superfamilies. **Encyclopedia of the human genome** [s], 2003.

OLESZAK, E. L. *et al.* Growth factor production by Creutzfeldt-Jakob disease cell lines. **J Virol**, Washigton, DC, v. 62, p. 3103-3108, 1989.

O'ROURKE, Katherine I. *et al.* Polymorphisms in the prion precursor functional gene but not the pseudogene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer. **Journal of General Virology**, London, UK, v. 85, n. 5, p. 1339-1346, 2004.

PALETTO, Alessandro; TOSI, Vittorio. Deadwood density variation with decay class in seven tree species of the Italian Alps. **Scandinavian Journal of Forest Research**, London, ENG, v. 25, n. 2, p. 164-173, 2010.

PAN, K.M., STAHL, N., PRUSINER, S.B.. Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. **Protein Sci**, Malden MA, v.1, n. 10, p. 1343-52, 1992.

PAN, K.M *et al.* Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 1, v. 90, n. 23, p. 10962-10966, 1993.

PASSET, B *et al.* Prion protein and Shadoo are involved in overlapping embryonic pathways and trophoblastic development. **PLoS One**, Cambridge, UK, v. 7, n.2, p. 127–130, 2013.

PEREDA, P.A.L. Estudo funcional de proteínas prion celular mutantes no domínio de ligação à STI1 e a vitronectina. **Dissertação (Mestrado)**. Fundação Antônio Prudente, São Paulo, SP, 80p., 2007.

PERROTT, MATTHEW R. *et al.* Mucosal transmission and pathogenesis of chronic wasting disease in ferrets. **Journal of General Virology**, London, UK, v. 94, n. 2, p. 432-442, 2013.

PERUCCHINI, M *et al.* PrP genotypes of free-ranging wapiti (*Cervus elaphus nelsoni*) with chronic wasting disease. **Journal of General Virology**, London, UK, v. 89, n. 5, p. 1324-1328, 2008.

PREMZL, Marko; GAMULIN, Vera. Comparative genomic analysis of prion genes. **BMC genomics**, London, UK, v. 8, n. 1, p. 1, 2007.

PRUSINER, Stanley B. Molecular biology of prion diseases. **Science/AAAS**, Washington, DC, v. 252, n. 5012, p. 1515-1522, 1991.

PRUSINER, S.B. Introduction: Prion diseases. **Seminars in Virology**, Amsterdam, NED, v. 7, p. 157, 1996.

PRUSINER, S. B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washignton, DC,, v. 95, n. 23, p. 13363-13383, 1998.

PRUSINER, S.B. Shattuck lecture-neurodegenerative diseases and prions. **N. Engl. J. Med**, Waltham, MA, v.344, p.1516–1526, 2001.

RHYAN, JC *et al.* Failure of fallow deer (*Dama dama*) to develop chronic wasting disease when exposed to a contaminated environment and infected mule deer (*Odocoileus hemionus*). **Journal of wildlife diseases**, Lawrence, KS, v. 47, n. 3, p. 739-744, 2011.

RIBEIRO, A.M. Os veados do Brasil segundo as coleções Rondon e de varios museus nacionaes e estrangeiros. **Rev. Museu Paulista**, Ipiranga, SP, v. 11, p. 209-308, 1919.

ROBINSON, Stacie J. *et al.* Emerging prion disease drives host selection in a wildlife population. **Ecological Applications**, Washington, DC, v. 22, n. 3, p. 1050-1059, 2012.

RONGYAN, Z. *et al.* Evolution and differentiation of the prion protein gene (PRNP) among species. **Journal of heredity**, Newport, OR, v. 99, n. 6, p. 647-652, 2008.

ROSSI, R.V. Taxonomia de *Mazama* Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae). **Dissertação (Mestrado)**, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 189p., 2000.

ROSSI, R.V. & DUARTE, J.M.B. 2008. ***Mazama nemorivaga***. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T136708A4330028.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T136708A4330028.en>. Downloaded on 05 June 2016.

RULL, V. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. **Molecular Ecology**, Malden, MA, v.17, p. 2722–2729, 2008.

SALMAN, M. D. Chronic wasting disease in deer and elk: scientific facts and findings. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, JPN, v. 65, n. 7, p. 761-768, 2003.

SAMBROOK, Joseph *et al.* **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, New York, NY, 1989.

SANTAMARIA, M.; LANAVE, C.; SACCONI, C. The evolution of the adenine nucleotide translocase family. **Gene**, Amsterdam, NED, v.333, p.51–59, 2004.

SIGURDSON, Christina J.; AGUZZI, Adriano. Chronic wasting disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, Amsterdam, DEN, v. 1772, n. 6, p. 610-618, 2007.

STAHL, N.; BORCHELT, D.R.; HSIAO, K.; PRUSINER, S.B. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. **Cell**, Cambridge, MA, v. 51, n. 2, p. 229-40, 1987.

SUZUKI, Y; GOJOBORI, T. A method for detecting positive selection at single amino acid sites. **Molecular biology and evolution**, Oxford, ENG, v. 16, n. 10, p. 1315-1328, 1999.

TAMGÜNEY, Gültekin *et al.* Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. **Nature**, v. 461, n. 7263, p. 529-532, 2009

TELLING, Glenn C. *et al.* Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. **Science/AAAS**, Washington, DC, v. 274, n. 5295, p. 2079-2082, 1996.

THIRY, ETIENNE *et al.* Current status of transmissible spongiform encephalopathies in ruminants. **Biotechnologie, agronomie, société et environnement**, Amsterdam, DEN, v. 8, n. 4, p. 221-228, 2004.

VANIN, E.F., Processed pseudogenes: characteristics and evolution. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, CA, v.19, p. 253-72, 1985.

VILES, J.H *et al.* Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 96, p. 2042-2047, 1999.

YANG, Z. Computational molecular evolution. **Oxford University Press**, Oxford, ENG, 2006.

WANG, Shao-Bin *et al.* Protein disulfide isomerase regulates endoplasmic reticulum stress and the apoptotic process during prion infection and PrP mutant-induced cytotoxicity. **PLoS One**, Cambridge, v. 7, n. 6, p. e38221, 2012.

WAGNER, A. Selection and gene duplication: a view from the genome. **Genome Biology**, London, UK, v.3, p.1012.1-1012.3, 2002.

WATTS, JOEL C.; WESTAWAY, DAVID. The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, Amsterdam, DEN, v. 1772, n. 6, p. 654-672, 2007.

WEISSMANN, Charles. The state of the prion. **Nature Reviews Microbiology**, London, UK, v. 2, n. 11, p. 861-871, 2004.

WHITE, SN *et al.* Association analysis of PRNP gene region with chronic wasting disease in Rocky Mountain elk. **BMC research notes**, London, UK, v. 3, p314, 2010.

WILLIAMS, E.S.; MILLER, M.W. Chronic wasting disease in deer and elk in North America. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, FRA, v. 21, n.2, p. 305-316, 2002.

WILLIAMS, Elizabeth S. *et al.* Chronic wasting disease of deer and elk: a review with recommendations for management. **The Journal of wildlife management**, Hoboken, NJ, p. 551-563, 2002b.

WILLIAMS, E.S.; MILLER, M.W. Transmissible spongiform encephalopathies in non-domestic animals: origin, transmission and risk factors. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, FRA, v. 22, n. 1, 145-156, 2003.

WILSON, Gregory A. et al. Polymorphisms at the PRNP gene influence susceptibility to chronic wasting disease in two species of deer (*Odocoileus* Spp.) in western Canada. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, London, ENG, v. 72, n. 17-18, p. 1025-1029, 2009.

WLON, D., LEBERT, M. and BRACHET, P. Messenger RNAs of beta-amyloid precursor protein and pnon protem are regulated by nerve growth factor in PC12 cells. **Int J Dev Neurosci**, Amsterdam, DEN, v. 6, p. 387-340, 1988.

ZOMOSA-SIGNORET, V *et. al.* Physiological role of the cellular prion protein. **Vet. Res.**, London, UK, v.39, p.9, 2008.

ANEXOS

Anexo 1 – Lista das espécies de *Mazama* cinzas trabalhadas.

	ID	ESPÉCIE	LOCALIZAÇÃO
1	266	<i>M.nemorivaga</i>	Santarém-PA
2	T322	<i>M. nemorivaga</i>	Marabá-PA
3	63	<i>M.gouazoubira</i>	Contenda-PR
4	194*	<i>M.gouazoubira</i>	Serra da Mesa-GO
5	<u>139</u>	<i>M.gouazoubira</i>	Mossoró-RN
6	<u>182</u>	<i>M.gouazoubira</i>	Fazenda Alegria-MS
7	T61	<i>M.gouazoubira</i>	São Roque-SP
8	T65	<i>M.gouazoubira</i>	Zoo Curitiba-PR
9	T66	<i>M.gouazoubira</i>	Zoo Curitiba-PR
10	T67	<i>M.gouazoubira</i>	Zoo Curitiba-PR
11	T75	<i>M.gouazoubira</i>	Gramado-RS
12	T76	<i>M.gouazoubira</i>	Gramado-RS
13	T77	<i>M.gouazoubira</i>	Alegrete-RS
14	T78	<i>M.gouazoubira</i>	Fund. Zoobot/Porto Alegre-RS
15	T80	<i>M.gouazoubira</i>	São Francisco de Paula-RS
16	T82	<i>M.gouazoubira</i>	Julho de Castilho-RS
17	T92	<i>M.gouazoubira</i>	Candiota-RS
18	T94	<i>M.gouazoubira</i>	Cruz Alta-RS
19	T95	<i>M.gouazoubira</i>	Cruz Alta-RS
20	T111	<i>M.gouazoubira</i>	Jundiaí-SP
21	T114	<i>M.gouazoubira</i>	Ribeirão Preto-SP
22	T119	<i>M.gouazoubira</i>	Goiânia-GO
23	T126	<i>M.gouazoubira</i>	Brasília-DF
24	T127	<i>M.gouazoubira</i>	Zoo Brasília-DF
25	T134	<i>M.gouazoubira</i>	Juazeiro-BA
26	T135	<i>M.gouazoubira</i>	Petrolina-PE
27	T137	<i>M.gouazoubira</i>	Fortaleza-CE

28	T138	<i>M.gouazoubira</i>	Mossoró-RN
29	T140	<i>M.gouazoubira</i>	Mossoró-RN
30	T141	<i>M.gouazoubira</i>	João Pessoa-PB
31	T142	<i>M.gouazoubira</i>	Orto Dois Irmãos-PE
32	T143	<i>M.gouazoubira</i>	Campina Grande-PB
33	T144	<i>M.gouazoubira</i>	Paraíba
34	T145	<i>M.gouazoubira</i>	Paraíba
35	T146	<i>M.gouazoubira</i>	Chapada Diamantina - BA
36	T147	<i>M.gouazoubira</i>	Boa Vista do Tupim-BA
37	T152	<i>M.gouazoubira</i>	Barrinha-SP
38	T160	<i>M.nemorivaga</i>	Belém-PA
39	T191	<i>M.gouazoubira</i>	Mangueirinha-PR
40	T309	<i>M.nemorivaga</i>	Revcon / Centro Região Amapá
41	T370	<i>M.nemorivaga</i>	Margem Esquerda do Rio Xingú / UHE/ Belo Monte-PA
42	T371	<i>M.nemorivaga</i>	Margem Esquerda do Rio Xingú / UHE/ Belo Monte-PA

Anexo 2 – Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene PRNP de cervídeos do Velho mundo e do Novo Mundo. Por serem sequências consenso algumas outras interpretações para nucleotídeos ambíguos podem estar presentes (R: A/G (purinas); Y: C/T (pirimidinas); M: A/C; W: A/T; S: C/G; K: G/T; B: C/G/T; D: A/G/T; H: A/C/T; V: A/C/G; N: A/C/G/T). Os pontos “.” representam base idênticas às da sequência de referência; traços “-” indicam ausência de bases.

Cervus_nippon	GTCGGCCTCT	GCAAGAAGCG	ACCAAAACCT	GGAGGAGGAT	GGAACACTGG	GGGGAGCCGA	TACCCGGGAC
AGGGAAGT							
Cervus_dama	..G.....						
.....							
Cervus_elaphus_elaphus							
.....							
Cervus_elaphus_nelsoni	..Y.....						
.....							
Dama_dama	..G.....						
.....							
Muntiacus_reevesi	..G.....						
.....							
Alces_alces_alces	..G.....						
.....							
Rangifer_tarandus	..G.....						
.....							
Odocoileus_virginianus	..G.....						
.....							
Odocoileus_hemionus	..G.....						
.....							
Blastoceros_dichotomus	..G.....						
.....							
Ozotoceros_bezoarticos	..G.....		G...				
.....							
Mazama_nemorivaga	R.G.....M.						R....
.....							
Mazama_gouazoubira	..G.....	..W.....					
.....							

Cervus_nippon	CCTGGAGGCA	ACCGCTATCC	ACCTCAGGGA	GGGGGTGGCT	GGGGTCAGCC	CCATGGAGGT	GGCTGGGGCC
AACCTCAT							
Cervus_dama					C.....		
.....							
Cervus_elaphus_elaphus				R...			
.....							
Cervus_elaphus_nelsoni							
.....							
Dama_dama					C.....		
.....							
Muntiacus_reevesi							
.....							
Alces_alces_alces						Y.....	
.....							
Rangifer_tarandus						G...	
.....							
Odocoileus_virginianus							
.....							
Odocoileus_hemionus							
.....							
Blastoceros_dichotomus							
.....							
Ozotoceros_bezoarticos							
.....							
Mazama_nemorivaga							
.....							
Mazama_gouazoubira							
.....							

Cervus_nippon	GGAGGTGGCT	GGGGTCAGCC	CCATGGTGGT	GGCTGGGGAC	AGCCACATGG	TGGTGGAGGC	TGGGGTCAAG
GTGGTACC							
Cervus_dama							
.....							
Cervus_elaphus_elaphus			Y.....				
.....R..							
Cervus_elaphus_nelsoni							
.....							
Dama_dama							
.....							
Muntiacus_reevesi							
.....G.							
Alces_alces_alces		...G....		G.			
.....							
Rangifer_tarandus				G.			
.....							
Odocoileus_virginianus				G.			WR
.....							
Odocoileus_hemionus				G.			
.....							
Blastoceros_dichotomus				G.			
.....							
Ozotoceros_bezoarticos				G.			
.....							
Mazama_nemorivaga				G.			
.....							
Mazama_gouazoubira				G.			
.....							

Cervus_nippon	CACGGTCAGT	GGAACAAGCC	CAGTAAACCA	AAAACCAACA	TGAAGCATGT	GGCAGGAGCT	GCTGCAGCTG
GAGCAGTG							

```

Cervus_dama      ...A.....
.....
Cervus_elaphus_elaphus ...A.....
.....
Cervus_elaphus_nelsoni ...A.....
.....
Dama_dama        ...A.....
.....
Muntiacus_reevesi ...A.....
.....
Alces_alces_alces ...A.....C M.....
.....
Rangifer_tarandus ...A.....C....
.....
Odocoileus_virginianus ...A.....S.....C....
.....
Odocoileus_hemionus  ...A.....M....
.....
Blastoceros_dichotomus ...A.....C....
.....
Ozotoceros_bezoarticos ...A.....C....
.....
Mazama_nemorivaga   ...A.....C....
.....K..
Mazama_gouazoubira  ...A.....Y....
.....

```

```

Cervus_nippon      GTAGGGGGCC TCGGTGGCTA CATGCTGGGA AGTGCCATGA GCAGGCCTCT TATACATTTT GGCAATGACT
ATGAGGAC
Cervus_dama        .....AT.....
.....
Cervus_elaphus_elaphus .....T.....
.....
Cervus_elaphus_nelsoni .....W.....
.....
Dama_dama          .....AT.....
.....

```

Muntiacus_reevesi								
.....								
Alces_alces_alces		.T.....						
.....								
Rangifer_tarandus		.Y.....						C....
.....								
Odocoileus_virginianus		.T.....			A.....			Y....
.....								
Odocoileus_hemionus		.Y.....			R...R.....			Y....
.....								
Blastoceros_dichotomus		.T.....						C....
.....								
Ozotoceros_bezoarticos		.T.....						C....
.....								
Mazama_nemorivaga		.T.....		Y....				C....
.....								
Mazama_gouazoubira		.T.....			R...R.....			C....
.....								

Cervus_nipon	CGTTACTATC	GTGAAAACAT	GTACCGTTAC	CCCAACCAAG	TGTACTACAG	GCCAGTGGAT	CAGTATAATA
ACCAGAAC							
Cervus_dama							
.....							
Cervus_elaphus_elaphus							
.....							
Cervus_elaphus_nelsoni							
.....							
Dama_dama							
.....							
Muntiacus_reevesi							
.....							
Alces_alces_alces							
.....							

```

Rangifer_tarandus .....
.....R..
Odocoileus_virginianus .....
.....
Odocoileus_hemionus .....
.....
Blastoceros_dichotomus .....
.....
Ozotoceros_bezoarticos .....
.....
Mazama_nemorivaga .....
.....
Mazama_gouazoubira .....
.....

```

```

Cervus_nipon      ACCTTTGTGC ATGACTGTGT CAACATCACA GTCAAGCAAC ACACAGTCAC CACCACCACC AAGGGGGAGA
ACTTCACC
Cervus_dama .....
.....
Cervus_elaphus_elaphus .....
.....
Cervus_elaphus_nelsoni .....
.....
Dama_dama .....
.....
Muntiacus_reevesi .....
.....
Alces_alces_alces .....
.....
Rangifer_tarandus .....
.....
Odocoileus_virginianus .....Y.....
.....
Odocoileus_hemionus .....
.....

```

```

Blastoceros_dichotomus .....
.....
Ozotoceros_bezoarticos .....
.....
Mazama_nemorivaga .....
.....Y
Mazama_gouazoubira .....
.....

```

```

Cervus_nipon      GAAACTGACA TCAAGATGAT GGAGCGAGTT GTGGAGCAAA TGTGCATCAC CCAGTACCAG AGAGAATCCG
AGGCTTAT
Cervus_dama      .....
.....
Cervus_elaphus_elaphus .....C
.....
Cervus_elaphus_nelsoni .....
.....
Dama_dama        .....
.....
Muntiacus_reevesi .....C
.....
Alces_alces_alces .....T.....C
.....
Rangifer_tarandus .....T.....M.C
.....
Odocoileus_virginianus .....T.....C
.....
Odocoileus_hemionus .....Y.....C
.....
Blastoceros_dichotomus .....T.....C
.....C
Ozotoceros_bezoarticus .....T.....C
.....C

```

Mazama_nemorivaga		.T.....		...S.....		K.....	C
.....Y							
Mazama_gouazoubira		.T.....	...R.....				C
.....C							

Cervus_nipon	TACCAAAGAG	GGGCAAGTGT	GATCCTCTTC	TCCTCCCCTC	CTGTGATCCT	CCTCATCTC
Cervus_dama						
Cervus_elaphus_elaphus						
Cervus_elaphus_nelsoni						
Dama_dama						
Muntiacus_reevesi						
Alces_alces_alces						...M.....
Rangifer_tarandus						
Odocoileus_virginianus						
Odocoileus_hemionus						
Blastoceros_dichotomus						
Ozotoceros_bezoarticus						
Mazama_nemorivaga						
Mazama_gouazoubira			.W.....			

