

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**VARIABILIDADE GENÉTICA E VERIFICAÇÃO DE PATERNIDADE DA COLÔNIA
CATIVA DO MICO-LEÃO-PRETO (*Leontopithecus chrysopygus*) (PRIMATES,
CALLITHRICIDAE) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES.**

Paola Andrea Ayala Burbano

Orientadora: Dr. Patrícia Domingues de Freitas

São Carlos, SP 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**VARIABILIDADE GENÉTICA E VERIFICAÇÃO DE PATERNIDADE DA COLÔNIA
CATIVA DO MICO-LEÃO-PRETO (*LEONTOPITHECUS CHRYSOPYGUS*)
(*PRIMATES*, *CALLITHRICIDAE*) UTILIZANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES.**

Paola Andrea Ayala Burbano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: **Prof. Dra. Patricia Domingues de Freitas.**

São Carlos, SP
2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

A973vg Ayala Burbano, Paola Andrea.
Variabilidade genética e verificação de paternidade da colônia cativa do mico-leão-preto (*Leontopithecus Chrysopygus*) (*Primates, Callithricidae*) utilizando marcadores microssatélites / Paola Andrea Ayala Burbano. - São Carlos : UFSCar, 2015.
98 f.

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

1. Genética de populações. 2. Microssatélites. 3. Diversidade genética. 4. Genética da conservação. 5. Paternidade. 6. Mico-leão-preto. I. Título.

CDD: 575.15 (20ª)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Ata de Defesa de Dissertação
Candidata: Paola Andrea Ayala Burbano

Aos 03/06/2015, às 09:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, a defesa de dissertação de mestrado sob o título: Variabilidade genética e verificação de paternidade da colônia cativa do mico-leão preto (*Leontopithecus chrysopygus*) (PRIMATES, CALLITHRICIDAE) utilizando marcadores microssatélites, apresentada pela candidata Paola Andrea Ayala Burbano. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca	Função	Instituição	Conceito
Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas	Presidente	UFSCar	A
Profa. Dra. Alexandra Sanches	Titular	UFSCar	A
Profa. Dra. Laurence Marianne Vincianne Culot	Titular	UNESP	A

Resultado Final: Aprovada

Parecer da Comissão Julgadora*:

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Ivanildes Menezes, representante do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

RL = [assinatura]

Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas

[assinatura]

Profa. Dra. Alexandra Sanches

[assinatura]

Profa. Dra. Laurence Marianne Vincianne Culot

[assinatura]

Representante do PPG: Ivanildes Menezes



Observações:

- Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.
- Para gozar dos direitos do título de Mestre ou Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, o candidato ainda precisa ter sua dissertação ou tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.
- Nesta ata não são necessárias as assinaturas dos componentes da banca.

Con todo mi amor para las personas que han hecho todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por creer en mí, por motivarme, por darme fuerza cuando a veces sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi amor, mi corazón, mis pensamientos y sobretodo mi agradecimiento.

Rosario e Edgar

*"Es necesario abrir los ojos y percibir que las cosas buenas están dentro de nosotros,
donde los sentimientos no precisan de motivos ni los deseos de razón.
Lo importante es aprovechar el momento y aprender su duración,
pues la vida está en los ojos de quien sabe ver."*

Gabriel García Márquez

AGRADECIMENTOS

Obrigado a cada uma das pessoas que sempre estiveram perto ou longe do meu lado neste sonho que empreendi há alguns anos;

A Deus por estar comigo em todos os momentos, por todas as oportunidades.

Obrigada por me iluminar e me dar força para continuar neste sonho;

Ao meu Pai, por ser um exemplo de um trabalho árduo, honestidade e valores, por ser um lutador de vida;

A minha mãe por ser o anjo da minha vida, por seu imenso amor, por ser minha mãe, minha companheira, minha melhor conselheira. Porque se alguém está por trás de todo esse trabalho e você é minha Negra, você foi sempre a minha força e meus pés nesta terra;

A meus irmãos Giovanni, Rolando y Ana Maria pelo amor e o bom exemplo, vocês que conseguiram me formar com bons sentimentos, hábitos e valores o que tem me ajudado a alcançar meus sonhos sempre procurando o melhor caminho;

Ao mais lindo da minha vida, Manuela, Sofia y Nicolas. Pelo seu sorriso e o amor sincero. Obrigada por fazer minha vida mais feliz;

A meu Andy que tem sido meu amor, meu amigo e meu companheiro. Obrigada pelo seu amor e compreensão, por seus conselhos e por cada uma das suas palavras;

A Hernán (Nancho) Cerón obrigada pela amizade, pela ajuda, os conselhos a cumplicidade e sobretudo pelo sorriso eterno.

A minha “gorda bella” (Edna Calpa), porque aprendemos a viver juntas, crescemos como cúmplices dia a dia, somos incondicionais sempre compartilhando sucessos e fracassos. Dou graças a Deus porque você faz parte da minha vida;

A minha orientadora Patrícia Dominguez, obrigada pelo tempo, pelo apoio e pela sabedoria que me deu no desenvolvimento de minha formação profissional, por guiar o desenvolvimento e finalização deste trabalho;

Ao professor Pedro Manoel Galletti que me deu a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Conservação e Biodiversidade Molecular, por seu apoio, carinho e conselhos durante o desenvolvimento da minha formação;

A todos os meus amigos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (DGE – UFSCar), pela amizade, pela companhia, pela enorme ajuda. Obrigada pelos

ensinamentos, pela paciência e por tornar cada dia mais amigável. Obrigada Karen e Rafinha, Danni, Gissele, Priscilla, Rosane, Bruno, Ueslei;

À Fundação Zoológico de São Paulo, Parque Ecológico de São Carlos, Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, Zoológico de La Palmyre e ao Durrell Wildlife Conservation Trust pela informação e amostras concedidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de estudos.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Espécie em estudo- <i>Leontopithecus chrysopygus</i>	16
1.1.2 Programa de reprodução dos micos-leões em cativeiro.....	19
1.2 Análise do pedigree e terminologia.....	21
1.3 Diversidade genética e conservação <i>ex situ</i>	23
1.3.1 O uso de marcadores moleculares para medição da variação genética.....	26
1.3.2. Microssatélites e seu uso na conservação.....	27
1.4 Determinação de paternidade por meio de marcadores microssatélites.....	27
1.4.1 Inferências Estatísticas para Cálculo de Paternidade.....	29
1.4.2 Índice de paternidade.....	29
1.4.3 Calculo de paternidade mediante razão de verossimilhança.....	30
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. <i>Studbook</i> e análise de pedigree.....	35
3.2 Amostragem e Extração de DNA.....	35
3.3 Amplificação dos locos de microssatélites e genotipagem.....	39
3.4 Análise dos dados.....	42
3.4. 1 Diversidade Genética.....	42
3.4.2 Testes de Paternidade.....	43
3.4.3 Estrutura Genética.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1 <i>Studbook</i> e análise de pedigree.....	45
4.2 Análise de Diversidade Genética.....	54
4.3 Análise de Paternidade.....	61
4.3.1 Probabilidade de Exclusão.....	61
4.3.2. Inferências Estatísticas por meio da razão de verossimilhança mediante o programa Cervus.....	61
4.4 Estruturação Genética.....	67
4.4.1 Análise Fatorial de Correspondência.....	67

5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXOS.....	92
Anexo 1- Alelos privados encontrados no grupo em cativeiro brasileiro e a população de Capão Bonito.	92
Anexo 2- Valores dos cinco estimadores de heterozigosidade individual descritos na literatura para o grupo em cativeiro Brasileiro e a população de Capão Bonito.	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do Estado de São Paulo onde se mostra a área de distribuição atual do mico-leão-preto. (MORAES RODRIGUES; GAGETTI; PIRATELLI, 2014).....	14
Figura 2. Distribuição original e atual do gênero <i>Leontopithecus</i> . Fonte: Stephen D. Nash/ Conservation International.	17
Figura 3. Mico-leão-preto	18
Figura 4. Reação de amplificação usando a cauda universal M13. Fonte: Adaptado de Schuelke (2000).....	41
Figura 5. Representação gráfica da colônia cativa do Mico-leão-preto segundo dados do <i>Studbook</i>	48
Figura 6. Número de indivíduos reproduzindo-se em cada geração em relação ao total de número de indivíduos por geração.	48
Figura 7. Número de indivíduos na população cativa de 1973 e 2013.....	49
Figura 8. Estrutura etária da população atual do mico-leão-preto	50
Figura 9. Distribuição da frequência do relacionamento médio (MK) medido a partir de dados de <i>Studbook</i>	51
Figura 10. Porcentagem de indivíduos em cada nível de endogamia desde a fundação.....	52
Figura 11. Variação do coeficiente de endogamia médio (F) ao longo das gerações (Cinza). Coeficiente de endogamia máximo em cada geração (Preto).	53
Figura 12. Correlação entre o percentual de indivíduos sobreviventes até os 18 meses de idade e o coeficiente médio de endogamia dos indivíduos encontrados no grupo cativo do Mico-Leão-Preto ($n = 9$ $p < 0,001$).	54
Figura 13. Distribuição das frequências alélicas dos grupos em cativeiro e da população de Capão Bonito do Mico-leão-preto.....	57
Figura 14. Distribuição da frequência de relacionamento interno (IR) e heterocigosidade individual padronizada com base na heterocigosidade observada (Hs_{obs}).....	60
Figura 15. Genealogia do grupo em cativeiro do Mico-Leão-Preto.....	66
Figura 16. Gráfico da Análise Fatorial de Correspondência (FCA)	67
Figura 17. Grupo Familiar Fundação Parque Zoológico de São Paulo.....	69
Figura 18. Grupo Familiar Parque Ecológico São Carlos.	70
Figura 19. Grupo Familiar do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro.....	71
Figura 20. Grupo Familiar Inglaterra.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação dos 37 indivíduos que fazem parte da colônia cativa do Mico-Leão-Preto no Brasil.	36
Tabela 2. Sequências forward e reverse dos primers de microssatélites usados neste trabalho.	39
Tabela 3. Parâmetros estimados pelo programa PedScope para 28 fundadores.	46
Tabela 4. Valores máximos e médios do coeficiente de endogamia calculada com base no <i>Studbook</i> por geração.....	51
Tabela 5. Locus microssatélites polimórficos no mico-leão-preto..	55
Tabela 6. Diversidade genética do mico-leão-preto do grupo Brasileiro, da Inglaterra e da população selvagem de Capão Bonito.....	58
Tabela 7. Limites de delta estabelecidos por meio de simulação ($r=10.000$) mediante o programa Cervus.....	62
Tabela 8. Resultados da prova de paternidade por meio da razão de verossimilhança mediante o programa Cervus.....	62
Tabela 9. Probabilidade de paternidade mediante o teorema de Bayes para confirmar a paternidade da progênie incorretamente atribuída pelo programa Cervus.	64
Tabela 10. Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseada em FST e RST para os dados microssatélites.....	68
Tabela 11. Valores de FST e de RST obtidos a partir dos dados Microssatélites.	68

RESUMO

Maximizar a conservação da diversidade genética é um dos principais objetivos de qualquer programa de reprodução em cativeiro. Por serem de pequeno tamanho, grupos mantidos em cativeiro são particularmente suscetíveis à perda de diversidade genética, depressão endogâmica e adaptação ao cativeiro. Na tentativa de minimizar tais impactos, a caracterização genética de populações de vida livre e de cativeiro, torna-se uma importante ferramenta para a conservação destas espécies, uma vez que possibilita o desenvolvimento de estratégias de manejo que visem à manutenção de níveis adequados de diversidade genética. Neste contexto o objetivo principal deste trabalho foi avaliar através de 15 loci microsatélites, os níveis de variabilidade genética e paternidade dos animais mantidos em cativeiro no Brasil, no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Parque Ecológico de São Carlos e 14 espécimes que faziam parte do *Durrell Conservation Trust* na Inglaterra. Os resultados referentes à riqueza alélica e heterozigosidade esperada mostraram que há uma representação similar nos valores de alelos e heterozigosidade quando comparado com outras espécies de *Calitriquídeos*. A análise de correspondência fatorial (FCA) mostrou que os grupos em cativeiro do Brasil apresentaram maior homogeneidade, quando comparados a um grupo de vida livre proveniente da região de Capão Bonito (São Paulo) e aos 14 indivíduos que representam ao grupo em cativeiro do zoológico de *Durrell*. O alto grau de parentesco entre os animais em cativeiro evidencia baixa diferenciação entre os grupos pertencentes às diferentes instituições brasileiras estudadas. Os grupos de cativeiro do Brasil, no entanto, mostraram-se divergentes dos animais de Capão Bonito. As informações obtidas neste trabalho são fundamentais para aumentar o conhecimento sob aspectos genéticos dos micos-leões-pretos e subsidiar planos de reprodução assistida que visem minimizar a perda de diversidade genética e a endogamia.

Palavras-chave: Mico-leão-preto, *Studbook*, microsatélites, diversidade genética, paternidade, genética da conservação

ABSTRACT

The main goal of any captive breeding program consists is maximizing the conservation of genetic diversity. Groups kept in captivity are particularly susceptible to the loss of genetic diversity, inbreeding depression and adaptation to captivity, due to their small size. The genetic characterization of wild and captive populations is an important tool both to minimize these impacts and for the conservation of these species, since it enables the development of management strategies aimed at maintenance of genetic diversity. In this context, the main objective of the study was to evaluate genetic variability and paternity for animals of *black lion tamarin* from *Centro de Primatología do Rio de Janeiro, Fundação Parque Zoológico de Sao Paulo, Parque Ecológico de Sao Carlos* and 14 specimen belonging to the *Durrell Conservation Trust in England* using 15 microsatellite loci. The results of the allelic richness and expected heterozygosity showed similar values of alleles numbers and heterozygosity when compared with other species of *Callitrichidae*. Factorial correspondence analysis (FCA) showed greater homogeneity among captive animals than wild animals from Capão Bonito. The captive groups showed no differentiation among them and high differentiation from the wild Capão Bonito population. The data obtained herein are fundamental to increase the knowledge in genetic aspects of tamarins and support breeding programs to prevent loss of genetic diversity and inbreeding.

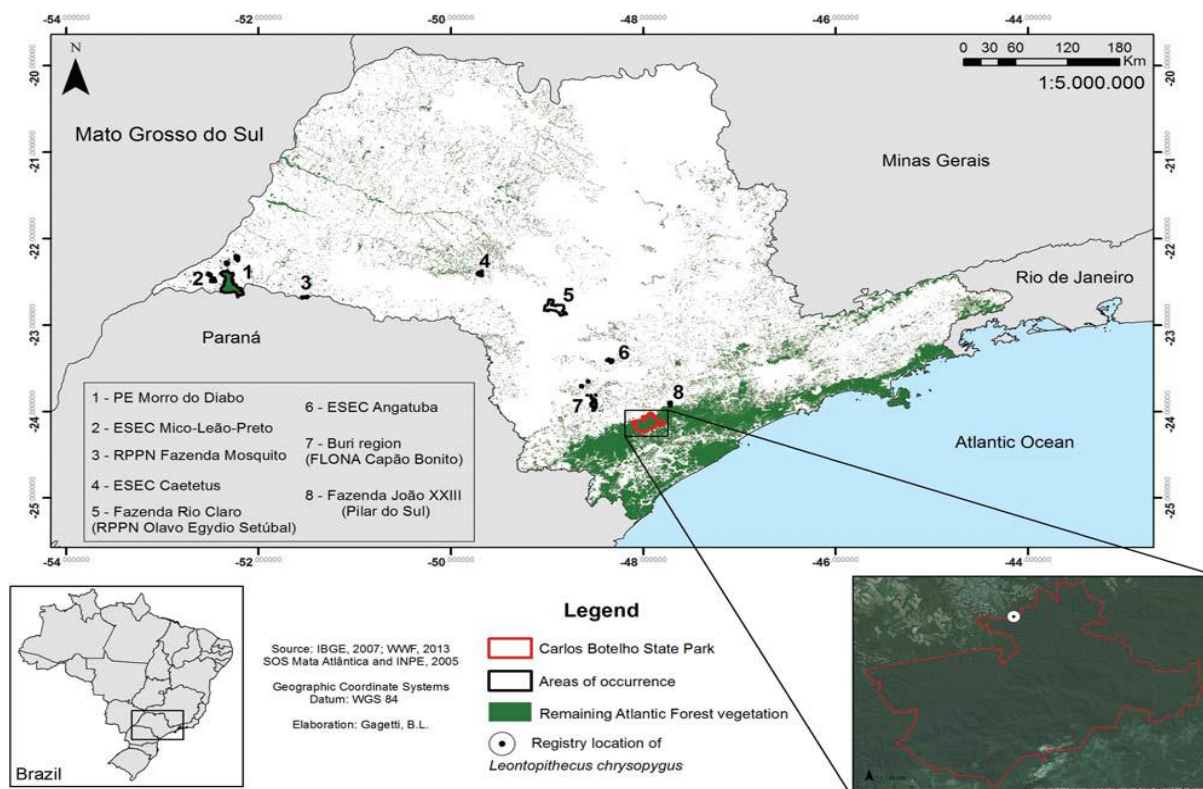
Keywords: Black lion tamarin, *Studbook*, microsatellites, genetic diversity, paternity conservation genetic.

1. INTRODUÇÃO

O mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*) considerado como espécie-guarda chuva e espécie bandeira, é endêmica da Mata Atlântica brasileira e está listada como ameaçada pela lista vermelha da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza). No passado sua área de distribuição original incluía as partes baixas do interior da Mata Atlântica, localizadas entre os rios Tietê e Paranapanema no estado de São Paulo (KLEIMAN D.; MALLISON., 1998). A destruição acelerada do habitat fez com que esta espécie fosse considerada extinta por mais de 65 anos, uma vez que nenhum exemplar de mico-leão-preto era encontrado em vida livre. Após a redescoberta do mico-leão-preto no Parque Estadual do Morro do Diabo no ano de 1970 (COIMBRA FILHO, 1970) um senso estimou cerca de 200 animais de vida livre compondo uma única população.

Na década de 90 foi feita uma estimativa de 900 indivíduos de vida livre distribuídos em sete populações, sendo cinco destas localizadas na região do Pontal do Paranapanema, a qual compreende o Parque Estadual do Morro do Diabo e quatro fragmentos que na atualidade fazem parte do Parque Estadual Mico Leão Preto. Atualmente a distribuição da espécie limita-se a oito localidades com 18 populações a maioria em fragmentos pequenos e isolados, algumas das quais habitam sete áreas protegidas: Parque Estadual do morro do Diabo, Estação Ecológica Mico-Leão-Preto, Fazenda Mosquito, Estação Ecológica Caetetus, Reserva Privada Olavo Egydio Setúbal, Estação Ecológica Angatuba e a Floresta Nacional de Capão Bonito (HOLST et al., 2006; REZENDE, 2014) (Figura 1). No ano 2002 foi registrada uma população de mico-leão-preto na Fazenda João XXIII, no município de Pilar do Sul, perto da Serra de Paranapiacaba nos parques estaduais de Intervales e Carlos Botelho (MORAES RODRIGUES; GAGETTI; PIRATELLI, 2014; RÖHE, F., PINASSI, A., FARAH, 2003). O mais recente registro da espécie foi em 2013 no Parque Estadual Carlos Botelho, município de São Miguel Arcanjo no estado de São Paulo (RODRIGUES; GARRIDO; SANTOS, 2013).

Figura 1- Mapa do Estado de São Paulo onde se mostra a área de distribuição atual do mico-leão-preto. Os números indicam os lugares onde atualmente se distribui a espécie.



Fonte: MORAES RODRIGUES; GAGETTI; PIRATELLI, 2014

Além das populações de vida livre, o mico-leão-preto é também encontrado em cativeiro em diferentes instituições no Brasil e no exterior. O primeiro grupo de *L. chrysopygus* em cativeiro foi formado pelo pesquisador Coimbra-Filho no ano de 1972 quando o número de animais em vida livre foi estimado em apenas cerca de 200 indivíduos. O grupo foi estabelecido a partir de sete indivíduos provenientes do Parque Estadual do Morro do Diabo sendo este considerado o primeiro grupo em cativeiro desta espécie no Banco Biológico da Tijuca. No ano de 1984, um total de 26 indivíduos foram levados para o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) e em 1985 outros seis animais foram introduzidos no CPRJ. Em 1986, 31 indivíduos foram capturados na área de inundação da hidrelétrica de Rosana que incluía 3.000 ha do Parque Estadual do Morro do Diabo. Entretanto devido às péssimas condições da saúde destes animais apenas catorze indivíduos (seis machos e oito fêmeas)

sobreviveram, os quais foram alocados na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP, São Paulo, Brasil.)

Com a finalidade de contribuir com o manejo dos grupos em cativeiro, no ano de 1987, foi criado um Comitê Internacional para a Preservação e Manejo do mico leão preto e foi a partir dessa iniciativa que se dá início ao primeiro registro genealógico da espécie (*Studbook*). As únicas instituições reproduzindo o mico-leão-preto naquela época eram a FPZSP e o CPRJ. Entretanto, seis animais foram transferidos destas instituições para o Centro de Preservação da Vida Selvagem de Jersey (Inglaterra) *Jersey Wildlife Preservation Trust* atualmente chamado *Durrell Wildlife Conservation Trust*.

A reprodução dos animais mantidos no zoológico de Durrell teve sucesso e vários animais foram transferidos para outras instituições na Europa assim como para alguns recintos na América do Norte e na Austrália, sendo que nestes países os indivíduos não sobrevieram. Em 2014, o *Studbook* registrou um grupo cativo de 46 indivíduos em quatro instituições no Brasil e no zoológico de Durrell (WORMELL, 2012).

A introdução e manutenção de animais de *L. chrysopygus* em cativeiro faz parte de um conjunto de ações que visam manter as populações de vida livre desta espécie viável e autossustentável. Para atingir esse objetivo, no entanto, é fundamental que os grupos em cativeiro de mico-leão-preto sejam devidamente dirigidos para introdução e manutenção de novos animais na natureza. Entretanto, apesar do número de animais em cativeiro tenha “aumentado” desde o início do programa, a sobrevivência e desenvolvimento de filhotes nascidos nos recintos tem sido muito baixa.

O manejo dos animais em cativeiro do mico-leão-preto, tem sido feita através das informações de pedigree mantidas no *Studbook* da espécie. Através destes dados os acasalamentos têm sido direcionados evitando-se o cruzamento entre indivíduos relacionados, a fim de manter um alto nível de diversidade genética nos grupos em cativeiro. No entanto, as estimativas de diversidade baseadas no pedigree estão limitadas uma vez que nem sempre as informações sobre paternidade estão disponíveis. Além disso, é necessário considerar o eventual gargalo genético ocorrido na fundação de grupos de cativeiro e o grau de parentesco entre os indivíduos que formaram o grupo inicial (JONES; GLENN; LACY, 2002)

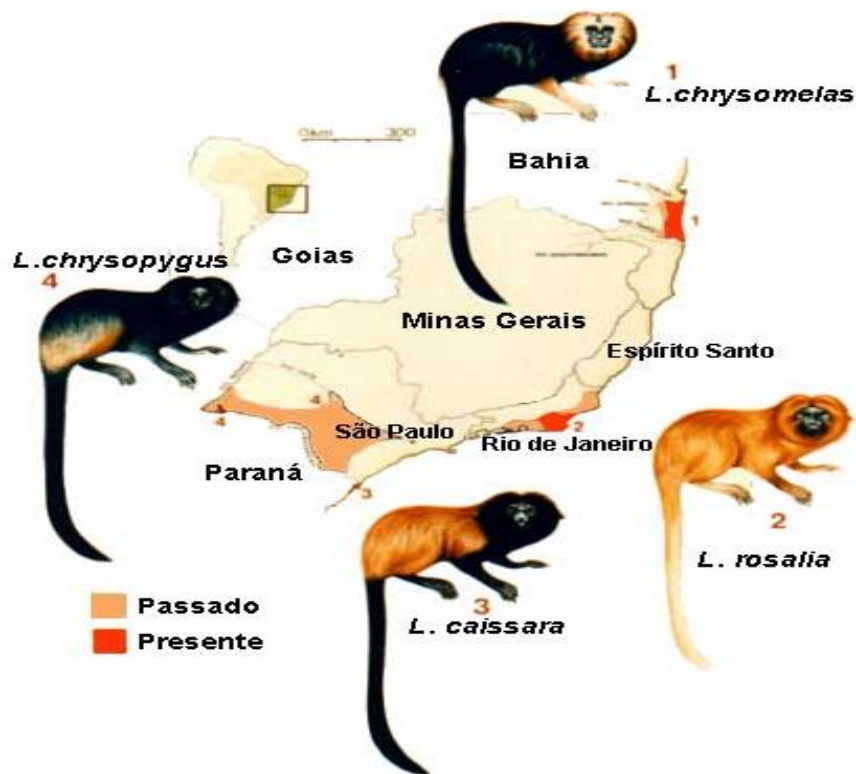
Neste sentido, dada a existência de um possível efeito de gargalo genético na formação inicial dos primeiros grupos em cativeiro, é provável que os animais fundadores de mico-leão-preto possam ser geneticamente relacionados entre si. O gargalo genético pode ter um grande efeito sobre os níveis de diversidade genética e de endogamia em grupos de cativeiro incluindo os de *L. chrysopygus* (FORMAN et al., 1986; VALLADARES-PADUA 1987; PEREZ SWEENEY et al., 2005; CALDANO et al., 2014).

Em 2014, em um encontro nacional organizado pela Fundação Parque Zoológico de São Paulo, foram discutidas questões relevantes sobre o manejo do mico-leão-preto. Este encontro, nomeado- Mico em Prosa-, reuniu pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento com o objetivo de avaliar as estratégias de monitoramento e manejo da espécie *L. chrysopygus*, na natureza e no cativeiro. Dentre as estratégias propostas durante o evento, foi sugerida a introdução de novos animais de vida livre no cativeiro, como alternativa para a renovação do pool gênico dos grupos cativos. Além disso, outra medida interessante apontada foi o intercâmbio de animais entre as instituições do Brasil e do exterior que ainda mantêm animais vivos desta espécie, ação que deixo de ser feita há algumas gerações. No entanto, tais propostas, apesar de viáveis, apresentam alto grau de dificuldade, além de elevados custos. (WITZENBERGER; HOCHKIRCH, 2013)

1.1 Espécie em estudo- *Leontopithecus chrysopygus*

Na Mata Atlântica brasileira habitam quatro espécies endêmicas de micos-leões: o mico leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) distribuído no extremo sul da Bahia e norte de Minas Gerais; o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), que se encontra apenas na região costeira do Rio de Janeiro; o mico-leoa-de-cara-preta (*Leontopithecus caissara*) que habita o litoral norte do estado do Paraná e o litoral sul do estado São Paulo; e o mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*) que habita exclusivamente no oeste do estado de São Paulo e (Guidorizzi, 2008) (Figura 2)

Figura 2- Distribuição original e atual do gênero *Leontopithecus*.



Fonte: Stephen D. Nash/ Conservation International.

O mico-leão-preto (Figura 3) foi descrito pela primeira vez no ano de 1822 na região de Sorocaba- SP. Este é um primata de pequeno porte de hábito diurno (RYLANDS, 1993), que pesa aproximadamente 600 gramas quando adulto apresentando um comprimento total próximo a 32 cm (sem cauda) e cauda com cerca de 35 cm (KLEIMAN D.; MALLISON., 1998; VALLADARES-PADUA, 1993). Esta espécie não apresenta dimorfismo sexual e sua cor é predominantemente preta com uma linha dourada ou avermelhada sobre a metade inferior (distal) do seu corpo. Como característica da espécie e do gênero, a face dos micos-leões-pretos não apresenta pelagem densa, sendo, porém, rodeada por uma juba similar a dos leões.

Figura 3-Mico-leão-preto.



Foto: Paola Andrea Ayala B.

Quanto à sua ecologia o mico-leão-preto tem uma dieta influenciada pela sazonalidade do seu ambiente, utilizando os recursos alimentares dependendo da sua disponibilidade (PASSOS; ALHO, 2001). Eles possuem hábito frugí-insetívoro (DIETZ; PERES; PINDER, 1997), com uma dieta constituída por frutos pequenos, macios, doces e com muita poupa. Frutos grandes podem ocasionalmente serem consumidos, sendo dispersos pelo próprio mico-leão-preto (PASSOS; ALHO, 2001). Assim mesmo são consumidores de pequenos invertebrados e ocasionalmente néctar. É uma espécie que se comporta como um exímio predador de invertebrados e pequenos vertebrados, necessitando de diferentes micro-habitats para forrageio (COIMBRA FILHO, 1981).

Os animais atingem a maturidade aos 18 meses e seu período de gestação é de 125 dias (VALLADARES-PADUA, 1993). Quanto ao sistema de acasalamento, os micos-leões-pretos são considerados monogâmicos (KLEIMAN D.; MALLISON., 1998) e a reprodução ocorre sazonalmente (BAKER; DIETZ; KLEIMAN, 1993) tendo sido observado grupos com muitas fêmeas, uma é a reprodutora. Grupos com dois ou mais machos também têm sido observados, porém, tudo indica que apenas um macho seja o reprodutor (SADDY, 2003).

Em relação à dinâmica de grupos, esta envolve imigrações e emigrações. Aceitação de animais para grupos estabelecidos são raras e geralmente

quando ocorre são realizadas por machos. As fêmeas não costumam realizar imigração, uma vez que herdaram os territórios das mães e subsequentemente a posição de reprodutora dentro do grupo. A substituição do indivíduo dominante em geral costuma ocorrer pela morte ou emigração destes animais (BAKER; BALES; DIETZ, 2008).

1.1.2 Programa de reprodução dos micos-leões em cativeiro

Programas de reprodução em cativeiro têm empenhado esforços para salvar espécies consideradas extintas ou quase extintas na natureza (ex. Bisonte-europeu, condor da Califórnia) e também espécies que não estão sob ameaça, mas que são utilizadas para fins educacionais, recreativos e investigativos (BALLOU, J.D.; KLEIMAN, D.G.; MALLISON, J.J.C.; RYLANDS, A.B.; VALLADARES-PADUA, C.B.; LEUS, 2008). Tais programas fornecem uma quantidade relevante de informações sobre a biologia e o comportamento de uma espécie, possibilitando sua manutenção em cativeiro e servindo como uma apólice de seguro, caso uma eventual extinção ocorra na natureza.

Existem atualmente três programas internacionais envolvendo micos-leões em cativeiro: o Programa do mico-leão-dourado (*L. rosalia*), do mico-leão-da-cara-dourada (*L. chrysomelas*) e do mico-leão-preto (*L. chrysopygus*). Embora os micos-leões possuam uma enorme similaridade taxonômica, biológica e geográfica, cada um desses programas apresenta objetivos e contribuições diferentes devido a particularidades dos grupos estabelecidos em cativeiro e das populações de vida livre.

Em relação ao manejo demográfico e genético do mico-leão-preto, sabe-se que o primeiro grupo em cativeiro desta espécie foi fundado com um número menor de indivíduos quando comparado ao das espécies *L. rosalia* e *L. chrysomelas*. Além do mais, animais cativos de *L. chrysopygus* apresentam dificuldade em se reproduzir, exibindo baixas taxas reprodutivas e sobrevivência dos filhotes.

Em 1991 foi proposto o primeiro plano para o manejo do grupo cativo de mico-leão-preto, que incluía recomendações para reproduções e intercâmbios de animais. Entretanto, após um ano de ação, o Comitê Internacional de Monitoramento e Recuperação, IMRC (*International Recovery and Management Committee*) propôs a introdução de novos indivíduos no cativeiro, devido à baixa diversidade genética e ao

pequeno tamanho amostral do primeiro grupo de cativeiro. Esta estratégia, entretanto, foi pouco viável e como alternativa a esta iniciativa, foi proposta uma nova estratégia, que incluía um programa de manejo de metapopulação, tendo como população núcleo o grupo cativo (FOOSE et al., 1986; SEAL; BALLOU; VALLADARES-PÁDUA, 1990). Desta forma o Instituto de Pesquisas Ecológicas (IPE) e o pesquisador Valladares-Padua iniciaram a translocação de indivíduos entre os fragmentos, com a finalidade de colonizar manchas florestais não habitadas.

Uma nova proposta foi apresentada no ano de 1998, sugerindo-se a introdução de 150 a 200 animais em poucos zoológicos, para manutenção de 95% da diversidade genética da população natural. Entretanto, haveria ainda a necessidade de introdução contínua de novos animais. Alternativamente, sugeriu-se também a introdução de 14 fundadores da natureza, com introduções periódicas posteriores de 3 a 4 fundadores por geração. Entretanto ambas as propostas se mostraram inviáveis (VALLADARES-PADUA, C.B.; BALLOU J.D.; MARTINS SADDY C., 2002).

Um estudo realizado no ano 2003 (o qual fazia parte do plano de manejo de metapopulação), teve como objetivo realizar três tipos diferentes de movimentação de animais entre subpopulações e avaliá-los através de parâmetros ecológicos e comportamentais. O primeiro tipo de movimentação foi a transferência de um grupo selvagem de animais capturados da Fazenda Rio Claro para a Fazenda Mosquito. Na fazenda Mosquito existia um outro grupo que foi translocado desde a Fazenda Rio claro no ano de 1995. O segundo tipo de movimentação foi a translocação de um grupo misto (grupos formados entre animais de vida livre y animais nascidos em cativeiro). O terceiro tipo de movimentação foi a captura de dois machos de vida livre e a soltura em um território diferente do original, mas dentro da mesma população selvagem. O estudo concluiu que o primeiro tipo de manejo foi o tipo de movimentação mais bem-sucedida tendo em conta as alterações no comportamento e ecologia quando comparados com os padrões observados a grupos selvagens. No entanto a intenção foi unicamente aprender e verificar qual dos três tipos de movimentação era o mais viável para o programa de manejo de metapopulação (SADDY, 2003).

Embora o programa de manejo de metapopulação do mico-leão-preto tenha sido proposto, atualmente, os grupos de cativeiro apresentam uma série de problemas relacionados à reprodução, devido ao baixo número de casais reprodutores

e idade avançada dos mesmos e as altas taxas de mortalidade dos filhotes. Neste contexto, o maior desafio para o adequado monitoramento dos grupos cativos é garantir a sua expansão demográfica e genética através da introdução de novos fundadores e da translocação de indivíduos entre recintos. Sabe-se, no entanto, que tais medidas são de difícil exequibilidade.

1.2 Análise do pedigree e terminologia

Os programas de reprodução em cativeiro geralmente são baseados nos registros genealógicos ou *Studbooks* pois estes livros mantêm informações detalhadas sobre os indivíduos que são mantidos em cativeiro. Estes registros são baseados na população fundadora original que foi estabelecida quando o programa de reprodução em cativeiro foi estabelecido. É assumido que os indivíduos fundadores não tem nenhum vínculo familiar (LACY et al., 1995) e é através das análises de pedigree que são estimados parâmetros genéticos na população atual com a finalidade de determinar as mudanças ou perdas de variabilidade genética em relação a população inicial (RALLS; BALLOU, 2004)

Existem várias abordagens que utilizam uma variedade de modelos para fazer análise de pedigree. Um deles é conhecido como modelo de simulação Gene-drop. Outra abordagem usa uma matriz aditiva de parentesco entre todos os indivíduos (RALLS; BALLOU, 2004) para determinar os valores de parentesco e endogamia.

O modelo de simulação Gene-drop analisa que cada fundador aporta dois alelos originais que são “dropped” através da genealogia assumindo herança mendeliana, de modo que cada descendente recebe um alelo selecionado aleatoriamente a partir de sua mãe e um alelo selecionado aleatoriamente a partir do seu pai. Milhares de iterações são realizadas para simular amostragem ao longo do genoma do indivíduo. Este modelo assume nenhuma ligação, e nenhuma seleção (HAIG; BALLOU, 2002). Através dessa abordagem é possível por exemplo, estimar diversidade genética (GD) genomas fundadores equivalentes (Fg) dos grupos em cativeiro. GD é calculada contando as frequências alélicas dos alelos fundadores remanescentes na população existente. Fundadores equivalentes referem-se ao número de fundadores igualmente representados que produziriam o mesmo nível de

diversidade genética como a observada na população atual assumindo que não há perda de alelos (LACY; BALLOU, 2001).

Por outro lado a média de parentesco (MK) é derivada da média de parentesco entre cada indivíduo na população e todos os outros indivíduos da população (LACY et al., 1995). Esta é uma ferramenta útil para a identificação de indivíduos geneticamente importantes com o objetivo de minimizar parentesco médios da população e assim para maximizar a retenção de diversidade genética fundadora (MILLER, 1995).

Um as descrições mais detalhadas das estimativas comumente usadas nas análises de pedigree são descritas a seguir:

Equivalentes fundadores: é o número de fundadores que contribuem igualmente e que seriam esperados para produzir o mesmo nível de diversidade genética da população atual (LACY, 1989)

Genomas fundadores equivalentes: Um conceito útil relacionado com heterozigiosidade retida. É uma medida relativa que, ao contrário do número de equivalentes fundadores, leva em conta a deriva genética. É o número de fundadores que contribui igualmente sem perda aleatória de alelos na descendência que seriam esperados para produzir o mesmo nível de diversidade genética da população atual (LACY, 1989).

Alelos fundadores sobreviventes: faz referência a proporção de genoma de um fundador que sobrevive até a população existente (" retenção alelo ", ou r) também é calculada utilizando modelos gene-drop (LACY, 1989; THOMPSON, 1986). Existem apenas três possibilidades para um fundador em qualquer simulação: nenhum dos alelos presentes = 0%, apenas um presente = 50%, ambos presentes = 100%; estes são calculados sobre todas as simulações (LACY, 1989; THOMPSON, 1986).

Parentesco Médio: parentesco médio é usado para identificar indivíduos geneticamente importantes. Parentesco (MK) é calculada para cada animal vivo na população como a média do parentesco entre esse indivíduo e todos os indivíduos da população, incluindo a própria média (LACY et al., 1995). Indivíduos com baixo parentesco médio são menos estreitamente relacionadas entre eles do que aqueles com altos valores de parentesco médio.

Ballou e Lacy (1995) mostraram que estratégias de melhoramento que preferencialmente selecionam animais com baixos parentescos médios são os melhores em reter heterozigidade esperada na população, uma vez que o parentesco médio está diretamente relacionado à heterozigidade esperada. Assim, minimizando parentesco médio da população é maximizada a heterozigidade. A maioria, se não todos, os programas de reprodução em cativeiro usam esta estimativa quando o objetivo é selecionar animais para reprodução (BALLOU; FOOSE, 1996).

1.3 Diversidade genética e conservação *ex situ*

Diversidade genética é definida como sendo toda a variação biológica hereditária gerada principalmente por mutações nas sequências de nucleotídeos durante a replicação do DNA e acumulada durante o processo evolutivo. A quantidade e o tipo de diversidade genética em uma população dependem de fatores como seleção, endogamia, deriva genética, fluxo gênico e mutação, os quais podem contribuir para o aumento e/ou diminuição da diversidade (FREEMAN; HERRON, 2007).

Podemos mensurar a variação genética de diferentes formas, incluindo as estimativas de diversidade de alelos (ou riqueza alélica) e heterozigidade individual ou populacional (BALLOU; FOOSE, 1996). Diversidade alélica consiste no número de alelos de um determinado locus. Já a heterozigidade refere-se à percentagem de locos numa população ou indivíduo que apresentam alelos diferentes (BALLOU; FOOSE, 1996). Em populações que apresentam tamanho populacional reduzido (como é o caso dos grupos em cativeiro) os efeitos de deriva e endogamia tornam-se mais acentuados, favorecendo a perda da diversidade alélica e a diminuição dos níveis de heterozigidade, o que diminui seu potencial de adaptação (FERNANDES, 2008).

É amplamente conhecido que a reprodução *ex situ* através de acasalamentos dirigidos em indivíduos em cativeiro é uma ferramenta extremamente útil para a conservação de uma espécie (BOWKETT, 2009; RUSSELLO; AMATO, 2007). A principal meta de um programa de conservação *ex situ* consiste em buscar estabelecer uma “população” autossustentável que seja capaz de minimizar a endogamia e a perda de diversidade genética no cativeiro, mantendo assim o seu

potencial adaptativo (FRANKHAM, 2008; FRANKHAM, R., HEMMER, H., RYDER, O.A., CONTHAN, SOULÉ, M.E., MURRAY, N.D., SNYDER, 1986). Esta ideia se baseia no princípio de que se os grupos de cativeiro mantem um pool gênico representativos da espécie, estes animais poderão ser utilizados futuramente em programas de reintrodução ao habitat natural, uma vez que alelos das populações de vida livre foram preservados (ROBERT; COUVET; SARRAZIN, 2007).

Entretanto, a reprodução e manutenção de animais em cativeiro pode comprometer a capacidade destes indivíduos para se reproduzir e sobreviver na natureza (FRANKHAM, 2008), uma vez que a depressão endogâmica e acumulação de mutações associadas à adaptação em cativeiro, promovem uma rápida modificação da estrutura genética nos grupos em cativeiro, os quais, em geral, apresentam reduzido tamanho populacional (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002).

O número de indivíduos reproduzindo em cativeiro propicia o aumento na taxa de endocruzamento, o que pode conduzir à exposição de alelos deletérios em homozigose, e ocasionar a depressão endogâmica, promovendo diminuição na variação genética e no potencial adaptativo dos indivíduos, o que aumenta a o seu risco de extinção (HEDRICK, 2001).

A adaptação genética ao cativeiro se dá devido a diferenças ocorridas no processo de seleção natural, pois como os ambientes de cativeiro diferem dos habitats naturais, variantes genéticas favorecidas em cativeiro, não necessariamente consistirão naquelas selecionadas positivamente em ambientes naturais (FRANKHAM, 2008). Segundo Darwin (1868), a seleção natural é inevitável quando, por exemplo, é voltada para a docilidade e outras características adaptativas relacionadas à domesticação. Frankham (2008), afirma que as adaptações genéticas relacionadas ao aumento no sucesso reprodutivo tendem a ser deletérias quando os indivíduos são reintroduzidos no habitat natural. Neste sentido, é claro que a adaptação genética ao cativeiro deve ser minimizada para grupos que provavelmente serão reintroduzidos.

A heterozigosidade individual definida como a heterozigosidade média entre os indivíduos que pode ser mensurada através de marcadores genéticos, é outro conceito importante, uma vez que teoricamente está correlacionado com os principais componentes de aptidão individual, tais como a sobrevivência (COULSON

et al., 1998), fecundidade (AMOS et al., 2001), resistência a doenças (COLTMAN et al., 1999), sucesso reprodutivo (SLATE et al., 2000) e características envolvidas com seleção de parceiros e com sucesso de paternidade extra-par (FOERSTER et al., 2003).

Várias estimativas de heterozigosidade individuais têm sido propostas, sendo que a mais usada é a proporção de locos heterozigotos em um indivíduo (PHt) (AMOS et al., 2001). No entanto, outras formas de calcular este tipo de heterozigosidade têm sido sugeridas. Uma delas é a heterozigosidade padronizada (Hs) que se baseia na média da heterozigosidade observada (Hs_obs) ou esperada (Hs_exp) (COLTMAN et al., 1999). Apesar da padronização não considerar se os indivíduos incluídos na amostra foram ou não genotipados para o mesmo loci, ela assume uma relação linear entre a heterozigosidade em um determinado loco e o seu número de alelos, atribuindo mesmo peso a todos os locos, independentemente de suas frequências alélicas. As estimativas de Hs_obs são altamente conservadoras e nos casos da existência de alelos nulos ou alelos *dropout* sua estimativa é mais indicada que a de Hs_exp (AMOS et al., 2001)

Outra forma de calcular a heterozigosidade individual é estimar o grau de relacionamento interno (IR) (AMOS et al., 2001). Este estimador leva em conta o número total de locos, o número de locos homozigotos, e a frequência dos alelos que contém determinado genótipo. Esta estimativa também é altamente conservadora. No entanto, a sua distribuição é assimétrica: tomando valores máximos e mínimos. O valor máximo (1) é obtido quando todos os locos são homozigotos, independentemente das frequências alélicas. O valor mínimo (-1) pode ser obtido apenas quando todos os locos apresentam somente dois alelos e o indivíduo é heterozigoto para todos os casos (APARICIO; ORTEGO; CORDERO, 2006)

Por último a homozigosidade por locos (HL) é um estimador desenvolvido com a finalidade de resolver alguns problemas do IR. Para levar em conta o fato de que alguns locos são mais informativos do que outros, HL considera a contribuição de cada loco, em vez da contribuição de cada alelo. O peso dado a cada loco depende da sua variabilidade: aos locos mais informativos são dados pesos maiores (APARICIO; ORTEGO; CORDERO, 2006).

1.3.1 O uso de marcadores moleculares para medição da variação genética

O desenvolvimento de diferentes metodologias da Genética Molecular tem possibilitado o acesso a informações genéticas importantes, como de variação genética, a diversidade e riqueza alélica, diversidade intra- e interpopulacional, fluxo gênico, grau de parentesco, etc. O uso de marcadores moleculares em conjunto com a teoria evolutiva pode fornecer informações sobre a história evolutiva, demografia, ecologia, e também o comportamento das espécies, auxiliando o manejo de espécies através da avaliação de riscos e priorização de estratégias, delimitação de unidades evolutivas e implementação de unidades de conservação efetivas (GODOY, 2009).

Desta forma, o uso de marcadores moleculares tem auxiliado o estudo de populações de vida livre e de cativeiro, as quais se encontram ameaçadas ou não (GLAUBITZ; RHODES; DEWOODY, 2003). Na natureza, o conhecimento do relacionamento genético entre os animais pode ser útil em estudos de seleção de parentesco, comportamento e organização social, dispersão, isolamento por distância, e estimativas de herdabilidade. Em populações em cativeiro, o conhecimento das relações e ancestralidade compartilhada permite a minimização da consanguinidade, direcionando cruzamentos prioritários entre indivíduos geneticamente menos relacionados (BÖMCKE; GENGLER, 2009).

Dentre as principais técnicas desenvolvidas para acessar a variabilidade genética, estão o estudo de aloenzimas, DNA mitocondrial, locos do complexo principal de histocompatibilidade e de repetições em tandem de número variável (VNTR, *Variable Number Tandem Repeats*). As VNTRs representam locos individuais onde alelos são compostos por repetições em tandem que variam no número de unidade do cerne (NAKAMURA et al., 1987), por este motivo, elas exibem uma enorme variabilidade. Quando os blocos de DNA repetitivo são compostos por 10 a 64 pares de bases, cujo tamanho total varia de 0,1 a 7,0 Kb, estas sequencias são denominadas minissatélites (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985) e aquelas que exibem de 1 a 5 pares de bases em sua unidade repetitiva ou motivo (motif), são denominadas microssatélites (PARKER et al., 1998; SUNNUCKS, 2000).

1.3.2. Microssatélites e seu uso na conservação

Também conhecidos como marcadores hipervariáveis, STRs (*Short Tandem Repeats*), ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*), os microssatélites são sequências repetitivas em tandem compostas por unidades de 1-6 bp repetidas lado a lado (DALTOÉ, 2006; TORRES, 2010). O número de unidades repetidas é altamente variável entre microssatélites localizados no mesmo loco e em locos diferentes, tornando-os altamente polimórficos (TORRES, 2010). Este tipo de marcador apresenta maior conteúdo de informação, sendo muito utilizado para avaliar a diversidade genética intra e interespecífica.

O uso de microssatélites tem sido aplicado em estudos de hibridação, história demográfica, detecção de gargalos e endogamia, servindo para abordagens que visem a avaliação do comportamento reprodutivo, estrutura social, dispersão e estrutura genética de uma espécie. Eles são considerados marcadores ideais para análise da variabilidade genética e determinação de paternidade entre indivíduos de ascendência desconhecida, ou seja, com ausência de informação no pedigree, uma vez que permitem uma estimativa conservadora da relação entre indivíduos, sendo úteis para delineamento de acasalamentos que visem, por exemplo, maximizar a variabilidade genética e minimizar a endogamia. Além disso, há a possibilidade de amplificação cruzada, ou seja, utilização de locos entre espécies relacionadas. Por esses motivos, os microssatélites oferecem inúmeras vantagens para o estudo de espécies ameaçadas em abordagens conservacionistas (BEAUMONT M.A. E BRUFORD M.W., 1999; FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002; RUSSELLO; AMATO, 2004).

1.4 Determinação de paternidade por meio de marcadores microssatélites

Os marcadores de microssatélites tem possibilitado a identificação das relações entre os genótipos progenitor-progênie com o fim de confirmar paternidade (MELLO, 2004). Os testes de paternidade baseados em microssatélites são realizados através da comparação do perfil genético dos animais independentemente da idade ou condições fisiológicas, ou seja, em qualquer momento é possível verificar a identidade de um animal, pela obtenção do perfil genético de uma nova amostra e comparação com um perfil obtido anteriormente (ALVES SILVA, 2012).

A efetividade do teste de paternidade pode ser medida em termos de probabilidade de exclusão. O poder de exclusão indica a capacidade de um sistema de teste excluir uma paternidade ou maternidade falsamente atribuída, ou seja, é a probabilidade de se ter uma exclusão precisa de parentesco, quando um indivíduo e seus pais são analisados (BIERMAN, 2010). A efetividade dos testes de paternidade não depende apenas do número de marcadores genéticos utilizados, mas também do poder informativo de cada marcador tende a aumentar de acordo como o número de fenótipos distintos que poder ter uma determinada probabilidade e que podem depender de algumas características como, por exemplo, o número de locos, o número de alelos em cada loco e a frequências destes alelos em cada loco (ALVES SILVA, 2012).

Apesar disso, os diferentes métodos desenvolvidos para a análise de paternidade apresentam dificuldades, quando se desconhece ambos os pais ou quando falta algum indivíduo da prole; quando há indivíduos relacionados ao trio prole-pai-mãe na lista de candidatos a progenitores, desconsiderando o verdadeiro pai ou mãe. Estes fatores, somados ao pouco conhecimento sobre o comportamento da espécie em estudo, reduzem a confiabilidade do teste.

Devido à falta de informações necessárias para o cálculo de paternidade e parentesco, outras metodologias têm sido propostas. Entre estas está o cálculo das probabilidades categórica e fracional, a reconstrução genotípica e a técnica de exclusão (FIUMERA; DEWOODY, 2002; GARCIA et al., 2002; JAMIESON; C S TAYLOR, 1997; JONES; ARDREN, 2003; NEFF; REPKA; GROSS, 2000).

No método de exclusão, o compartilhamento de alelos entre a progênie e o suposto pai estabelece a inclusão de paternidade, já o macho que possui o genótipo incompatível como a progênie em questão é rejeitado como possível pai. Embora este método seja muito usado, ele não leva em conta os possíveis erros de genotipagem, assim como também não admite que haja loci não genotipados (MARSHALL, T C, SLLATE, J, KRUIK, L.B.E, PAMBERTON, 1998).

O método de probabilidade categórica para teste de paternidade atribui fracionalmente a paternidade a todos os indivíduos não excluídos da análise como base na probabilidade relativa de paternidade. Já probabilidade fracional utiliza todos os dados avaliados, e por isso se torna superior a probabilidade categórica

(MARSHALL, T C, SLLATE, J, KRUIK, L.B.E, PAMBERTON, 1998; SMOUSE; MEAGHER, 1994)

1.4.1 Inferências Estatísticas para Cálculo de Paternidade

Devido ao fato do método de exclusão apresentar algumas dificuldades para sua implementação, métodos estatísticos que se baseiam na ausência de uma exclusão, podem ser alternativamente utilizados para inferências de paternidade. A base para o cálculo da probabilidade de paternidade é dada pela fórmula:

$$PP = \frac{1}{(1 - PE)}$$

Em que PE é a probabilidade de exclusão.

Para pares específicos de mãe-filho, o alelo paterno obrigatório pode ser frequente ou raro. Neste caso, a ausência de exclusão quando o alelo for raro será mais significativa que quando o alelo for frequente. Esta estimativa pode ser calculada pela razão de verossimilhança da paternidade e da não paternidade, conhecido como Índice de Paternidade (IP).

1.4.2 Índice de paternidade

O índice de paternidade (IP) é definido como a razão de verossimilhança de duas hipóteses mutuamente excludentes. A primeira hipótese H(X) assume que o compartilhamento de alelos entre as partes envolvidas resulta num vínculo genético, enquanto que a segunda hipótese H(Y) assume que o compartilhamento de alelos entre as partes envolvidas é resultado de eventos aleatórios (RODRIGUES; GARRIDO; SANTOS, 2013).

A fórmula para o cálculo do IP é representada por:

$$IP = X/Y$$

Em que X é a probabilidade de transmissão do alelo materno (m) multiplicado pela probabilidade de transmissão do alelo obrigatório paterno (p) e Y é a probabilidade de transmissão do alelo materno (m) multiplicado pelo frequência do alelo paterno na população da mesma origem (f).

Assim, temos $P = m \times p/m \times f$

As probabilidades de transmissão dos alelos m e p podem ter valor de 0.5 quando a mãe ou pai são heterozigotos e de 1 quando são homozigotos. O IP é calculado para cada loco analisado e o produto dos resultados obtidos a partir dos IPs é conhecido como Índice de Paternidade Combinado (IPC), representado pela fórmula:

$$IPC = IP1 \times IP2 \times IP3 \times IPn$$

A partir do valor do IPC é possível calcular a probabilidade de paternidade (W) mediante o teorema de Bayes (RODRIGUES; GARRIDO; SANTOS, 2013), tendo como base uma probabilidade a priori ($PP=0,5$) como descrito a seguir:

$$W = \frac{(PP) \times (IPC)}{\{[(PP) \times (IPC)] + 1\}}$$

A probabilidade a *priori* é usada para garantir imparcialidade no cálculo. Ela geralmente é tomada por 0,5 devido ao fato de haver uma probabilidade de 50% do pai testado ser realmente o pai biológico do indivíduo em questão. Existem três categorias de resultados possíveis: provável pai, quando as probabilidades estão de 90-94,9%; forte indicio de paternidade entre 95-99% e paternidade praticamente certa acima de 99%.

1.4.3 Calculo de paternidade mediante razão de verossimilhança

No ano de 1986, Meagher em seu trabalho com dados de aloenzimas na espécie *Chamaelirium luteum* desenvolveu uma nova metodologia aplicando a razão da verossimilhança para inferência de paternidade. Ele introduziu o termo *LOD score*, o qual é definido como a razão de verossimilhança de um painel de locos avaliados conjuntamente ao qual é aplicado o logaritmo natural. Este valor LOD pode ser positivo, negativo ou assumir um valor igual a zero. Uma pontuação LOD negativa significa que o pai candidato tem menos probabilidade de ser o verdadeiro pai do que o verdadeiro pai. Uma pontuação igual à zero significa que o pai candidato tem a mesma probabilidade tanto de ser o pai como de não ser o pai verdadeiro. Por fim, uma pontuação LOD positiva significa que o pai candidato é mais provável de ser o

pai verdadeiro, do que qualquer outro indivíduo tomado ao acaso na população (MARSHALL, T C, SLLATE, J, KRUIK, L.B.E, PAMBERTON, 1998).

Toda esta abordagem considera os dados genotípicos do trio mãe-progênie-pai candidato (g_m , g_p e g_c), assim como também duas hipóteses mutuamente excludentes, a hipótese nula H_1 , em que o pai candidato é o verdadeiro pai, e a hipótese alternativa H_2 , em que o pai candidato é um indivíduo ao acaso. Quando o genótipo da mãe é conhecido, a razão de verossimilhança é dada pela seguinte fórmula (MEAGHER, 1986):

$$L(H_1, H_2 | g_m, g_p, g_c) = \frac{T(g_p | g_m, g_c)}{T(g_p | g_m)}$$

Em que $T(g_p | g_m, g_c)$ é a probabilidade do genótipo da progênie, dado o genótipo da mãe e do pai candidato, na segregação Mendeliana.

Quando o genótipo da mãe é desconhecido, a razão de verossimilhança é dada pela seguinte fórmula:

$$L(H_1, H_2 | g_p, g_c) = \frac{T(g_p, g_c)}{P(g_p)}$$

Em que $P(g_p)$ é a frequência do genótipo da progênie.

O método acima descrito foi incluído no programa CERVUS para inferência e confirmação de paternidade. Marshall e colaboradores desenvolveram um teste Δ que é calculado a partir da diferença entre as pontuações LOD dos dois pais mais prováveis, tendo em conta uma distribuição Δ através de uma simulação (MARSHALL, T C, SLLATE, J, KRUIK, L.B.E, PAMBERTON, 1998)

$$\Delta = LOD_1 - LOD_2, \text{ se } n \geq 2$$

LOD_1 se $n = 1$ e zero se $n = 0$, em que n é o número de machos candidatos com pontuações LOD maiores que zero.

Outro parâmetro que pode ser calculado é o nível de confiança que é definido como a tolerância para atribuir um falso positivo. Cervus mostra dois níveis de confiança: *relaxed* (80% de certeza) e *strict* (95% de certeza). Nesta abordagem, uma simulação previa é feita antes de se iniciar a análise de parentesco. Esta simulação feita avalia a viabilidade da análise de parentesco e calcula os valores críticos da razão de verossimilhança usando o conjunto de locos utilizados. Para esta simulação, são necessários dados relativos ao número de machos candidatos, à

proporção de machos candidatos amostrados, à proporção de locos genotipados e a taxa de erro.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Segundo a lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) e o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o mico-leão-preto é uma espécie classificada como “ameaçada” no Brasil. Neste sentido, nos últimos anos, a reprodução desta espécie em cativeiro se tornou necessária com o fim de assegurar a sua não extinção. Segundo Frankham et al., (2002), um programa de conservação *ex situ* deve visar estabelecer uma população autossustentável capaz de minimizar a perda de diversidade genética, a endogamia e a adaptação ao cativeiro. Neste sentido, muito esforço tem sido empenhado no manejo em cativeiro, no que se refere ao acasalamento entre indivíduos geneticamente menos relacionados e em igualar as linhagens fundadoras ou seja em manter a contribuição genética dos indivíduos que fundaram o grupo em cativeiro. Contudo, a obtenção de dados relativos a estimativas de diversidade genética com base na análise dos *Studbooks* é limitada, uma vez que as informações sobre os pedigrees em geral costumam a ser incompletas ou inexistentes (LUTAAYA et al., 1999). Este fato gera incertezas sobre o grau de parentesco entre os animais que se acasalam, podendo excluir da reprodução animais potencialmente interessantes (com alelos/genótipos exclusivos, raros ou diversos) (OGDEN et al., 2007) induzindo suposições errôneas sobre a ancestralidade dos mesmos, fazendo com que animais mais aparentados reproduzam entre si, o que pode aumentar os níveis de endogamia e ocasionar a perda de diversidade genética (LACY;BALLOU 1995).

Neste sentido, a abordagem integrada da análise dos dados do *Studbooks* e de dados moleculares das espécies de cativeiro pode contribuir para melhor compreensão das informações de pedigree e da distribuição da variação genética dentro do cativeiro. Sendo assim, a caracterização da estrutura genética dos grupos cativos de mico-leão-preto torna-se um importante instrumento, para orientar o manejo adequado desta espécie em cativeiro, e, assegurar futuramente estratégias de manejo de populações silvestres.

Dentro deste contexto,

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética dos grupos cativos de mico-leão-preto residentes em diferentes zoológicos brasileiros e verificar a paternidade destes animais através do uso de marcadores moleculares de microssatélites.

Dentre os objetivos específicos estabelecidos estavam:

- 2.1. Analisar os dados disponíveis no *Studbook* da espécie;
- 2.2. Validar um conjunto de locos microssatélites capazes de estimar os níveis de diversidade genética a partir dos genótipos estabelecidos para os animais;
- 2.3. Determinar os níveis de divergência genética entre os grupos avaliados e comparar estes dados com uma população silvestre;
- 2.4. Utilizar os dados de microssatélites para verificação de paternidade mediante a utilização do método de verossimilhança;
- 2.5. Estimar a probabilidade de paternidade (W) para os indivíduos que não tiveram esta informação esclarecida pelo método de verossimilhança;
- 2.6. Gerar informações úteis para serem incorporadas aos dados atualmente disponíveis no *Studbook* da espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. *Studbook* e análise de pedigree

Os dados necessários para o manejo dos grupos em cativeiro são compilados no *International Studbook for the Black Lion Tamarin* atualmente mantido por Dominic Wormell chefe do departamento de mamíferos do *Durrell Wildlife Conservation Trust* na Inglaterra. Foi analisada a versão de 2012 do *Studbook* que registra 492 micos-leões-pretos em cativeiro desde a fundação. Em geral os indivíduos são nomeados pelo seu número de *Studbook*, entretanto em alguns casos foram nomeados pela sigla BLT mas um número, para facilitar as análises.

Neste sentido o programa Pedigree Viewer (KINGHORN, 1994), versão 6.5.2.0, foi utilizado para construção do pedigree completo dos grupos cativos desde sua fundação, e estabelecimento dos coeficientes de endogamia de heredograma (F), baseados nas informações disponíveis no *Studbook*. Nesta análise foi calculada a probabilidade de que os alelos herdados de cada um dos pais sejam idênticos por descendência (IBD). O programa PedScope V 2.4.01xs (*Advanced Pedigree Analysis & Population Conservation Management*) foi usado para calcular a diversidade genética (GD), genomas fundadores equivalentes (fg), equivalentes fundadores (fe), ancestrais efetivos (fa) e parentesco médio (MK). Assim mesmo foram calculados alguns parâmetros demográficos da população em cativeiro desde a fundação.

Para avaliar o efeito no aumento nos níveis de endogamia, foi feita uma relação entre o coeficiente de endogamia e a percentagem de indivíduos que sobreviveram até a idade reprodutiva (18 meses de vida). Esta análise de regressão foi realizada utilizando o Excel 2010 para Windows 7, e o PAST (PAleontological STatistics) (OYVIND, [s.d.]), versão 2.16.

3.2 Amostragem e Extração de DNA

Foram coletadas amostras de pelo e sangue de trinta e sete indivíduos (representando 80% dos animais vivos mantidos em cativeiro no Brasil, registrados no *Studbook* até a atualização mais recente), sendo 17 pertencentes à Fundação Parque zoológico de São Paulo (FPZSP), 17 ao Centro de Primatologia do Rio de

Janeiro (CPRJ) e 4 do Parque Ecológico de São Carlos (PESC) (Tabela 1). Além destas, 14 amostras pertencentes a espécimes em óbito do *Durrell Wildlife Conservation Trus* (DWCT) na Inglaterra e dois do Zoológico *La Palmyre* na França, também foram coletadas. Embora esses indivíduos não sejam mais representativos para o programa de reprodução, são geneticamente relacionados com os animais que ainda estão vivos e representam a colônia cativa europeia. Além disso foram analisadas amostras de 10 animais de vida livre os quais representam dois grupos que habitam na Floresta Nacional de Capão Bonito-SP. Esses indivíduos foram estudados em um trabalho anteriormente desenvolvido no Laboratório de biodiversidade molecular e conservação (CALDANO, 2014).

Tabela 1-Identificação dos 37 indivíduos que fazem parte da colônia cativa do Mico-Leão-Preto no Brasil.

Identificação <i>Studbook</i>	Identificação Zoológico	Identificação Trabalho	Sexo	Zoológico
391	27097	BLT1	Macho	PESC
500	-	BLT3	Macho	PESC
386	2037	BLT4	Macho	PESC
399	2078	BLT5	Fêmea	PESC
385	29697	BLT6	Macho	FPZSP
421	29348	BLT7	Fêmea	FPZSP
458	29653	BLT8	Fêmea	FPZSP
457	29652	BLT9	Macho	FPZSP
392	27098	BLT10	Macho	FPZSP
263	28548	BLT11	Macho	FPZSP
464	30154	BLT12	Macho	FPZSP
432	29450	BLT13	Fêmea	FPZSP
469	30497	BLT14	Macho	FPZSP
470	30498	BLT15	Macho	FPZSP
412	29791	BLT16	Macho	FPZSP
467	30168	BLT17	Fêmea	FPZSP
473	30596	BLT18	Macho	FPZSP
430	29597	BLT19	Fêmea	FPZSP

471	30518	BLT20	Macho	FPZSP
472	30595	BLT21	Macho	FPZSP
312	1821	BLT22	Macho	CPRJ
408	2109	BLT23	Fêmea	CPRJ
486	2571	BLT24	Macho	CPRJ
487	2572	BLT25	Macho	CPRJ
427	2288	BLT26	Macho	CPRJ
366	1995	BLT27	Fêmea	CPRJ
384	2034	BLT28	Macho	CPRJ
436	2356	BLT29	Fêmea	CPRJ
387	2038	BLT30	Macho	CPRJ
400	2079	BLT31	Fêmea	CPRJ
488	2574	BLT32	Macho	CPRJ
437	2383	BLT33	Macho	CPRJ
481	2464	BLT34	Fêmea	CPRJ
431	2311	BLT35	Macho	CPRJ
424	2232	BLT36	Macho	CPRJ
425	2266	BLT37	Macho	CPRJ
428	2289	BLT38	Macho	CPRJ
195	M1829	BLT39	Macho	DWCT
295	M2309	BLT40	Macho	DWCT
306	M2381	BLT41	Fêmea	DWCT
371	M2459	BLT42	Macho	DWCT
409	M2802	BLT43	Macho	DWCT
220	M1935	BLT44	Fêmea	DWCT
468	M1671	BLT45	Fêmea	DWCT
320	M2435	BLT46	Macho	DWCT
327	M2436	BLT47	Macho	DWCT
420	M2846	BLT48	Macho	<i>La Palmyre</i>
261	M2146	BLT49	Fêmea	<i>La Palmyre</i>
256	M2107	BLT50	Macho	DWCT
302	M2982	BLT51	Fêmea	DWCT

189	M2039	BLT52	Macho	DWCT
110	M1601	BLT53	Fêmea	DWCT
125	M1597	BLT54	Fêmea	DWCT

A coleta de sangue foi realizada com seringas para sucção de aproximadamente 0,2 centímetros cúbicos de sangue (200 μ L) por indivíduo. Uma vez coletado o sangue, este foi vertido para tubos *vacutainer* contendo anticoagulante EDTA. Os tubos foram acondicionados a -20°C. Em relação às amostras de pelo, este foi arrancado do dorso de cada indivíduo e acondicionado em envelopes plásticos. Os folículos ou bulbos presentes na base do pelo, os quais contém células vivas com material genético, foram utilizados para extração de DNA.

Todas as amostras foram mantidas no banco de tecidos do laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação da Universidade Federal de São Carlos. A extração de DNA das amostras de pelos e de sangue foi feita usando o protocolo de Sambrook et al., 1989.

Alíquotas de sangue e/ou bulbos de pelo foram inicialmente homogeneizadas com 300 μ L de uma solução de digestão contendo 25 μ L de SDS 10%, 5 μ L de RNase 0,1 mg/mL, 100 μ L de EDTA 0,1M, 2,5 μ L de Tris-HCl 0.01 M e 322,5 μ L de água MilliQ. As amostras foram incubadas por aproximadamente 2 hora a 55° C. Subsequentemente foram adicionados 5 μ L de Proteinase K 0,1mg/mL e as amostras foram incubadas 24 horas por 56° C (para as amostras de pelo foram adicionados 30 μ L de Proteinase K 0,1mg/mL). Em seguida foi adicionado o mesmo volume de fenol clorofórmico/álcool isoamílico (aproximadamente 400 μ L), agitando-se os tubos vagarosamente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos em micro-centrífuga e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Após essa etapa foi acrescentado NaCl 5M para uma concentração final da solução de 1M. Posteriormente, foram adicionados 500 μ L de álcool 10% gelado e as amostras foram agitadas delicadamente para a precipitação do DNA. Uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos foi feita o sobrenadante foi descartado. Uma vez realizado o procedimento anterior foram acrescentados 300 μ L de álcool 70% gelado e as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos em estufa a 37°C por 1 h. Após a secagem do material, o *pellet* obtido foi diluído em 50 μ L de TE.

A quantificação das amostras foi feita em biofotômetro (*BioPhotometer*, Eppendorf®) e alíquotas de DNA com a concentração de 50ng/μl foram preparadas. Tanto as soluções de extração quanto as alíquotas foram armazenadas a – 20° C.

3.3 Amplificação dos locos de microssatélites e genotipagem

Para caracterizar geneticamente os grupos de estudo foram utilizados 10 *primers* homólogos isolados especificamente para *Leontopithecus chrysopygus* (PEREZ-SWEENEY et al., 2005), nove *primers* heterólogos descritos para *Leontopithecus chrysomelas* (GALBUSERA; GILLEMOT, 2007) e cinco *primers* heterólogos descritos para *Leontopithecus rosalia* (GRATIVOL; BALLOU; FLEISCHER, 2001) (Tabela 2).

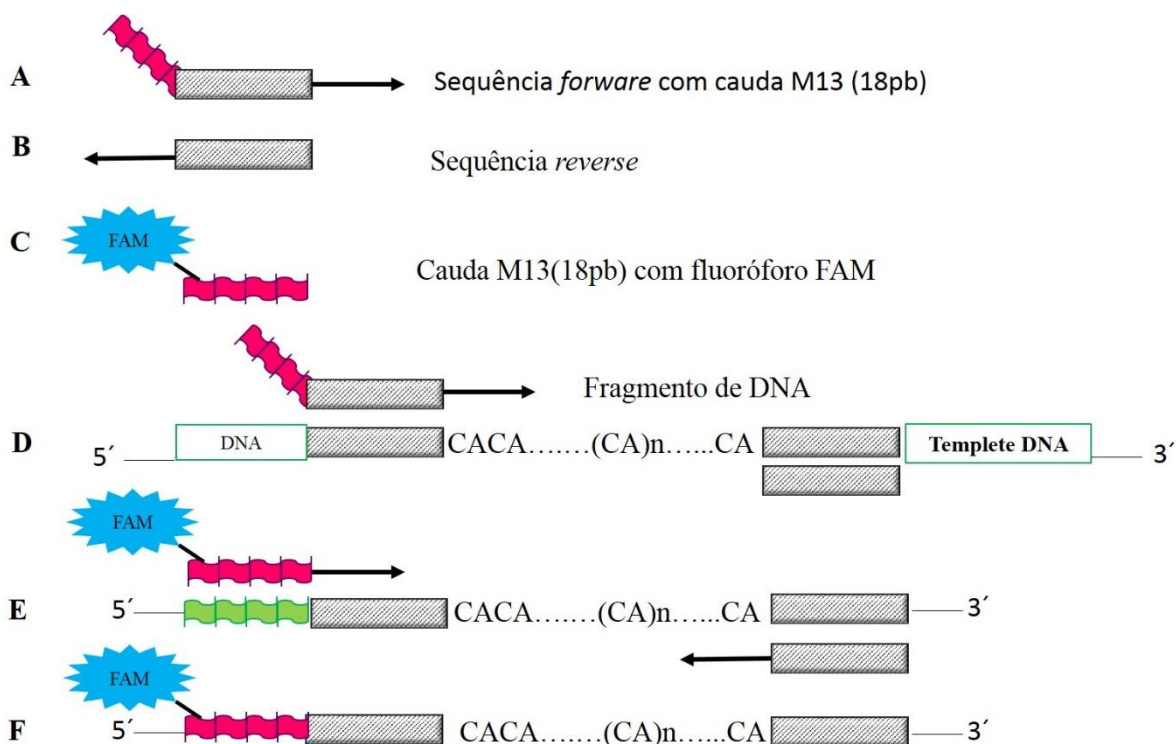
Tabela 2-Sequências *forward* e *reverse* dos primers de microssatélites que serão usados neste trabalho.

Espece	Locos Testados	Sequência do Primer (5' - 3')	Ta (°C)
<i>L. chrysopygus</i>	Leon2	F:CTGCTTCTTGTTCCACTTCTTCTC R: GTTTGGGTGGTTGCCAAG	55
	Leon15c85	F: CTGATCCTTGAAGCAGCATTG R: GGTTAAAGGGTTCGTTCTGTG	60
	Leon21c75	F: CAGTTGAGGGAACAGGAATTA R: CACTGCACTGACAGAGCAAG	60
	Leon3c20	F: CTGTATGTGATCGCTTTTACCTG R: AAGGCAATCTAACTAATCAACACTC	60
	Leon31c97	F: TGGTCCAGAGAAATGATGTC R: GTAATTCCTTGGATTTATGCC	58
	Leon11c72	F: AGGATTACAGGTGCCAC R: TTGCATATTGTGTTCAACTTC	60
	Leon35c42	F: GTGGAAAGTTTTCAGAATATC R: TGCAGTTGTCCACACTTTA	60
	Leon30c73	F: GGACCTGATTGAAGCAGTC R: TTCCCTGAGAATCTAATGGAG	60
	Leon26c10	F: TTCATCTCAATGACACGAAAC R: CATCGAGTGTCCTGCTGT	58
	Leon27c13	F: AAGCGCAGATTTATTGATAGG R: TGCAGGTAAATGATGGTAATG	60
<i>L. chrysomelas</i>	Lchu01	F:GCTCAGGTGTTATTTATGTCCAAA R:GTTTCTTGCAACTATCTTGCATGTTCTGC	58
	Lchu02	F: AGATTCTGCCTCAAGAAATTCAGT R: GTTTCTTTCTAGATCCAGGTCGGCAAT	58

Lchu03	F: AAGGCATGATGTATCTTGTTCTCA R:GTTTCTTATCTTTCTGTATGTGTCTCCCTGTC	58
Lchu04	F: TGACCAAAGAAAATGCAAAA R: GTTTCTTGCACAGGGTATTTAGCAGGA	55
Lchu05	F: TGATGCTAAAACAGAAGCATTT R: GTTTCTTGTCTGTATGTTACAAAACCT	55
Lchu06	F: GCCTTAATTAGCACCAGAACC R: GTTTCTTACCACTCCAAGCCTTCAGTA	55
Lchu07	F: TCTCATTTCTTCTCATGGACTC R: GTTTCTTCTTGACTCACAGCATGACCT	55
Lchu08	F: CACGGCAATGTGGGAATAA R: GTTTCTTTTCAGTAGTTGGGACTGGGATAA	58
Lchu09	F: TTCATTGTAGCATTGTTGGTCAT R GTTTCTTTTGCCTCCTCATAGTTCCTCAT	58
<i>L. rosalia</i>		
Lr.P2BH6	F: TCTGTTTGAATCCCCAGTCC R: GCAGTCCCTCAAGGTTTTCT	55
Lr.P5BE6	F: TGTGCATGCTTGCCTGTGTC R: ATCTCACTGGACCCACCT	55
Lr.P3AF1	F: CCATCCTGGCCAACATAGGT R: GTAGCTGGGATTACAGGCAC	62

As reações de amplificação foram realizadas seguindo o protocolo de Schuelke (2000). Neste protocolo adiciona-se a PCR um terceiro *primer* universal M13 marcado com um fluoróforo (FAM, HEX ou TET) e uma cauda complementar M13 é adicionada em um dos *primers* (forward ou reverse) flanqueador do microsatélite (Figura 4).

Figura 4- A figura representa a reação de amplificação usando a cauda universal M13. A. Primer *forward* o qual tem adicionado a cauda M13. B. Primer *reverse*. C. Cauda M13 marcada com fluoróforo FAM. D. Anelamento dos primers específicos às regiões flanqueadoras os e amplificação do fragmento. E. Anelamento da cauda M13 a sua seqüência complementar. F. DNA microsatélite amplificado junto com a cauda M13 marcada com fluoróforo.



Fonte: Adaptado de Schuelke (2000)

As PCRs foram realizadas usando-se 5 μ L de *GoTaq*[®] (PROMEGA), 0,7 μ L de cada um dos três *primer*, 0,3 μ L BSA (10mg/ml), 0,15 μ L MgCl₂ (50mn/ μ L), 1 μ L de DNA (50ng) e 1,45 μ L de água milli-Q para completar um volume final de 10 μ L de reação. O ciclo de PCR incluiu: uma etapa de desnaturação a 94° por 5 min, seguido de 30 ciclos de 30" s a 94°C, um gradiente de alinhamento específico para cada loco durante 45" e mais 8 ciclos adicionais distribuídos da seguinte maneira: 30" a 94°C, 45" a 53°C (temperatura de alinhamento da cauda M13 marcada), 45" a 72°C e finalmente uma etapa de extensão de final 72°C por 10 min.

Os produtos de amplificação foram observados através da análise eletroforética de 2 μ L de cada amostra com 1 μ L de azul de bromofenol e 1 μ L de GelRed (Uniscience), aplicados em gel de agarose 2% e submetidos a voltagem

constante de 100V por 35 minutos. Os fragmentos amplificados foram genotipados em sequenciador MegaBACE na empresa DNA Consult Genética e Biotecnologia (São Carlos, SP). Os eletroferogramas foram analisados no programa Megabase™ Fragment Profiler (GE Healthcare Life Science) para estabelecimento dos alelos e genótipos dos indivíduos.

3.4 Análise dos dados

3.4.1 Diversidade Genética

As análises de diversidade genética foram feitas para os 37 indivíduos do grupo em cativeiro brasileiro, os 14 indivíduos em óbito que representam o grupo da Inglaterra assim como também para os 10 indivíduos de vida livre que foram capturados na Floresta Nacional de Capão Bonito. É importante ressaltar que no estudo anteriormente realizado por Caldano et al., 2014, foram testados 20 locos no total, 10 descrito para a espécie *L. chrysopygus* oito para *L. chrysomelas* e dois para *L. rosalia*. Neste trabalho foram padronizados mais dois locos, um para a espécie *L. chrysomelas* e um para *L. rosalia* totalizando um painel de 22 locos microssatélites.

A determinação do número de alelos (N_a), e dos valores da heterozigiosidade esperada (H_e) e observada (H_o) foi feita pelo programa GenAlex 6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) e a riqueza alélica (R_a) pelo software FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001). Os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg entre os pares de locos foram estimados pelo programa Genepop (RAYMOND; ROUSSET, 1995). As estimativas para o desvio de HWE e deficiência de heterozigotos foram obtidas pelo algoritmo Cadeia de Markov-Monte Carlo (MCMC). A correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989) foi utilizada para confirmar as significâncias dos resultados encontrados em todos os testes realizados, corrigindo os intervalos de confiança. Os coeficiente de endogamia F_{IS} foram determinados em conjunto com os valores de p para o excesso (PL) e para o déficit de heterozigotos (PS).

Mediante o programa GENHET v3.1, o qual é um pacote para o programa R foram calculados as cinco mais importantes estimativas heterozigiosidade individual (COULON, 2010). No entanto foram escolhidas duas de essas estimativas para saber como está variando a heterozigiosidade dentro de cada indivíduo e para fins comparativos entre os grupos de cativeiro e a população de vida livre; a

heterozigosidade padronizada baseada na média da heterozigosidade observada (Hs_obs) e o índice de relacionamento interno (IR) (COLTMAN et al., 1999).

A presença de alelos nulos foi checada pelo programa Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada um dos locos foi estimado no programa Cervus 3.0.3 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007) a partir dos genótipos e das frequências alélicas estabelecidas.

3.4.2 Testes de Paternidade

A percentagem de exclusão foi calculada com respeito aos genótipos da descendência no programa Cervus. Dados para a probabilidade combinada de exclusão e confiabilidade da análise, com base na probabilidade de que uma atribuição errada de um pai seja detectada na análise de parentesco (JAMIESON; C S TAYLOR, 1997) foram fornecidos. Para isso foram calculadas a probabilidade de exclusão conhecendo somente um dos parentais (Excl1) e a probabilidade de exclusão conhecendo os dois parentais (Excl2). O programa analisou conjuntamente 20 indivíduos entre reprodutores e a descendência considerando-os pertencentes a uma mesma população. Estes 20 indivíduos foram escolhidos para as análises pois são os indivíduos que tinham dados genótipos maternos y paternos. Para a identificação do pai mais provável de cada indivíduo da prole foram feitas simulações e análises de paternidade no programa Cervus 3.0.3 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). . Em seguida, cada macho foi testado para selecionar os indivíduos com maior possibilidade de paternidade para cada indivíduo da progênie testada. A confiança das atribuições e o candidato parental mais provável foram determinados pelo valor estatístico LOD, o qual é obtido pelo logaritmo natural da razão da verossimilhança. Valores LOD negativos indicam que o pai candidato tem menor probabilidade de ser o verdadeiro pai. Nesta análise, o nível de confiança, Relaxed (80% de certeza) e Strict (95% de certeza), que se define como a como a tolerância para atribuir um falso positivo, também foi determinado.

A simulação previa para analisar a viabilidade da análise de parentesco e calcular os valores críticos da razão de verossimilhança foi realizada considerando-se 1000 rodadas, 10% de erro de genotipagem e 90% para proporção de locos genotipados corretamente.

Após esta etapa foi determinada a paternidade mediante o teorema de Bayes das atribuições incorretamente estabelecidas no programa Cervus. A probabilidade *a priori* para garantir imparcialidade no cálculo foi de 0,5, devido a uma probabilidade de 50% do pai testado ser realmente o pai biológico do indivíduo em questão.

3.4.3 Estrutura Genética

Para determinar o grau de diferenciação genética entre os grupos de cativo brasileiro e da Inglaterra assim como também a diferenciação entre estes e o grupo de vida livre capturado na Floresta Nacional de Capão Bonito, foram calculados, a partir da Análise de Variância Molecular (AMOVA), os índices F_{ST} (WRIGHT, 1965) e R_{ST} (SLATKIN, 1995), conforme Weir & Cockerham (1984) e Michalakis & Excoffier (1996), respectivamente. Estas análises de variância molecular foram realizadas utilizando o programa GenAlex (PEAKALL; SMOUSE, 2006), versão 6.3.

Assim mesmo, foi feita uma análise fatorial de correspondência (FCA) com o programa GENETIX (BELKHIR et al., 1996), versão 4.05.2 com a finalidade de comprovar a diferenciação mostrada pelo AMOVA. A análise fatorial de correspondência (FCA) é um método de análise multidimensional, equivalente à análise de componentes principais (PCA), a qual é adaptada ao estudo de tabelas de contingência e de frequências. Por meio desta análise pode-se representar de forma simultânea as observações e as variáveis, que neste caso representam os dois grupos (vida livre e cativo) e seus alelos. Adicionalmente, esta análise tem a vantagem de identificar os alelos mais discriminantes. É uma análise exploratória que detecta a melhor combinação linear das variáveis (frequências alélicas em diferentes locos) e descreve a variação entre os indivíduos amostrados, otimizando as diferenças entre estes. Desta maneira, a relação entre os indivíduos pode ser visualizada em dois ou três eixos em um gráfico bi ou tridimensional.

4. RESULTADOS

4.1 *Studbook* e análise de pedigree

De acordo com o registro genealógico, o número total de indivíduos mantido em cativeiro desde 1973 é de 492 micos-leões-pretos. Entretanto, quatro indivíduos não possuem informações completas e por isso não foram incluídos nas análises no presente trabalho. A análise do *Studbook* pelo programa Pedigree Viewer (KINGHORN, 1994) demonstrou que os demais 488 indivíduos descendem inicialmente do estabelecimento de sete possíveis fundadores (4 fêmeas, 3 machos), todos selvagens, capturados na região atualmente pertencente ao Parque Estadual Morro do Diabo. Ao longo dos anos 1985 até o ano 2010 foram introduzimos mais 27 indivíduos de vida livre totalizando 34 indivíduos registrados no livro genealógico como fundadores.

A análise no programa PedScope estimou os seguintes parâmetros para 28 fundadores que constam com a informação completa no *Studbook*: contribuição dos fundadores (proporção dos genes na população atual, devido aos fundadores), alelos retidos (proporção dos genes que provavelmente estarão na população atual) e os genomas fundadores únicos (GU) (probabilidade de que genes dos fundadores estejam somente presentes em normalmente um membro da população atual). A probabilidade de alelos retidos e os genomas únicos foram calculados através da análise *gene-drop* (Tabela 3).

Tabela 3-Parâmetros estimados pelo programa PedScope para 28 fundadores. A tabela mostra a identificação de cada fundador (ID), o lugar de captura; MD: Morro do Diabo; RB: Rio Bonito; BR: Capão Bonito; Contribuição de cada fundador; Alelos retidos; Genomas fundadores únicos (GU), Sexo; Número total de prole contribuinte por cada fundador; Número de prole do sexo masculino; Número de prole de sexo feminino y Número de prole de sexo desconhecido.

ID	Origem	Contribuição	Alelos Retidos	GU	Sexo	#Prole	#Prole ♀	#Prole ♂	#Prole Unk
006	MD	0,16	1,00	0,00	F	11	4	7	-
073	MD	0,14	1,00		M	27	15	12	-
074	MD	0,14	1,00	-	F	25	15	10	
001	MD	0,10	0,87	-	M	25	14	10	1
003	MD	0,09	1,00	0,00	M	6	3	3	-
005	MD	0,07	0,99	0,00	M	6	2	4	-
076	MD	0,07	1,00	0,00	F	11	6	5	-
002	MD	0,06	0,98	0,00	F	12	6	6	-
091	MD	0,03	1,00	0,00	F	12	3	6	3
096	MD	0,03	1,00	0,00	M	14	5	6	3
075	MD	0,02	1,00	0,00	M	11	7	1	3
089	MD	0,01	0,98	0,03	F	6	3	1	2
095	MD	0,01	0,98	0,02	F	6	4	-	2
097	MD	0,01	0,88	0,04	M	3	2	1	-
098	MD	0,01	0,87	0,04	F	3	2	1	-
099	MD	0,01	0,94	0,05	M	4	3	1	-
100	MD	0,01	0,94	0,05	F	4	3	1	
293	-	0,01	0,93	0,02	M	4	2	2	2
430	BR	0,01	1,00	0,00	F	13	5	6	2
004	MD	0,00	0,50	0,08	F	1	1	-	-
037	-	0,00	0,50	1,00	M	1	-	-	-
092	MD	0,00	0,50	1,00	F	1		1	
093	MD	0,00	0,87	0,25	M	3	1	-	2
094	MD	0,00	0,87	0,25	F	3	1	-	2
103	MD	0,00	0,50	1,00	M	1	-	-	-
170	RB	0,00	0,50	1,00	M	1	1	-	1
171	RB	0,00	0,75	0,50	F	2	-	-	-
464	MD	0,00	0,75	0,51	M	2	2	-	-

No total, os 28 fundadores deram origem a 218 indivíduos dos 492 reportados na atualização mais recente do *Studbook*. É possível observar que o indivíduo fundador 006 tem a maior contribuição na população atual, seguido dos indivíduos 073 e 074. Além disso, eles possuem 100% dos genes representados na população atual. O restante dos indivíduos e sua contribuição, alelos retidos e genomas únicos são mostrados na tabela 3.

Em relação à totalidade dos indivíduos mantidos em cativeiro desde a fundação foi possível observar que somente 131 indivíduos (27%) deixaram descendência e apenas 37, dos 131, atualmente possuem descendentes vivos. Uma análise mais detalhada do registro genealógico mostrou que a contribuição dos parentais é desigual, sendo que a grande maioria dos indivíduos cativos ao longo das gerações não produz nenhuma descendência e a prole resultante é proveniente de um reduzido número de reprodutores. O número total de pais e mães contribuintes desde a fundação foi de 63 e 68 indivíduos, respectivamente. O tamanho máximo da família paterna foi de 30 animais e da família materna de 29.

Desta forma, observamos que dos 131 indivíduos de mico-leão-preto que deixaram descendência, 81 indivíduos (78%) provém de acasalamentos entre irmãos completos, ou seja, consistem em descendentes da primeira ordem relativa. A representação gráfica do pedigree do mico-leão-preto de acordo com o registro genealógico, como produzido pelo Pedigree Viewer, revelou nove gerações (Figura 5) com vários indivíduos não reprodutores e alguns indivíduos com alta taxa de reprodução (Por exemplo, o animal com *Studbook* # 430 é mãe de 14 indivíduos que fazem parte do zoológico de São Paulo, e que ainda se presumem vivos na colônia cativa). O número de indivíduos se reproduzindo em cada geração é menor em relação ao o total de indivíduos nascidos em cada uma destas gerações como é mostrado no gráfico 6 no qual também se mostra a variação média da endogamia de heredograma ao longo das 9 gerações.

Figura 5-Representação gráfica da colônia cativa do Mico-leão-preto segundo dados do *Studbook*. G1 representa os fundadores selvagens. G2 –G9 representam os descendentes. Linhas rosa indicam os machos. Linhas verdes indicam fêmeas.

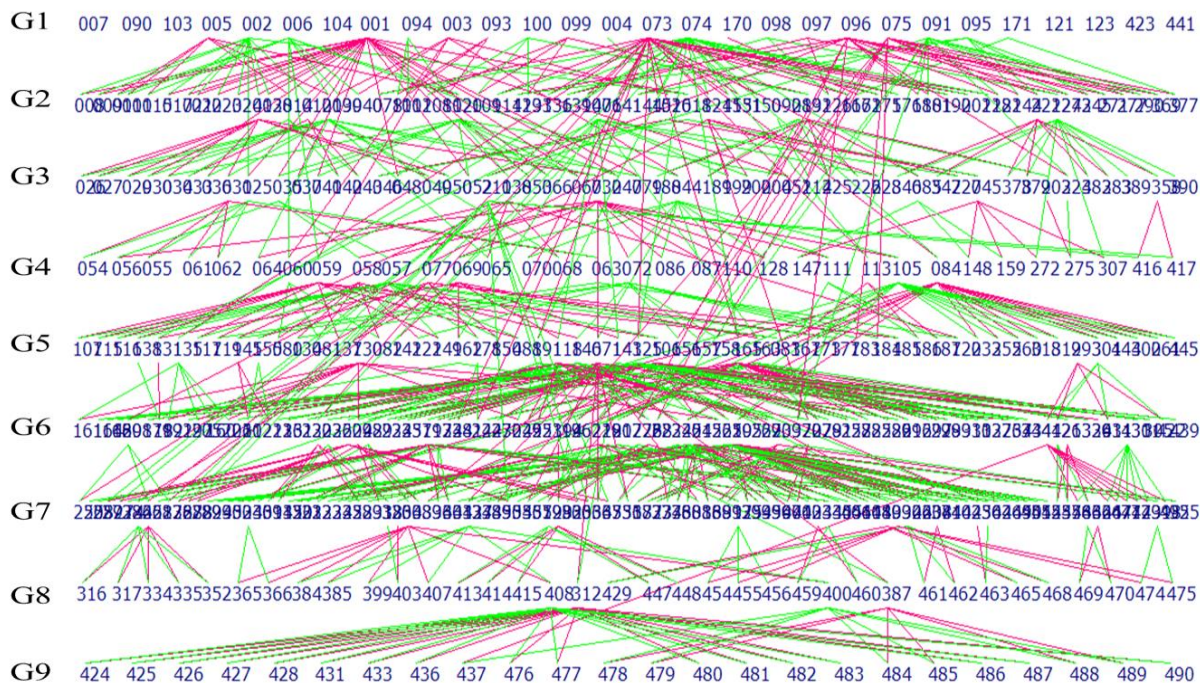
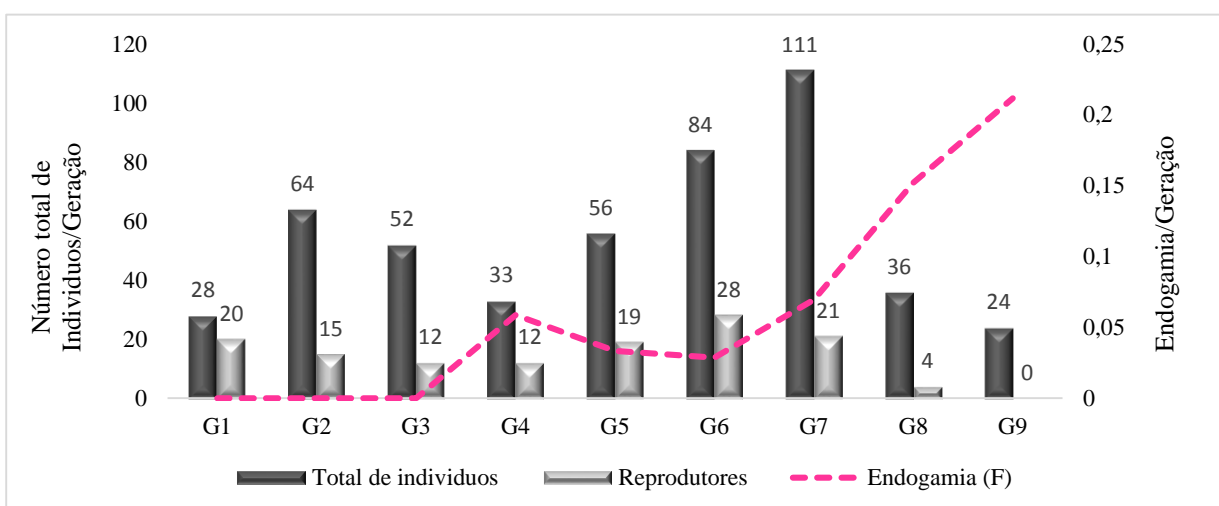
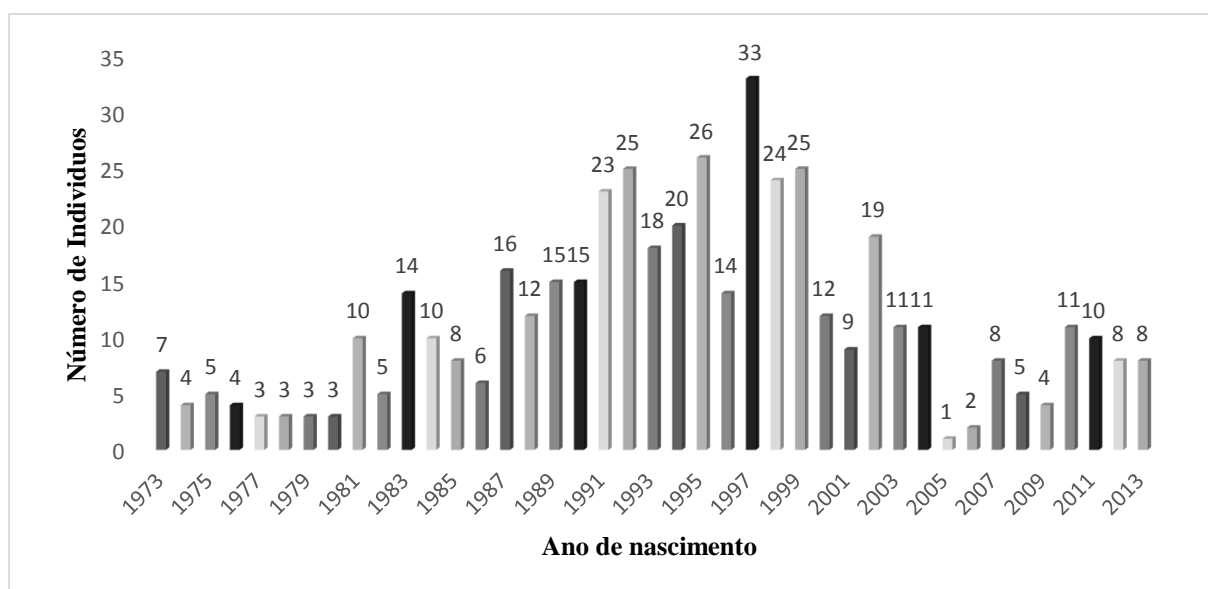


Figura 6- Número de indivíduos reproduzindo-se em cada geração em relação ao total de número de indivíduos por geração. A linha rosa mostra a variação do coeficiente de endogamia de heredograma ao longo das 9 gerações.



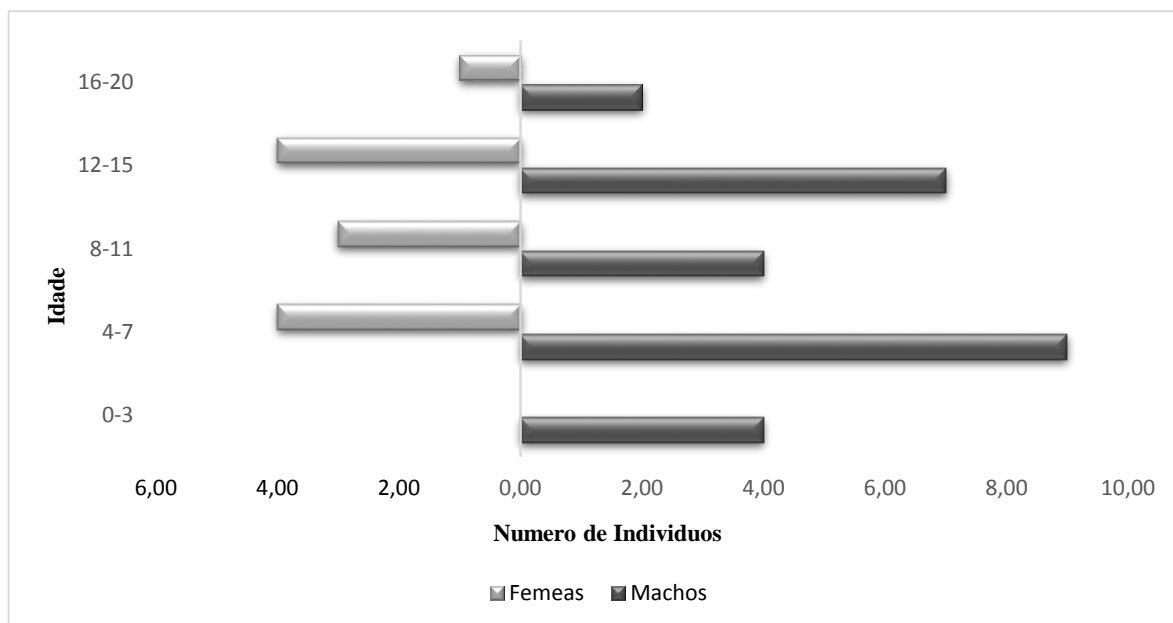
O crescimento anual do grupo de cativo de mico-leão-preto teve uma média de 11,46 indivíduos nascidos desde 1973. No ano 1993 foi observado um elevado número de nascimentos (33), no entanto, nos anos subsequentes se observou uma queda nesse número (Figura 7). Até o ano 2013, o *Studbook* reportou 37 indivíduos compondo o grupo em cativo no Brasil, sendo 16 animais pertencentes a Fundação Parque Zoológico de São Paulo, 17 ao Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, e quatro ao Parque Ecológico de São Paulo. Nove indivíduos compõem o grupo em cativo na Inglaterra.

Figura 7- Número de indivíduos na população cativa de 1973 e 2013. O grande declínio na população entre 1999 e 2013 foi em grande parte devido à animais com pouca taxa de reprodução.



A estrutura etária da população atual é relativamente jovem, pois a maioria dos micos-leões está em uma faixa entre os quatro e sete anos de idade. No entanto, não há um equilíbrio entre o número de machos e fêmeas, o que seria esperado para uma população em rápido crescimento (Figura 8). Ao contrário, é observado um déficit de fêmeas na classe de idade de 0-1 ano, devido à alta taxa de mortalidade dos filhotes, os quais em sua maioria consistem em fêmeas. Em relação a época de nascimento, foi observado que grande parte dos micos leões em cativo nasceu nos meses de outubro (33,3%) e setembro (22%). No mês de janeiro foi registrada uma proporção de 19% dos nascimentos, sendo que o restante dos nascimentos (24,4%) ocorreu nos meses de fevereiro, agosto, novembro e dezembro.

Figura 8- Estrutura etária da população atual do mico-leão-preto. Em cinza claro são representadas as fêmeas; em cinza escuro são representados os machos. É observado um déficit de fêmeas na classe de idade de 0-3.

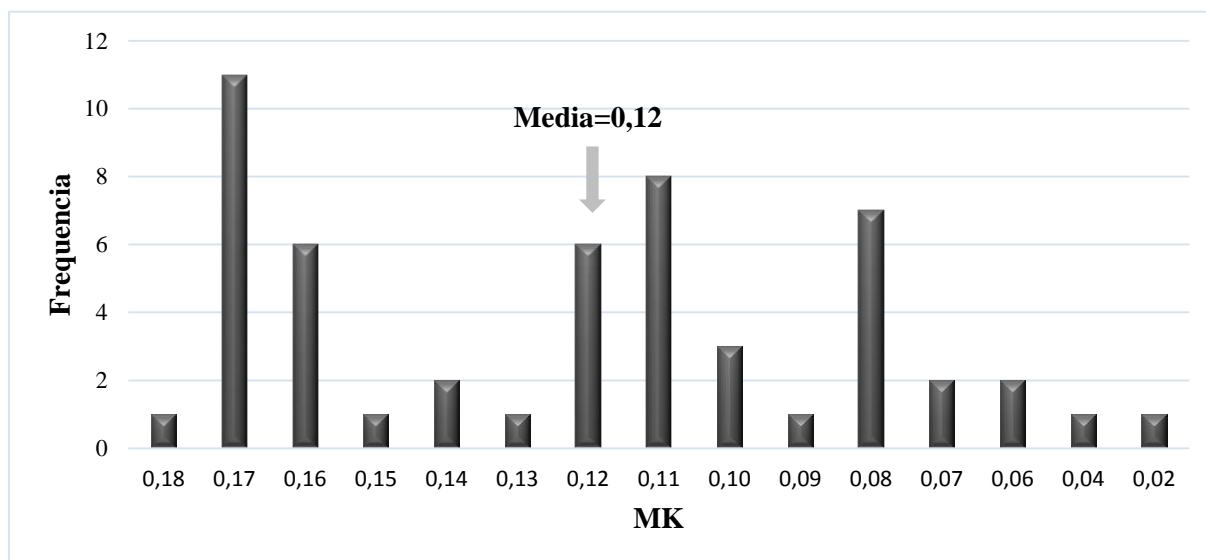


Considerando-se que o período de gestação desta espécie tem a duração de 125 dias, em média a concepção dos animais foi assumida como tendo início no mês de junho. Alguns dados fornecidos pelo CPRJ mostraram que a idade mínima no momento da concepção foi de 24 meses, para este recinto. É interessante notar que o CPRJ conta com dois casais reprodutivos: stud# 312- 408 (casal 1) e stud# 387-stud#400 (casal 2). O casal 1 teve onze experiências reprodutivas enquanto que o casal 2 teve somente quatro experiências. A fêmea 408 (casal 1) produziu uma prole total de 18 indivíduos ao longo dessas 11 reproduções. Esta fêmea começou a reprodução com dois anos de idade e o macho reprodutor com oito anos. A fêmea do casal dois teve uma prole total de sete indivíduos. Sua primeira reprodução foi aos seis anos de idade e o macho reprodutor aos nove anos. A taxa de mortalidade neonatal foi de 24%. Dados da FPZSP mostram que a idade mínima da primeira reprodução neste recinto foi de 3 anos aproximadamente. A fêmea como *Studbook* #430 é a atual reprodutora deste zoológico com 7 eventos reprodutivos e 13 filhotes nascidos. A taxa de mortalidade neonatal resultou em 11, 76%

De acordo com os parâmetros genéticos, a proporção de diversidade genética retida a partir da população fundadora é de 87,8%, com cerca de 12 genomas fundadores equivalentes. O parentesco médio foi de 0,122, com uma variação

individual de 0,026 a 0,173 (Figura 9). Um parentesco médio de 0,125 equivale a um indivíduo em média estar relacionado com a população em nível de meio irmão.

Figura 9- Distribuição da frequência do relacionamento médio (MK) medido a partir de dados de *Studbook*. O parentesco médio de 0,125 é equivalente a um indivíduo estar relacionado com a população em média meio irmão.



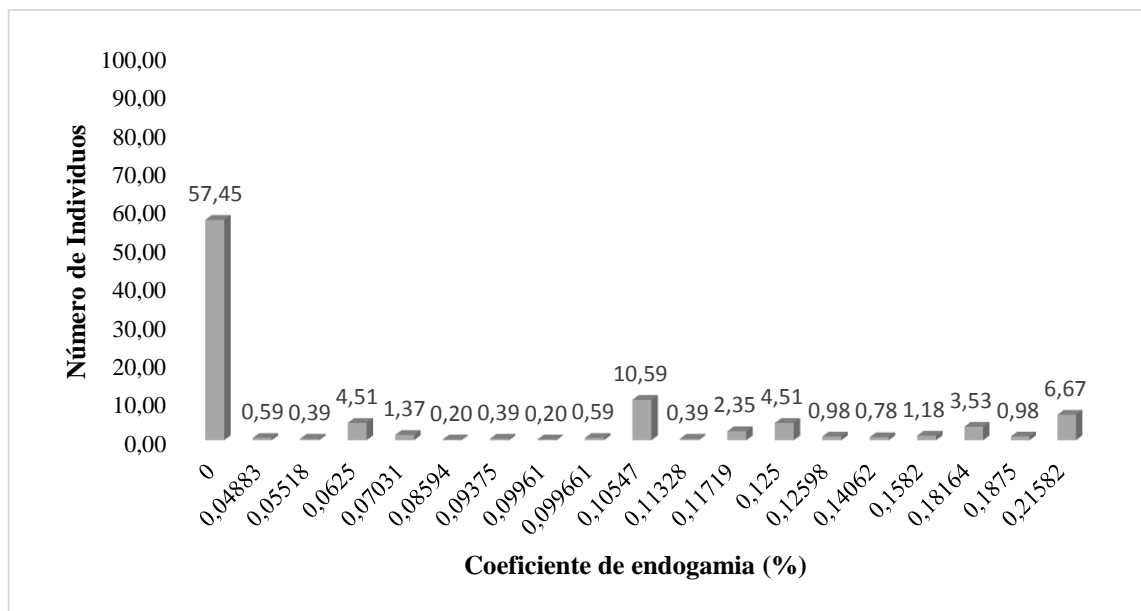
O número de equivalentes fundadores e o número efetivo de ancestrais foi de 12,23 e 10,82, respectivamente. O coeficiente de endogamia médio (F) determinado com base na análise do pedigree mostrou um valor médio de $F=0.0502$, com um intervalo de 0 a 0,22559. Entretanto, é provável que este coeficiente assumira um valor ainda maior devido a uma possível sobre estimativa do verdadeiro número de fundadores, e a possibilidade de alguns destes indivíduos serem relacionados. Na tabela 4 são apresentados os valores máximos e médios da endogamia por geração. Na figura 10 é representada a porcentagem de indivíduos em cada nível de endogamia desde a fundação em cativeiro.

Tabela 4-Valores máximos e médios do coeficiente de endogamia calculada com base no *Studbook* por geração. Se destaca também o número de indivíduos por cada geração.

Gerações	Indivíduos/ geração	F máximo/geração	Endogamia/geração
1	28	0	0
2	64	0	0
3	52	0	0
4	33	0,125	0,058
5	56	0,125	0,033

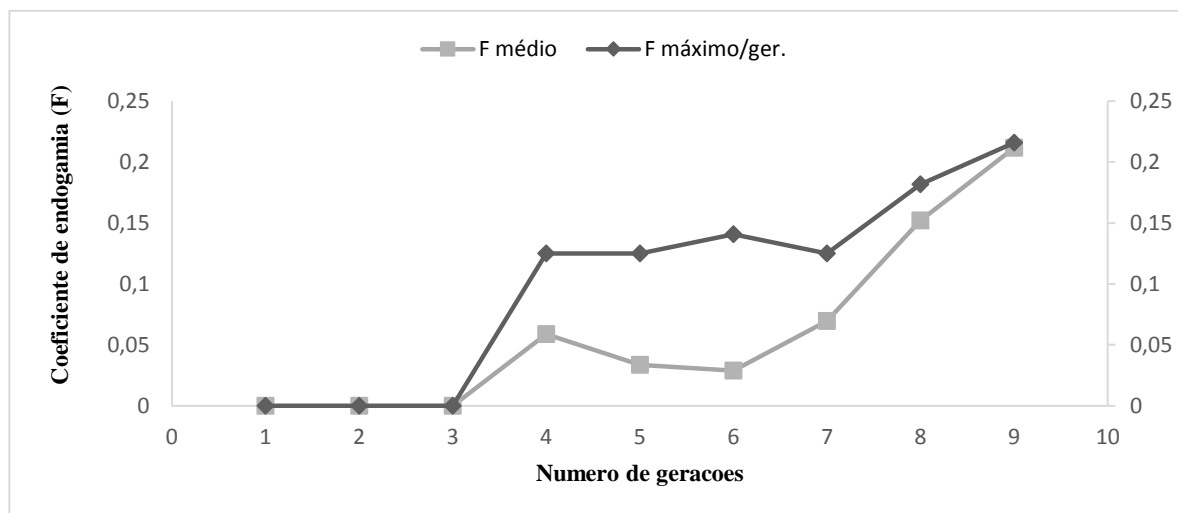
6	84	0,140	0,028
7	111	0,125	0,069
8	36	0,181	0,152
9	24	0,215	0,211

Figura 10- Porcentagem de indivíduos em cada nível de endogamia desde a fundação.



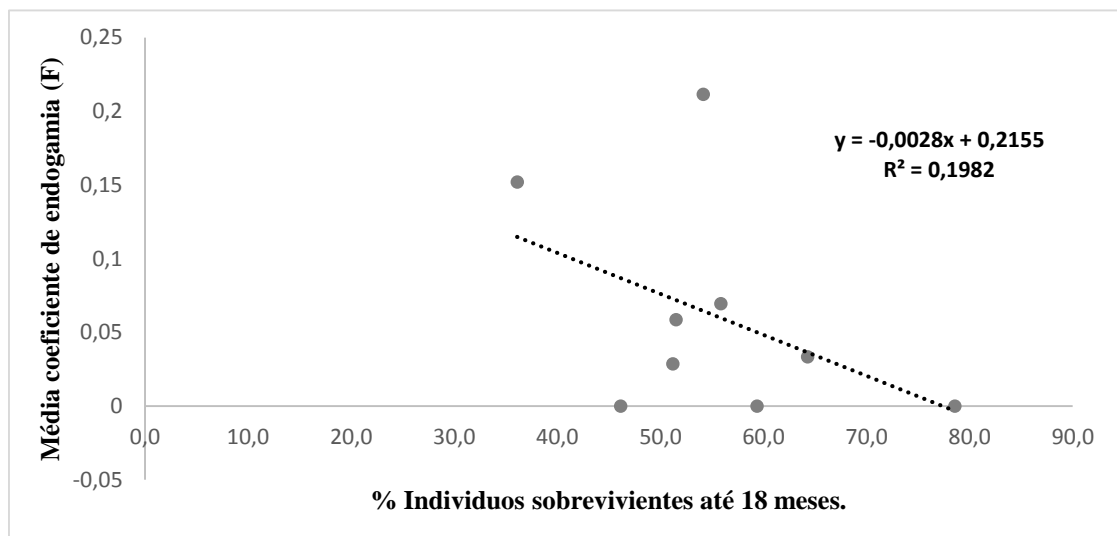
Em relação aos valores de endogamia de heredograma (F) foi assumido que os indivíduos fundadores não possuem nenhum relacionamento, sendo, portando, este valor igual a zero. Considerando essa premissa, o valor de F observado nas três primeiras gerações é zero, sendo que a partir da quarta geração é observado um aumento no valor médio de F, nas gerações 5 e 6 uma diminuição e a partir da sétima geração há um incremento significativo por geração (Figura 11). Esses resultados mostraram que os níveis de endogamia de heredograma estão aumentando ao longo das gerações no grupo brasileiro mantido em cativeiro. Quando avaliado o valor máximo do F por geração, foi possível observar um alto valor de F nas últimas gerações, sendo por exemplo observado um F max igual a 0,21582 na geração G9 (Figura 11).

Figura 11- Variação do coeficiente de endogamia médio (F) ao longo das gerações (Cinza). Coeficiente de endogamia máximo em cada geração (Preto).



Com a finalidade de estudar os possíveis efeitos dessa endogamia na colônia em cativeiro foi feita uma análise de correlação de *Spearman* entre os coeficientes de endogamia e a percentagem de indivíduos que sobrevivem até a idade reprodutiva (18 meses de idade). A endogamia mostrou correlação negativa com a sobrevivência. Entretanto esta não foi significativa ($n = 9$, $p < 0,005$) (Figura 12). O valor de r^2 igual a 0,1982 significa que a percentagem de indivíduos sobreviventes até os 18 meses é capaz de explicar somente 20% da variabilidade observada nos coeficientes de endogamia médios.

Figura 12- Correlação entre o percentual de indivíduos sobreviventes até os 18 meses de idade e o coeficiente médio de endogamia dos indivíduos encontrados no grupo cativo do Mico-Leão-Preto (n = 9 p <0,001).



4.2 Análise de Diversidade Genética

Os testes utilizando 22 locos de microssatélites demonstraram padrões de amplificação satisfatórios no mico-leão-preto. Entretanto, os locos Lchu02, Lchu04, Lchu05, Lchu09, Leon26c10 e Leon27c13 mostraram-se monomórficos. Foi detectada a presença de alelos nulos nos locos Lchu02 e Lchu03, sendo que o loco Lchu03 também apresentou *stutters*. O loco Lchu02 apresentou um excesso de homozigotos para todas as classes alélicas. Por esse motivo tanto os locos monomórficos como os que apresentaram alelos nulos foram removidos das análises posteriores.

A tabela 5 apresenta os valores relativos ao número de alelos e tamanho dos fragmentos obtidos para os 15 locos que apresentaram polimorfismo no presente trabalho. Dados publicados na literatura para as espécies mico-leão-dourado, mico-leão-de-cara-preta e mico-leão-preto (GALBUSERA; GILLEMOT, 2007; GRATIVOL; BALLOU; FLEISCHER, 2001; PEREZ-SWEENEY et al., 2005) também são apresentados.

Após a genotipagem e análise dos eletroferogramas, o conteúdo de informação polimórfica (PIC) calculado mostrou que os locos Lchu01, Lhu07 e 3c20 são altamente informativos e que os demais locos são razoavelmente informativos (Tabela 5), considerando os critérios de BOTSTEIN *et al.* (1980). Foi encontrado um

valor médio de PIC= 0,44 para os marcadores testados, indicando que o conjunto de locos utilizado é considerado razoavelmente informativo para esta espécie (Tabela 5).

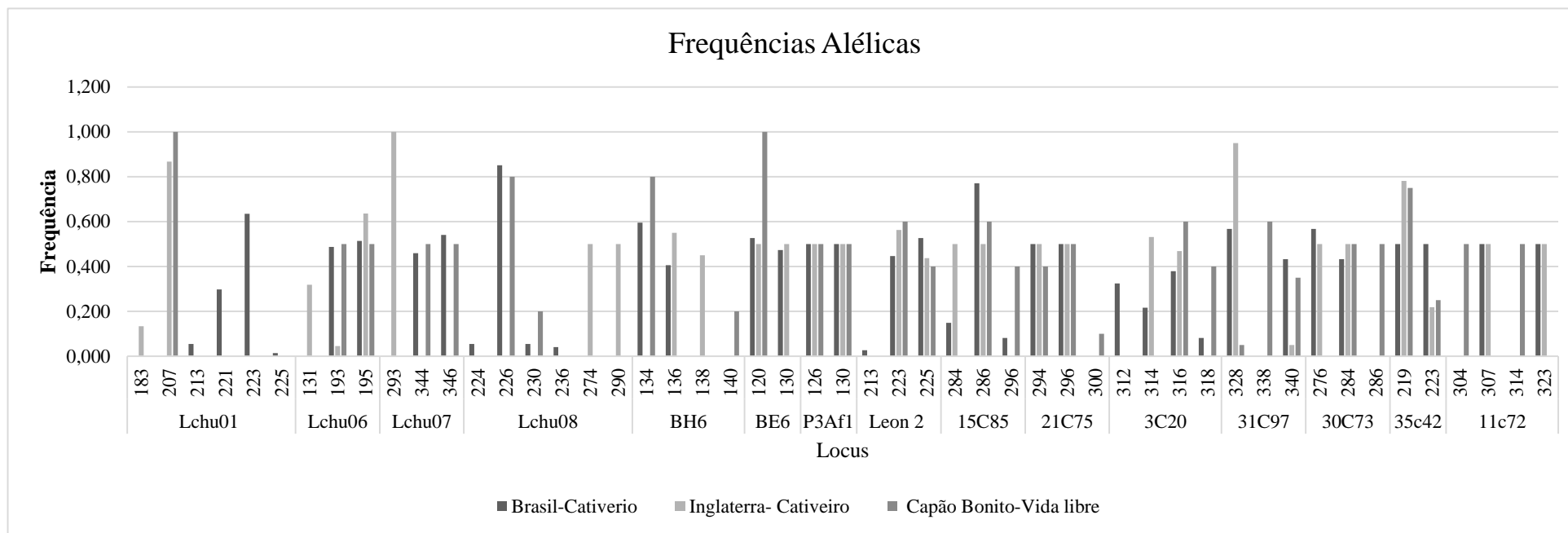
Tabela 5- Locos microssatélites polimórficos no mico-leão-preto. O número de alelos (Na) e o tamanho dos fragmentos amplificados nesse estudo são comparados aos resultados obtidos nas espécies onde os polimorfismos foram descritos. O tamanho dos alelos considera os 18pb da cauda M13. PIC: Conteúdo de informação polimórfica dos locos com dados desse trabalho.

Loci	Na espécie original	Na nesse Estudo	Tamanho dos Fragmentos na Espécie original	Tamanho dos Fragmentos nesse Estudo	PIC
Lchu01	3	6	188–196	183-223	0.634
Lchu06	3	3	161–171	193-195	0,461
Lchu07	3	3	319–325	293-346	0,539
Lchu08	5	6	209–219	226-290	0.468
Lr.P5BH6	6	3	102	134-138	0.491
Lr.P5BE6	5	2	108	120-130	0.375
Lr.P3AF1	6	2	128	126-130	0.375
Leon2	2	3	206-208	223-225	0.402
Leon15c85	2	3	270-274	286-296	0.393
Leon21c75	3	2	278-282	294-296	0.375
Leon3c20	2	4	294-296	312-314	0.623
Leon31c97	4	2	311-323	328-340	0.352
Leon30c73	6	2	255-269	276-284	0.373
Leon35c42	3	2	201-205	219-223	0.368
Leon11c72	2	2	296-304	307-323	0.375
Media		3,0			0.4402

Considerando-se a totalidade dos locos em ambos os grupos em cativeiro, do Brasil e da Inglaterra, um total de 45 alelos foi detectado, sendo observada uma variação de dois (Lr.P5Bh6, Lr.P5be6, Lr.P3AF1, Leon21c75, Leon31c96, Leon30c73, Leon35c42, Leon11c72) a seis alelos por loco (Lchu01, Lchu08) e uma média de 3,0 alelos por loco. Quando estes dados foram comparados com o grupo de vida-livre, foi observado um total de 38 alelos na colônia brasileira, 30 alelos na população de Capão Bonito e 30 no Zoológico de Durrell da Inglaterra. Oito

alelos foram considerados privados no grupo brasileiro e seis no grupo da Inglaterra e na população selvagem. A lista dos alelos privados nos dois grupos e a frequência de cada um deles é apresentada no Anexo 1. A distribuição da frequência alélica para os quinze locos comparando-se os genótipos dos grupos em cativeiro e em vida livre encontra-se ilustrada na Figura 13.

Figura 13- Distribuição das frequências alélicas dos grupos em cativeiro e da população de Capão Bonito do Mico-leão-preto.



As estimativas de diversidade genética baseadas nos valores de heterozigosidade observada (H_o), esperada (H_e) e riqueza alélica e os valores de p estão resumidos na tabela 6. Valores de p significativos para ausência de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram observados em 9 locos analisados na colônia brasileira e 6 e nenhum na população de Capão Bonito no grupo da Inglaterra após a correção sequencial de Bonferroni ($0,0033 < \alpha < 0,05$), devido a um excesso de heterozigotos.

Tabela 6- Diversidade genética do mico-leão-preto do grupo Brasileiro, da Inglaterra e da população selvagem de Capão Bonito baseadas nos dados de quinze locos de microssatélites heterólogos e homólogos. Número de indivíduos analisados (N), a heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), riqueza alélica (Ra), valor de p obtido para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (PEHW).

Loco	N	NA	RA	HO	HE	P _{EHW}	F _{is}	p Larger	p Smaller
Cativeiro-Brasil									
Lchu01	37	4	2,762	0,541	0,505	0,9950	-0,056	0,7033	0,4344
Lchu06	37	2	2,000	0,973	0,500	0,0000*	-0,946	1,0000	0,0011
Lchu07	37	2	2,000	0,919	0,497	0,0000*	-0,846	1,0000	0,0011
Lchu08	37	4	2,625	0,243	0,268	0,2560	0,105	0,2978	0,9089
Lr.P2BH6	37	2	2,000	0,757	0,482	0,0008*	-0,560	1,0000	0,0011
Lr.P5BE6	37	2	2,000	0,838	0,499	0,0000*	-0,673	1,0000	0,0011
Lr.P3AF1	37	2	2,000	1,000	0,500	0,0000*	-1,000	1,0000	0,0011
Leon2	37	3	2,345	0,784	0,523	0,9789	-0,489	1,0000	0,0011
Leon15c85	37	3	2,648	0,459	0,378	0,0923	-0,202	1,0000	0,1089
Leon21c75	37	2	2,000	1,000	0,500	0,0000*	-1,000	1,0000	0,0011
Leon3c20	37	4	3,705	0,162	0,698	0,0000*	0,773	0,0011	1,0000
Leon31c97	37	2	2,000	0,757	0,491	0,0014	-0,532	1,0000	0,0011
Leon30c73	37	2	2,000	0,811	0,491	0,0000*	-0,644	1,0000	0,0022
Leon35c42	37	2	2,000	0,622	0,500	0,1377	-0,230	0,9500	0,1544
Leon11c72	37	2	2,000	1,000	0,500	0,0000*	-1,000	1,0000	0,0011
Média			2,272	0,724	0,489		-0,472		
Cativeiro-Inglaterra									
Lchu01	15	2	1,934	0,133	0,231	0,2007	0,451	0,2100	0,9967
Lchu06	11	3	2,636	0,545	0,492	0,5995	-0,062	0,7511	0,6078
Lchu07	7	1	1,000	0,000	0,000	-	-	-	-
Lchu08	8	2	2,000	1,000	0,500	0,0196	-1,000	-1,0000	0,0167
Lr.P2BH6	10	2	2,000	0,700	0,495	0,3042	-0,370	0,9711	0,3122
Lr.P5BE6	10	2	2,000	1,000	0,500	0,00552	-1,000	1,0000	0,0089
Lr.P3AF1	9	2	2,000	1,000	0,500	0,0102	-1,000	1,0000	0,0122
Leon2	16	2	2,000	0,875	0,492	0,0046*	-0,765	1,0000	0,0056
Leon15c85	16	2	2,000	1,000	0,500	0,0000*	-1,000	1,0000	0,0011
Leon21c75	16	2	2,000	1,000	0,500	0,0001*	-1,000	1,0000	0,0011

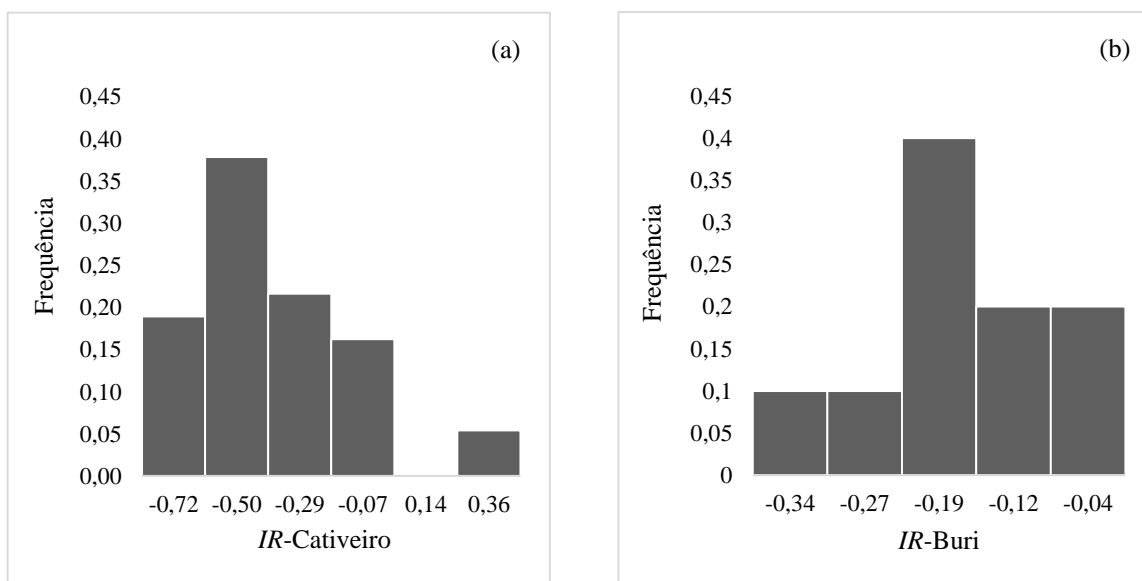
Leon3c20	16	2	2,000	0,938	0,498	0,0008*	-0,875	1,0000	0,0022
Leon31c97	10	2	1,700	0,100	0,095	-	0,000	1,0000	1,0000
Leon30c73	16	2	2,000	1,000	0,500	0,0001*	-1,000	1,0000	0,0011
Leon35c42	16	2	1,991	0,438	0,342	0,4349	-0,250	1,0000	0,4356
Leon11c72	11	2	2,000	1,000	0,500	0,0027*	-1,000	1,0000	0,00033
Média			1,950	0,715	0,489		-0,727		
Vida livre- Capão Bonito	N	Na	Ra	Ho	He	P_{EHW}	F_{is}	p Larger	p Smaller
Lchu01	10	1	1,000	0,000	0,000	-	-	-	-
Lchu06	10	2	2,000	1,000	0,500	0,0058	-1,000	1,000	0,0067
Lchu07	10	2	2,000	1,000	0,500	0,0057	-1,000	1,000	0,0100
Lchu08	10	2	1,997	0,400	0,320	0,6942	-0,200	1,000	0,6878
Lr.P2BH6	10	2	1,997	0,400	0,320	0,6927	-0,200	1,000	0,6978
Lr.P5BE6	10	1	1,000	0,000	0,000	-	-	-	-
Lr.P3AF1	10	2	2,000	1,000	0,580	0,0059	-1,000	1,000	0,0056
Leon2	10	2	2,000	0,800	0,480	0,0923	-0,636	1,000	0,0867
Leon15c85	10	2	2,000	0,400	0,480	0,4798	0,217	0,4567	0,9111
Leon21c75	10	3	2,921	1,000	0,580	0,0055	-0,698	1,000	0,0078
Leon3c20	10	2	2,000	0,800	0,480	0,0897	-0,636	1,000	0,978
Leon31c97	10	3	2,700	0,800	0,515	0,0883	-0,516	1,000	0,1067
Leon30c73	10	2	2,000	1,000	0,500	0,0056	-1,000	1,000	0,0044
Leon35c42	10	2	2,000	0,500	0,375	0,5210	-0,286	1,000	0,5000
Leon11c72	10	2	2,000	1,000	0,500	0,0053	-1,000	1,000	0,0033
Média			1,974	0,673	0,403		-0,639		

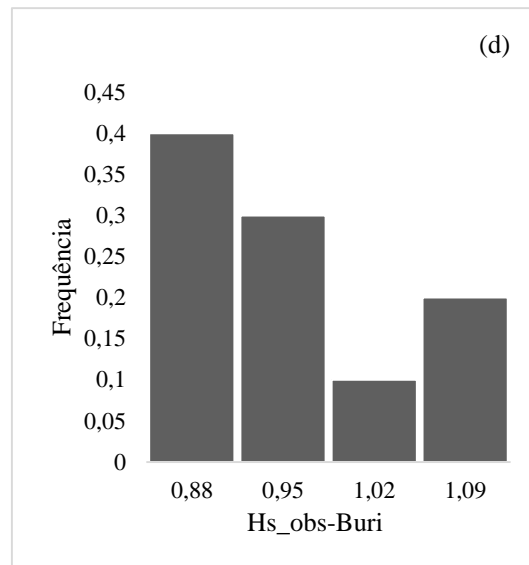
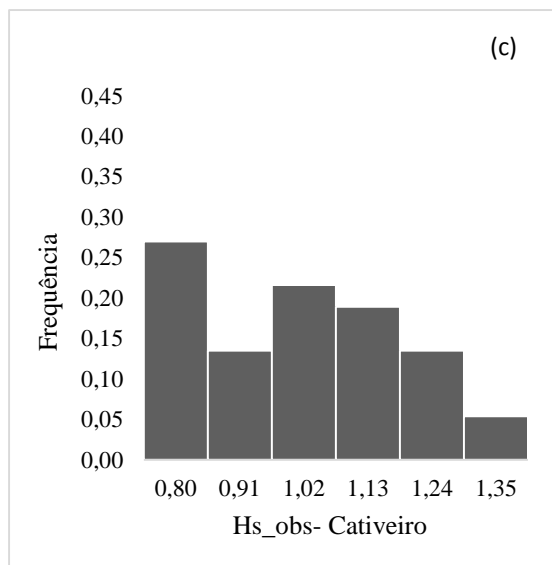
*Valores de p significativos.

A riqueza alélica teve uma variação de 2 a 3,7 alelos como uma média de 2,27 alelos por loco para o grupo do Brasil, de 1,7 a 2,6 alelos por loco com uma média de 1,95 alelos por loco para o grupo da Inglaterra e de 1,0 a 2,9 alelos como uma média de 1,974 alelos por loco como mostrado na tabela 6. A heterozigosidade esperada teve uma variação de 0,268 (Lchu08) a 0,698 (Leon3c20), com um valor médio 0,489 para todos os locos analisados no grupo em cativeiro no Brasil. No grupo da Inglaterra a heterozigosidade esperada teve uma variação de 0,000 a 0,500, com um valor médio de 0,489. O valor médio de heterozigosidade esperada na população selvagem foi 0,403, similar a heterozigosidade média observada no grupo cativo brasileiro. O índice FIS (endogamia de sistema de acasalamento) sugeriu déficit de heterozigotos em duas de 53 comparações realizadas em ambos grupos em cativeiro. Nenhum dos locos mostrou diferenças significativas. O coeficiente de endogamia (Fis) médio foi de -0,472, -0,727 e 0,639 para os três grupos que indica um sistema de exogamia (fuga da endogamia).

As análises de heterozigidade individual (AMOS et al., 2001) foram realizadas para fins unicamente comparativos entre os indivíduos em cativeiro ainda vivos e a população selvagem. Cinco estimadores de heterozigidade individual descritos na literatura foram determinados. Os valores de cada estimador para cada indivíduo são apresentados no Anexo 2. Dois destes estimadores foram selecionados para as análises posteriores: heterozigidade individual padronizada com base na média da heterozigidade observada (Hs_obs) e o relacionamento interno (IR). O primeiro (Hs_obs) é um estimador altamente conservador, descrito na literatura para ser utilizado em dados que exibem alelos nulos ou alelo *dropout*. O segundo (IR) é um bom estimador de heterozigidade individual, pois é mais eficiente em populações com alto grau de endogamia. Ambos os estimadores foram estabelecidos para cada indivíduo usando a medida de relacionamento interno (IR) e heterozigidade padronizada (Hs_obs). Para determinar o grau em que essas variáveis estão medindo propriedades semelhantes, estas foram correlacionadas entre si. A correlação foi estatisticamente significativa com IR e Hs_obs apresentando-se fortemente correlacionadas ($r = -0,93$, $p < 0,05$). As distribuições de frequência das duas variáveis são mostradas na figura 14.

Figura 14- Distribuição da frequência de (a) relacionamento interno (IR) colônia cativa (b) IR população Capão Bonito ;(c)Hs_obs colônia cativa; (d) Hs_obs população Capão Bonito.





4.3 Análise de Paternidade

4.3.1 Probabilidade de Exclusão

Neste trabalho foi calculada a probabilidade de exclusão conhecendo um dos parentais (Excl1) e conhecendo ambos parentais (Excl2). A probabilidade de exclusão para o total de locos conhecendo-se um dos pais foi de 0,14756709 e conhecendo-se ambos os pais foi de 0,00511602. Estes valores indicam que a probabilidade de que o casal indicado como parental não seja correta é de 0,51 %, sugerindo que de fato a alocação feita é confiável, uma vez que as probabilidades de que os parentais sejam diferentes dos indicados é muito baixa.

4.3.2. Inferências Estatísticas por meio da razão de verossimilhança mediante o programa Cervus

Os testes de verificação de paternidade para as 20 progênes com informação do genótipo materno em pelo menos 15 locos e os limites críticos de delta gerados pela simulação, com 1.000 rodadas com nível de confiança restrito (95%) e relaxado (80%), são apresentados na tabela 7.

Tabela 7- Limites de delta estabelecidos por meio de simulação ($r=10.000$) mediante o programa Cervus, para dois casos: 1. Pai possui genótipo desconhecido. 2. Pai com o genótipo da mãe conhecido. Entre parêntesis se mostra a porcentagem de casos de paternidade resolvidos nos dados apresentados.

	Caso 1	Caso 2
Confiança 95%	1,95(42%)	0,82(81%)
Confiança 80%	0,08(91%)	0,00 (90%)

Quando o genótipo da mãe foi informado, o programa Cervus conseguiu solucionar 14 (70%) paternidades, com 80% de confiança. Quando não foi informado o genótipo da mãe, 15 (70%) paternidades foram solucionadas, restando, no entanto, cinco casos não resolvidos. Na tabela 8 estão os resultados de teste de paternidade obtidos, atribuindo-se um pai candidato para cada filho. O teste de paternidade mostrou que há seis atribuições incorretas. Com nível de confiança de 95% e de 80 %, os valores de pontuação delta são maiores ao valor crítico estabelecido na simulação.

Tabela 8- Resultados da prova de paternidade por meio da razão de verossimilhança mediante o programa Cervus.

ID filhos	Loci genotipados	ID mãe	Pai Candidato	Atribuição Cervus	Par LOD Score	Par Delta Score	NC	Trio LOD score	Trio Delta
BLT3	15	BLT5	BLT4	BLT4	1,07	0,00		1,90	2,13
BLT8	15	BLT7	BLT11	BLT11	6,99	1,03	+	1,59	9,20
BLT9	15	BLT7	BLT11	BLT11	6,99	1,03	+	1,59	9,20
BLT13	15	BLT7	BLT11	BLT11	2,05	1,03	+	2,23	9,20
BLT14	15	BLT13	BLT12	BLT12	1,01	0,00		1,56	1,56
BLT15	15	BLT13	BLT12	BLT12	2,71	2,02	*	3,79	3,79

BLT17	15	BLT19	BLT16	BLT16	-5,99	0,00		6,20	6,20
BLT18	15	BLT19	BLT16	BLT16	-1,75	0,00		4,89	4,89
BLT20	15	BLT19	BLT16	BLT16	5,02	1,71	+	6,02	6,02
BLT21	15	BLT19	BLT16	BLT16	-1,75	0,00		4,89	4,89
BLT24	15	BLT23	BLT22	BLT22	2,16	6,37	+	1,18	3,10
BLT25	15	BLT23	BLT22	BLT30	2,20	6,83	+	1,47	6,83
BLT26	15	BLT23	BLT22	BLT22	1,48	6,37	+	6,14	3,10
BLT29	15	BLT23	BLT22	BLT22	2,04	6,83	+	1,33	6,83
BLT32	15	BLT31	BLT30	BLT30	3,46	0,00		9,34	2,96
BLT33	15	BLT31	BLT16	BLT22	1,37	6,37	+	1,72	1,72
BLT35	15	BLT23	BLT22	BLT16	6,85	6,85	+	6,47	6,47
BLT36	15	BLT23	BLT22	BLT16	8,57	8,08	+	7,85	6,75
BLT37	15	BLT23	BLT22	BLT16	3,79	3,79	+	8,60	6,75
BLT38	15	BLT24	BLT22	BLT16	-469	0,00		4,17	4,17

ID: Identificação progênie testada. **Loci genotipados:** número de loci genotipados na descendência. **ID padre:** Identificação do progenitor conhecido. **Pai candidato:** Pai registrada no *Studbook*. **Atribuição CERVUS:** Pai atribuído pelo programa comparando os 15 loci. **Par LOD score:** logaritmo natural da razão da verossimilhança das relações progenitor-progênie entre o pai atribuído e a descendência **Delta score:** Diferença da pontuação LOD entre os dois pais mais prováveis e a descendência. **N.C:** Nível de confiança da atribuição usando o 95% (*) e usando o 80% (+). **Trio LOD score:** Logaritmo natural da razão de verossimilhança das relações progenitor-progênie entre o pai atribuído pelo programa e descendência dada uma mãe conhecida. **Trio Delta:** diferença da pontuação LOD entre os dois pais mais prováveis e a descendência dada uma mãe conhecida. Em cinza se mostra as atribuições incorretas.

4.2.3 Probabilidade de Paternidade

Considerando as atribuições incorretas, a probabilidade de paternidade mediante o teorema de Bayes foi determinada com a finalidade de confirmar a paternidade para estes casos. Os genótipos individuais considerando-se todos os locos polimórficos permitiram analisar a estrutura familiar nas distintas progênes em cativeiro. Para cada progênie incorretamente atribuída, pelo programa Cervus, foi avaliada a congruência mendeliana dos dados genotípicos e foram estimados o índice de paternidade (IP), o índice de paternidade combinada (IPC) e a probabilidade de paternidade (W), tendo como base uma probabilidade a priori (PP) de 0,5 (Tabela 9).

Tabela 9- Probabilidade de paternidade mediante o teorema de Bayes para confirmar a paternidade da progênie incorretamente atribuída pelo programa Cervus.

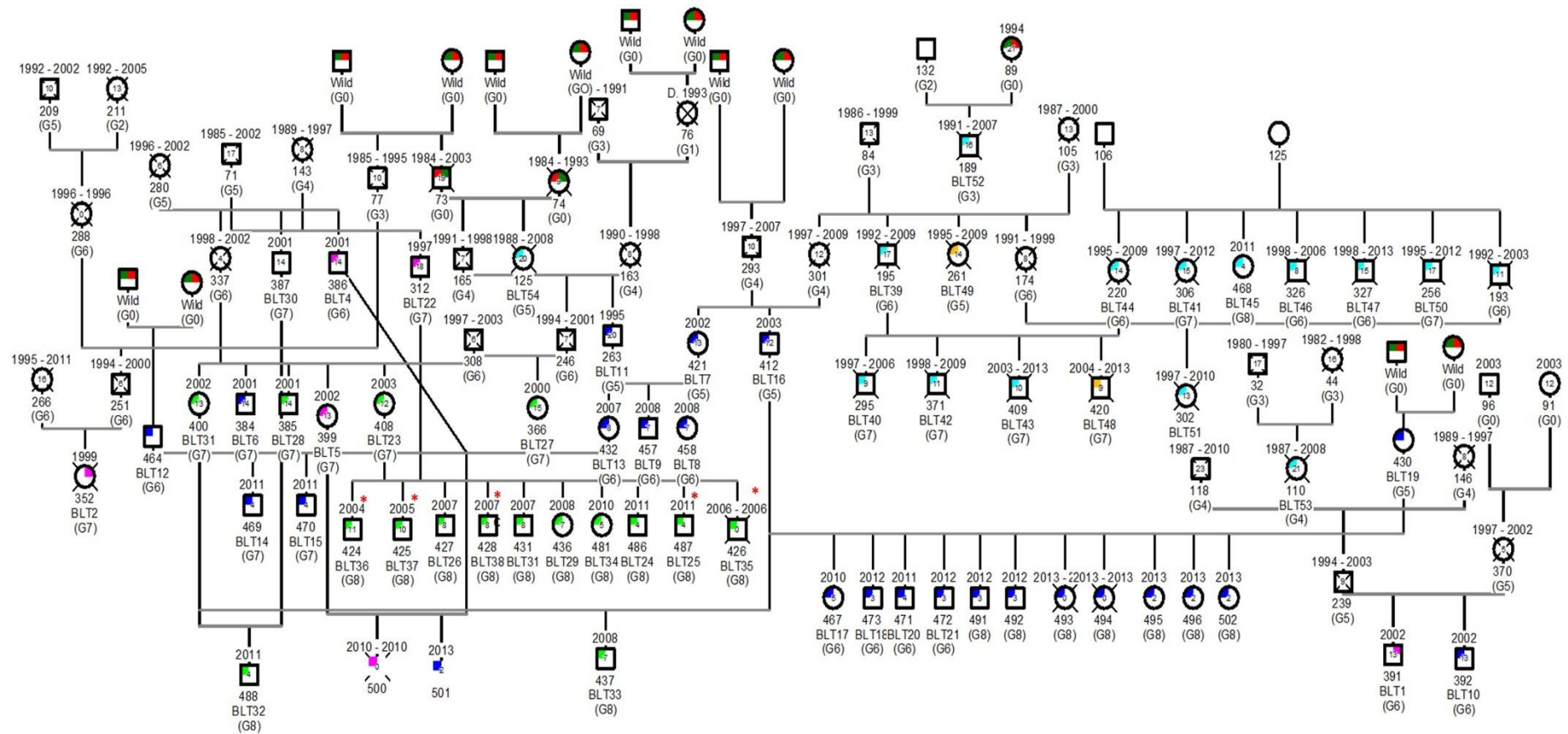
Individuo	BT25	BLT35	BLT36	BLT37
Locos	IP	IP	IP	IP
Lhu01	1,184	0,865	0,865	1,184
Lchu06	1,033	1,033	1,033	1,033
Lchu07	1,066	1,066	1,066	1,066
Lchu08	1,103	0,551	0,906	1,103
Lr.P2BH6	1,776	1,776	1,776	2,283
Lr.P5BE6	0,968	0,968	0,968	0,991
Lr.P3Af1	1,000	1,000	1,000	1,000
Leon 2	1,033	1,033	0,989	0,991
15C85	3,546	0,649	0,652	0,852
21C75	1,033	1,000	1,033	1,000
3C20	1,000	1,033	1,000	1,033
31C97	0,888	1,776	0,888	0,888
30C73	1,231	0,841	0,841	1,2315
35c42	1,141	0,888	0,888	1,141
11c72	1,000	1,000	1,000	1,000
IPC	11,68	0,821	0,6427	3,54
W(%)	92,113	45,085	39,124	77,973
Locos	BLT38	BLT33		
	IP	IP		
Lchu01	0,865	1,184		
Lchu06	1,033	1,033		
Lchu07	1,066	1,066		
Lchu08	1,103	1,103		
Lr.P2BH6	2,283	0,888		
Lr.P5BE6	0,991	1,033		
Lr.P3Af1	0,992	1,000		

Leon 2	0,991	1,033
15C85	0,852	1,305
21C75	1,000	1,000
3C20	5,813	1,033
31C97	0,888	1,776
30C73	1,231	0,841
35c42	1,141	2,283
11c72	1,000	1,000
IPC	14,56	6,308
W (%)	93,573	86,316

Neste sentido, foi testada a paternidade do indivíduo BLT33 (o qual, segundo o *Studbook*, tem como pai e mãe os indivíduos BLT16 e BLT31, respectivamente) e os indivíduos BLT25, BLT35, BLT36, BLT37, BLT38 (os quais, segundo o *Studbook*, têm como pai e mãe o indivíduo BLT22 e BLT23, respectivamente). Além disso foi construído o heredograma com as informações sobre as relações de parentesco mostradas pelo programa pelo Pedigree Viewer. A partir do heredograma gerado, foi possível observar a formação de duas famílias distintas dentro das oito gerações de micos criados em cativeiro no Brasil (Figura 15), uma delas alocada no CPRJ (quadros verdes) e outra na FPZSP (quadros azuis).

Sobre a probabilidade de paternidade foi observado que para os indivíduos BLT25, BLT37, BLT38 e BLT33 o pai testado tem grande probabilidade de ser o verdadeiro pai, pois a probabilidade de paternidade (em porcentagem) é alta. Entretanto para os indivíduos BLT35 e BLT36, a a probabilidade de que o pai testado seja de fato o pai foi baixa.

Figura 15- Genealogia do grupo em cativeiro do Mico-Leão-Preto onde se mostra as relações dos micos que tem contribuído para o estabelecimento da colônia de 37 indivíduos que atualmente fazem parte da FPZSP, o CPRJ e o PESC. Machos e fêmeas são representados por círculos y quadrados respectivamente. Indivíduos de vida livre são coloridos de verde e vermelho. Embaixo de cada indivíduo se mostra o número da identificação no *Studbook* o número de identificação que foi dado neste estudo e entre parêntesis o número da geração a qual pertence. Encima de cada indivíduo se mostra o ano de nascimento e/ou falecimento. Símbolos coloridos em azul= FPZSP; em verde=CPRJ; em rosa= PESC; em amarelo= La Palmyre; em azul claro=Durrell. *Indivíduos com

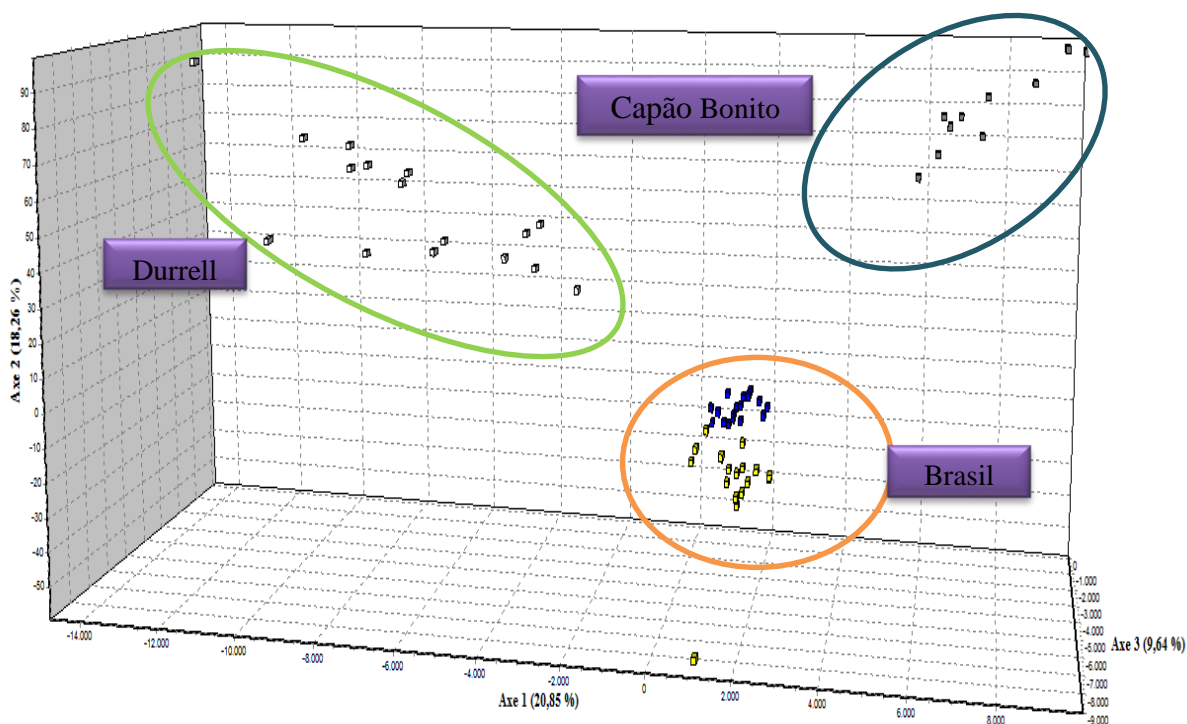


4.4 Estruturação Genética

4.4.1 Análise Fatorial de Correspondência.

O resultado da AFC obtido para os dois grupos avaliados neste trabalho está representado na figura 16 em plano definido por três eixos principais.

Figura 16 - Gráfico da Análise Fatorial de Correspondência (FCA), mostrando a distribuição das amostras de cativeiro e da população selvagem nos três primeiros eixos fatoriais. No círculo laranja são agrupados os indivíduos do PESC, da FPZSP e do CPRJ. Em verde os indivíduos do zoológico de Durrell; em azul os indivíduos da população de Capão Bonito.



O padrão de estruturação genética encontrado mostra a formação de três agrupamentos ao longo dos três primeiros eixos. O primeiro deles foi formado exclusivamente pelos indivíduos provenientes dos diferentes zoológicos brasileiros que incluem os indivíduos do PESC, a FPZSP e o CPRJ. O segundo, pelo grupo representado pelos indivíduos provenientes do zoológico de Durrell e o terceiro grupo pelos indivíduos provenientes da região de Capão Bonito (Figura 15). O primeiro eixo da análise representa 20,85% da variação total e distingue os três grupos analisados.

O segundo e terceiro eixos compreendem, respectivamente, 18,26% e 9,64 da variação total.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA), de acordo com os índices de fixação *FST* e *RST*, utilizada para o teste de diferenciação genética entre os grupos, mostrou uma diferenciação significativa ($FST = 0,251$ e $RST = 0,429$, $p < 0,01$) para as amostras analisadas (Tabela 10). Os valores de *FST* e *RST* encontrados entre os três grupos foram extremamente elevados, sugerindo um alto nível de diferenciação genética entre os grupos de cativeiro do Brasil e da Inglaterra e entre estes e a população de Capão Bonito (Tabela 11).

Tabela 10- Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseada em *FST* e *RST* para os dados microssatélites.

Índice	Percentagem de variação			Valores índice de fixação
	Entre indivíduos	Dentro dos indivíduos	Entre Populações	
FST	0%	81%	19%	0,251
RST	56%	1%	43%	0,429

Tabela 11- Valores de *FST* (abaixo da diagonal) e de *RST* (acima da diagonal) obtidos a partir dos dados Microssatélites.

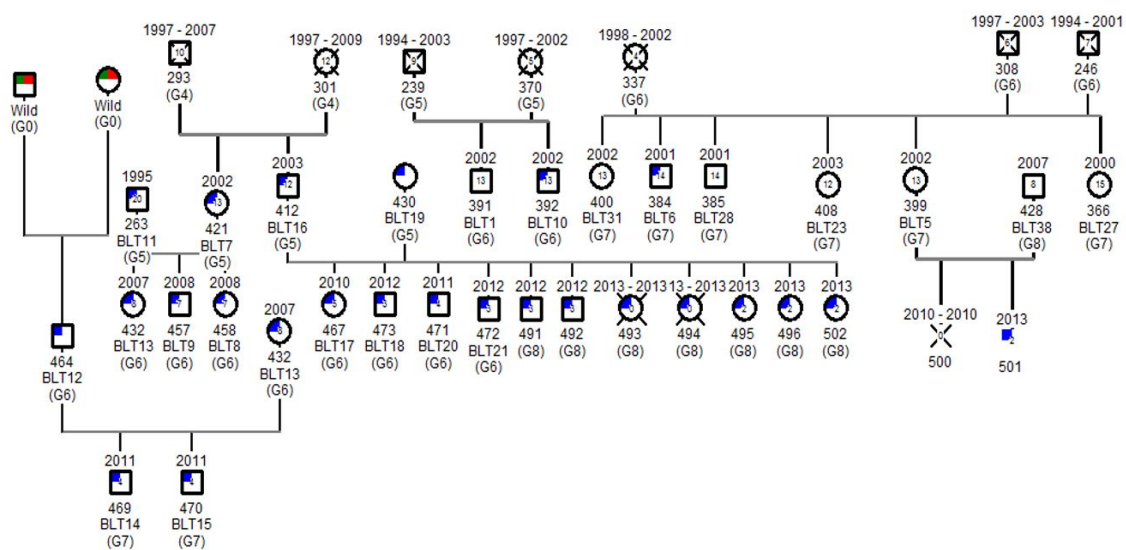
	FPZSP	CPRJ	Durrell	Capão Bonito
FPZSP		0,043*	0,462*	0,537*
CPRJ	0,094*		0,437*	0,576*
Durrell	0,287*	0,268*		0,359*
Capão Bonito	0,322*	0,256*	0,322*	

*Valores significativos para $p < 0,05$

5. DISCUSSÃO

Ao revisar o *Studbook* da espécie e analisar o heredograma do grupo em cativeiro no Brasil foi possível identificar a existência atual de três famílias distintas, distribuídas na FPZSP, no CPRJ e no PESC. A família da FPZSP é formada por 14 indivíduos (467, 473, 471, 472, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 502), originados da reprodução entre a fêmea 430 (Kinha) e o macho 412, totalizando 16 animais nesta família (Figura 17). No entanto, mais 9 indivíduos também compõem os animais do recinto da FPZSP (392, 384, 464, 469, 470, 432, 457, 457, 421). A segunda família identificada pertence ao CPRJ e é formada por 17 indivíduos, sendo 10 indivíduos de origem do casal 408-312 (424, 425, 426, 427, 428, 431, 436, 481, 486, 487). O casal 337-308 originou três indivíduos (385, 400, 408). O casal 400-487 originou um indivíduo somente (488). Finalmente o casal 400-412 originou o indivíduo 437 (Figura 18). A família estabelecida no PESC está conformada por quatro indivíduos, sendo que o casal 399-386 deu origem aos indivíduos 500 -501 (Figura 19). Os genótipos de cada grupo familiar são mostrados no Anexo 3.

Figura 17- Grupo Familiar Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Machos e fêmeas são representados por círculos y quadrados respectivamente. Indivíduos de vida livre são coloridos de verde e vermelho. Embaixo de cada indivíduo se mostra o número da identificação no *Studbook* o número de identificação que foi dado neste estudo e entre parêntesis o número da geração a qual pertence. Encima de cada indivíduo se mostra o ano de nascimento e/ou falecimento.



Embora nosso estudo não tenha tido acesso às amostras dos nove indivíduos vivos atualmente existentes em recintos na Inglaterra, é importante ressaltar que a maioria deles apresenta alto grau de relacionamento com os 14 indivíduos analisados neste trabalho, segundo os dados disponíveis no *Studbook* (Figura 20).

Figura 18- Grupo Familiar Parque Ecológico São Carlos. Machos e fêmeas são representados por círculos y quadrados respectivamente. Embaixo de cada indivíduo se mostra o número da identificação no *Studbook* o número de identificação que foi dado neste estudo e entre parêntesis o número da geração a qual pertence. Encima de cada indivíduo se mostra o ano de nascimento e/ou falecimento.

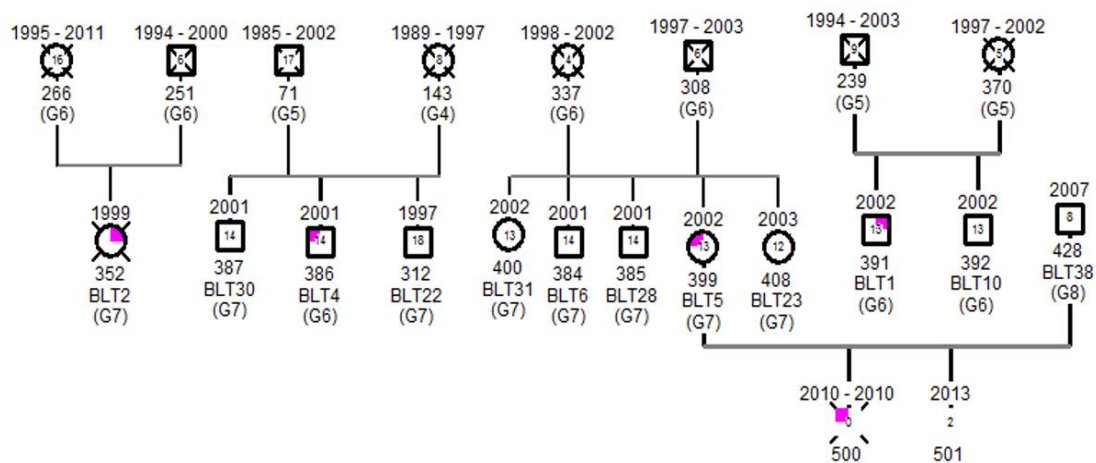


Figura 19- Grupo Familiar do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro. Machos e fêmeas são representados por círculos y quadrados respectivamente. Embaixo de cada indivíduo se mostra o número da identificação no *Studbook* o número de identificação que foi dado neste estudo e entre parêntesis o número da geração a qual pertence. Encima de cada indivíduo se mostra o ano de

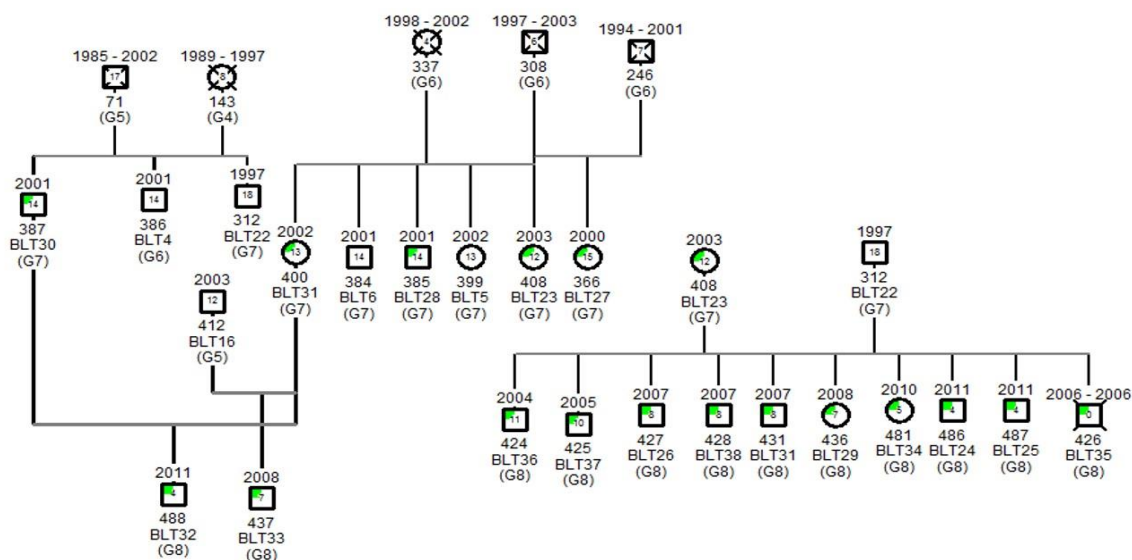
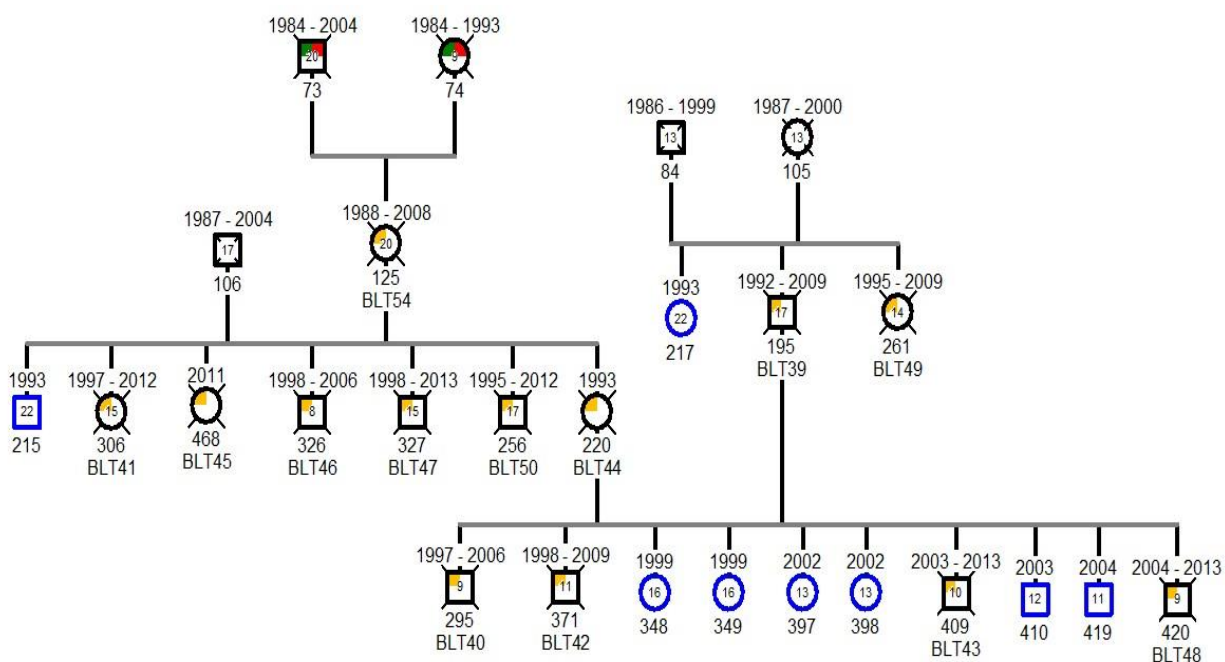


Figura 20- Grupo Familiar Inglaterra. Machos e fêmeas são representados por círculos y quadrados respectivamente. Embaixo de cada indivíduo se mostra o número da identificação no *Studbook* e o número de identificação que foi dado neste estudo. Encima de cada indivíduo se mostra o ano de nascimento e/ou falecimento. Em azul indivíduo vivos; em amarelo espécimes mortos analisados neste trabalho.



Considerando a importância dos atuais grupos familiares para o programa de conservação da espécie e o objetivo de manter uma alta diversidade genética, a compreensão da estrutura da população do mico-leão-preto em cativeiro é fundamental. Como mostrado pela análise do *Studbook*, a reprodução desigual das linhas fundadoras selvagens muitas vezes conduz ao aumento da endogamia nas gerações futuras, e a uma perda da diversidade genética (Lacy, 1989). Este estudo confirma que a população do mico-leão-preto em cativeiro apresenta perda de cerca de 12,2% da diversidade de genética original, conforme os dados disponíveis no *Studbook*, considerando o total de animais (vivos e em óbito). Além disso, foram observados altos valores de endogamia por geração, sendo que o parentesco médio estimado em 0,122 indica que os indivíduos estejam relacionados em nível de meio irmãos como descrito no trabalho de Ralls e Ballou, 2004. De acordo com o número de equivalentes fundadores estabelecido para os grupos cativos no Brasil, seria necessária a introdução de pelo menos seis novos fundadores para manter o mesmo nível de diversidade genética atualmente observada nestes grupos.

Quando analisados os dados moleculares foi observado que mesmo sendo famílias estabelecidas em recintos diferentes todos os indivíduos possuem vários alelos iguais. Os valores negativos do *F_{is}* teoricamente mostram que existe um sistema de fuga de endogamia (exogamia) o que é indício que nos recintos estão evitando os acasalamentos entre indivíduos altamente aparentados, no entanto mesmo que se estejam evitando esses acasalamentos o grau de parentesco entre os indivíduos é alto como descrito teoricamente descrito por Templeton em 2006.

Segundo Ralls e Ballou 2004, as colônias em cativeiro deveriam ser uma reserva tanto demográfica como genética. De acordo Valladares-Padua e colaboradores (2002), se grupos em cativeiro forem manejados como subpopulações de uma metapopulação, um tamanho populacional de 150 a 200 animais seria suficiente para manter 95% da diversidade genética da metapopulação (VALLADARES-PADUA, C.B., BALLOU J.D., MARTINS SADDY C., 2002). No entanto, apenas 88% da diversidade genética desde a fundação tem sido mantida nos grupos de mico-leão-preto em cativeiro no Brasil. A maioria dos animais fundadores não conseguiu se reproduzir e, como resultado, a representatividade da população em cativeiro é cada vez menor, tanto demográfica como genética (WORMELL, 2012).

Uma análise feita pelo *Studbook keeper* do mico-leão-preto no software PMX demonstrou que com o tamanho populacional atual dos grupos em cativeiro, apenas 49% da diversidade genética será mantida ao longo dos próximos 100 anos. Por tanto, dadas as metas de gestão e tendo em conta os valores de pedigree e a demografia atual desses grupos, seria adequado tentar reproduzir todas as fêmeas adultas em cativeiro, visando o aumento do tamanho da população. Há também uma necessidade de começar a tentar reproduzir mais fêmeas em cativeiro para corrigir o déficit de indivíduos mais jovens nos grupos de cativeiro. Além de manter viável as populações em cativeiro, este manejo poderia contribuir para reintrodução de animais na natureza.

É importante destacar que quando os programas de reprodução em cativeiro são estabelecidos a partir de um número reduzido de reprodutores, como no caso do mico-leão-preto, em que em geral ocorre efeito de gargalo, as estimativas de parentesco e coeficientes endogamia médios costumam ser sobrestimados nas análises que consideram apenas os dados de pedigree, sendo importante que análises moleculares sejam também realizadas com o objetivo de avaliar o status genético dos grupos avaliados.

No presente trabalho, a análise dos dados moleculares demonstrou que apesar das diferentes famílias representantes do mico-leão-preto em cativeiro estarem alocadas em recintos distintos, estas compartilham um grande número de alelos. Os valores negativos do *F_{is}* teoricamente mostram que existe um sistema de fuga de endogamia (exogamia), o que pode ser um indício de que o manejo realizado nestes recintos esteja evitando acasalamentos entre indivíduos altamente aparentados. Entretanto, mesmo evitando-se esses acasalamentos, o grau de parentesco entre os indivíduos ainda permanece alto como descrito teoricamente por Templeton, 2006.

Os resultados apresentados neste estudo indicam que a diversidade genética do grupo em cativeiro é reduzida, considerando o conjunto de locos microssatélites utilizado. Estudos realizados anteriormente com 47 *loci* de aloenzimas em 16 indivíduos de *L. chrysopygus* demonstraram baixíssimo polimorfismo nesta espécie, a qual evidenciou apenas dois locos (4,3%) polimórficos com dois alelos cada um (Forman et al., 1986). Essa quase ausência de variação genética também foi observada em populações de vida livre e cativeiro da espécie *L. rosalia* por Valladares-

Padua (1987). Neste estudo, os 25 locos enzimáticos testados mostraram-se monomórficos, sugerindo que e níveis baixos de diversidade genética sejam um traço compartilhado pelos representantes da família *Callitrichidae*, ao menos para os locos avaliados.

Martins e colaboradores (2011), propõem que para os dados de microssatélites as comparações entre populações devem idealmente ser feitas em relação à riqueza alélica e não em relação aos valores de heterozigosidade esperada, como é observado na maioria dos estudos, uma vez que as estimativas de heterozigosidade estão relacionadas ao tamanho amostral. Apesar desta indicativa, valores de riqueza alélica têm sido raramente descritos na literatura para estudos dessa natureza.

Embora em um estudo mais recente, Caldano *et al.* (2014), tenham descrito os valores de riqueza alélica (2,42) para uma população de mico-leão-preto da região de Capão Bonito, a maioria dos trabalhos, em geral, reporta o número médio de alelos por loco. Graviton e colaboradores (2001) encontraram um número médio de alelos por loco de 5,25 em cinco grupos familiares da espécie *L. rosalia*. Martins *et al.* (2010) encontraram uma média de 2,56 e 2,67 em duas populações de *L. caissara* e Neivergelt e colaboradores (2000) observaram um número médio de alelos igual a 3,09 para o sagui *Callithrix jacchus*, espécie relacionada à *Leontopithecus*. Apesar dessas informações serem importantes, estes dados não necessariamente refletem a diversidade genética dessas populações, uma vez que a descrição do o número de alelos por si também depende do tamanho amostral e representatividade da amostra avaliada.

No presente estudo foi observado um número médio de 3,0 alelos por loco no grupo em cativeiro, valor maior que aquele observado nos indivíduos de vida livre (2,42) analisados com o mesmo conjunto de marcadores. Além disso, houve também a presença de alelos exclusivos, demonstrando que o grupo de cativeiro difere do grupo da região de Capão Bonito. As oscilações, perdas ou fixação dos alelos podem surgir a partir da ação da deriva genética ou seleção ao cativeiro. O baixo nível de polimorfismo observado pode ter sido devido ao tamanho amostral no caso dos indivíduos selvagens e número de alelos observado nos dos grupos comparados pois estas duas variáveis estão correlacionas. Outros fatores podem ter influenciado no baixo nível de polimorfismo encontrado como é a transferibilidade, já

que são alguns dos marcadores utilizados neste trabalho são originários de outras espécies, e se sabe que ao se trabalhar com marcadores heterólogos espera-se uma redução no número de alelos observados. Além disso, os animais amostrados tem uma similaridade genética, contribuindo para o baixo nível de polimorfismo (DE AGUIAR SILVESTRE, 2012).

Os valores de heterozigosidade esperada estimados para os grupos de cativeiro do CPRJ, da FPZSP, do PESC e do DCT, calculados com os locos microssatélites, mostraram um valor médio muito maior do que aqueles reportados na literatura para marcadores enzimáticos (FORMAN et al., 1986: 47 loci de aloenzimas, $H= 0.001$, VALLADARES-PADUA 1987: 25 loci, $H=0$), o que é esperado uma vez que locos enzimáticos apresentam em geral um baixo polimorfismos devido sua alta pressão de seleção (PAIM, 1995). Por outro lado, os dados de heterozigosidade esperada foram similares aos observados em às populações naturais (PEREZ SWEENEY et al., 2005: 15 loci, $H= 0.29$, CALDANO et al., 2014: 20 loci, $H= 0,43$), incluindo a população de vida livre aqui analisada ($H= 0,40$), sugerindo que tanto as populações de cativeiro quanto as de vida livre apresentam valores comparáveis de heterozigosidade esperada, a despeito de não necessariamente este conjunto de locos microssatélite ter sido igual em todos os estudos mencionados.

Sendo assim, considerando os de valores número de alelos por loco e de heterozigosidade esperada para locos microssatélites reportados para espécies do gênero *Leontopithecus*, podemos dizer que estes valores são baixos e em geral similares entre os grupos de cativeiro e as populações de vida-livre. Esta baixa diversidade genética evidenciada nos *Callitriquídeos* tem atraído a atenção de pesquisadores. Pope (1996), por exemplo, sugere que estes dados possam ser explicados pelo sistema social deste grupo, no qual a reprodução é geralmente limitada a uma e, ocasionalmente, duas fêmeas dominantes por grupo (DIETZ; PERES; PINDER, 1997; GOLDIZEN, 1990). Além disso, os machos dominantes da família *Callitrichidae* geralmente são os parentais da maioria das crias no grupo (FAULKES; ARRUDA; MONTEIRO DA CRUZ, 2003; HUCK et al., 2005; NIEVERGELT et al., 2000). Alguns estudos *in situ* também mostram que o comportamento agressivo dos indivíduos dominantes limita o acesso para o acasalamento de indivíduos do mesmo sexo que são subordinados ao sexo oposto (ABBOTT et al., 1997).

Outra hipótese para explicar os baixos níveis de variabilidade genética encontrados nos Calitriquídeos é a redução do tamanho efetivo populacional dos grupos de cativeiro e de vida livre e a conseqüente possibilidade crescente de aumento nas taxas de endogamia. Esses fatores combinados além de alguns problemas na natureza como são as oportunidades limitadas de dispersão e também o limitado número de vagas para novos reprodutores em ambientes saturados resultam em uma baixa taxa de reprodução (POPE, 1996).

Em relação às estimativas de heterozigosidade individual, o presente trabalho explorou o índice de relacionamento interno (IR), proposto por Queller e Goodnight's (1989), que é uma medida baseada na estimativa de relacionamento entre dois grupos ou indivíduos. De forma geral a estimativa de heterozigosidade individual pelo IR é feita pela comparação entre pares de indivíduos, considerando-se dois alelos de diferentes locos ao invés do genótipo desses locos. Uma vez que a quantidade a ser medida é entre a média dos genótipos dos pais de um indivíduo, este índice serve como uma medida de relacionamento (AMOS et al., 2001; APARICIO; ORTEGO; CORDERO, 2006). Os valores de IR podem variar de 1 a -1, sendo que o valor máximo é obtido quando todos os locos são homozigotos independentemente das frequências alélicas. O mínimo valor é atingido quando todos os locos apresentam somente dois alelos e o indivíduo é heterozigoto para todos eles. Valores negativos de IR indicam heterozigosidade elevada enquanto que valores positivos indicam elevada homozigosidade (APARICIO; ORTEGO; CORDERO, 2006). No presente trabalho, foram encontrados valores negativos para a maioria dos indivíduos analisados, indicando elevada heterozigosidade individual nos locos analisados.

As proporções genóticas observadas nos grupos (Brasil, Inglaterra) analisados apresentaram desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg em 10 e seis dos locos, com valores de p significativo após a correção sequencial de Bonferroni ($0,0033 < \alpha < 0,05$), provavelmente, devido ao excesso de heterozigotos observados. Segundo Romana-Eguia et al. (2004), este resultado é esperado em grupos mantidos em cativeiro, já que desvios nas frequências, provocados eventualmente pela deriva genética, tendem a ampliar-se com o passar das gerações, ocasionando a perda de alelos e conseqüente redução da variabilidade genética. No presente trabalho, apesar de termos observado um número de heterozigotos maior do que esperado, a diversidade de genótipos heterozigotos foi baixa devido ao reduzido número de alelos. Esta heterozigosidade "limitada" pode interferir na capacidade de uma população de

se adaptar a mudanças ambientais. No caso de indivíduos de cativeiro, que possivelmente poderão ser utilizados em programas de reintrodução de espécies na natureza, este evento pode comprometer os planos de conservação das populações naturais, especialmente aquelas em risco de extinção, (ROMANA-EGUIA; EGUIA, 2004) como é o caso da espécie *L. crysophygus*.

A baixa variabilidade que vem sendo observada tanto nos grupos em cativeiro como nos grupos de vida livre de mico-leão-preto pode também ser atribuída à endogamia das distintas progênies ao longo das gerações. Segundo Cuervo (2010), caso não haja uma contribuição reprodutiva de todos os indivíduos em cativeiro, perdas significativas na diversidade genética poderão ocorrer a cada geração. Avaliações monitoradas da riqueza alélica desses grupos ao longo das gerações poderão indicar se está perda está sendo efetiva. Desta forma, apesar da heterozigiosidade ser um importante estimador de diversidade, dados de riqueza alélica podem ser mais informativos, uma vez que a perda de alelos pode prover diferenças significativas no sucesso reprodutivo (CUERVO, 2010).

O coeficiente de endogamia (*Fis*) médio foi de -0,472 e -0,727 para os grupos mantidos em cativeiro no Brasil e na Inglaterra, respectivamente. Apesar destes dados indicarem um sistema de exogamia, estes valores foram menor que aqueles determinados a partir dos coeficientes de endogamia pela análise dos heredograma, baseada nos dados de *Studbook* (*F*). Este fato se deve provavelmente à estreita relação entre os fundadores, bem como a existência de homoplasia e de alelos nulos, os quais podem aumentar consideravelmente os valores de *Fis*. Partindo deste pressuposto seria esperado que os valores de *Fis* fossem maiores que o coeficiente de consanguinidade baseado no *Studbook* (WITZENBERGER; HOCHKIRCH, 2013). Por outro lado, os valores de *Fis* negativos evidenciaram um excesso de heterozigotos. O excesso de heterozigotos observado no grupo de cativeiro, com base no seu registro de pedigree, pode ser devido à troca de alguns animais entre os diferentes recintos brasileiros, manejo realizado como estratégia para evitar o acasalamento entre indivíduos aparentados. Entretanto, todos estes indivíduos possuem algum grau de relacionamento, como evidenciado pelos dados de *Studbook* e moleculares. Comparando esses dados, aos da população de Capão Bonito, incluindo os resultados descritos por Caldano (2014), apesar de haver uma ausência de endogamia, um baixo grau de parentesco é observado entre os indivíduos reprodutores desse grupo.

A análise de paternidade evidenciou uma alta frequência dos mesmos alelos nos parentais e nas progênes nos grupos estudados, demonstrando que a variabilidade genética observada na progênie é representativa da geração parental. De forma geral, não ocorreu perda significativa de alelos nas geração descendentes, indicando que a escolha dos casais esteja sendo adequada (LOPERA-BARRERO et al., 2014). É importante ter em conta que o fato de dois ou mais indivíduos possuírem os mesmos genótipos não significa que obrigatoriamente a origem dos alelos seja a mesma (DE SOUZA; MELGAÇO; PARADELA, [s.d.]

Ao desenvolver um programa de reprodução em cativeiro para fins conservacionistas é importante que haja um manejo adequado da reprodução para evitar uma perda significativa de diversidade genética e um aumento na endogamia (ALLENDORF, 1987). Neste sentido, a determinação da estrutura familiar e das relações de parentesco entre os reprodutores e as progênes disponíveis, é um dado de extrema importância. No presente trabalho, a probabilidade combinada de exclusão (Excl1) de um candidato não relacionado, considerando todo o painel de microssatélites e conhecendo-se o genótipo do outro parental, teve um valor de 0,927, indicando que os marcadores utilizados neste estudo são eficientes para determinação da paternidade. O uso desse marcadores em conjunto com outros locos mais polimórficos poderá melhorar a probabilidade de exclusão, principalmente quando o genótipo materno não é conhecido, e também aumentar o poder de exclusão quando os animais tem alto grau de parentesco.

Os resultados de paternidade apresentados pelo programa Cervus foram em sua maioria consistentes com os dados do *Studbook*. A principal vantagem em utilizar este método é que o programa possibilita que o usuário informe possíveis erros de genotipagem, aumentando a confiabilidade dos dados gerados. Quanto maior a qualidade dos dados, melhor a robustez do resultado. Além disso, o método usado pelo programa indica o pai mais provável dentre os possíveis candidatos, sem fazer a exclusão da paternidade. Por outro lado, graças ao teste de paternidade mediante o método de verossimilhança foi possível comprovar a confiabilidade das atribuições dos pais que constam no *Studbook*, já que quando foi utilizado a análise de parentesco mediante outros estimadores a maioria das atribuições foi errada.

A combinação dos métodos de verossimilhança e do método de Bayes para estabelecimento da probabilidade de paternidade, apresentada neste estudo,

aumenta a acurácia desta determinação, uma vez que o genótipo materno é informado. O método que utiliza a razão de verossimilhança (CERVUS) é robusto a erros de genotipagem (MARSHALL, T C, SLLATE, J, KRUIK, L.B.E, PAMBERTON, 1998; SLATE et al., 2000), facilitando a genotipagem a larga escala. Por outro lado o fornecimento de um dado a priori, tendo como base uma probabilidade de 0,5, direciona a análise de verossimilhança. Utilizando este tipo de abordagem, dos seis indivíduos que apresentaram atribuições incorretas, dois tiveram sua paternidade solucionada.

Apesar da inclusão de dois indivíduos utilizando essa abordagem, uma baixa percentagem de determinação de paternidade foi observada. Este resultado pode ser devido a vários fatores como, por exemplo, o grau de relacionamento genético entre os progenitores, que pode afetar a probabilidade de paternidade e reduzir a capacidade em detectar um macho falsamente atribuído, além de gerar falsas inclusões de paternidade. Em estudos de determinação de paternidade, em geral costuma-se comparar duas hipóteses: (i) o suspeito ser o pai biológico da progênie em relação a outro macho não relacionado geneticamente, (ii) o suposto pai, mesmo quando os indivíduos são parentes, ser de fato o pai. Os casos analisados comparando-se essas hipóteses tendem a gerar resultados superestimados, por não considerarem a possibilidade de os alelos compartilhados entre o suposto pai e o filho serem idênticos por descendência, ou seja, do alelo ter sido transmitido pelo avô para a mãe e para pretensa progênie (RODRIGUES; GARRIDO; SANTOS, 2013).

Os valores de *FST* e *RST* entre os grupos cativos e o grupo de vida livre foram significativos. Segundo Waples (1998) e Hedrick (1999), embora seja frequente encontrar valores significativos de *FST* e *RST*, nem sempre é possível explicar biologicamente essa diferenciação. No presente estudo uma alta homogeneidade genética foi observada entre os grupos de cativeiro do Brasil. Desconsiderando os valores de *p*, *FST* entre 0 e 0,05 indicam baixa diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15, diferenciação moderada, entre 0,15 e 0,25, grande diferenciação, e valores acima de 0,25 indicam ampla diferenciação genética (HARTL; CLARK, 1997; WRIGHT, 1965). Como já mencionado, este fato pode ser devido a troca “recente” de animais (reprodutores) entre os recintos brasileiros. De acordo com Laval et al. (2000), nestes grupos, a “migração” tem efeito maior na redução da diferenciação genética do que a acumulação de mutações ou deriva genética.

A análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou uma alta diferenciação entre os grupos de cativeiro e de vida livre ($F_{ST} = 0,251$ e $R_{ST} = 0,429$, $p < 0,01$). Esta acentuada diferenciação entre os animais do Brasil e os da Inglaterra decorre de não haver fluxo gênico entre esses grupos pela troca de reprodutores putativos e, a despeito da origem dos fundadores ser comum (Morro do Diabo), um grande número de gerações ter decorrido após a fundação desses grupos. Além do mais, recintos situados na área natural da espécie facilitam a reprodução em cativeiro (WITZENBERGER; HOCHKIRCH, 2013), como é o caso da FPZSP, contribuindo para o aumento dos grupos de cativeiro. Por outro lado, no zoológico de Durrell, a reprodução em cativeiro, ineficaz aliada a não introdução de novos animais a este recinto, contribui para ausência de incremento variação dentro do recinto e para o aumento de variação entre este recinto e os demais aqui analisados.

Da mesma forma, uma alta diferenciação foi observada entre os grupos de cativeiro do Brasil e do zoológico de Durrell e o a população de Capão Bonito. A comparação dos valores de F_{ST} e R_{ST} pode fornecer alguns insights sobre as principais causas dessa diferenciação (HARDY et al., 2003). Na maioria dos casos, valores de R_{ST} apresentam o mesmo padrão de diferenciação dos de F_{ST} . No entanto, para grupos de cativeiro, que encontram-se sob um padrão evolutivo diferenciado de populações naturais, é esperado um valor de R_{ST} maior que o valor F_{ST} , como observado no presente trabalho (HARDY et al., 2003).

Os dados de análise de correspondência fatorial (PCA) confirmaram a diferenciação dada pela AMOVA, mostrando que os grupos brasileiros em cativeiro apresentaram maior homogeneidade entre si, quando comparados ao grupo do zoológico de Durrell e à população de Capão Bonito. Mesmo havendo compartilhamento de alelos entre os grupos, houve uma distribuição em quadrantes distintos dos indivíduos de Capão Bonito, do Brasil e da Inglaterra.

No presente trabalho, tanto as análises genéticas quanto as de *Studbook* demonstraram que as estimativas de parentesco estabelecidas para a maioria dos indivíduos de *L. chrysopygus* mantidos em cativeiro, indicam algum grau de relacionamento entre estes. Neste contexto, o manejo adequado da reprodução *ex situ* desses animais torna-se um grande desafio para as instituições que mantêm esta espécie em cativeiro. Considerando estes dados, e o panorama atual da espécie, mesmo que o manejo priorize o cruzamento entre indivíduos menos aparentados, e

que um excesso de heterozigotos esteja sendo observado nos grupos cativos, simulando uma fuga de endogamia, comumente observada em populações de vida livre, os reprodutores atualmente disponíveis em cativeiro apresentam uma estreita relação genética e uma baixa diversidade de alelos, características que, em geral, não costumam assegurar a manutenção da diversidade genética e viabilidade populacional em longo prazo (HEDRICK, 2001).

Tradicionalmente o objetivo principal dos programas de reprodução em cativeiro tem sido manter níveis de diversidade genética representativos das populações de vida livre (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002). Obviamente que esta é uma tarefa extremamente difícil já que nem sempre é possível introduzir novos animais da natureza para renovar o pool genético dos grupos cativos. Assim, com o passar das gerações, os animais de cativeiro tendem a aumentar as taxas de endocruzamento e conseqüentemente de endogamia. Neste processo, alelos raros ou de baixas frequências podem ser perdidos, seja pelo efeito aleatório da deriva genética, seja pela reprodução de poucos indivíduos. Por outro lado, alelos recessivos prejudiciais podem ser expostos pelo aumento da homozigosidade para estes locos, diminuindo assim o fitness da população (HEDRICK, 2001).

Alternativamente, os dados moleculares podem fornecer informações uteis para direcionar os cruzamentos entre indivíduos que, mesmo aparentados, possuam conjuntos de alelos diferenciados, evitando a perda de alelos raros. Além dessa abordagem, aspectos relacionados ao comportamento reprodutivo da espécie também precisam ser estudados para que a reprodução dos animais em cativeiro seja efetiva e gere proles viáveis. Esta condição, apesar de desejável, nem sempre é observada, já que animais de cativeiro costumam apresentar baixa taxa de copulação e mobilidade dos espermatozoides e altas taxas de infertilidade e de mortalidade de filhotes (como dito na reunião Mico em prosa). No gênero *Leontopithecus*, estes problemas estão se apresentando bem mais evidentes nos grupos de cativeiro da espécie de mico-leão-preto que em grupos de outras espécies. Além disso, muito pouco se sabe sobre quais genes influenciam diretamente o comportamento reprodutivo desses animais e por que alguns animais não conseguem se reproduzir em cativeiro.

Outra questão relevante a ser considerada é que embora os dados obtidos no presente trabalho estejam mostrando uma tentativa de evitar a endogamia

em cativeiro, aspectos relacionados à diminuição da performance reprodutiva comumente estão associados a elevadas taxas de endogamia e ao consequente efeito da depressão endogâmica (NEWMAN, D., PILSON, 1997). Neste sentido, a análise dessas populações deve priorizar a inclusão de novos marcadores moleculares, e a associação a estudos comportamentais. Esta abordagem integrada pode ser uma estratégia eficiente para contribuir com definições de práticas de manejo mais eficazes que visem reproduzir esses animais em cativeiro, não somente com a finalidade de manter os grupos cativos viáveis e autossustentáveis, mas principalmente com o objetivo de manter o potencial evolutivo da espécie e assim diminuir o seu risco de extinção. Esta análise integrada deve reforçar a importância de acrescentar aos *Studbooks* dados relativos à diversidade e divergência genética dos grupos de cativeiro, correlacionando-os, se possível, a dados de populações de vida livre. Além disso, informações sobre o comportamento reprodutivo dos animais também deverão enriquecer o *Studbook*, fazendo com que sua análise sirva não somente para o registro genealógico dos animais, mas também para estudos que viabilizem a determinação de cruzamentos *ex situ* eficientes, com vias a reintrodução *in situ*, caso esta seja necessária. Apesar do presente estudo ter tentado correlacionar dados genéticos a dados de fitness, a escassez de informações relacionadas a performance dos animais em cativeiro e o baixo número de reprodutores impediu a realização de uma análise mais robusta. Neste sentido, novas análises, considerando o tratamento dos dados disponíveis, deverão ser futuramente realizadas. Tais estudos poderão servir como modelo para o manejo da espécie *L. chrysopygus* e para o de outras espécies ameaçadas.

6. CONCLUSÕES

- A análise dos dados do *Studbook* demonstrou que a população de mico-leão-preto em cativeiro teve uma perda de diversidade de genética de 12,2%, e que os indivíduos apresentam um parentesco médio equivalente a meio irmãos.
- O estudo do *Studbook* também demonstrou que de acordo com o número de equivalentes fundadores seria necessária a introdução de pelo menos seis novos animais para manter os níveis diversidade genética, atualmente observados nos grupos em cativeiro.
- Valores de endogamia de heredograma altos foram observados em alguns indivíduos, sugerindo que esses animais não devem ser utilizados na reprodução em cativeiro.
- Os valores de endogamia estimados podem ser maiores do que os determinados, uma vez que alguns destes indivíduos podem ser relacionados, podendo ter havido uma possível sobre estimativa do verdadeiro número de fundadores.
- Embora os 15 locos avaliados não tenham sido altamente informativos, estes apresentaram-se adequados para avaliar a variabilidade genética de *Leontopithecus crysophygus*.
- O nível de diferenciação genética observada entre os grupos cativos foi baixa. Esse padrão pode ser explicado pela troca de animais entre os recintos brasileiros e/ou pela origem comum dos grupos fundadores.
- A alta diferenciação observada entre os grupos de cativeiro e a população de Capão Bonito sugeriu um padrão evolutivo pouco observado em animais sob “domesticação”, refletindo um tempo curto de divergência entre os dois grupos comparados.
- Os 15 locos microssatélites utilizados no presente trabalho constituem um painel de marcadores eficaz para ser utilizado em estudos de verificação de paternidade, utilizando o método de máxima verossimilhança, com uma confiabilidade alta, sendo indicado o conhecimento do genótipo materno para aumentar a acurácia do teste.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ABBOTT, D. H. et al. The prenatally androgenized female rhesus monkey as a model for polycystic ovarian syndrome. **Androgen Excess Disorders in Women. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven**, p. 369–382, 1997.

ALLENDORF, F. W. Genetic management of hatchery stocks. **Population genetics and fisheries management.**, p. 141–160, 1987.

ALVES SILVA, E. **Avaliação de um painel de microssatélites para identificação animal / averiguação de paternidade e estrutura genética da população de cavalos de raça Mangalarga Marchador.** 2012. 72f. Tese (Mestrado em Genética)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerias, 2012.

AMOS, W. et al. The influence of parental relatedness on reproductive success. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 268, n. 1480, p. 2021–2027, 2001.

APARICIO, J. M.; ORTEGO, J.; CORDERO, P. J. What should we weigh to estimate heterozygosity, alleles or loci? **Molecular Ecology**, v. 15, n. 14, p. 4659–4665, 2006.

BAKER, A. J.; DIETZ, J. M.; KLEIMAN, D. G. Behavioural evidence for monopolization of paternity in multi-male groups of golden lion tamarins. **Animal Behaviour**, v. 46, n. 6, p. 1091–1103, 1993.

Ballou, J.D. and R.C. Lacy. Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in pedigreed populations. In J.D. Ballou, M. Gilpin, and T.J. Foose (eds.), *Population Management for Survival & Recovery. Analytical Methods and Strategies in Small Population Conservation.* Columbia University Press, New York. Pages, 1995.p.76-111

BALLOU, J. D.; FOOSE, T. J. Demographic and genetic management of captive populations. 1996.

BALLOU, J.D.; KLEIMAN, D.G.; MALLISON, J.J.C.; RYLANDS, A.B.; VALLADARES-PADUA, C.B.; LEUS, K. Lion Tamarin: Biology and Conservation. In: KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. (Ed.). **Micos-Leões. Biologia e Conservação.** Brasília: Washington: Smithsonian Institution, 2008. p. 568.

BEAUMONT M.A. E BRUFORD M.W. Microsatellites in conservation genetics. In: **Microsatellites: Evolution and Applications.** Oxford Uni ed.[s.l: s.n.]. p. 165– 182.

BELKHIR, K. et al. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. **Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR**, v. 5000, p. 1996–2004, 1996.

BIERMAN, A. **Refinement and validation of a microsatellite based identification and parentage testing panel in horses**. 2010. 72f. Tese (Magister Scientiae)- Department of Production Animal Studies, University of Pretoria, Ondertepoort, 2010.

BÖMCKE, E.; GENGLER, N. Combining microsatellite and pedigree data to estimate relationships among Skyros ponies. **Journal of applied genetics**, v. 50, n. 2, p. 133–43, jan. 2009.

BOWKETT, A. E. Recent captive-breeding proposals and the return of the ark concept to global species conservation. **Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology**, v. 23, n. 3, p. 773–6, jun. 2009.

CALDANO, L. **Censo populacional e avaliação da variabilidade genética das populações de mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus* Mikan, 1823) na Floresta Nacional de Capão Bonito- SP Lucas Tadeu**. 2014. 64f. Tese (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular)- Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São carlos 2014.

COIMBRA FILHO, A. F. Acerca da redescoberta de *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823) e apontamentos sobre sua ecologia. **Revista Brasileira Biologia**, v. 30, n. 4, p. 609–615, 1970.

COIMBRA FILHO, A. F. Animais predados ou rejeitados pelo sauí-piranga, *Leontopithecus r. rosalia* (L., 1766) na sua área de ocorrência primitiva (Callitrichidae, Primates). **Revista Brasileira Biologia**, v. 41, n. 4, p. 717–731, 1981.

COLTMAN, D. W. et al. Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population. **Evolution**, p. 1259–1267, 1999.

COULON, A. genhet: an easy-to-use R function to estimate individual heterozygosity. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 1, p. 167–9, jan. 2010.

COULSON, T. N. et al. Microsatellites reveal heterosis in red deer. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1395, p. 489–495, 1998.

CUERVO, L. **Caracterización genética de la población ex situ de *Crocodylus intermedius* (Graves, 1819) en Colombia mediante microsatélites**. 2010. 60f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas)- Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2010.

DALTOÉ, A. P. **Caracterização genética de *Alouatta caraya* (Primates , Atelidae) utilizando marcadores heterólogos do tipo microsatélites**. 2006. 61f. Tese (Mestrado em Biologia Animal)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2006.

DE AGUIAR SILVESTRE, E. **Caracterização genética de caprinos da raça anglonubiana no centro norte do Piauí**. 2012. 53f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento)- Programa de Pós- Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, , 2012.

DE SOUZA, M. C. P. P.; MELGAÇO, A. L. DOS S. F.; PARADELA, E. R. Investigação de vínculo genético por análise do DNA: os dados sempre oferecem suporte as conclusões? In: **Âmbito Jurídico**, Rio Grande, X, n. 45, set 2007. Disponível em: http://ambitojuridico.com.br/site/?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=2234&revista_caderno=6. Acesso em: abr. 2011.

DIETZ, J. M.; PERES, C. A.; PINDER, L. Foraging ecology and use of space in wild golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). **American Journal of Primatology**, v. 41, p. 289–305, 1997.

FAULKES, C. G.; ARRUDA, M. F.; MONTEIRO DA CRUZ, M. A O. Matrilineal genetic structure within and among populations of the cooperatively breeding common marmoset, *Callithrix jacchus*. **Molecular ecology**, v. 12, p. 1101–1108, 2003.

FIUMERA, A.; DEWOODY, J. Estimating the proportion of offspring attributable to candidate adults. **Evolutionary Ecology**, v. 16, p. 549–565, 2002.

FOERSTER, K. et al. Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings. **Nature**, v. 425, n. 6959, p. 714–717, 2003.

FOOSE, T. J. et al. Propagation plans. **Zoo Biology**, v. 5, p. 139–146, 1986.

FRANKHAM, R. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. **Molecular ecology**, v. 17, n. 1, p. 325–33, jan. 2008.

FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. **Introduction to conservation genetics**. [s.l.] Cambridge University Press, 2002.

FRANKHAM, R., HEMMER, H., RYDER, O.A., CONTHRAN, SOULÉ, M.E., MURRAY, N.D., SNYDER, M. Selection in Captive Populations. 1986.

FREEMAN, S.; HERRON, J. C. **Evolutionary analysis**. [s.l.] Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, 2007.

GALBUSERA, P. H. A.; GILLEMOT, S. Polymorphic microsatellite markers for the endangered golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichidae). **Conservation Genetics**, v. 9, n. 3, p. 731–733, 7 ago. 2007.

GARCIA, D. et al. Sib-parentage testing using molecular markers when parents are unknown. **Animal genetics**, v. 33, n. March, p. 364–371, 2002.

GLAUBITZ, J.; RHODES, O.; DEWOODY, J. Prospects for inferring pairwise relationships with single nucleotide polymorphisms. **Molecular Ecology**, p. 1039–1047, 2003.

GODOY, J. A. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. **Ecosistemas**, v. 18, n. 1, p. 23–33, 2009.

GOLDIZEN, A. W. A comparative perspective on the evolution of tamarin and marmoset social systems. **International Journal of Primatology**, v. 11, n. 1, p. 63–83, 1990.

GOUDET, J. FSTAT, version 2.9.3, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. **Lausanne University, Lausanne, Switzerland**, 2001.

GRATIVOL, A. D.; BALLOU, J. D.; FLEISCHER, R. C. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). n. 1998, p. 1–9, 2001.

HAIG, S. M.; BALLOU, J. D. Pedigree analyses in wild populations. **Population viability analysis. University of Chicago Press, Chicago**, p. 388–405, 2002.

HARDY, O. J. et al. Microsatellite Allele Sizes: A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation. **Computer**, v. 1482, n. April, p. 1467–1482, 2003.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. [s.l.] Sinauer associates Sunderland, 1997. v. 116

HEDRICK, P. Founder effect in an island population of bighorn sheep. **Molecular ...**, n. December 1998, p. 851–857, 2001.

HOLST, B. et al. **Lion Tamarin Population and Habitat Viability Assessment Workshop 2005, final report**. Lion Tamarin Population and Habitat Viability Assessment Workshop 2005, final report. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN, USA.2006.

HUCK, M. et al. Paternity and kinship patterns in polyandrous moustached tamarins (*Saguinus mystax*). **American Journal of Physical Anthropology**, v. 127, n. December 2004, p. 449–464, 2005.

JAMIESON, A; C S TAYLOR, S. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. **Animal Genetics**, v. 28, n. 6, p. 397–400, 17 dez. 1997.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, n. 314, p. 67–73, 1985.

JONES, A. G.; ARDREN, W. R. Methods of parentage analysis in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 10, p. 2511–2523, out. 2003.

JONES, K.; GLENN, T.; LACY, R. Refining the Whooping Crane *Studbook* by Incorporating Microsatellite DNA and Leg-Banding Analyses. **Conservation Biology**. v. 16, n. 3, p. 789–799, jun. 2002.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099–1106, 2007.

KINGHORN, B. P. Pedigree viewer—a graphical utility for browsing pedigreed data sets. Fifth World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Guelph, 7–12 August 1994. vol. 22, pp. 85–86.

KLEIMAN D., MALLISON., J. C. Recovery and Management committees for Lion Tamarins: Partnerships in Conservation Planning and Implementation. **Conservation Biology**, v. 12, n. 1, p. 27–38, 1998.

LACY, R. C. Analysis of founder representation in pedigrees - founder equivalents and founder genome equivalents. **Zoo Biology**, v. 8, p. 111–123, 1989.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Diversidade genética e paternidade de progênie de Brycon orbignyanus obtidas por diferentes sistemas reprodutivos Genetic diversity and paternity of Brycon orbignyanus offspring obtained for different reproductive systems. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina.**, v. v. 35, n. , p. 541–554, 2014.

LUTAAYA, E. et al. Inbreeding in populations with incomplete pedigrees. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 116, p. 475–480, 1999.

MARSHALL, T C, SLLATE, J, KRUIK, L.B.E, PAMBERTON, M. Statistical confidence for likelihood-based paternity. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639–655, 1998.

MEAGHER, T. R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. **American Naturalist**, p. 199–215, 1986.

MELLO, A. **Paternidade e Diversidade genética de caprinos no Brasil por meio de microssatélites de DNA**. 2004. 90f. Tese (Doutorado em Ciências)- Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2004.

MILLER, P. Selective Breeding Programs for Rare Alleles: Examples from the Przewalski's Horse and California Condor Pedigrees. **Conservation Biology**, v. 9, p. 1262–1273, 1995.

MORAES RODRIGUES, S. B.; GAGETTI, B. L.; PIRATELLI, A. J. First record of *Leontopithecus chrysopygus* (Primates: Callitrichidae) in Carlos Botelho State Park, São Miguel Arcanjo, São Paulo, Brazil. **Mammalia**, v. 0, p. 1–4, 2014.

NAKAMURA, Y. et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, v. 235, n. 4796, p. 1616–1622, 1987.

NEFF, B. D.; REPKA, J.; GROSS, M. R. Statistical confidence in parentage analysis with incomplete sampling: how many loci and offspring are needed? **Molecular Ecology**, v. 9, n. 5, p. 529–539, 2000.

NEWMAN, D., PILSON, D. Increased Probability of Extinction Due to Decreased Genetic Effective Population Size: Experimental Populations of *Clarkia pulchella*. **Evolution**, v. 51, p. 354–362, 1997.

NIEVERGELT, C. M. et al. Genetic Analysis of Group Composition and Breeding System in a Wild Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Population - Springer. **International Journal of Primatology**, v. 21, n. 1, p. 1–20, 2000.

OGDEN, R. et al. Genetic markers and sample types for pedigree reconstruction in Grevy's zebra (*Equus grevyi*). **Zoologische Garten**, v. 77, p. 29–35, 2007.

OYVIND, H. **PAleontological STatistics Version 2.16**, [s.d.].

PAIM, A. **Polimorfismo Enzimático e Variação Morfológica em uma População Natural de *Dryas iulia* (Fabr.1775) (Lepidoptera; Nymphalidae)**. 1995. 137f. Tese(Mestrado em Genética e Evolucao), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

PARKER, P. G. et al. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 361–382, 1998.

PASSOS, F. C.; ALHO, C. J. R. Importância de diferentes microhabitats no comportamento de forrageio por presas do mico-leão-preto, *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan) (Mammalia, Callitrichidae) 1. **Revista Brasileira Zool**, v. 18, n. 1, p. 335–342, 2001.

PEAKALL, R. O. D.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular ecology notes**, v. 6, n. 1, p. 288–295, 2006.

PEREZ-SWEENEY, B. M. et al. Dinucleotide microsatellite primers designed for a critically endangered primate, the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Molecular Ecology**, v. 5, n. 2, p. 198–201, 4 mar. 2005.

POPE, T. R. Socioecology, population fragmentation, and patterns of genetic loss in endangered primates. In: **Conservation Genetics**. [s.l.] Springer, 1996. p. 119–159.

RALLS, K.; BALLOU, J. D. Genetic status and management of California Condors. **Condor**, v. 106, n. 2, p. 215–228, 2004.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of heredity**, v. 86, n. 3, p. 248–249, 1995.

REZENDE, G. C. **Mico-leão-preto: a História de Sucesso na Conservação de uma Espécie Ameaçada**. Matrix, São Paulo. 2014. p.176

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, p. 223–225, 1989.

ROBERT, A.; COUVET, D.; SARRAZIN, F. Integration of demography and genetics in population restorations. **Ecoscience**, v. 14, n. 4, p. 463–471, dez. 2007.

RODRIGUES, E. L.; GARRIDO, R. G.; SANTOS, C. A. Associando Índice de Incesto e de Paternidade para discriminação de agressão sexual entre indivíduos aparentados

Associating the Incest and Paternity Index to discriminate sexual aggression among close blood relatives. **Saúde, Ética & Justica**, v. 18, n. 2, p. 141–145, 2013.

RÖHE, F., PINASSI, A., FARAH, C. The discovery of a new population of black lion tamarins (*Leontopithecus chrysopygus*) in the serra de paranapiacaba, são paulo, brazil. **Neotropical Primates**, v. 11, n. August, p. 29–30, 2003.

ROMANA-EGUIA, M. R. R.; EGUIA, R. V. Growth of five Asian red tilapia strains in saline environments. **Aquaculture**, v. 173, p. 161–170, 1999.

RUSSELLO, M. A.; AMATO, G. On the horns of a dilemma: molecular approaches refine ex situ conservation in crisis. **Molecular ecology**, v. 16, n. 12, p. 2405–6, jun. 2007.

RUSSELLO, M. A.; AMATO, G. Ex situ population management in the absence of pedigree information. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 9, p. 2829–2840, 2004.

RYLANDS, A. B. The ecology of the lion tamarins, *Leontopithecus*: some intrageneric differences and comparisons with other callitrichids. **Oxford University Press**, p. 296–313, 1993.

SADDY, M. C. **Conservação do Mico leão preto, tres tipos de manejo avaliados através da ecologia e comportamento**. 2003. 154f. Tese (Doutor em Ecologia)- Universidad Estadual de Campinas, 2003.

SEAL, U. S.; BALLOU, J. D.; VALLADARES-PÁDUA, C. *Leontopithecus* Population Viability Analysis. Saint Paul: Captive Breeding Specialist Group - IUCN, 1991. v. 1. 314p.

SLATE, J. et al. Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1453, p. 1657–1662, 2000.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p. 457–462, 1995.

SMOUSE, P. E.; MEAGHER, T. R. Genetic analysis of male reproductive contributions in *Chamaelirium luteum* (L.) gray (Liliaceae). **Genetics**, v. 136, n. 1, p. 313–322, 1994.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 5, p. 199–203, 2000.

THOMPSON, E. A. Ancestry of Alleles and Extinction of Genes in Populations With Defined Pedigrees. **Zoo Biology**, v. 5, p. 161–170, 1986.

TORRES, F. **Caracterização da diversidade genética, da estrutura populacional e do parentesco de Arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) por meio da análise de regiões dos genomas nuclear e mitocondrial**. 2010. 46f. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Biociências, Universidade de Sao Paulo, São Paulo, 2010.

VALLADARES-PADUA, C. **The ecology, behavior and conservation of the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*, Mikan, 1823)**. Tese (Doctoral dissertation) University of Florida, Gainesville., 1993.

VALLADARES-PADUA, C.B., BALLOU J.D., MARTINS SADDY C., C. L. Metapopulation management for the conservation of black lion tamarins. In: **Lion tamarins: biology and conservation**. Smithsonian ed.[s.l: s.n.]. p. 3–41.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.

WITZENBERGER, K. A.; HOCHKIRCH, A. Evaluating ex situ conservation projects: Genetic structure of the captive population of the Arabian sand cat. **Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 78, n. 5, p. 379–382, 2013.

WORMELL, D. **International *Studbook* for the Black Lion Tamarin *Leontopithecus chrysopygus* Compiled by :**, 2012.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, p. 395–420, 1965.

ANEXOS

Anexo 1- Alelos privados encontrados no grupo em cativeiro brasileiro e a população de Capão Bonito.

Locos		Grupo Brasil			Grupo Inglaterra		Grupo Capão Bonito	
Lchu01	213	221	223	225	183			
Lchu06					131			
Lchu07					293			
Lchu08	224	246			274	290		
P2BH6					138		140	
Leon2	213							
21c75							300	
15C85								
3C20	312							
30C73							286	
31C97							338	
11c72							304	314

Anexo 2- Valores dos cinco estimadores de heterozigosidade individual descritos na literatura para o grupo em cativeiro Brasileiro e a população de Capão Bonito.

Cativeiro					
Individuos	PHt	Hs_obs	Hs_exp	IR	HL
BLT1	0,80	1,121	1,517	-0,585	0,178
BLT3	0,53	0,748	1,012	-0,067	0,444
BLT4	0,60	0,841	1,138	-0,198	0,401
BLT5	0,60	0,841	1,138	-0,145	0,398
BLT6	0,73	1,028	1,391	-0,414	0,288
BLT7	0,73	1,028	1,391	-0,407	0,301
BLT8	0,87	1,215	1,644	-0,619	0,143
BLT9	0,87	1,215	1,644	-0,619	0,143
BLT10	0,67	0,934	1,265	-0,275	0,317
BLT11	0,67	0,934	1,265	-0,354	0,323
BLT12	0,60	0,841	1,138	-0,025	0,398
BLT13	0,73	1,028	1,391	-0,463	0,260
BLT14	0,67	0,934	1,265	-0,345	0,335
BLT15	0,73	1,028	1,391	-0,398	0,269
BLT16	0,60	0,841	1,138	-0,205	0,399
BLT17	0,80	1,121	1,517	-0,500	0,187
BLT18	0,80	1,121	1,517	-0,553	0,207
BLT19	0,53	0,748	1,012	0,020	0,486
BLT20	0,53	0,748	1,012	-0,088	0,465
BLT21	0,87	1,215	1,644	-0,654	0,125
BLT22	0,80	1,121	1,517	-0,551	0,160
BLT23	1,00	1,402	1,897	-0,824	0,000
BLT24	0,87	1,215	1,644	-0,691	0,098
BLT25	0,80	1,121	1,517	-0,590	0,187

BLT26	0,93	1,308	1,770	-0,784	0,036
BLT27	0,87	1,215	1,644	-0,687	0,125
BLT28	0,73	1,028	1,391	-0,482	0,246
BLT29	0,73	1,028	1,391	-0,411	0,286
BLT30	0,67	0,934	1,265	-0,299	0,322
BLT31	0,73	1,028	1,391	-0,421	0,246
BLT32	0,67	0,934	1,265	-0,406	0,299
BLT33	0,73	1,028	1,391	-0,417	0,219
BLT34	0,60	0,841	1,138	-0,184	0,427
BLT35	0,53	0,748	1,012	-0,111	0,463
BLT36	0,60	0,841	1,138	-0,250	0,389
BLT37	0,80	1,121	1,517	-0,467	0,219
BLT38	0,80	1,121	1,517	-0,466	0,212

Capão Bonito

Individuos	PHt	Hs_obs	Hs_exp	IR	HL
BLT39	0,67	0,934	1,265	-0,166	0,305
BLT40	0,60	0,841	1,138	-0,141	0,381
BLT41	0,60	0,841	1,138	-0,129	0,355
BLT42	0,67	0,934	1,265	-0,209	0,293
BLT43	0,67	0,934	1,265	-0,212	0,293
BLT44	0,60	0,841	1,138	-0,002	0,369
BLT45	0,80	1,121	1,517	-0,292	0,195
BLT46	0,80	1,121	1,517	-0,380	0,203
BLT47	0,60	0,841	1,138	-0,057	0,420
BLT48	0,73	1,028	1,391	-0,213	0,279

Anexo 3- Genótipos de cada grupo familiar

CPRJ	Lchu01	Lchu06	Lchu07	Lchu08	P2BH6	P5BE6	P3Af1	Leon 2	15C85	21C75	3C20	31C97	30C73	35c42	11c72
BLT22*	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 134	120/ 130	126/ 130	223/ 225	284/ 286	294/ 296	316/ 318	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT23*	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 230	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	284/ 286	294/ 296	316/ 318	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT24	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 134	120/ 130	126/ 130	223/ 225	284/ 286	294/ 296	316/ 318	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT25	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 134	120/ 130	126/ 130	223/ 225	284/ 286	294/ 296	316/ 316	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT26	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	284/ 286	294/ 296	316/ 318	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT29	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 134	120/ 130	126/ 130	223/ 225	284/ 286	294/ 296	316/ 316	328/ 328	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT34	223/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	284/ 286	294/ 296	316/ 316	328/ 340	276/ 276	219/ 219	307/ 323
BLT35	223/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	316/ 316	328/ 340	276/ 284	219/ 219	307/ 323
BLT36	223/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	316/ 316	328/ 340	276/ 284	219/ 219	307/ 323
BLT37	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 230	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	316/ 316	328/ 328	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT38	223/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 230	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	316/ 318	328/ 328	276/ 284	219/ 223	307/ 323

FPZSP	Lchu01	Lchu06	Lchu07	Lchu08	P2BH6	P5BE6	P3Af1	Leon 2	15C85	21C75	3C20	31C97	30C73	35c42	11c72
BLT16*	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	316/ 316	328/ 328	276/ 284	223/ 223	307/ 323
BLT19*	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 223	286/ 296	294/ 296	316/ 318	340/ 340	284/ 284	223/ 223	307/ 323
BLT17	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 296	294/ 296	316/ 318	328/ 340	276/ 284	223/ 223	307/ 323
BLT18	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 296	294/ 296	316/ 318	328/ 340	276/ 284	219/ 219	307/ 323
BLT20	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 296	294/ 296	316/ 318	328/ 340	276/ 284	219/ 219	307/ 323
BLT21	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 296	294/ 296	316/ 318	328/ 340	276/ 284	219/ 219	307/ 323

FPZSP	Lchu01	Lchu06	Lchu07	Lchu08	P2BH6	P5BE6	P3Af1	Leon 2	15C85	21C75	3C20	31C97	30C73	35c42	11c72
BLT11*	223/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	314/ 314	328/ 340	276/ 284	219/ 219	307/ 323
BLT7*	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 230	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	314/ 314	328/ 328	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT8	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 230	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	314/ 314	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT9	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 230	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	314/ 314	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT13	223/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	314/ 314	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323

FPZSP	Lchu01	Lchu06	Lchu07	Lchu08	P2BH6	P5BE6	P3Af1	Leon 2	15C85	21C75	3C20	31C97	30C73	35c42	11c72
BLT12*	221/ 221	195/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 296	294/ 296	314/ 314	328/ 340	276/ 284	223/ 223	307/ 323
BLT13*	223/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	314/ 314	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT14	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	314/ 314	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT15	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 136	120/ 130	126/ 130	223/ 225	286/ 296	294/ 296	314/ 314	328/ 340	276/ 284	223/ 223	307/ 323

FPZSP	Lchu01	Lchu06	Lchu07	Lchu08	P2BH6	P5BE6	P3Af1	Leon 2	15C85	21C75	3C20	31C97	30C73	35c42	11c72
BLT30*	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 134	120/ 130	126/ 130	223/ 225	284/ 286	294/ 296	316/ 316	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT31*	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	136/ 136	120/ /130	126/ 130	223/ 225	284/ 286	294/ 296	316/ 316	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323
BLT32	221/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 134	120/ 120	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	316/ 316	328/ 340	276/ 284	219/ 223	307/ 323

PESC	Lchu01	Lchu06	Lchu07	Lchu08	P2BH6	P5BE6	P3Af1	Leon 2	15C85	21C75	3C20	31C97	30C73	35c42	11c72
BLT4*	223/ 223	193/ 195	344/ 346	226/ 226	134/ 134	120/ 120	126/ 130	225/ 225	286/ 286	294/ 296	314/ 314	328/ 340	276/ 276	219/ 223	307/ 323
BLT5*	221/ 223	193/ 195	346/ 346	226/ 226	134/ 134	120/ 120	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	312/ 312	328/ 340	276/ 276	219/ 223	307/ 323
BLT3	221/ 223	193/ 195	346/ 346	226/ 226	134/ /134	120/ 120	126/ 130	223/ 225	286/ 286	294/ 296	312/ 314	328/ 340	276/ 276	219/ 219	307/ 323

