

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO**  
**DA FAUNA**

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE**  
**SEQUÊNCIAS MICROSSATÉLITES NO GENOMA DO MICO-LEÃO-**  
**PRETO (*Leontopithecus chrysopygus*)**

**PRISCILLA PINA PARDO**

**SÃO CARLOS, SP.**

**2015**

**PRISCILLA PINA PARDO**

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE  
SEQUÊNCIAS MICROSSATÉLITES NO GENOMA DO MICO-LEÃO-  
PRETO (*Leontopithecus chrysopygus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Conservação da Fauna.

**Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**  
**Universidade Federal de São Carlos**

**SÃO CARLOS, SP.**

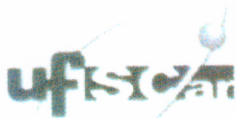
**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P226i Pardo, Priscilla Pina  
Identificação, caracterização e validação de  
sequências microssatélites no genoma do mico-leão-  
preto (*Leontopithecus chrysopygus*) / Priscilla Pina  
Pardo. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
47 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2015.

1. *Leontopithecus chrysopygus*. 2. Marcadores  
Moleculares. 3. Microssatélites. 4. Data Mining. 5.  
Amplificação Heteróloga. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Priscilla Pina Pardo, realizada em 28/08/2015:

Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas  
UFSCar

Profa. Dra. Danielly Veloso Blanck  
UFSCar

Prof. Dr. Bruno César Rossini  
UNESP

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Domingues de Freitas pela orientação.

À Fundação Parque Zoológico de São Paulo pela bolsa de estudos concedida.

Aos funcionários e amigos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo que, de forma eficiente e generosa, contribuíram para esta conquista.

Aos colegas de Mestrado pela amizade, carinho, por todos os dias felizes e sorrisos bobos e por todas as histórias e ajudas compartilhadas.

A todos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação da Universidade Federal de São Carlos pela amizade e por toda sabedoria compartilhada.

A DEUS, pela vida, proteção, oportunidade, e mais uma vitória alcançada.

Ao meu pai (*in memoriam*), Elias, por todo o seu amor, por todos os ensinamentos e pelo maior exemplo de luta pela vida que eu poderia ter.

À minha mãe, Neusa, por todo o seu amor, pela incansável dedicação aos seus filhos e por ser tão especial e essencial na minha vida.

À minha avó, Maria de Lourdes, por ser tão linda e iluminada, por todo o seu amor, cuidado, carinho e atenção.

Ao meu irmão por sempre me incentivar.

Ao meu namorado, Mario, por todo o apoio, incentivo, compreensão, dedicação, carinho e pela constante companhia.

Aos meus gatos, Pink e Floyd, pelo amor incondicional, pelo carinho e por me fazerem amar mais do que eu consiga explicar.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram e fazem parte da minha vida contribuindo para minha formação pessoal e profissional, os meus mais sinceros agradecimentos.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

**Albert Einstein**

## RESUMO

O mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*) é um dos mais ameaçados primatas neotropicais e as causas históricas que o levaram à beira da extinção estão intimamente relacionadas à história da Mata Atlântica. Entre suas principais ameaças estão a fragmentação de seu habitat, o número reduzido de suas populações sobreviventes e o isolamento das mesmas, as quais afetam diretamente a estrutura genética dessas populações. O uso de análises genéticas e marcadores moleculares a favor da conservação da vida silvestre vêm crescendo ao longo dos últimos anos com o surgimento das tecnologias genéticas, moleculares e da bioinformática, possibilitando o estabelecimento do rápido diagnóstico de doenças e de muitos parâmetros genéticos e ecológicos, como taxa de migração, tamanho populacional, diversidade genética, relações de parentesco. Dentre os principais marcadores estão os microssatélites que consistem em pequenas sequências de DNA repetidas em *tandem* compostas de 1 a 6 pares de base amplamente distribuídas nos genomas eucarióticos e procarióticos. Suas características de codominância e alto nível de polimorfismos fazem desses marcadores ferramentas importantes para estimativas de perda de variabilidade e de mudanças recentes na estruturação genética de populações, além do uso em investigações forenses. Dentre os métodos utilizados para o isolamento de tais marcadores, está a mineração *in silico* para espécies com dados genéticos disponíveis. No presente estudo, identificamos 60 microssatélites tetranucleotídicos no genoma do saguí-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) através de *Data Mining* realizados no genoma desta espécie. Pares de *primers* foram desenhados e testados em *Leontopithecus chrysopygus*, uma vez que esta espécie não possui dados genômicos disponíveis. Dos 60 locos testados, 87% tiveram sucesso de amplificação em amostras de DNA provenientes de 10 animais de cativeiro. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose e 13 locos foram genotipados em sequenciador automático ABI3730XL. O programa Geneious versão 8.1.6 foi utilizado para genotipagem. Somente quatro locos demonstraram polimorfismo, sendo observados dois alelos por loco. Esse baixo polimorfismo pode estar associado à origem das colônias de cativeiro.

**Palavras-chave:** *Leontopithecus chrysopygus*, Marcadores Moleculares, Microssatélites, *Data Mining*, Amplificação Heteróloga, Anotação Genômica.

## ABSTRACT

The black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*) is one of the most endangered neotropical primates and the historical causes that led them to the brink of extinction are closely related to the history of the Atlantic Rainforest. Among its main threats are the fragmentation of their habitat, the small number of his surviving populations and the isolation of them, which directly affect the genetic structure of these populations. The use of genetic analysis and molecular markers for the wildlife conservation have been growing over the past few years with the advent of genetic and molecular technologies and bioinformatics, allowing the establishment of rapid diagnosis of diseases and many genetic and ecological parameters such as migration rate, population size, genetic diversity, kinship relations. Among the main molecular markers are microsatellite that consist of short DNA sequences tandemly repeated composed of 1 to 6 bases pairs widely distributed in eukaryotic and prokaryotic genomes. Characteristics like codominance and high level of polymorphism make microsatellites an important tool to measure the loss of genetic diversity and recent changes in genetic structure of populations, and for use in forensic investigations. Among the methods used for the isolation of such markers, is the *in silico* mining for species with available genetic data. In the present study, we identified 60 tetranucleotide microsatellite loci have been identified in the genome of common marmoset (*Callithrix jacchus*) through data mining conducted in the genome of this species. Primer pairs were designed and tested in black lion tamarin, since this kind does not have any genomic data available. Of the 60 loci tested, 87% had successful amplification of DNA samples from 10 captive animals. PCR products were analyzed on agarose gel and 13 loci were genotyped in automatic sequencer ABI3730XL. The Geneious version 8.1.6 software was used for genotyping. Only four loci showed polymorphism, observed two alleles per locus. This low polymorphism may be associated with the origin of the captive colonies.

**Palavras-chave:** *Leontopithecus chrysopygus*, Molecular Markers, Microsatellites, *Data Mining*, cross-species amplification, Genome Annotation



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	7
1.1. PROBLEMATIZAÇÃO .....	7
1.2. <i>Leontopithecus crhysopygus</i> (MICO-LEÃO-PRETO) E <i>Callithrix jacchus</i> (SAGUI-DE-TUFO-BRANCO) .....	8
1.2.1. Taxonomia e Morfologia .....	8
1.2.2. Distribuição e Reprodução de <i>Leontopithecus crhysopygus</i> .....	9
1.2.3. Status de Conservação do Mico-Leão-Preto .....	10
1.3. ESTUDOS GENÉTICOS NA CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE .....	11
1.3.1. Marcadores Moleculares .....	12
1.3.2. Marcadores Microsatélites .....	14
1.3.3. Anotação Genômica .....	16
2. OBJETIVOS .....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1. MÉTODO <i>DATA MINING</i> .....	19
3.1.1. Prospecção de sequências microsatélites no genoma de <i>Callithrix jacchus</i> e estabelecimento dos seus respectivos <i>primers</i> flanqueadores .....	19
3.2. ANOTAÇÃO GENÔMICA DOS LOCOS SSR .....	20
3.3. COLETA DE MATERIAL PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA .....	21
3.3.1. Extração de DNA pelo método de Sambrook <i>et al.</i> (1989) Adaptado. ....	21
3.3.2. Extração de DNA com Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit .....	22
3.3.3. Quantificação e Acondicionamento das Amostras de DNA .....	23
3.4. VALIDAÇÃO DOS LOCOS .....	23
3.4.1. Estabelecimento e construção dos oligonucleotídeos .....	23
3.4.2. Determinação das temperaturas de anelamento dos primers e reações de PCR para amplificação das sequências-alvo .....	24
3.4.3. Reações de PCR para validação populacional e genotipagem das sequências para identificação de locos polimórficos .....	25
4. RESULTADOS .....	26
4.1. EXTRAÇÃO DE DNA .....	26
4.2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS MICROSATÉLITES A PARTIR DA ABORDAGEM <i>DATA MINING</i> .....	26
5. DISCUSSÃO .....	36
6. CONCLUSÃO .....	41
7. REFERÊNCIAS .....	42

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. PROBLEMATIZAÇÃO

Diferente das extinções em massa ocorridas em períodos geológicos passados, nas quais milhares de espécies morreram em consequência de grandes catástrofes, as extinções atuais possuem causas humanas. Ecossistemas são diariamente destruídos e espécies levadas à extinção causando o declínio da diversidade biológica, que é resultado de inúmeros processos evolutivos ocorridos durante bilhões de anos (PRIMACK, 2010).

A destruição, fragmentação e degradação de habitat, mudanças climáticas globais, exploração de espécies nativas para uso humano, introdução de espécies invasoras e a disseminação de doenças estão entre as maiores ameaças à diversidade biológica e se dão tão rapidamente, e em uma abrangência tão grande, que as espécies não conseguem se adaptar às alterações, perdendo variabilidade genética à medida que diminuem seu número populacional e se tornam muito distantes e isoladas umas das outras (GROOM *et al.*, 2005; PRIMACK, 2010).

Uma vez que a perda de uma espécie pode revelar-se devastadora para o planeta e para a espécie humana por conta do papel que essas espécies possuem na manutenção dos ecossistemas, ações direcionadas à conservação devem recuperar e aumentar a viabilidade das populações de espécies ameaçadas de extinção para que estas possam persistir no ambiente por mais um longo período de tempo mantendo a sua variabilidade genética, a qual possibilita a adaptação das espécies frente às mudanças ambientais e contribui para a sua habilidade de evolução (PRIMACK, 2010; FRANKHAN *et al.*, 2002).

Neste cenário, o mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*) está entre os mais ameaçados primatas neotropicais e as causas históricas que o levaram à beira da extinção estão intimamente relacionadas à história da Mata Atlântica, bioma que, atualmente, somados todos os fragmentos de floresta nativa acima de três hectares, só possui 12,5% dos 1,3 milhões de km<sup>2</sup> originais (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2015; INPE, 2015).

Entre suas principais ameaças estão a fragmentação de seu habitat, o número bastante reduzido de suas populações sobreviventes e o isolamento das mesmas, as quais afetam diretamente a estrutura genética dessas populações, uma vez que com a redução de fluxo gênico entre elas, essas se tornam mais susceptíveis aos efeitos deletérios da endogamia, os quais comprometem a fecundidade e o valor adaptativo da espécie (KLEIMAN; RYLANDS, 2008; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Para muitas espécies, incluindo o mico-leão-preto, estudos genéticos ainda são escassos. Entretanto, é sabido que análises de DNA, incluindo as sequências repetitivas do tipo microssatélite, também conhecidas como SSR (Single Sequence Repeats), vêm sendo altamente utilizadas para a estimativa de muitos parâmetros ecológicos e genéticos, como identificação individual, relações de parentesco, tamanhos populacionais, taxas de migração, entre outros (SELKOE; TOANEN, 2006; DI FIORE, 2009). Sendo assim, estudos que consideram a descrição de marcadores moleculares úteis para estudos populacionais nesta espécie se fazem necessários.

## **1.2. *Leontopithecus crhysopygus* (MICO-LEÃO-PRETO) E *Callithrix jacchus* (SAGUI-DE-TUFO-BRANCO)**

### **1.2.1. Taxonomia e Morfologia**

A taxonomia atual dos primatas neotropicais modernos estima 152 espécies, 204 subespécies e 20 gêneros (RYLANDS *et al.*, 2012). Dentro da ordem Primata, subordem *Anthropoidea* e infraordem *Platyrrhini* (Primatas do Novo Mundo com narizes amplos) está a família *Callitrichidae*, representada por pequenos animais que possuem unhas transformadas em garras em todos os dedos, exceto pelo polegar, e molares simplificados, com hábitos alimentares variando entre insetos, frutas, pequenos vertebrados, gomas e exsudatos de árvores. Tal família inclui os gêneros *Leontopithecus*, *Cebuella*, *Callithrix*, *Saguinus* e *Mico*, representados pelos menores primatas existentes (POUGH; JANIS; HEISER, 2003).

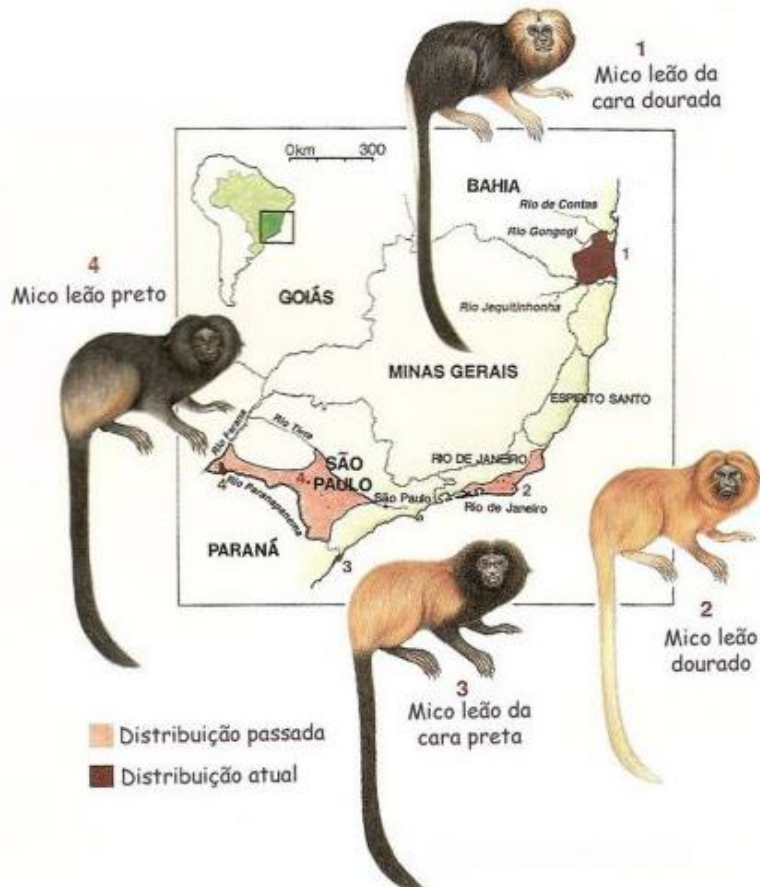
O gênero *Leontopithecus* (LESSON, 1840) é considerado o maior representante dos calitriquídeos, com peso corporal variando entre 600 e 700g e composto por pequenas espécies de primatas conhecidos como micos-leões, assim caracterizados pela pelagem abundante, sedosa e proeminente ao redor da cabeça e pescoço, formando uma juba. O mico-leão-preto, especificamente, é caracterizado por sua pelagem preta brilhante e regiões com colorido variando do amarelo ao acastanhado nas partes dorsal inferior e ventral e faces externas das coxas (MORAES, 2004).

Atualmente são descritas quatro espécies para o gênero, todas endêmicas da Mata Atlântica: *Leontopithecus rosalia* (LINNAEUS, 1766), *Leontopithecus chrysopygus* (MIKAN, 1823), *Leontopithecus chrysomelas* (KUHL, 1820) e *Leontopithecus caissara* (PERSSON; LORINI, 1990). Já o gênero *Callithrix* possui seis espécies, incluindo *Callithrix jacchus* (LINNAEUS, 1758) (RYLANDS *et al.*, 2000; KLEIMAN; RYLANDS, 2008;

LUDWIG; KIERULFF; RUIZ-MIRANDA, 2008), o sagui-de-tufo-branco, espécie com grandes tufo branco nas orelhas, cauda com, aproximadamente, 280mm com faixas largas escuras e faixas claras estreitas, crescimento corporal de até 188mm e peso adulto aproximado de 356g (EAZA, 2010).

### 1.2.2. Distribuição e Reprodução de *Leontopithecus crhysopygus*

Inicialmente descrito em 1823 por Johann Natterer na região de Sorocaba, o mico-leão-preto possuía uma área de distribuição original que incluía as partes baixas da Mata Atlântica do interior entre os rios Tietê e Paranapanema (KLEIMAN; RYLANDS, 2002) (Figura 1). Porém, a acelerada devastação das florestas no estado de São Paulo fez com que o mico-leão-preto fosse considerado uma espécie extinta durante 65 anos, até ser reencontrada por Coimbra-Filho, no ano de 1970, na Floresta Estadual do Morro do Diabo, município de Teodoro Sampaio, SP (KLEIMAN; RYLANDS, 2008; REZENDE, 2013). A partir de então, com o Programa de Conservação do Mico-leão-preto, iniciaram-se levantamentos e censos a fim de descobertas e monitoramento de novas populações (REZENDE, 2014).



**Figura1:** Distribuição do gênero *Leontopithecus*

Ilustração por Stephen D. Nash/ *Conservation International* (KLEIMAN; RYLANDS, 2008).

Atualmente, são conhecidos 18 locais de ocorrência para o mico-leão-preto, sendo três unidades de conservação estaduais (Estação Ecológica Caetetus, Estação Ecológica de Angatuba e Parque Estadual do Morro do Diabo), duas unidades de conservação federais (Floresta Nacional de Capão Bonito e Estação Ecológica Mico-Leão-Preto – Ponte Branca, Tucano e Santa Maria I) e fragmentos de mata privados (Fazendas Mosquito em Narandiba (população translocada), Santa Maria das Águas e Santa Mônica no Pontal do Paranapanema, Rio Claro, área de conservação das unidades de manejo da Lwarcel Papel e Celulose em Lençóis Paulista, João XXIII em Pilar do Sul, e a região de Buri (Fazendas Pezzoni, Planebrás, Urupês, Vale do Apiaí e Fernando Espanhol, e matas ciliares dos rios Apiaí – Mirim e Apiaí – Guaçu)). Porém, a população do Parque Estadual Morro do Diabo continua sendo a única viável em longo prazo (CBSG, 2005; ICMBIO, 2007; REZENDE, 2013).

A principal ameaça aos micos-leões é a devastação de seus habitats naturais e, uma vez que em São Paulo a maioria das florestas remanescentes é em serra, o fato desses animais se restringirem às florestas de planície faz com que a sobrevivência dos micos-leões-pretos seja dependente da viabilidade de suas populações em fragmentos florestais minúsculos e isolados (KLEIMAN; RYLANDS, 2008).

Em relação à reprodução, o gênero *Leontopithecus* é considerado principalmente monogâmico, sendo a poliginia (macho acasalando com várias fêmeas) uma hipótese alternativa. Os micos-leões-pretos possuem um período de vida de, aproximadamente, 15 anos (em cativeiro), atingem a maturidade por volta dos 15 meses e as reproduções ocorrem sazonalmente, com um período de gestação de, aproximadamente, 128 dias (EAZA, 2010).

### **1.2.3. Status de Conservação do Mico-Leão-Preto**

Espécies endêmicas são as mais vulneráveis em biomas tão gravemente ameaçados como a Mata Atlântica. Atualmente, reflexos da destruição de seu habitat original fazem com que *L. chrysopygus* seja considerada em perigo de extinção pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) devido ao isolamento extremo das populações remanescentes e ao declínio contínuo da qualidade de seu habitat (KIERULFF *et al*, 2008). A Lista Vermelha de espécies ameaçadas publicada em 2008 pela IUCN, válida até os dias atuais, justifica tal classificação pelos critérios B2ab(iii), os quais significam que a espécie enfrenta alto risco de extinção na natureza (EN) por apresentar uma área estimada de ocupação menor do que 500 km<sup>2</sup> (B2), apresentando populações severamente fragmentadas

ou um número menor do que cinco locais de ocorrência (a) e declínio contínuo (b) de sua área em extensão e/ou qualidade de habitat (iii) (IUCN, 2001).

O início dos planos de ação para conservação do mico-leão-preto é recente e coincide com o momento da sua redescoberta na natureza, em 1970. A partir de então, todos os passos necessários à recuperação de suas populações na natureza começaram a ser seguidos, desde pesquisas com a espécie, ações de manejo, envolvimento comunitário até as relações interinstitucionais que permitiram a construção e evolução de um Programa de Conservação (REZENDE, 2013).

Dados mais recentes apontam que sua população total é estimada em apenas 1000 indivíduos distribuídos por 11 fragmentos florestais isolados, dos quais 10 certamente são inviáveis em longo prazo por conta de seus tamanhos populacionais reduzidos (KIERULFF *et al.*, 2008), fato que aumenta a propensão de extinções populacionais locais.

### **1.3. ESTUDOS GENÉTICOS NA CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE**

A biodiversidade do nosso planeta está diminuindo rapidamente em consequência direta ou indireta do comportamento humano em relação ao meio ambiente. Um grande número de espécies já se extinguiu e as populações de espécies ainda sobreviventes estão sendo reduzidas a níveis próximos ao risco da extinção (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

O uso de análises genéticas a favor da conservação da vida silvestre vem crescendo ao longo dos últimos 20 anos com o surgimento das tecnologias genéticas, moleculares e da bioinformática, o que possibilita o estabelecimento, com precisão, do status e de prospecções futuras de inúmeras espécies ameaçadas (ZHANG; HEWITT, 2003; WAN *et al.*, 2004). De acordo com a Teoria Genética da Seleção Natural de Fisher (1930), a taxa evolutiva em uma população é proporcional à quantidade de variabilidade genética disponível e, uma vez que a biodiversidade e a extinção são extremamente relacionadas com a diversidade genética, a genética da conservação atua com o intuito de manter a variabilidade genética dos indivíduos nas populações de diversas espécies, possibilitando a adaptação dos mesmos às diferentes mudanças e pressões ambientais e nos ajudando a entender a natureza e a trajetória dos eventos genéticos que ameaçam a viabilidade populacional. Além disso, o uso de análises genéticas moleculares pode ser empregado para a elucidação de aspectos relevantes da biologia da espécie para o seu manejo e conservação, em resoluções de incertezas

taxonômicas, no manejo de populações cativas para maximizar o sucesso de reintroduções futuras, em questões forenses e em contribuições para o manejo de espécies invasivas que ameaçam espécies locais ameaçadas (GROOM *et al.*, 2005; PRIMACK, 2010; LAIKRE *et al.*, 2010; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

A utilização de marcadores genéticos moleculares é muito útil e tem sido bastante aplicada na conservação das espécies, pois, além de estimar níveis de variação genética, pode possibilitar o rápido diagnóstico de doenças e estimar muitos parâmetros de interesse ecológico, como, entre outros, taxa de migração, tamanho populacional e relações de parentesco (ZHANG; HEWITT, 2003; SELKOE; TOONEM, 2006).

### **1.3.1. Marcadores Moleculares**

O DNA é o principal material genético da maioria dos organismos e, portanto, é o material ideal para investigações genéticas. A escolha do marcador molecular a ser utilizado para cada questão genética depende da aplicação e do nível de variação requeridos. Os níveis de variação são uma função das taxas de mutação para o segmento de DNA, as quais variam nas diferentes regiões do genoma, sendo algumas regiões extremamente conservadas, onde qualquer mutação pode alterar a expressão gênica e afetar a capacidade adaptativa da espécie, colocando-a sob seleção natural (SCRIBNER, 2006; TEMPLETON; 2011).

A maioria do genoma não é expressa em fenótipo (DNA codificante) e as mutações nessas regiões não afetam, necessariamente, o valor adaptativo dos indivíduos e são seletivamente neutras, as quais são valiosas na genética da conservação, uma vez que resultam em marcadores genéticos moleculares, descritos como sítios de heterozigose de DNA, não necessariamente associados à variação fenotípica, usados como marcação para determinado locus cromossômico (GRIFFITHS *et al.*, 2011; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Com os avanços da genética e da biologia molecular, com o surgimento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia de polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA, foram desenvolvidas inúmeras técnicas para o desenvolvimento de diferentes tipos de marcadores genéticos moleculares que são altamente utilizados para a estimativa de inúmeros parâmetros ecológicos, evolutivos, diagnósticos e de diversidade genética, gerando informações importantes para subsidiar diferentes linhas de pesquisa, incluindo programas de conservação (TEMPLETOM, 2011; SELKOE; TOONEM, 2006; EMBRAPA, 2011).

Atualmente existe um grande número de marcadores moleculares e suas diferentes classes apresentam vantagens e desvantagens, sendo a utilização de um ou de outro dependente, entre outros fatores, do objetivo do estudo, da infraestrutura laboratorial disponível, dos recursos financeiros disponíveis, da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007).

Os marcadores mitocondriais, por exemplo, são bastante úteis na análise de relações filogenéticas e na resolução de incertezas taxonômicas, além de ser uma ferramenta auxiliar poderosa para determinação do *status* atual da estrutura populacional (WAN *et al.*, 2004). Já os SNPs (*Single nucleotide Polymorphism*) são marcadores de DNA gerados por substituição de uma única base nitrogenada e são utilizados para a identificação de mutações e polimorfismos baseados na posição de nucleotídeo único, muito interessantes para o estudo de características genéticas complexas (influenciadas por um grande número de fatores, como o envolvimento de mais de um gene, e complexas interações entre fatores genéticos e ambientais) e para o entendimento da evolução genômica (JEHAN E LAKHANPAUL, 2006; BORGES-OSÓRIO E ROBINSON, 2013). Existem também os marcadores VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), dispersos por todo o genoma eucariótico e procariótico e divididos em duas principais classes – microssatélites e minissatélites – caracterizados pelo alto grau de polimorfismo, resultado da variação do número de repetições em tandem no fragmento (WAN *et al.*, 2004; ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002).

Ainda podemos citar os RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), fragmentos obtidos com enzimas de restrição e separados por eletroforese, sendo a variação observada como diferentes padrões de banda representando os diferentes genótipos; os AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), fragmentos de DNA obtidos com a digestão do DNA com enzimas de restrição, seguida da ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos por PCR; e os RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando *primers* curtos (aproximadamente 10 nucleotídeos), os quais possuem complementariedade em múltiplos locais do genoma apenas por acaso, e não necessariamente em razão de uma homologia subjacente (FALEIRO, 2007; TEMPLETON, 2011).



**Tabela 1:** Principais características de alguns marcadores moleculares empregados em genética da conservação. Adaptado de FREITAS, 2007; EMBRAPA, 2011.

Propriedades dos Marcadores Moleculares						
Atributos das Marcas	Marcadores Moleculares					
	RFLP	AFLP	RAPD	SNP	Minissatélites	Microssatélites
Eficiência via PCR	ALTA	ALTA	ALTA	MODERADA	BAIXA	ALTA
Conhecimento prévio da sequência	SIM	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM
Expressão	CODOMINANTE	DOMINANTE	DOMINANTE	CODOMINANTE	CODOMINANTE	CODOMINANTE
Número de locos	ALTO	ALTO	ALTO	BAIXO	MODERADO	MODERADO
Taxa polimórfica	MODERADA	ALTA	ALTA	BAIXO	ALTA	ALTA

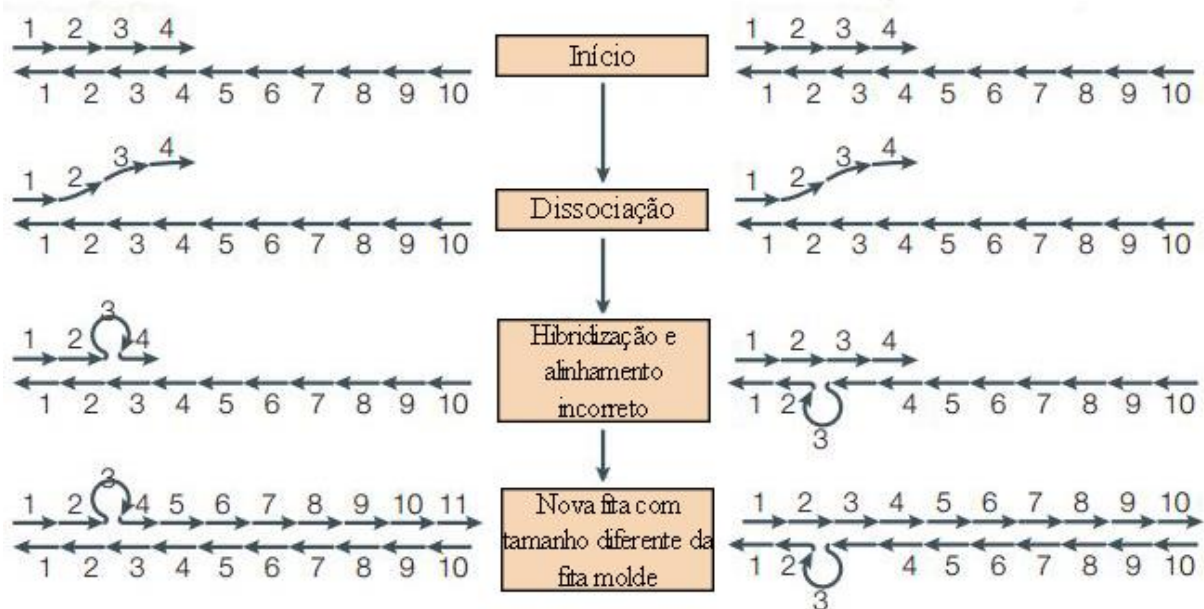
### 1.3.2. Marcadores Microssatélites

Os marcadores microssatélites, também conhecidos como SSRs (*Simple Sequence Repeats*) ou STRs (*Short Tandem Repeats*), são pequenos trechos de sequências de DNA compostas de 1 a 6 pares de base repetidas em *tandem* (dispostas lado a lado) amplamente encontradas e distribuídas nos genomas eucariótico e, menos frequentemente, procariótico (GROVER; AISHWARYA; SHARMA, 2012; ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002).

Suas características principais, como a codominância e o alto nível de polimorfismo, permitem a distinção entre homo e heterozigotos e geram a grande diversidade alélica necessária para estudos genéticos e de processos que atuam em escala de tempo ecológico. Além disso, a alta taxa de reprodutibilidade das marcas e a possibilidade de detecção de inúmeros locos microssatélites em uma mesma análise (multiplex), fizeram com que tais marcadores emergissem como uma das mais populares escolhas para estudos genéticos (SCHLÖTTERER, 2000; SELKOE; TOANEN, 2006; FALEIRO, 2007).

O alto polimorfismo observado nesses marcadores é resultado da variação do número de repetições de sua unidade repetitiva, sendo essa variação originada por dois principais mecanismos mutacionais. O primeiro, conhecido como *Replication Slippage*, sugere um pareamento incorreto, de uma ou mais unidades de repetição, entre as fitas molde e nascente do DNA durante a replicação. Por consequência, o fragmento repetitivo é forçado a fazer um “loop” no local de incompatibilidade e, caso haja continuidade da replicação, o número de unidades repetitivas do fragmento é alterado (Figura 2) (EISEN, 1999; ELLEGREN, 2004; MADESIS; GANOPOULOS; TSAFTARIS, 2013). O segundo mecanismo é conhecido durante o processo de recombinação, o qual está associado com a troca de unidades repetitivas

entre cromossomos homólogos envolvendo *crossing over* desigual ou conversão gênica, contribuindo para a diversidade alélica desses locos (ELLEGEN, 2004; FAN; CHU, 2007). Acredita-se também que mecanismos envolvendo elementos transponíveis tenham associação com a grande variabilidade alélica observada (FAN; CHU, 2007).



**Figura 2:** *Replication Slippage*, um dos mecanismos mutacionais para a variabilidade dos locos microssatélites. Adaptado de Ellegren (2004).

Embora as regiões microssatélites possuam taxas polimórficas bastante elevadas, as regiões que flanqueiam esses marcadores, em geral, são altamente conservadas entre indivíduos da mesma espécie e, muitas vezes, entre indivíduos taxonomicamente relacionados, permitindo a amplificação cruzada desses locos e a transferabilidade entre genomas, o que possibilita o desenvolvimento de marcadores para espécies que não possuem dados genômicos disponíveis (SELKOE; TOANEN, 2006; SHARMA; GROVER; KAHL, 2007).

Dada a sua grande aplicabilidade, marcadores microssatélites têm sido comumente isolados e um grande número de novos protocolos têm sido desenvolvido. Atualmente estão disponíveis diferentes métodos e técnicas que podem ser utilizados para a sua identificação, porém, tradicionalmente, tais locos têm sido isolados a partir da construção de biblioteca genômica da espécie de interesse, na qual o DNA é fragmentado com a ajuda de enzimas de restrição ou por sonificação, e os menores fragmentos selecionados (preferencialmente 300 – 700 pb) e ligados à plasmídeos. Após a transformação de bactérias competentes com a

inserção dos plasmídeos recombinantes, clones recombinantes contendo regiões repetitivas são identificados e selecionados por *Southern blot* para que *primers* específicos sejam desenhados e a técnica de PCR otimizada para a amplificação dos locos (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002).

A técnica PIMA (*PCR Isolation of Microsatellite Arrays*), outra abordagem de isolamento proposta por Lunt *et al.* (1999), resumidamente, utiliza diversos *primers* para amplificação aleatória (RAPD) de fragmentos do genoma da espécie em estudo. Os fragmentos amplificados são, então, clonados e os clones recombinantes selecionados a partir de ampliações com *primers* de microssatélites. Os produtos contendo regiões repetitivas são selecionados e sequenciados (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002; FREITAS, 2005).

Outra metodologia de isolamento mais recentemente utilizada consiste na análise *in silico* de dados genômicos e/ou transcriptômicos utilizando-se ferramentas de bioinformática. Este método, conhecido como *data mining*, tem se mostrado uma ferramenta importante para a identificação e caracterização de sequências microssatélites no genoma de diversas espécies, possibilitando o desenvolvimento desses marcadores inclusive em regiões codificadoras do DNA, permitindo a descrição de regiões microssatélites de uma forma rápida e direta para espécies que possuam dados genômicos disponíveis. A técnica consiste na utilização de bancos de dados genômicos como fonte de dados e a utilização de algoritmos que, direta ou indiretamente, detectam repetições em *tandem* distribuídas no genoma. Uma vez identificados os locos, são construídos *primers* específicos e os fragmentos amplificados via PCR para análise populacional da espécie de interesse (FREITAS, 2005; TONG; WANG; CHENG, 2009). A detecção de SSRs por mineração de dados a partir de sequências genômicas é uma estratégia de baixo custo para organismos com dados genômicos suficientes disponíveis muito utilizada em estudos básicos e aplicados para a biologia, produção, conservação e manejo de muitos organismos (TONG; WANG; CHENG, 2009).

### 1.3.3. Anotação Genômica

O sequenciamento de genomas representa um passo essencial no entendimento da biologia das espécies e tem gerado uma enorme quantidade de informações. Porém, é importante lembrar que o sequenciamento de genomas é apenas uma parte de um complexo quebra-cabeça. Para ser significativo, sequências genômicas devem ser convertidas em dados biológicos, e a anotação genômica é um passo essencial para que tal conhecimento seja

alcançado. A anotação genômica é o processo pelo qual uma sequência desconhecida é documentada e todos os seus segmentos analisados se envolvidos funcionalmente ou não no genoma. E, embora a anotação genômica tenha surgido na mesma época em que surgiram as bases de dados de sequências, ela ainda é um desafio novo e um processo de risco, pois depende da presença de homologias nos banco de dados e da análise correta dos resultados (ROUZÉ; PAVY; ROMBAUTS, 1999).

## 2. OBJETIVOS

Considerando a necessidade de estudos genéticos das populações selvagens remanescentes e dos indivíduos em cativeiro de *Leontopithecus chrysopygus*, este trabalho teve por objetivos

1. Caracterizar novos locos microssatélites para esta espécie através mineração de dados genômicos disponíveis para espécie relacionada *Callithrix jacchus*;

Para isso, bases de dados públicas foram mineradas e posteriormente submetidas a análises *in silico* de data mining objetivando a localização de regiões repetitivas, delineamento dos *primers* flanqueadores e estabelecimento da localização gênica dos locos. Para a validação populacional dos locos identificados, foi realizada a padronização de reações de amplificação para a análise dos marcadores, facilitando os estudos populacionais, de parentesco e de diversidade genética das populações de mico-leão-preto. Estes protocolos foram estabelecidos para novos locos na espécie, provendo o grupo com um conjunto de locos que possam fornecer informações consistentes para futuros estudos integrados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado entre os meses de abril/2013 a agosto/2015 no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação da Universidade Federal de São Carlos e no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisas Aplicadas do Centro de Conservação de Fauna da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

#### 3.1. MÉTODO *DATA MINING*

##### 3.1.1. Prospecção de sequências microssatélites no genoma de *Callithrix jacchus* e estabelecimento dos seus respectivos *primers* flanqueadores

As sequências genômicas utilizadas para a mineração dos marcadores microssatélites foram obtidas da espécie *Callithrix jacchus*, uma vez que a espécie alvo deste estudo ainda não possui dados genômicos disponíveis. Tais sequências foram obtidas do GenBank, um banco primário de dados biológicos do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) que armazena informações biológicas originais (XIONG, 2006). Para cada um dos 22 cromossomos autossômicos (tabela 2) da espécie foram escolhidas, aleatoriamente, quatro regiões suficientemente distantes entre si, evitando-se a ligação gênica.

**Tabela 2:** Número de acesso das sequências dos 22 cromossomos autossômicos de *Callithrix jacchus* obtidos do GenBank

Cromossomo	pb	Acesso Genbank
1	210,400,635	CM000856.1
2	204,313,951	CM000857.1
3	190,850,796	CM000858.1
4	171,630,274	CM000859.1
5	159,171,411	CM000860.1
6	158,406,734	CM000861.1
7	155,834,243	CM000862.1
8	128,169,293	CM000863.1
9	124,281,992	CM000864.1
10	132,174,527	CM000865.1
11	130,397,257	CM000866.1
12	121,768,101	CM000867.1
13	117,903,854	CM000868.1
14	108,792,865	CM000869.1
15	98,464,013	CM000870.1
16	96,796,970	CM000871.1
17	74,750,902	CM000872.1

18	47,448,759	CM000873.1
19	49,578,535	CM000874.1
20	44,557,958	CM000875.1
21	50,472,720	CM000876.1
22	49,145,316	CM000877.1

A procura das sequências repetitivas em cada região selecionada foi realizada com o *software* TRF (*Tandem Repeats Finder*), versão 4.07b (BENSON, 1999), na restringência dos seguintes parâmetros de alinhamento: pareamento, erro de pareamento e inserções e deleções (2,7,7, respectivamente), *Score* mínimo de alinhamento para relato da região repetitiva (50) e tamanho máximo do período (50). As regiões flangeadoras de cada região repetitiva encontrada, consistindo em 500 nucleotídeos de cada lado da repetição, também foram fornecidas para caracterizar as regiões para delineamento dos *primers* utilizados para a posterior amplificação através da técnica de PCR. Ao final da análise, o *software* TRF gerou arquivos de dados contendo o tamanho do período, o número de repetições do período, o tamanho da sequência consenso, a porcentagem de pareamento, a porcentagem de inserções e deleções, a porcentagem de cada nucleotídeo presente na repetição e a entropia para cada uma das sequências repetitivas encontradas.

A definição das regiões microssatélites se deu independente do número de repetições do *motif* e da classe pertencente (perfeitos, compostos e complexos) (CHAMBERS; MACAVOY, 2000), limitando-se apenas ao número de unidades repetitivas, sendo os tetranucleotídeos os *motifs* selecionados, devido sua maior eficiência no processo de validação e análise populacional, uma vez que costumam apresentar menos bandas inespecíficas nos produtos de PCR, particularmente quando os alelos diferem por poucas unidades repetitivas ou pares de base (MURRAY; MONCHAWIN; ENGLAND, 1993; WALSH; FILDES; REYNOLDS, 1996).

### 3.2. ANOTAÇÃO GENÔMICA DOS LOCOS SSR

O processo de anotação genômica para identificação de possíveis sequências correspondentes a genes expressos foi realizado através da ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), algoritmo que realiza alinhamentos simples, heurísticos e locais de sequências, fornecido pelo NCBI.

Cada sequência foi submetida ao *BLASTn* para uma comparação nucleotídeo/nucleotídeo dentro do banco de dados *RefSeq\_RNA*, o qual contém sequências referências definidas para RNA mensageiro.

### **3.3. COLETA DE MATERIAL PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA**

As amostras de DNA de *L. chrysopygus* utilizadas neste trabalho foram extraídas a partir de dez amostras de sangue total colhido com anticoagulante EDTA de indivíduos mantidos em cativeiro no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), situado junto à antiga Estação Ecológica Estadual do Paraíso (EEEP), hoje integrada ao Parque Estadual dos Três Picos (PETP), em Guapimirim, Rio de Janeiro (INEA, 2015). A amostra de DNA de *C. jacchus* utilizada para controle positivo das reações de amplificação cruzada foi extraída a partir de amostra de sangue total colhido em tubo a vácuo com EDTA de um indivíduo mantido em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), inserida no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), Água Funda, na cidade de São Paulo, SP.

#### **3.3.1. Extração de DNA pelo método de Sambrook *et al.* (1989) Adaptado.**

Para a obtenção do material genético dos indivíduos de *L. chrysopygus*, aproximadamente 50uL da amostra de sangue foram adicionados a microtubos de 1,5mL e acrescentados 550uL de Tampão de Lise (50mM de Tris-HCL, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl), 40 uL de Dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% e 15uL de Proteinase K (20mg/mL). Tais amostras foram agitadas com o auxílio de um vortex e, em seguida, incubadas em banho seco a 55°C por 5 horas. Posteriormente, foram adicionados 300uL de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1). Os tubos foram fechados e homogeneizados por inversão durante 10 minutos e centrifugados por 30 minutos à 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante formado foi transferido para um novo microtubo de 2mL previamente identificado e as etapas de adição de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1), homogeneização dos tubos por inversão durante 10 minutos, centrifugação das amostras por 30 minutos à 14.000 rpm e transferência do sobrenadante para um novo tubo previamente identificado foram repetidas. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado igual volume de clorofórmio e os microtubos homogeneizados por inversão e centrifugados à 14.000 rpm durante 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionados 10% de acetato de sódio 3M (pH 7,0) e 2,5 vezes a quantidade recuperada de sobrenadante de etanol absoluto gelado. Os tubos foram fechados e homogeneizados cuidadosamente por inversão durante 10 minutos e incubados em freezer à temperatura de -20°C por, aproximadamente, três horas; sendo centrifugados a 14.000 rpm na temperatura de 4°C durante 15 minutos após esse período. Os microtubos foram vertidos



cuidadosamente e individualmente para descarte do etanol absoluto e manutenção do pellet de DNA formado ao fundo do tubo, muitas vezes invisível. Posteriormente foram adicionados 400uL de etanol 70% e os tubos novamente centrifugados à 4°C à 14.000 rpm durante 10 minutos. Mais uma vez os tubos foram vertidos para descarte do etanol 70% e mantidos *overnight* em estufa a 37°C para evaporação total de resíduos de etanol. Por fim, após a secagem, os DNAs foram ressuspensos em, aproximadamente, 100uL de TE (10mM de Tris, pH 8,0 e 1mM de EDTA, pH 7,4) para manutenção do material biológico e os mesmos acondicionados em freezer à -20°C.

### **3.3.2. Extração de DNA com Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit**

Para a extração de DNA genômico de amostra sanguínea de *C. jacchus* foi utilizado o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* da Promega. Para isso, foram coletados em tubo com anticoagulante EDTA 900uL de sangue total de um único indivíduo de *C. jacchus*. O volume total coletado foi dividido em 3 amostras (CJ1a, CJ1b e CJ1c) de 300uL cada em microtubos de 1,5mL. Para cada amostra foram adicionados 900uL de solução de lise celular, os tubos foram fechados e homogeneizados por inversão e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo homogeneizados de 2 a 3 vezes durante esse período para intensificar a lise das hemácias para liberação da hemoglobina livre que, segundo Gribben *et al.* (1991), em estudos com humanos, pode inibir a reação de PCR. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas à 13.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante formado foi descartado e o pellet formado ressuspensado com a ajuda de um vortex. Para a lise nuclear e precipitação das proteínas, foram adicionados em cada amostra 300uL de solução de lise nucleica e os tubos homogeneizados por inversão. Então, foram adicionados 100uL de solução de precipitação de proteínas e as amostras agitadas com o uso do vortex durante 20 segundos. Após essa fase, tais amostras foram centrifugadas à 13.000 rpm durante 3 minutos. Para a precipitação e reidratação do DNA, após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5mL, previamente identificado, contendo 300uL de isopropanol. Os tubos permaneceram à temperatura ambiente e foram homogeneizados cuidadosamente por inversão e centrifugados à 13.000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante formado após a centrifugação foi descartado e 300uL de etanol 70% foram adicionados às amostras, as quais foram novamente centrifugadas, nas mesmas condições descritas anteriormente, durante 1 minuto. Por fim, o etanol 70% foi descartado e as amostras deixadas em temperatura ambiente para

total evaporação de resíduos de etanol. Após a secagem total do material, o DNA foi reidratado com 100uL de solução de reidratação de DNA e permaneceu incubado por 1 hora à 65°C. As amostras de DNA foram acondicionadas em freezer à -20°C.

### 3.3.3. Quantificação e Acondicionamento das Amostras de DNA

Após a extração de DNA, as amostras foram devidamente quantificadas e avaliadas com a utilização de espectrofotômetro (*Nanovue® Plus* da *GE Healthcare*) conforme as instruções do fabricante. Tais amostras, então, foram divididas em alíquotas-estoque e alíquotas de uso, as quais foram diluídas a 10 ng/uL e acondicionadas em freezer -20°C no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

## 3.4. VALIDAÇÃO DOS LOCOS

### 3.4.1. Estabelecimento e construção dos oligonucleotídeos

As sequências FASTA com seus motifs de microssatélites identificados foram submetidos à análise no *software* Primer 3 Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2007) para o delineamento dos primers para as regiões flanqueadoras às sequências repetitivas selecionadas. O estabelecimento de parâmetros de busca se deu da seguinte forma: tamanho dos oligonucleotídeos entre 18 e 27 pares de base, com valor ótimo de 20 pares de base; temperatura de *melting* entre 57 e 63°C, com valor ótimo de 60°C; porcentagem de citosina e guanina entre 20 e 80, com valor ótimo de 50% e tamanho do *amplicon* entre 200 e 300 pares de base. O programa nos sugeriu, para cada sequência, cinco pares de *primers* alternativos, os quais foram posteriormente analisados no *software* OligoAnalyzer versão 3.1 para verificação da qualidade e especificidade dos mesmos. Foram preferencialmente selecionados pares de primers que possuíam valores de  $\Delta G$  até -2Kcal/mol para *hairpins* e valores de  $\Delta G$  até 10% do valor de  $\Delta G$  máximo para homodímeros e heterodímeros, com uma tolerância de valores de  $\Delta G$  até -3Kcal/mol para *hairpins* internos, até -5Kcal/mol para homodímeros e heterodímeros na extremidade 3' e -6Kcal/mol para homodímeros e heterodímeros internos (IDT, 2011).

Para cada sequência, somente um par de *primer* entre os sugeridos pelo *software* Primer 3 foi selecionado de acordo com os parâmetros já descritos acima. Os oligonucleotídeos selecionados foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies (IDT)* em uma escala de 25nmoles na condição liofilizada. Uma sequência composta por 18 pares de

base (TGTAACGACGGCCAGT), complementar à sequência universal M13 (*Macrogen*) marcada com fluoróforos, foi adicionada à extremidade 5' de cada *primer forward* para posterior genotipagem dos locos amplificados, conforme descrito por Schuelke (2000).

### 3.4.2. Determinação das temperaturas de anelamento dos primers e reações de PCR para amplificação das sequências-alvo

Para as reações de amplificação dos locos microssatélites selecionados, os pares de *primers* liofilizados *forward* e *reverse* específicos para cada uma das sequências foram ressuspensos em água miliQ à uma concentração de 100pmoles para a solução estoque e, posteriormente, juntamente com o *primer* M13 não marcado com fluoróforo, foram utilizados em concentrações de 2, 8 e 8pmoles, respectivamente.

A princípio, as temperaturas de anelamento dos *primers* foram determinadas 5°C abaixo da temperatura de *melting* (PROMEGA, 2013) descrita nos documentos de características dos *primers* fornecidos pelo fabricante dos mesmos e uma temperatura média entre os pares foi utilizada para as reações-teste, as quais foram realizadas em termociclador *Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)* com um *mix* contendo concentrações finais de 0,4pmoles dos *primers reverse* e M13, 0,1pmoles do *primer forward*, 0,75mM de MgCl<sub>2</sub>, metade do volume final da reação de *GoTaq® Colorless Master Mix (PROMEGA)*, 10ng/uL da amostra de DNA de um mesmo exemplar e H<sub>2</sub>O miliQ completando um volume final de 10uL de reação nas condições descritas na tabela 3.

Os produtos da PCR foram submetidos, com utilização do *GelRed™ (Biotium)* como intercalante de ácidos nucleicos de fita dupla para visualização das amostras, à eletroforese em gel de agarose 1% imerso em TAE 1X. As corridas ocorreram em condições de 90V, 90mA e 90W por 2 horas. As imagens analisadas foram capturadas em sistema de fotodocumentação *L-Pix Touch (Loccus biotecnologia)*.

Para os primers sem padrão de amplificação ou com amplificação de bandas inespecíficas, foram realizados testes de gradiente de temperatura com variações de temperatura de 53 a 60°C nas mesmas condições já descritas. Após as amplificações e testes de gradiente de temperatura, novas amplificações foram realizadas para todos os locos com as temperaturas estabelecidas em todas as amostras de DNA de *L. chrysopygus*.

**Tabela 3:** Ciclos da amplificação pela técnica de PCR

<b>Programa</b>			
<b>1x</b>	94°C	05 minutos	Desnaturação
	94°C	30 segundos	
<b>30x</b>	Temperatura de anelamento	45 segundos	Hibridização primers específicos
	72°C	45 segundos	
	94°C	30 segundos	
<b>8x</b>	53°C	04 segundos	Hibridização cauda M13
	72°C	48 segundos	
<b>1x</b>	72°C	10 minutos	Extensão

### 3.4.3. Reações de PCR para validação populacional e genotipagem das seqüências para identificação de locos polimórficos

Para determinados locos, ajustes nas condições de PCR e nas concentrações dos reagentes foram necessários para otimização das reações e do padrão de amplificação das amostras. Para todos os locos que apresentaram padrão de amplificação satisfatório, foram repetidas as reações de PCR nas mesmas condições já descritas, porém, com primer M13 marcado com fluoróforo específico (FAM, VIC, NED ou PET) utilizando-se o número amostral total. Novamente os produtos da amplificação foram submetidos com *GelRed*<sup>TM</sup> (*Biotium*) à análise eletroforética em gel de agarose 1% imerso em TAE 1X em corridas com condições de 90V, 90mA e 90W por 2 horas e as imagens analisadas capturadas em sistema de fotodocumentação *L-Pix Touch* (*Loccus biotecnologia*).

Após as reações de amplificação, 5uL dos produtos obtidos para 13 locos amplificados satisfatoriamente foram enviados para genotipagem na empresa *Macrogen* (Coréia do Sul) em sequenciador *ABI3730XL*, *Applied Biosystems*. Os eletroferogramas foram analisados no software *Geneious* versão 8.1.6 (*KEARSE et al.*, 2012).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EXTRAÇÃO DE DNA

As extrações de DNA das amostras de sangue de todos os indivíduos foram realizadas com sucesso, sendo sua concentração e qualidade demonstradas na tabela 4.

**Tabela 4:** Avaliação, quantificação e diluição de DNA para solução de trabalho.

<i>Leontopithecus chrysopygus</i>								
AMOSTRAS	A260	A280	A260/ 280	Concentração DNA (ng/µl)	Concentração Sol. Trabalho (50µL)	Volume DNA	Volume água	Extração Fenol: Clorofórmio
BLT22	0,62	0,47	1,514	21,5	10 ng/µL	23,25	26,75	10/04/2014
BLT23	0,43	0,35	1,451	14	10 ng/µL	35,71	14,29	10/04/2014
BLT28	0,5	0,38	1,506	18	10 ng/µL	27,77	22,23	10/04/2014
BLT30	0,67	0,51	1,472	24	10 ng/µL	20,83	29,17	10/04/2014
BLT31	1,04	0,82	1,386	39,5	10 ng/µL	12,65	37,35	10/04/2014
BLT32	0,68	0,5	1,56	25,5	10 ng/µL	19,6	30,4	10/04/2014
BLT33	0,73	0,56	1,524	24	10 ng/µL	20,83	29,17	10/04/2014
BLT34	0,66	0,47	1,559	26,5	10 ng/µL	18,86	31,14	10/04/2014
BLT35	0,7	0,57	1,382	23,5	10 ng/µL	21,27	28,73	10/04/2014
BLT37	0,85	0,64	1,488	30,5	10 ng/µL	16,39	33,61	10/04/2014
<i>Callithrix jacchus</i>								
AMOSTRAS	A260	A280	A260/ 280	Concentração DNA (ng/µl)	Concentração Sol. Trabalho (50µL)	Volume DNA	Volume água	Extração Kit PROMEGA
CJ1a	0,49	0,33	1,739	18	_____	_____	_____	06/02/2015
CJ1b	0,53	0,42	1,643	12,9	_____	_____	_____	06/02/2015
CJ1c	0,6	0,37	1,845	25	10 ng/µL	20	30	06/02/2015

### 4.2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS MICROSSATÉLITES A PARTIR DA ABORDAGEM DATA MINING

Dos 22 cromossomos autossômicos analisados, foram selecionadas 88 regiões, sendo que somente 17 cromossomos apresentaram padrão satisfatório para delineamento dos *primers* nas quatro regiões aleatórias selecionadas. Para outros cinco cromossomos, somente três regiões permitiram o delineamento de pares de *primers* eficientes, totalizando 83 regiões contendo sequências repetitivas tetranucleotídicas. Um total de 830 *primers* foi submetido à análise individual de especificidade e eficiência para a amplificação dos locos. Após a análise no *software* Oligoanalyzer de cada um dos cinco pares de *primers* sugeridos pelo *software* Primer3PLUS para cada uma das 83 sequências selecionadas, somente 60 pares (Tabela 5) obtiveram resultados satisfatórios, respeitando os parâmetros estabelecidos já descritos.

Os microssatélites selecionados foram classificados de acordo com Chambers e Macavoy (2000) em perfeito, imperfeito, composto e composto interrompido, sendo 98,33% categorizados como tetranucleotídeos e somente 1,67% como mono/tetranucleotídeos (Tabela 5).

**Tabela 5:** Primers com parâmetros satisfatórios para amplificação, tamanho esperado do fragmento, categoria e classificação das unidades repetitivas (microsatélites) segundo Chambers e Macavoy (2000), temperatura de anelamento e padrão de amplificação específicos para cada par de primer.

Cromossomo/Região	Nome	Primers (5' - 3')	Unidade Repetitiva	Produto esperado (pb)	Categoria	Classificação	Ta (°C)	Padrão de Amplificação <i>Leontopithecus chrysopygus</i>	Padrão de Amplificação <i>Callithrix jacchus</i>
1/1	LC11	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> CAACATGGATGAATATGCCACT - 3' (R) 5'- TCCTGTGATGGATTACTTCTGG - 3'	(AGAT) <sub>2</sub> TCAT (AGAT) <sub>4</sub> AGAC A-AT (GGAT) <sub>5</sub> (AGAT) <sub>4</sub> ACAC (AGAT) <sub>3</sub> ACAC (AGAT) <sub>2</sub>	280	Tetra	Composto interrompido	56	F>	Satisfatório
1/2	LC12	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> GCCAGTGACCGAAACTCAAT - 3' (R) 5'- GATGACCCAACAGGGCTAGA - 3'	(CATC) <sub>7</sub> TATC CATG (CATC) <sub>2</sub> CTTC (CATC)	377	Tetra	Imperfeito	55	F>	F>
1/3	LC13	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> GTTGCACTGAGCCAAGACTG - 3' (R) 5'- CCAGCAGATTCATCCTGAGC - 3'	(AAAG) <sub>2</sub> -AGA AAG- -AGA AAGA AAG- AA-A (AAGA) <sub>4</sub> (AA-A) <sub>2</sub> AAGA	206	Tetra	Composto interrompido	56	Insatisfatório	Insatisfatório
2/1	LC21	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> GCCAGCAGCTTCATCCTTAG - 3' (R) 5'- AGGCTGAGGCAGAGAATCAC - 3'	TCTT TC-T TCCT (TCTT) <sub>5</sub> (TC-T) TCTT TTTT (TCTT) <sub>2</sub> (TCTC) <sub>3</sub> (TCTT) <sub>2</sub> (TCTC (TCTT) <sub>2</sub> TC-T (TCTT) <sub>3</sub>	234	Tetra	Composto interrompido	56	Multilocos	Multilocos
2/2	LC22	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> AAAATTAGCTGGGCATGGTG - 3' (R) 5'- GGTGCAGTTTGTGTGGATG - 3'	(AAAT) <sub>10</sub>	243	Tetra	Perfeito	53	Multilocos	Multilocos
2/3	LC23	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> TGCCTGAACATCTGCAAGAG - 3' (R) 5'- AAGGCTGTGGTGAGTGATCC - 3'	(CCTC) <sub>5</sub> CTTT TCTC (CCTC) <sub>2</sub> CTTC (CCTC) <sub>2</sub> CTTC CTTT TCTC (CCTC) <sub>4</sub>	239	Tetra	Imperfeito	55	Satisfatório	Satisfatório
3/1	LC31	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> CCTACGTGCCAGATAGACCAG - 3' (R) 5'- TCATTGAGGGAGGGAGAGAG - 3'	(TTCC) <sub>19</sub>	222	Tetra	Perfeito	58	Multilocos	Multilocos
3/2	LC32	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> CCAGGCTCAGGGGAGATAAT - 3' (R) 5'- AGGAACCAAGCCAGGAATCT - 3'	(ATTT) <sub>7</sub>	215	Tetra	Perfeito	53	Multilocos	Satisfatório
3/3	LC33	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> CACCAGACTCTAATCTCCACCA - 3' (R) TTGCGAACACTTCTCTTGC - 3'	(GGAT) <sub>6</sub> (GGAC) <sub>4</sub> GGAT GGAC	244	Tetra	Composto	56	Satisfatório	F>
3/4	LC34	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> TTTATCAGCAGCATGAGAATGG - 3' (R) 5'- GATAGATAGACAATGTCCCAGCTC - 3'	(TCTA) <sub>10</sub>	257	Tetra	Perfeito	57	Multilocos	Multilocos
4/1	LC41	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> TGCCTGTAATCCCAGCTTCT - 3' (R) 5'- CCACCACACCTGGCTAATT - 3'	(AAAT) <sub>4</sub> GAAT (AAAT) <sub>2</sub>	367	Tetra	Imperfeito	54	Insatisfatório	Insatisfatório
4/3	LC43	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> ACACAGTGAACCCCGTCTC - 3' (R) 5'- CCCAAATTGCTGGGATTAGA - 3'	(ATAA) <sub>7</sub>	456	Tetra	Perfeito	54	Insatisfatório	Insatisfatório
5/1	LC51	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> TGGCTGCTAAACGAGCTTCT - 3' (R) 5'- GCAGGAGAAATTGCTTGAACC - 3'	(TTTC) <sub>2</sub> (TCTC) <sub>3</sub> TCTT -TTT (CTTT) <sub>5</sub> (CTCT) <sub>3</sub> TTCT CTCT (TTCT) <sub>4</sub>	200	Tetra	Composto interrompido	56	Multilocos	Multilocos
5/2	LC52	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> TCAGTGGACTGGTTTCTCTC - 3' (R) 5'- GTTGTGGTGAGCTGAGATCG - 3'	(TCCT) <sub>2</sub> TCTT (TCCT) <sub>2</sub> TTCT (T) <sub>4</sub> (TTCT) (TT-C) (TTC-) (TCCT) (TCCC) <sub>2</sub> TTCT (TTCC) <sub>6</sub> TT-A TTAC TTCC TTAC (TTCC) <sub>4</sub> (TTCC) <sub>2</sub> TTCC	253	Mono/Tetra	Composto interrompido	57	Multilocos	Multilocos
6/1	LC61	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> GAACTCGACTGGCACAATCA - 3' (R) 5'- CTTGAACTGGGAGGTGGAG - 3'	TTTG -TTG TTGT (GTTT) <sub>2</sub> G-TT -TTT (GTTT) <sub>4</sub>	296	Tetra	Composto interrompido	55	Satisfatório	Multilocos
6/2	LC62	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> CCTCCTCCTCTTCTGCTTT - 3' (R) 5'- TAGCTGGGTGTGGTGTCTTG - 3'	(TTCC) <sub>14</sub>	285	Tetra	Perfeito	57	Multilocos	Multilocos
6/4	LC64	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> ACCATCCCAGGTCAGAGAAA - 3' (R) TCATGCGATTTTGTACGATCA - 3'	(CATT) <sub>6</sub>	372	Tetra	Perfeito	52	F>	Multilocos
7/1	LC71	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> AGGCAGGAGAATCACTGG - 3' (R) 5'- TTCTCAGCCTTCCGAGTAGC - 3'	(AAAC) <sub>9</sub>	298	Tetra	Perfeito	53	Insatisfatório	Insatisfatório
7/2	LC72	(F) 5'- <b>TGTA AACCGACGGCCAGT</b> TGTGCTGCTCACCCTGAAT - 3'	TGGA TGGG TGGA TGGG (TGGA) <sub>5</sub>	294	Tetra	Composto interrompido	55	F>	F>

		(R) 5'- CGTCCACCTACCCATTCTTC - 3'	TAGA TGGG TAGG -TAG (ATGG) <sub>4</sub> (ATAG) <sub>2</sub> TTGG ATGG							
7/3	LC73	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT GGAGCCCTCCTTTGAGAAC - 3' (R) 5'- AGGCAGTGTGACTCCCAAGT - 3'	(TAGA) <sub>10</sub> (T-GA) (TAGA) <sub>9</sub>	382	Tetra	Perfeito	56	Insatisfatório	Insatisfatório	
7/4	LC74	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT CTTCCTCGTCTCCATCGTC - 3' (R) 5'- GGTGTGGTGAGCCAAGATT - 3'	TTCT (TTC-) <sub>7</sub> (TTCT) <sub>2</sub> TTC- TTCT (TTC-) <sub>2</sub> TTCT (TTCC) <sub>6</sub> (TTAC) <sub>3</sub> -TTC (CTTC) <sub>15</sub> (TTTC) <sub>14</sub>	280	Tetra	Composto interrompido	55	Multilocos	Multilocos	
8/4	LC84	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT GGCACATGGTAAATGCTCAA - 3' (R) 5'- CTCCCCAATAAATGCACTG - 3'	(TCCA) <sub>9</sub>	251	Tetra	Perfeito	58	F>	F>	
9/3	LC93	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT CCATTATGCTGACGGAACCT - 3' (R) 5'- AGGAGGTGAGGCAGGAGAAT - 3'	(TCCT) <sub>17</sub>	281	Tetra	Perfeito	55	Insatisfatório	Multilocos	
9/4	LC94	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT GAGCTGAGATTGTGCCACTG - 3' (R) 5'- CAGATTCCTTTCAATTTCACTCAA - 3'	(AGAA) <sub>3</sub> AAAA (AGAA) <sub>2</sub> AG-G (AGAA) <sub>3</sub> (A-AA) AGGA AAGA AAG- (AAGA) <sub>2</sub> AAG- AA-A (AAGA) <sub>5</sub>	221	Tetra	Composto interrompido	55	Satisfatório	Satisfatório	
10/4	LC104	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT GAACTCATGGGGAAAACAA - 3' (R) 5'- CAGGTCGGCAATGTCTCTTT - 3'	AGGA AGGC (AGGA) <sub>2</sub> AGGG AA-G AAGG ACGG TAGG GAGG (AAGG) <sub>2</sub> GATG (AAGG) <sub>4</sub> GAGG	315	Tetra	Composto interrompido	53	Multilocos	Satisfatório	
11/1	LC111	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT TAGCACTGTGGAGCAGATGG - 3' (R) 5'- AGGGGCTGTGAGGGTAACAT - 3'	(CCCT) <sub>10</sub>	293	Tetra	Perfeito	56	Satisfatório	Multilocos	
11/2	LC112	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT TGTTCTCCATCCAAGTCGA - 3' (R) 5'- CAGTACTAAGCAGGGGTTGA - 3'	(ATGG) <sub>9</sub>	240	Tetra	Perfeito	55	F>	Satisfatório	
11/3	LC113	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT CATCTGTGGAGCATGGACAC - 3' (R) 5'- AAGCCTCCTTCCTTCTTCT - 3'	AGGG AAGG AGGA (AGGG) <sub>7</sub>	226	Tetra	Imperfeito	55	Multilocos	Satisfatório	
11/4	LC114	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT TGGGTGACAGAGCAAGACTG - 3' (R) 5'- TTATGGATGGTGTGCTTGA - 3'	(AAGA) <sub>2</sub> AAGG (AAGA) <sub>5</sub> (GAGA) <sub>2</sub> AAGA GGAA GGTA (GGAA) <sub>3</sub> AGAA GGAA (AGAA) <sub>2</sub> (GGAA) <sub>2</sub> AGAA GGAA AGAA (TGAA) <sub>3</sub> AGAT CGAT (AGAA) <sub>2</sub>	300	Tetra	Composto interrompido	55	Multilocos	Satisfatório	
12/1	LC121	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT AATTTTGGATGGACGGACAG - 3' (R) 5'- GCCTGGGTAACAGAGCAAGA - 3'	(GATA) <sub>3</sub> GACA (GATA) <sub>3</sub>	299	Tetra	Imperfeito	54	Multilocos	Multilocos	
12/2	LC122	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT CACTTGCACCAACAGAAGG - 3' (R) 5'- GACTGAGGCAGGAGAATTGC - 3'	(TCTT) <sub>20</sub>	228	Tetra	Perfeito	55	Multilocos	Insatisfatório	
12/3	LC123	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT AAGGTGGGAAGACTGCTTGA - 3' (R) 5'- AGCAATGCTTAGGGCTTCAA - 3'	(AAAG) <sub>5</sub> (AGAG) <sub>5</sub> AAAG -AA- (AAAG) <sub>7</sub> -AGA (AAGA) <sub>2</sub> AAGG (AAGA) <sub>2</sub>	283	Tetra	Composto interrompido	56	Satisfatório	Multilocos	
12/4	LC124	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT CAGGCAAGGGTCTCTAGGTG - 3' (R) 5'- CAGGCTTAGGCTCACAGGAC - 3'	(GAAG) <sub>3</sub> GAAA (GAAG) <sub>5</sub>	327	Tetra	Imperfeito	58	Multilocos	Multilocos	
13/1	LC131	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT GGAAGGTGAGGGAAGGAGAG - 3' (R) 5'- TGTTGGTCTCAGTGTGATCCT - 3'	(AAGG) <sub>2</sub> AAAG AAGG AAAG AAGG (GAGG) <sub>2</sub> (AAGG) <sub>3</sub>	278	Tetra	Composto interrompido	56	F>	Multilocos	
13/3	LC133	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT GCTCCTCTAAATCGCCTCT - 3' (R) 5'- AAAATTAGCTGGGCATGGTG - 3'	TTGT TT-T (TTGT) <sub>3</sub> TTG- TTGT TT-T TTGT TT-T TTGT	263	Tetra	Perfeito	54	Multilocos	Multilocos	
13/4	LC134	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT CCAATAGGATGGATGGATGG - 3' (R) 5'- TCCCTGGTTAGGAGCTTTT - 3'	(TAGA) <sub>13</sub>	289	Tetra	Perfeito	54	Multilocos	Satisfatório	
14/1	LC141	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT CAAATCGGAAACATTTTCTTTCT - 3' (R) 5'- CCAGCCTGGGTAACAAGAGT - 3'	(TCCT) <sub>2</sub> TCTC TTTC (CTTC) <sub>11</sub> TCTC TCCT TCCA TTCC	306	Tetra	Composto interrompido	55	Multilocos	Satisfatório	
14/2	LC142	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT GGGCAACATGAGCAAAATC - 3' (R) 5'- TCCTCCTGAGCCATGATTTT - 3'	(TATC) <sub>2</sub> TTTC (TATC) <sub>12</sub>	275	Tetra	Imperfeito	54	Multilocos	Multilocos	
14/4	LC144	(F) 5'- <b>TGTA</b> AAACGACGGCCAGT GATGTGGGCTTTCACCATGT - 3'	(TATC) <sub>13</sub>	300	Tetra	Perfeito	56	Insatisfatório	Insatisfatório	



		(R) 5'-GGGAGGTAGAGGTTGCAGTG - 3'								
15/1	LC151	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT GAGCCTGACGGAGATCACTC - 3' (R) 5'-GAGATGGGAGGATTGCTTGA - 3'	(CCTT) <sub>2</sub> CCCT CTTT CTTT CTTT (CCTT) <sub>12</sub>	281	Tetra	Imperfeito	56	Multilocos	Multilocos	
15/3	LC153	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT CCACTTCCTCCCTCCCTCT - 3' (R) 5'-TAGCCAGGCATGATGGTCTA - 3'	(TCCT) <sub>2</sub> (TCCC) <sub>7</sub> (TCCT) <sub>7</sub>	288	Tetra	Composto	56	Satisfatório	Multilocos	
16/1	LC161	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT TTTCATCTGCTTTTCACTGG - 3' (R) 5'-AAACAAAGTGGCGGAATGAC - 3'	(TTTG) <sub>8</sub>	209	Tetra	Perfeito	52	F>	Satisfatório	
16/3	LC163	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT GTGTGTGATGCTCCCTTTT - 3' (R) 5'-GCCCTTACTGCTCCATGAC - 3'	(ATAG) <sub>2</sub> ATAA GATA GAT- (GATA) <sub>2</sub> GAT- GATA GATT (GATA) <sub>4</sub>	251	Tetra	Composto interrompido	55	F>	F>	
17/1	LC171	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT GATTAGCCACCGTTTTTGTGA - 3' (R) 5'-CGCACTGTTTCATAGCCATTT - 3'	(TGTA) <sub>6</sub>	298	Tetra	Perfeito	54	F>	Satisfatório	
17/3	LC173	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT TGAGAACAGGGCTCAGGAGT - 3' (R) 5'-GAGCACCAAGAAAGGGATT - 3'	(TGAA) <sub>6</sub>	300	Tetra	Perfeito	55	Satisfatório	F>	
18/1	LC181	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT GAAGTGAATGGGGCAGGTAA - 3' (R) 5'-TCCCTCCGCACTCTCTGAT - 3'	(GGAG) <sub>2</sub> GTGA GGGG AGGG AGGA (AGGG) <sub>5</sub>	237	Tetra	Composto interrompido	55	F>	Insatisfatório	
18/2	LC182	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT GTCTGTGCTGGATTGGTTGA - 3' (R) 5'-CAAGAGCGAAACTCCACCTC - 3'	(TTAT) <sub>12</sub>	206	Tetra	Perfeito	58	Satisfatório	Insatisfatório	
18/3	LC183	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT GCGTCCAAAATCACA ACTGA - 3' (R) 5'-CCTGGGTAACAAGAGCGAAA - 3'	(TTTA) <sub>7</sub>	211	Tetra	Perfeito	53	Multilocos	Multilocos	
18/4	LC184	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT CAAAGAAAAACCCCTCCTCC - 3' (R) 5'-CCTGGCAACAGAGCAAGACT - 3'	(CTTT) <sub>5</sub> (CTTC) <sub>3</sub> (CTTT) <sub>3</sub> TCTT TCTC TT-C CTCT TTCT TTCC TTGG TTTC TGTT (TCIT) <sub>2</sub>	271	Tetra	Composto interrompido	54	Multilocos	Multilocos	
19/2	LC192	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT GGTGTGGTGAGCCAAGATT - 3' (R) 5'-CCAAGCATTCTTCTTCTCT - 3'	(GAAG) <sub>2</sub> (GATG) <sub>2</sub> (GAAG) <sub>5</sub> GAAT GAAA AGAA (AGAG) <sub>2</sub> (AAGG) <sub>3</sub> TAGG GA-G (AAAG) <sub>2</sub> AA-A (AAAG) <sub>2</sub> AAGA AAGG (GAGG) <sub>3</sub> (AAGG) <sub>2</sub> AA-G AAGG	309	Tetra	Composto interrompido	54	Insatisfatório	Insatisfatório	
19/4	LC194	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT AACTGCTATAGGGCGGTTT - 3' (R) 5'-TCCAGCCTGGGTAACAAGAG - 3'	TTTC TTT- TTCT (CTTT) <sub>2</sub> C-TT -TTT CTTT -TTT CTTT -TTC (TCTT) <sub>2</sub> TC-T T- TT TCTC (TTCT) <sub>2</sub> TTTC TTT- TTCT (CTTT) <sub>4</sub> -TTC (TCTT) <sub>4</sub> TTCT (TTTC) <sub>2</sub>	225	Tetra	Composto interrompido	55	Multilocos	Insatisfatório	
20/1	LC201	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT GAAGGCTGCCAATTTAGGAA - 3' (R) 5'-GCCCTGCGATAAAAGAGAAA - 3'	(TCTT) <sub>13</sub> TC-T T-TT (TCTT) <sub>4</sub> TCTC TTCC TTTC CTTT CCTT -TTT CTTT TTTT C-TT CTTT C-TT CCTT CTTT CCCT TCCT TTCT TCCT (TTCC) <sub>2</sub> TTCT TCCT CTTT C-TT (CTTT) <sub>2</sub>	294	Tetra	Composto interrompido	52	F>	F>	
20/2	LC202	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT TAGACAGGCATGGTGGTGAA - 3' (R) TCCTCATTCTCTCACTTCCA - 3'	(AAAG) <sub>5</sub> --AG (AAAG) <sub>2</sub> -AA- (AAAG) <sub>8</sub>	368	Tetra	Perfeito	54	Multilocos	Insatisfatório	
20/3	LC203	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT TGTTTCATCTTCTGCTAGGCTCA - 3' (R) 5'-GGAAGAGGAGGTTGCACTGA - 3'	(GGTT) <sub>12</sub>	265	Tetra	Perfeito	57	Multilocos	Satisfatório	
20/4	LC204	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT GGGAACATACAGGGTTGTGG - 3' (R) 5'-CATCTACTCGGGAGGCTGAG - 3'	(CCTT) <sub>15</sub>	243	Tetra	Perfeito	57	Multilocos	Multilocos	
21/1	LC211	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT ACCCAATGGTCAAAGCAAAC - 3' (R) 5'-GCAGATTCTTAGAAGCAAGATGG - 3'	TTCT CTTC TTTC TTTT (CTTT) <sub>2</sub> (TCTT) <sub>13</sub> TTC- TTCT TT-T TCCT (CTTT) <sub>2</sub> (TCTT) <sub>3</sub> (TTCT) <sub>3</sub> TTC- TTCT TT-T TCCT (CTTT) <sub>2</sub>	290	Tetra	Composto interrompido	54	Satisfatório	Satisfatório	
21/3	LC213	(F) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT TTCCATTTCCCTTTTCAGG - 3' (R) 5'-CATTGAACCCGAGAGGTGT - 3'	GTTT TTTT (GTTT) <sub>6</sub>	204	Tetra	Imperfeito	52	Satisfatório	Satisfatório	

22/1	LC221	(F) 5'- <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> CTACTCCA ACTCCCCAGCAG - 3' (R) 5'- ACCCGACCCTCCATTATCT - 3'	(ATGG) <sub>6</sub>	206	Tetra	Perfeito	56	Multilocos	Multilocos
22/3	LC223	(F) 5'- <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> GCAAAATGTTAGCACACAGC - 3' (R) ATCCAGGTTGGCAATGTCTC - 3'	AGGA AGGC AGGA (AGGG) <sub>2</sub> AA-G AAGG ACGG TAGG GAGG (AAGG) <sub>2</sub> GATG (AAGG) <sub>3</sub> AAGT (AAGG) <sub>3</sub> GAGG AAGC G-GG (GAGG) <sub>3</sub> GAAG (GGAA) <sub>3</sub>	249	Tetra	Composto interrompido	54	Multilocos	Multilocos
22/4	LC224	(F) 5'- <b>TGTA AACGACGGCCAGT</b> TGGAGTTTGCGGTAAGTTGA - 3' (R) 5'- CCAGCTCTGGGGTTTTCTAA - 3'	(AAAC) <sub>6</sub>	216	Tetra	Perfeito	53	Multilocos	Satisfatório

Sequência M13 em azul nos *primers* forward; F>: Fragmento maior do que o esperado; F<: Fragmento menor do que o esperado

Do total de 60 locos testados para *L. chrisopygus* nas amplificações por PCR, 22 locos apresentaram padrão de amplificação satisfatório, 30 locos evidenciaram padrão de amplificação com múltiplas bandas e/ou tamanho do fragmento muito superior ao esperado e oito não amplificaram em nenhuma das condições testadas, mesmo após os testes de gradiente de temperatura. Quando utilizamos a amostra de *C. jacchus*, o padrão de amplificação evidenciou 23 locos satisfatórios, 25 locos com bandas múltiplas e 12 locos não amplificados em nenhuma das condições, conforme tabela 5. Uma vez que as amplificações para *C. jacchus* foram utilizadas apenas para controle positivo dos *primers* utilizados, essas foram realizadas uma única vez, sem posterior otimização da reação e continuidade das mesmas para validação populacional.

Os 13 locos selecionados para genotipagem em sequenciador automático revelaram baixa variação no número de alelos por loco nos indivíduos investigados (1 – 2 alelos), sendo monomórficos os locos LC11, LC12, LC33, LC64, LC153, LC173, LC201, LC211 e LC213, e polimórficos com dois alelos os locos LC23, LC111, LC171 e LC181, conforme descrito na tabela 6. As genotipagens dos locos LC153 e LC211 não apresentaram resultados satisfatórios.

**Tabela 6:** Relação dos locos heterozigotos e homozigotos para cada indivíduo

Locos	Indivíduos										Alelos
	BLT22	BLT23	BLT28	BLT30	BLT31	BLT32	BLT33	BLT34	BLT35	BLT37	
LC11	288	288	288	288	288	288	288	288	288	288	288
LC64	389	389	389	389	389	389	389	389	389	389	389
LC12	359	359	359	359	359	359	359	359	359	359	359
LC201	305	305	305	305	305	305	305	305	305	305	305
LC23	149/243	149/243	149/243	149/243	149/243	149/243	149/243	149/243	149/243	149/243	149/243
LC173	308	308	308	308	308	308	308	308	308	308	308
LC171	315	325	325	325	325	325	325	325	315	325	315/325
LC111	290	290	286	286	286	286	286	286	286	286	286/290
LC33	230	230	230	230	230	230	230	230	230	230	230
LC213	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220
LC181	277/289	277/289	277/289	277/289	277/289	277/289	277/289	277/289	277/289	277/289	277/289

O processo de anotação genômica automática, realizado através da ferramenta *BLASTn* fornecida pelo NCBI, revelou *hits* positivos, em sua maioria, para proteínas preditas, nunca isoladas em laboratório, e também para alguns genes já conhecidos (Tabela 7).

**Tabela 7:** Informações do processo de anotação automática com a ferramenta *BLAST n* fornecida pelo NCBI.

ID	pb	BLASTn	Max Score	Total Score	Query Cover %	E value	Ident %	Accession
LC11	1102	<u>PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC105370291 (LOC105370291), ncRNA</u>	1072	1072	99	0.0	85	<u>XR_915158.1</u>
LC12	1054	<u>PREDICTED: Chlorocebus sabaeus uncharacterized LOC103219642 (LOC103219642), ncRNA</u>	773	773	71	0.0	85	<u>XR_492079.1</u>
LC13	1106	<u>Homo sapiens zinc finger protein 585B (ZNF585B), mRNA</u>	363	363	35	1e-96	84	<u>NM_152279.3</u>
LC21	1098	<u>Homo sapiens zinc finger protein 585B (ZNF585B), mRNA</u>	375	375	35	2e-100	85	<u>XM_003273170.2</u>
LC22	1043	<u>PREDICTED: Nomascus leucogenys NUAK family, SNF1-like kinase, 2 (NUAK2), mRNA</u>	355	355	29	2e-94	88	<u>XM_003273170.2</u>
LC23	1076	<u>PREDICTED: Pan troglodytes COMM domain containing 2 (COMMD2), transcript variant X2, mRNA</u>	241	241	26	7e-60	82	<u>XM_009446673.1</u>
LC31	1076	Não encontrada nenhuma similaridade significativa						
LC32	1031	Não encontrada nenhuma similaridade significativa						
LC33	1048	Não encontrada nenhuma similaridade significativa						
LC34	1042	<u>PREDICTED: Macaca mulatta hypothetical protein LOC100427495 (LOC100427495), mRNA</u>	267	267	31	1e-67	81	<u>XM_002805249.1</u>
LC41	1031	<u>PREDICTED: Mandrillus leucophaeus vippee-like 1 (Drosophila) (YPEL1), transcript variant X2, mRNA</u>	436	436	43	8e-119	85	<u>XM_011987353.1</u>
LC43	1029	<u>Macaca mulatta leucine rich transmembrane and O-methyltransferase domain containing (LRTOMT), transcript variant 1, mRNA</u>	427	639	88	5e-116	80	<u>NM_001199354.1</u>
LC51	1084	<u>PREDICTED: Pan troglodytes uncharacterized LOC744739 (LOC744739), mRNA</u>	387	387	33	8e-104	86	<u>XM_009442564.1</u>
LC52	1121	<u>PREDICTED: Pan paniscus X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), transcript variant X4, mRNA</u>	300	300	25	1e-77	85	<u>XM_003823125.2</u>
LC61	1041	<u>Homo sapiens phosphorylated adaptor for RNA export (PHAX), mRNA</u>	337	337	26	8e-89	89	<u>NM_032177.3</u>
LC62	909	<u>PREDICTED: Cercocebus atys component of oligomeric golgi complex 7 (COG7), transcript variant X2, mRNA</u>	60.2	60.2	5	2e-05	87	<u>XM_012060976.1</u>
LC64		Não encontrada nenhuma similaridade significativa						
LC71	1037	<u>PREDICTED: Pan paniscus pleckstrin homology domain containing, family A member 5 (PLEKHA5), transcript variant X7, mRNA</u>	318	318	43	3e-83	80	<u>XM_008969588.1</u>
LC72	1085	Não encontrada nenhuma similaridade significativa						
LC73	1080	<u>Pongo abelii adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit (AP3S2), mRNA</u>	124	124	9	7e-25	90	<u>NM_001131540.1</u>
LC74	1165	<u>PREDICTED: Callithrix jacchus FAST kinase domains 1 (FASTKD1), transcript variant X3, mRNA</u>	436	436	27	8e-119	91	<u>XM_008998746.1</u>
LC84	1038	<u>PREDICTED: Aotus nancymae gametocyte specific factor 1 (GTSF1), transcript variant X2, mRNA</u>	93.5	93.5	6	2e-15	91	<u>XM_012450549.1</u>
LC93	1068	<u>PREDICTED: Pongo abelii uncharacterized LOC103892231 (LOC103892231), ncRNA</u>	289	476	25	2e-74	87	<u>XR_656450.1</u>
LC94	1089	<u>PREDICTED: Pan troglodytes uncharacterized LOC100614208 (LOC100614208), ncRNA</u>	311	311	27	5e-81	86	<u>XR_128960.2</u>
LC104	1074	<u>PREDICTED: Homo sapiens DNA meiotic recombinase 1 (DMC1), transcript variant X6, mRNA</u>	289	289	27	2e-74	85	<u>XM_006724112.2</u>
LC111	1040	<u>PREDICTED: Aotus nancymae uncharacterized LOC105719249 (LOC105719249), transcript variant X2, ncRNA</u>	202	202	13	3e-48	93	<u>XR_001107937.1</u>

<b>LC112</b>		Não encontrada nenhuma similaridade significativa							
<b>LC113</b>		Não encontrada nenhuma similaridade significativa							
<b>LC114</b>	1132	<u>PREDICTED: Macaca nemestrina Sp2 transcription factor (SP2), transcript variant X1, mRNA</u>	350	350	26	1e-92	88	<a href="#">XM_011725419.1</a>	
<b>LC121</b>	1031	<u>Homo sapiens proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4 (transmembrane) (PRRG4), mRNA</u>	196	196	26	1e-46	80	<a href="#">NM_024081.5</a>	
<b>LC122</b>	1081	<u>PREDICTED: Callithrix jacchus phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta (PI4K2B), transcript variant X4, mRNA</u>	403	403	28	8e-109	90	<a href="#">XM_008993520.1</a>	
<b>LC123</b>	1099	<u>PREDICTED: Equus przewalskii THO complex 2 (THOC2), mRNA</u>	180	180	19	1e-41	82	<a href="#">XM_008542445.1</a>	
<b>LC124</b>		Não encontrada nenhuma similaridade significativa							
<b>LC131</b>		Não encontrada nenhuma similaridade significativa							
<b>LC133</b>	1042	<u>PREDICTED: Callithrix jacchus isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT), mRNA</u>	451	451	28	3e-123	94	<a href="#">XM_002750230.2</a>	
<b>LC134</b>	1052	<u>PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC728099 (LOC728099), misc RNA</u>	113	113	9	2e-21	86	<a href="#">XR_941736.1</a>	
<b>LC141</b>	1078	<u>PREDICTED: Cercocebus atys zinc finger protein 160 (ZNF160), transcript variant X5, mRNA</u>	196	308	16	1e-46	87	<a href="#">XM_012081192.1</a>	
<b>LC142</b>	1061	<u>PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC105374790 (LOC105374790), ncRNA</u>	422	662	52	2e-114	89	<a href="#">XR_926117.1</a>	
<b>LC144</b>	1055	<u>Pongo abelii paraneoplastic Ma antigen 2 (PNMA2), mRNA</u>	219	282	28	3e-53	85	<a href="#">NM_001133537.1</a>	
<b>LC151</b>	1075	<u>PREDICTED: Pan paniscus Sp2 transcription factor (SP2), transcript variant X6, mRNA</u>	128	128	22	5e-26	77	<a href="#">XM_008952825.1</a>	
<b>LC153</b>	1065	<u>PREDICTED: Gorilla gorilla gorilla F-box protein 48 (FBXO48), mRNA</u>	254	254	24	8e-64	85	<a href="#">XM_004029346.1</a>	
<b>LC161</b>	1032	<u>PREDICTED: Pongo abelii transmembrane protein 127 (TMEM127), transcript variant X2, mRNA</u>	209	209	14	2e-50	92	<a href="#">XM_002811653.3</a>	
<b>LC163</b>	1056	<u>PREDICTED: Macaca nemestrina l(3)mbt-like 4 (Drosophila) (L3MBTL4), transcript variant X13, mRNA</u>	233	233	20	1e-57	86	<a href="#">XM_011736555.1</a>	
<b>LC171</b>		Não encontrada nenhuma similaridade significativa							
<b>LC173</b>	1026	<u>PREDICTED: Nomascus leucogenys protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3 (PTPN3), mRNA</u>	119	119	13	3e-23	82	<a href="#">XM_003260342.3</a>	
<b>LC181</b>	1047	<u>Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 52 (DDX52), transcript variant 1, mRNA</u>	84.2	84.2	6	1e-12	90	<a href="#">NM_007010.4</a>	
<b>LC182</b>	1050	<u>PREDICTED: Callithrix jacchus uncharacterized LOC103795545 (LOC103795545), transcript variant X3, ncRNA</u>	398	398	24	4e-107	95	<a href="#">XR_623128.1</a>	
<b>LC183</b>	1031	<u>PREDICTED: Saimiri boliviensis boliviensis zinc finger protein 682 (ZNF682), mRNA</u>	451	537	38	3e-123	93	<a href="#">XM_010330186.1</a>	
<b>LC184</b>	1089	<u>PREDICTED: Pan paniscus uncharacterized LOC100995691 (LOC100995691), ncRNA</u>	370	370	28	8e-99	88	<a href="#">XR_612888.1</a>	
<b>LC192</b>	1130	<u>PREDICTED: Cercocebus atys nucleic acid binding protein 2 (NABP2), transcript variant X4, mRNA</u>	274	274	25	7e-70	84	<a href="#">XM_012063470.1</a>	
<b>LC194</b>	1126	<u>PREDICTED: Saimiri boliviensis boliviensis zinc finger protein 682 (ZNF682), mRNA</u>	481	481	27	4e-132	95	<a href="#">XM_010330186.1</a>	
<b>LC201</b>	1172	<u>PREDICTED: Pan troglodytes WD repeat domain 55 (WDR55), transcript variant X1, mRNA</u>	78.7	78.7	5	5e-11	90	<a href="#">XM_003310871.3</a>	
<b>LC202</b>	1067	<u>PREDICTED: Pan paniscus complement component 4 binding protein, beta (C4BPB), transcript variant X7, mRNA</u>	220	220	26	9e-54	81	<a href="#">XM_008976514.1</a>	
<b>LC203</b>	1048	<u>PREDICTED: Nomascus leucogenys alpha-mannosidase 2x (LOC100598002), mRNA</u>	320	320	24	8e-84	89	<a href="#">XM_012507121.1</a>	

<b>LC204</b>	1061	<u>PREDICTED: Nomascus leucogenys par-6 family cell polarity regulator gamma (PARD6G), mRNA</u>	307	307	24	6e-80	88	<u><a href="#">XM_012506181.1</a></u>
<b>LC211</b>	1098	<u>PREDICTED: Propithecus coquereli myosin IIIB (MYO3B), transcript variant X2, misc_RNA</u>	87.9	87.9	5	9e-14	95	<u><a href="#">XR_001137744.1</a></u>
<b>LC213</b>	1032	<u>PREDICTED: Pan paniscus chromosome unknown open reading frame, human C4orf19 (LOC100993108), mRNA</u>	316	316	30	1e-82	85	<u><a href="#">XM_008957555.1</a></u>
<b>LC221</b>	1027	<u>PREDICTED: Callithrix jacchus outer dense fiber of sperm tails 3-like 2 (ODF3L2), mRNA</u>	130	130	6	1e-26	100	<u><a href="#">XM_008986863.1</a></u>
<b>LC223</b>	1118	<u>PREDICTED: Chlorocebus sabaeus interleukin-1 receptor-associated kinase 2 (IRAK2), mRNA</u>	86.1	86.1	9	3e-13	82	<u><a href="#">XM_007986218.1</a></u>
<b>LC224</b>	1027	<u>PREDICTED: Homo sapiens SURP and G patch domain containing 2 (SUGP2), transcript variant X15, misc_RNA</u>	335	583	37	3e-88	83	<u><a href="#">XR_936145.1</a></u>

## 5. DISCUSSÃO

A genética da conservação surge como uma área multidisciplinar que integra ecologia, biologia molecular, genética de populações e evolução utilizando dados genéticos para estratégias de preservação de espécies como entidades dinâmicas capazes de lidar com mudanças ambientais (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Muitas vezes confunde-se a genética da conservação com a genética de populações, um de seus principais componentes. Entretanto, a despeito de ambos os campos fazerem uso das mesmas ferramentas genéticas e moleculares, enquanto a genética de populações foca em processos e mecanismos pelos quais as mudanças evolutivas acontecem, a genética da conservação lida com os efeitos da perda de diversidade genética e mudanças recentes na estruturação genética que afetam a sobrevivência de espécies ameaçadas, requerindo o uso de marcadores moleculares com alta taxa evolutiva (HARTL; CLARK, 2010).

O fato de *L. chrysopygus* não possuir uma quantidade expressiva de locos microssatélites e tampouco dados genômicos disponíveis para análise *in silico* torna o uso de locos heterólogos uma alternativa viável, uma vez que altas taxas de transferabilidade de SSRs são observadas (SHARMA; GROVER; KAHL, 2007). Devido a esse fato, a mineração *in silico* no genoma de *C. jacchus* com posterior validação populacional em *L. chrysopygus*, foi utilizada neste estudo como uma estratégia viável para ampliar o número de locos SSRs na espécie focal de estudo. A amplificação cruzada dos locos demonstrou padrão de amplificação satisfatório para 37% de locos, padrão multilocos ou com tamanho de fragmento amplificado maior do que o esperado para 50% e 13% dos locos não foram amplificados. Como já mencionado, a taxa de amplificação observada se deve ao fato de regiões flanqueadoras de microssatélites serem, geralmente, conservadas entre indivíduos de espécies relacionadas filogeneticamente (SELKOE; TOONEN, 2006). Stackelberg *et al.* (2006) e Garnica *et al.* (2006) sugerem uma taxa de sucesso próxima de 50% em amplificações heterólogas de microssatélites obtidos de RNAm (EST-SSR) para a maioria das espécies, incluindo pássaros e bovinos (PRIMMER; MOLLER; ELLEGREN, 1996) e bovinos (MOORE *et al.*, 1991).

Apesar da boa taxa de amplificação, dentre os 13 locos genotipados, somente quatro se apresentaram polimórficos nas amostras avaliadas, sendo que cada loco apresentou apenas dois alelos, evidenciando um baixo nível de polimorfismo. Tal fato pode estar associado à natureza da amostra utilizada neste estudo que incluiu animais de uma população cativa de *L. chrysopygus* que foi fundada a partir de sete indivíduos selvagens provenientes de um único

local (Reserva Estadual do Morro do Diabo) por Ademar Coimbra Filho no ano de 1973. Esses animais foram transferidos e mantidos em cativeiro no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), três anos após a redescoberta da espécie (BALLOU *et al.* 2008). Em 1998, durante discussões sobre a quantidade mínima necessária de indivíduos para a manutenção de 90% da variabilidade genética existente na natureza, por um período de 100 anos, sem a necessidade de suplementação (de acordo com Ballou, *et al.*, 1995), Valladares-Pádua e Ballou (1998) verificaram que, apesar de a população inicial ter expandido, ela possuía 92,3% da diversidade genética da população selvagem, o que era equivalente à quantidade de diversidade genética existente nos sete indivíduos inicialmente capturados, o que também era equivalente a um nível médio de parentesco de 8% (maior do que o encontrado em primos de primeiro grau). Desta forma, embora cerca de 90% da diversidade genética tenha sido mantida, mesmo que a população atingisse 300 indivíduos, em 10 anos tal nível de variabilidade cairia abaixo de 90% por conta de seu tamanho populacional inicial pequeno e do alto nível de parentesco entre os indivíduos. E, mesmo com a tentativa de estratégias de manejo metapopulacional, no qual populações isoladas devido à fragmentação são manejadas como uma metapopulação com fluxo constante de indivíduos, inclusive entre cativeiros e natureza, de acordo com dados registrados em *Studbook* para permissão de fluxo gênico, reversão dos fatos e manutenção de sua variabilidade genética, dificuldades comprometeram a continuidade do processo trazendo prejuízos, em longo prazo e, inclusive, refletindo na capacidade reprodutiva dos animais, o que contribuiu para que, atualmente, a população *ex situ* de mico-leão-preto se encontre com baixa variabilidade genética e alto grau de parentesco entre os indivíduos (REZENDE, 2014).

Pope (1996) sugere que baixos níveis de variabilidade genética parecem caracterizar todos os gêneros de calitriquídeos já estudados, alegando que micos-leões, por exemplo, “podem, de fato, estar adaptados a um passado genético homozigótico”, embora tais níveis pareçam alarmantes em uma perspectiva conservacionista. Ele sugere também que os baixos níveis de variabilidade encontrados podem estar associados às características dos sistemas sociais desses taxa, especificamente à redução no tamanho efetivo ( $N_e$ ) da população e crescente possibilidade de endogamia, resultados da supressão reprodutiva dentro dos grupos e das oportunidades limitadas de dispersão e de vagas para novos reprodutores em ambientes saturados.



Embora, neste estudo, o objetivo não tenha sido avaliar a diversidade genética das populações cativas, o baixo número de alelos observado pode estar refletindo a origem e fundação da população de cativo avaliada.

Outra explicação que também pode estar associada ao baixo polimorfismo encontrado, seria a possível localização desses locos em regiões codificadoras do genoma. Microsatélites presentes em regiões expressas tendem a ser menos polimórficos do que os presentes em regiões não expressas, principalmente no caso de repetições microsatélites não múltiplas de três, as quais poderiam levar a uma mudança de fase de leitura do DNA alterando a estrutura tridimensional das proteínas, possibilitando a seleção negativa contra essas mutações e reduzindo suas chances de fixação na população (METZGAR; BYTOF; WILLS, 2000; CHABANE *et al.*, 2005; MADESIS; GANOPOULOS; TSAFTARIS, 2013). Neste trabalho, de acordo com os dados dos alinhamentos realizados na ferramenta *Blastn*, a maioria dos locos microsatélites, inclusive os locos selecionados para genotipagem, apresentou similaridade com produtos proteicos preditos, sugerindo que os locos apresentam-se relacionados a sequências codificadoras (tabelas 7 e 8).

**Tabela 8:** Relação dos locos genotipados e seus respectivos *hits* apresentados na anotação genômica automática.

Locos	Motif	Alelos	BLASTn	Max Score	Total Score	Query Cover %	E value	Ident %
LC11	(AGAT) <sub>2</sub> TCAT (AGAT) <sub>4</sub> AGAC A- AT (GGAT) <sub>5</sub> (AGAT) <sub>4</sub> ACAC (AGAT) <sub>3</sub> ACAC (AGAT) <sub>2</sub>	288	<a href="#">PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC105370291 (LOC105370291), ncRNA</a>	1072	1072	99	0.0	85
LC12	(CATC) <sub>7</sub> TATC CATG (CATC) <sub>2</sub> CTTC (CATC)	359	<a href="#">PREDICTED: Chlorocebus sabaeus uncharacterized LOC103219642 (LOC103219642), ncRNA</a>	773	773	71	0.0	85
LC23	(CCTC) <sub>5</sub> CTTT TCTC (CCTC) <sub>2</sub> CTTC (CCTC) <sub>2</sub> CTTC CCTT TCTC (CCTC) <sub>4</sub>	149/243	<a href="#">PREDICTED: Pan troglodytes COMM domain containing 2 (COMMD2), transcript variant X2, mRNA</a>	241	241	26	7e-60	82
LC33	(GGAT) <sub>6</sub> (GGAC) <sub>4</sub> GGAT GGAC	230	Não encontrada nenhuma similaridade significativa					
LC64	(CATT) <sub>6</sub>	389	Não encontrada nenhuma similaridade significativa					
LC111	(CCCT) <sub>10</sub>	286/290	<a href="#">PREDICTED: Aotus nancymaae uncharacterized LOC105719249 (LOC105719249), transcript variant X2, ncRNA</a>	202	202	13	3e-48	93
LC171	(TGTA) <sub>6</sub>	315/325	Não encontrada nenhuma similaridade significativa					
LC173	(TGAA) <sub>6</sub>	308	<a href="#">PREDICTED: Nomascus leucogenys protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3 (PTPN3), mRNA</a>	119	119	13	3e-23	82
LC181	(GGAG) <sub>2</sub> GTGA GGGG AGGG AGGA (AGGG) <sub>5</sub>	277/289	<a href="#">Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 52 (DDX52), transcript variant 1, mRNA</a>	84.2	84.2	6	1e-12	90
LC201	(TCTT) <sub>13</sub> TC-T T- TT (TCTT) <sub>4</sub> TCTC	305	<a href="#">PREDICTED: Pan troglodytes WD repeat domain 55 (WDR55), transcript</a>	78.7	78.7	5	5e-11	90

	TTCC TTTC CTTT CCTT -TTT CTTT TTTT C-TT CTTT C-TT CCTT CTTT CCCT TCCT TTCT TCCT (TTCC) <sub>2</sub> TTCT TCCT CTTT C-TT (CTTT) <sub>2</sub>		<a href="#">variant X1, mRNA</a>					
<b>LC213</b>	GTTT TTTT (GTTT) <sub>6</sub>	220	<a href="#">PREDICTED: Pan paniscus chromosome unknown open reading frame, human C4orf19 (LOC100993108), mRNA</a>	316	316	30	1e-82	85

De acordo com os resultados e dados obtidos para os alinhamentos realizados com o algoritmo *BLASTn* apresentados na tabela 7, 10 locos não encontraram nenhuma similaridade significativa, 31 apresentaram similaridade com sequências de RNA mensageiro de genes preditos, sete sequências encontraram similaridade com sequências ESTs já descritas e 11 locos apresentaram similaridade com DNA não codificante (LISTER HILL NATIONAL CENTER FOR BIOMEDICAL COMMUNICATIONS, 2016). Como descrito por Agostino (2012), uma sequência anotada como “predicted”, reflete similaridades significativas com sequências de RNA mensageiro conhecidas para organismos como humanos, ratos ou qualquer outra espécie mais profundamente estudada, além de evidências experimentais ainda incompletas.

Como podemos observar, os dois primeiros *hits* da tabela 8 são bastante significativos, ambos com *E-value* igual a zero, o que significa uma chance nula de similaridade ao acaso das sequências em questão com as sequências de referência. Também se mostram significativos os *hits* LC13, LC34, LC52, LC114, LC121, LC123, LC141, LC163, LC181, LC213 E LC221, com *E-values* 1e-96, 1e-67, 1e-77, 1e-92, 1e-46, 1e-41, 1e-46, 1e-57, 1e-12, 1e-82 e 1e-26, respectivamente, embora todos esses apresentem um queda na porcentagem de similaridade da cobertura total da sequência (*Query Cover*) com o respectivo *hit* encontrado e uma queda nos valores de *Max Score* e *Total Score*, evidenciando uma mudança no tamanho do alinhamento entre a sequência e o *hit* e/ou uma menor qualidade de alinhamento, além de informar o encontro de múltiplas regiões de similaridade entre as sequências, nos caso em que o valor *Total Score* é maior que o valor *Max Score*.

Em relação à sequência LC11, o alinhamento (Figura 3) e os valores da tabela 9 para essa sequência sugerem, praticamente, uma completa identidade à sequência de ncRNA humano (RNAs não codificadores de proteínas), com 99% de sua cobertura 85% idêntica à sequência referência. Já a sequência LC12, embora com *E-value* significativo, possui apenas

71% de sua cobertura total 85% similar ao melhor *hit* encontrado, refletindo uma queda significativa no valor de *Max Score* em relação ao alinhamento da primeira sequência.

Por fim, nos alinhamentos posteriores aos dois primeiros *hits*, podemos observar uma grande queda nos valores de *Query Coverage* e um aumento ainda maior nos valores de *E-value*, sugerindo que, apesar da existência de muitos *hits* com altos valores de Identidade, tais *BLASTs* encontraram apenas alguns pedaços das sequências em questão, podendo se constituir em possíveis variantes de proteínas.

## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível caracterizar 11 novos locos para *L. chrysopygus* em adição aos 15 já descritos por Perez-Sweeney *et al.* (2005). Apesar de poucos locos se mostrarem polimórficos na população amostral avaliada, cinco locos (LC23, LC173, LC181, LC201 e LC2013) encontram-se inseridos em regiões codificadoras do genoma. Estudos que considerem a validação destes locos em animais não aparentados poderão confirmar se o baixo polimorfismo observado se deve à natureza dos locos aqui caracterizados ou a estrutura genética da população avaliada. Adicionalmente, estudos que verifiquem a taxa de transferabilidade de tais microsatélites em espécies relacionadas poderão ser conduzidos com o intuito de fornecer ferramentas de análises genéticas para outras espécies de micos, incluindo saguis e outros pequenos primatas taxonomicamente próximos.

## 7. REFERÊNCIAS

- AGOSTINO, M. **Practical Bioinformatics**. New York: Garland Science, 2012. 394p.
- BALLOU, J. D. *et al.* A história, o manejo e o papel da conservação de populações de micos-leões em cativeiro. In: Kleiman, D. G.; Rylands, A. B. (Orgs.) **Micos-Leões: biologia e conservação**. Brasília: MMA, 2008. 568p.
- BALLOU, J. D., GILPIN, M. FOOSE, T. J. (Eds.) Population Management for Survival and Recovery: Analytical Methods and Strategies in Small Population Conservation. **New York: Columbia University Press, 1995, 375p.**
- BARKER, K. **Na Bancada – Manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 474p.
- BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 2, p. 573-580, 1999.
- BORGES-OSÓRIO, M. R., ROBINSON, W. M. **Genética Humana**. . 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 784p.
- CHABANE *et al.* EST versus genomic derived microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 52, n. 7, p. 903-909, 2005.
- CLAVERO, M., GARCÍA-BERTHOU, E. Invasive species are leading cause of animal extinctions. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 20, n. 3, p. 110 , 2005.
- CBSG (Conservation Breeding Specialist Group). **Lion Tamarin Population and Habitat Viability Assessment (PHVA) Workshop**, 3<sup>rd</sup>. Brasília: Escola de Administração Fazendária, 2005.
- CHAMBERS, G. K., MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology**, v. 126, n. 4, p. 455-76, 2000.
- DE MORAIS JR. *et al.* Os saguis, *Callithrix jacchus* e *penicillata* como espécies invasoras na região de ocorrência do mico-leão-dourado. In: Procópio de Oliveira, P., Grativol, A.D., Ruiz-Miranda, C.R. (Orgs.). **Conservação do Mico-Leão-Dourado: enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada**. Campos dos Goytacazes, RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense; Série Ciências Ambientais, 2008.
- DI FIORE, A. **Genetic approaches to the study of dispersal and kinship in New World primates**. In: GARBER, P. et al. South American Primates, Developments in Primatology: Progress and Prospects. New York: Springer, 2009, p. 211-250.
- EAZA (Associação Européia de Zoológicos e Aquários). **Guia de manejo para calitriquídeos**. Saint Aignan: Beauval Zoo, 2010. 218p.

EISEN, J. A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D. B. and SCHLOTTERER, C. (Eds.). **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford: Oxford University Press, 1999.

ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**. V. 5, p. 435-445, 2004.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Editores técnicos: Fábio Gelape Faleiro; Solange Rocha Monteiro de Andrade; Fábio Bueno dos Reis Junior. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 730p.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

FAN, H., CHU, J. Y. A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 5, n. 1, p. 7-14, 2007.

FISHER, R. A. **The Genetical Theory of Natural Selection**. 1<sup>st</sup> Ed. Oxford: Oxford University Press, 1930, 272p.

FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. **Biological Conservation**, v.143, n. 9, p. 1919-1927, 2010.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008, 280p.

FREITAS, P. D., **Marcadores Microssatélites em camarões: Curso Teórico**. 40p., 2005. Disponível em: [www.shrimp.ufscar.br](http://www.shrimp.ufscar.br). Acesso em: set. 2013.

FREITAS, P. D. **Isolamento, identificação e caracterização de SSRs (seqüências curtas repetidas) no genoma do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Crustacea)**. São Carlos: UFScar/Laboratório de Biodiversidade Citogenética e Molecular, 2007. 191p. Relatório Científico Final.

GARNICA, D. P. *et al.* Survey and analysis of microsatellites from transcript sequences in *Phytophthora* species: frequency, distribution, and potential as markers for the genus. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p. 245, 2006.

GOODEN, B. *et al.* Impact threshold for an alien plant invader, *Lantana camara* L., on native plant communities. **Biological Conservation**. v. 142, n. 11, p. 2631-2641, 2009.

GRIBBEN, J.G. *et al.* All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. **Blood**, v. 78, n. 12, p. 3275-3280, 1991.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à genética**. 9<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 712p.

GROOM, M. J.; MEFFE, G. K.; CARROLL, C. L. **Principles of Conservation Biology**. 3<sup>rd</sup> Ed. Sunderland, USA: Sinauer Associates, 2005. 699p.

HARTL, D. L; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660p.

ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). **Plano de Manejo da Estação Ecológica Mico-Leão-Preto**. Brasília: Diretoria de Unidades de Conservação de Proteção Integral, 2007. 259p.

IDT. **The Polymerase Chain Reaction**, Integrated DNA Technologies, 2011. 21p.

INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE (INEA). **Centro de Primatologia do Rio de Janeiro**. Disponível em:

<<http://www.inea.rj.gov.br/Portal/Agendas/BIODIVERSIDADEEAREASPROTEGIDAS/CentredePrimatologia/index.htm&lang=PT-BR#ad-image-0>>. Acesso: 26 fev. 2015.

IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources). **IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1**. Gland, Suíça/Cambridge, Reino Unido: IUCN Species Survival Commission. 2001. 30p.

JEHAN, T.; LAKHANPAUL, S. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) – Methods and application in plant genetics: a review. **Indian Journal of Biotechnology**, v.5, p.435- 459, 2006.

KEARSE, M. *et al.* **Geneious**\_Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KIERULFF, M.C.M., RYLANDS, A.B., MENDES. S.L., DE OLIVEIRA, M.M. 2008. *Leontopithecus chrysopygus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2015.2. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: 04 ago. 2015.

KLEIMAN, D. G., RYLANDS, A. B. **Micos-Leões: Biologia e Conservação**. Brasília: MMA, 2008. 568p.

LAIKRE, L. *et al.* Neglect of Genetic Diversity in Implementation of the Convention on Biological Diversity. **Conservation Biology**, v. 24, n. 1, p. 86-88, 2010.

LEPRIEUR, F. *et al.* Fish Invasions in the World's River Systems: When Natural Processes are Blurred by Human Activities. **PLoS Biology**. v. 6, n. 2, p. 404-410, 2008.

LISTER HILL NATIONAL CENTER FOR BIOMEDICAL COMMUNICATIONS. **Handbook - Help Me Understand Genetics**. Bethesda: U.S. National Library of Medicine, 2016. 203p.

LUDWIG, G., KIERULFF, M. C. M., RUIZ-MIRANDA, C. R.. Gênero *Leontopithecus*

Lesson, 1840. p. 97-103. In: REIS, N. R., PERACCHI, A. L., ANDRADE, F. R. **Primatas Brasileiros**, 2008. 259 p.

LUNT, D. H., HUTCHINSON, W. F., CARVALHO, G. R. An efficient method for PCR-based identification of microsatellite arrays (PIMA). **Molecular Ecology**, v. 8, p. 891-894, 1999.

MADESES, P., GANOPOULOS, I., TSAFTARIS, A. Microsatellite: Evolution and Contribution. **Methods in Molecular Biology**, v. 1006, p. 1-13, 2013.

METZGAR, D. BYTOF, J., WILLS, C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite in coding DNA. **Genome Research**, v. 10, n. 1. P. 72-80, 2000.

MOORE *et al.* The conservation of dinucleotide **microsatellites** among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v. 10, n. 3, p. 654-660, 1991.

MORAES, I. A. **Investigações sobre a fisiopatologia da reprodução em micosleões (*Leontopithecus sp.*, LESSON, 1840) mantidos em cativeiro (*Callitrichidae* - Primates)**. 2004. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

MURRAY, V., MONCHAWIN, C., ENGLAND, P. R. The determination of the sequences presente in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 10, p. 2395-2398, 1993.

PEREZ-SWEENEY, B. M. *et al.* Dinucleotide microsatellite primers designed for a critically endangered primate, the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 2, p. 198-201, 2005.

POPE, T. R. Socioecology, population fragmentation, and patterns of genetic loss in endangered primates. In: Avise, J. C., Hamrick, J. L. (Eds.) **Conservation genetics: Case histories from nature**. New York: Chapman and Hall, 1996, p. 119-159.

POUGH, F. H., JANIS, C. M., HEISER, J. B. A Vida dos Vertebrados. 3ª edição. São Paulo: Atheneu, 2003, 699p.

PRIMACK, R. B. **Essentials of conservation biology**. 5<sup>th</sup> Ed. Sunderland, USA: Sinauer Associates, 2010. 601p.

PRIMMER, C. R., MOLLER, A. P., ELLEGREN, H. A Wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 3, p. 365-378, 1996.

PROMEGA. **Wizard Genomic DNA Purification Kit Technical Manual**, Madison: Promega Corporation, 2014. 18 p.



PROMEGA. **GoTaq Colorless Master Mix Usage Information**. Madison: Promega Corporation, 2013. 2p.

RELATÓRIO TÉCNICO. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2013-2014**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE); 2015. 60p.

REZENDE, G. C. **Sucesso em Programas de Conservação de Espécies da Fauna Ameaçada: A história do Programa de Conservação do Mico-Leão-Preto**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Escola Superior De Conservação Ambiental E Sustentabilidade, Instituto de Pesquisas Ecológicas (IPÊ), Nazaré Paulista, 2013.

REZENDE, C. R. **Mico-leão-preto: a história de sucesso na conservação de uma espécie ameaçada**. 1ª ed. São Paulo: Matrix, 2014. 176p.

ROUZÉ, P., PAVY, N., ROMBAUTS, S. Genome annotation: which tools do we have for it? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, n. 2, p. 90-95, 1999.

RYLANDS, A. B., MITTERMEIER, R. A., SILVA JR, J.S. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. **International Zoo Yearbook**, v. 46, p. 11-24, 2012.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2ª ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SELKOE, K., A., TOANEN, R., J. **Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers**. *Ecology Letters*, v. 9, n. 5, p. 615-629, 2006.

SCHLÖTTERER, C, Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v. 109, n. 6, p. 365-371, 2000.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234, 2000.

SCRIBNER, K., T. Measures of genetic diversity. In: GROOM, M. J.; MEFFE, G. K.; CARROLL, C. L. **Principles of Conservation Biology**. 3<sup>rd</sup> Ed. Sunderland, USA: Sinauer Associates, 2005. 699p

SHARMA, P. C., GROVER, A., KAHL, G. Mining microsatellites in eukaryotic genomes. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 490-498, 2007.

STACKELBERG, M. V., RENSING, S. A., RESKI, R. Identification of genic moss SSR markers and a comparative analysis of twenty-four algal and plant gene indices reveal species-specific rather than group-specific characteristics of microsatellites. **BMC Plant Biology**, v. 6, p. 9, 2006.

TEMPLETOM, A. R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**. 1ª Ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011. 705p.

TONG, J., WANG, D., CHENG, L. Development of microsatellite markers by data mining from DNA sequences. In: **Data Mining and Knowledge Discovery in Real Life Applications**. Edited by Ponce, J. and Karahoca, A. Shangai: InTech, 2009. Disponível em: [http://www.intechopen.com/books/data\\_mining\\_and\\_knowledge\\_discovery\\_in\\_real\\_life\\_applications/development\\_of\\_microsatellite\\_markers\\_by\\_data\\_mining\\_from\\_dna\\_sequences](http://www.intechopen.com/books/data_mining_and_knowledge_discovery_in_real_life_applications/development_of_microsatellite_markers_by_data_mining_from_dna_sequences). Acesso em: 15 jul. 2015.

VALLADARES-PADUA, C. B., BALLOU, J. D. *Leontopithecus chrysopygus* metapopultion management action plan. In: Ballou *et al.* **Leontopithecus II: The second population and habitat viability assessment for Lion Tamarins (Leontopithecus): Final Report**. Apple Valley, USA: Conservation Breeding Specialist Group (SSC/IUCN), 1998. Appendix B, 10p.

WALSH, P. S., FILDES, N. J., REYNOLDS, R. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 14, p. 2807-2812, 1996.

UNTERGASSER, A. *et al.*, Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 71-74, 2007.

WAN, Q. H. *et al.* Wich genetic marker for which conservation genetics issue? **Electrophoresis**, v. 18, n. 14, p. 2165-2176, 2004.

XIONG, J. **Essential Bioinformatics**. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 2006.

ZANE, L., BARGELLONI, L., PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ZHANG, D. X., HEWITT, G. M. Nuclear DNA analyses um genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 6, p. 563-84, 2003.