

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

Variabilidade genética e análise de parentesco de animais de cativeiro Muriqui-do-sul
(*Brachyteles arachnoides*, E. GEOFFROY, 1806)

Aluno: Fernando Peron Magrini

Co-orientadora: Prof. Dra. Danielly Veloso Blanck

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

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

Variabilidade genética e análise de parentesco de animais de cativeiro Muriqui-do-sul
(*Brachyteles arachnoides*, E. GEOFFROY, 1806)

Fernando Peron Magrini

Dissertação de Mestrado Profissional apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Conservação da Fauna

Co-orientadora: Prof. Dra. Danielly Veloso Blanck

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

São Carlos – 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Fundação Parque Zoológico de São Paulo pelo auxílio financeiro concedido para elaboração deste trabalho;

Ao programa de pós-graduação em Conservação da Fauna da Universidade Federal de São Carlos;

Ao SISBIO (ICMBio) pela autorização de manejo das amostras biológicas;

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, Parque Zoológico Quinzinho de Barros, Passeio Público de Curitiba e Criadouro Comercial Toca da Raposa pela colaboração com informações e amostras concedidas para realização do projeto;

Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram e incentivaram na escolha de carreira, e de fazer este mestrado, à todos que tiveram um dedinho de participação aqui e ali;

Aos meus pais e irmãos que sempre me apoiam e tentam me acalmar quando não sou eu mesmo, e sem os quais nada disso seria possível;

Ao meu orientador Pedro Manoel Galetti pela oportunidade, atenção e pelo tempo doado ao meu aprendizado e formação no LabBMC;

Aos professores e funcionários do Zoológico de São Paulo pelo carinho e atenção durante o período que passamos juntos. Também levo comigo boas amizades feitas lá;

Aos meus colegas de laboratório, que além de amigos para todas as horas, também são professores, que me ajudaram muito durante esses dois anos;

Em especial, um agradecimento a Paola, Karen e Dany que me aguentaram esses últimos anos, me ajudando, me atormentando, me forçando a cozinhar para elas, e acabaram se tornaram minha mais uma família postiça;

Agradeço a Malu, Pati e Naty, as outras 3 pernas da nossa mesa, que foi montada há 7 anos e se mantém firme e forte até hoje;

Aos meus colegas mestardados barangos, Gabi, Caio, May, Dods, Mármara, Rainha Sá e Patica. O marrom marrom nunca mais será o mesmo!;

A minha Julia que fez dos últimos meses do mestrado, os melhores. Obrigado por me aguentar!;

Aos meus colegas da república Camorra que são minha família São Carlense, e sempre aguentaram minhas neuras e estão sempre por perto;

A tantos outros que fizeram parte da minha vida durante toda estadia na Ufscar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 O muriqui-do-sul, <i>Brachyteles arachnoides</i>	9
1.2 Status de conservação do muriqui-do-sul	11
1.3 Genética de muriqui-do-sul	13
1.4 Marcadores moleculares como ferramenta para estudo genético.....	14
1.5 O papel da conservação <i>ex situ</i> para a conservação animal	15
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	17
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Amostragem	19
4.2. Análises moleculares	20
4.2.1. Extração de DNA	20
4.2.2. Amplificação dos loci microssatélites	21
4.2.3. Análises de genética populacional.....	24
4.2.4. Parentesco	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. Extração e Qualidade do DNA	26
5.2. Amplificação e Genotipagem dos <i>Loci</i> Microssatélites.....	26
5.3. Caracterização dos <i>Loci</i> Microssatélites em Muriqui-do-Sul	28
5.4. Caracterização da Variabilidade Genética do Muriqui-do-Sul de Cativeiro.....	31

5.5. Parentesco.....	40
6. IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DO MURIQUI-DO-SUL.....	44
7. CONCLUSÕES	46
8. REFERÊNCIAS	47
9. ANEXOS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto do gel de agarose, sob luz UV, contendo a extração do DNA de seis amostras de miquiqui-do-sul	26
Figura 2. Foto do gel de agarose, sob luz UV, da reação de amplificação dos primers P18 (L.chu06), P21 (Leon21c75), P7 (Leon31c97), P26 (AB06), P9 (Leon30c73) e P6 (Leon3c20)	28
Figura 3. Foto do gel de PCR purificada contendo todos os loci amplificados	29
Figura 4. Foto do sequenciamento do <i>loci</i> Leon3c20	30
Figura 5. Consenso da árvore de máxima parcimônia encontrada para 27 sequências alinhadas do gene ϵ -globina de primatas (Schneider <i>et al.</i> , 1993).....	31
Figura 6. Distribuição das frequências alélicas dos animais de cativeiro	36
Figura 7. Heterozigosidade observada neste trabalho e heterozigosidade encontrada na literatura	37
Figura 8. Heterozigosidade observada neste trabalho e heterozigosidade encontrada na literatura.....	38
Figura 9. Diversidade genética de Miquiqui-do-sul: Cativeiro x Natureza	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das amostras de muriquis-do-sul de cativeiro	19
Tabela 2. Sequências de marcadores microssatélites, constando identificação dos loci, espécie de origem, sequências dos pares de <i>primers</i> e temperaturas de anelamento.....	22
Tabela 3. Comparação das temperaturas de anelamento na literatura e temperaturas padronizadas para este estudo	27
Tabela 4. Comparação entre <i>motif</i> encontrado na literatura descrita para cada <i>loci</i> espécie-específico e <i>motif</i> encontrado para o Muriqui-do-sul	29
Tabela 5. Comparação entre tamanho dos alelos encontrados neste trabalho e na literatura	30
Tabela 6. Panorama genético dos muriquis de cativeiro.....	33
Tabela 7. Medidas de diversidade genética da população cativa de muriqui-do-sul.....	35
Tabela 8. Relações de parentesco na população como inferido pelo estimador de Queller & Goodnight usando o programa Coancestry	40
Tabela 9. Genótipos da fêmea 2049, mãe dos indivíduos machos 2583, 2263 e 2434.....	42

RESUMO

A principal ameaça à biodiversidade e diversidade genética para populações selvagens é a fragmentação de habitat decorrente da contínua ação antrópica, como desmatamento, mineração e caça, ligadas ao desenvolvimento humano. Essas atividades têm consequências diretas nas espécies animais e vegetais, alterando riqueza e modificando a dinâmica das populações ao afetar processos físicos, químicos e biológicos ligados às populações. Neste contexto, as populações de cativeiro de animais ameaçados de extinção assumem uma enorme importância para a conservação de diversas espécies, servindo como uma fonte de material genético e relações ecológicas. Portanto, o manejo dessas populações é fundamental para evitar diversos problemas-associados ao cativeiro, e uma das ferramentas para alcançarmos esses objetivos é a caracterização genética das populações. O miquiqui-do-sul é o maior primata neotropical, endêmico de florestas de Mata Atlântica ele consta na lista de animais ameaçados da IUCN na categoria de “Em Perigo de Extinção”. Utilizamos 8 *loci* microssatélites heterólogos para caracterizar a variabilidade genética e verificar possíveis relações de parentesco em 18 indivíduos de cativeiro. Os resultados indicam que a riqueza alélica e diversidade genética presente nos animais cativos é similar, quando não alta se comparada com outros estudos de cativeiro e *in situ*, contradizendo literatura predominante, atingindo valores médios de heterozigosidade esperada e riqueza de 0,619 e 5,253. As análises de parentesco deixaram algumas dúvidas, mas revelaram várias novas relações entre indivíduos cuja origem pré-cativeiro é incerta. Este trabalho prove informações fundamentais para criação de uma estratégia de manejo *ex situ* visando reprodução e manutenção da variação genética presente hoje nos cativeiros do Brasil, e a importância da produção de um *studbook* para a espécie, que facilitará o próprio manejo, assim como possíveis futuros trabalhos com a espécie.

Palavras-chave: Miquiqui. *Brachyteles arachnoides*. Genética. *Ex situ*. Microssatélite. Conservação.

ABSTRACT

The main threat to biodiversity and genetic diversity of natural populations is habitat fragmentation, caused by continuous anthropic actions such as deforestation, mining and hunting, all connected to human development. These activities have direct consequences on both vegetal and animal species, altering richness and modifying population dynamics by affecting physical, chemical and biological processes linked to the populations. In this context, captive populations of threatened animals take on huge responsibility onto conservation of several species providing a source of genetic material and ecological relations. Therefore, management of these populations is fundamental to avoid captive associated problems, and one of many tools used to achieve such goals resides in the genetic characterization of populations. The southern muriqui is the biggest neotropical primate, endemic of Atlantic Forest, it is in the threatened animals list of IUCN at the category "Endangered". We used 8 heterologous microsatellite *loci* to characterize the genetic variability and verify possible parentage relationships between 18 captive individuals. Results show that the allelic richness and genetic diversity identified in captive animals is similar, otherwise higher when compared to other captive and *in situ* studies, contradicting prevailing literature. We achieved values of mean expected heterozygosity of 0,619 and mean richness of 5,253. Parentage analysis may have left some doubts still, but revealed several new relationships between some individuals whose pre-captive origin is uncertain. This essay supplies fundamental information for creating an *ex situ* management strategy aiming reproduction and maintaining genetic variation found at Brazil's captivities today. We also stress the importance and need to produce a studbook for this specie, which may assist the management itself as well as future work with the specie.

Keywords: Muriqui. *Brachyteles arachnoides*. Genetics. *Ex situ*. Microsatellite. Conservation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O miqui-do-sul, *Brachyteles arachnoides*

O miqui-do-sul pertence ao gênero *Brachyteles* que, juntamente com *Alouatta*, *Ateles*, *Lagothrix* e *Oreonax*, constituem a Família Atelidae (Rylands *et al.*, 2014). Até 1944 a única espécie conhecida do gênero era o *Brachyteles arachnoides*, que foi então dividido em *B. arachnoides* e *B. hypoxanthus* devido a algumas diferenças morfológicas como coloração e presença, ou não, de polegar vestigial (Magnus, 2011). O miqui-do-sul, seguido por seu congênere, o miqui-do-norte, é o maior primata do Novo Mundo e endêmico das florestas de Mata Atlântica, um dos maiores *hotspots* de biodiversidade brasileira. Atualmente, populações de miqui-do-sul podem ser encontradas em algumas unidades de conservação (UCs) e fragmentos isolados de mata nos estados do Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro (Breves *et al.*, 2014)

Brachyteles arachnoides, consta na lista de animais ameaçados da IUCN (International Union for Conservation of Nature) como “Em Perigo de Extinção”, principalmente devido à caça para venda de carne e pele, e pela diminuição de habitat por desmatamento da Mata Atlântica, onde podem ser encontrados a até 1800 m de altitude. Também conhecido como mono carvoeiro, este primata habita árvores de grande porte, onde dormem, se alimentam e se locomovem. Normalmente eles não descem ao solo devido ao perigo de predação, mas há relatos de alguns grupos forrageando no chão (Boubli, Couto-Santos e Mourthé, 2010). O miqui-do-sul possui pelagem de coloração parda podendo variar com a idade e estação, sua cara é escura, assim como as palmas das mãos e sola do pé. Possuem membros alongados, mãos em formato de gancho e uma cauda preênsil que lhes permite uma rápida locomoção entre os galhos das árvores (Ferraz, 2013).

A espécie pode viver em grupos de 7 a 60 indivíduos em áreas que variam entre 100 e 580 hectares (Torres De Assumpção, 1983; Pinto *et al.*, 1993). Estes primatas podem ser encontrados em maior densidade, principalmente em florestas de vegetação secundária. Em áreas florestais de vegetação primária, a densidade destes animais diminui. Isso pode ser explicado pela diferença na disponibilidade de alimentos e caça predatória entre as duas áreas. Entretanto os miquis parecem usar ambas, e assim aumentando suas chances de sobrevivência (Pinto *et al.*, 1993). As fêmeas normalmente dispersam do grupo natal quando

atingem a puberdade e desenvolvem estímulos sexuais, em média, por volta dos 6 anos de idade. Tem sua primeira cria a partir de 2 anos depois de deixarem o grupo para trás, e só terão outro filhote depois que o primeiro, se sobreviver, tiver atingindo 2 anos de idade. Os machos normalmente permanecem no mesmo grupo natal por toda a vida (De Moraes, De Carvalho e Strier, 1998).

A dieta de um animal é um dos principais meios de entender e determinar seu comportamento e estratégias ecológicas, além de inferir o modo de obtenção de energia e características morfológicas e comportamentais de sua alimentação. Em primatas, há uma seleção específica de alimentos para cada indivíduo, indicando que o *intake* e requerimentos energéticos também difere, gerando preferências pelas escolhas em sua alimentação (Talebi, Bastos e Lee, 2005). A escolha da dieta depende de variáveis como distribuição espacial e temporal, propriedades nutricionais, morfologia e fisiologia do animal, taxa de crescimento, reprodução. Primatas podem, no entanto, se alimentar de uma variedade de alimentos para suprir suas necessidades.

Como os *Alouatta*, a dieta dos *Brachyteles* possui grande quantidade de folhas. Entretanto, o sistema digestivo dos primeiros é caracterizado por uma passagem lenta dos alimentos, aumentando a taxa de absorção de nutrientes da folhagem, enquanto nos miquis, a passagem é rápida, característica mantida dos ancestrais frutívoros mais próximos, *Ateles* (Strier e Department of Anthropology, 2014).

Primatas com mais de 1 kg, normalmente se alimentam desses dois tipos de alimentos, e quanto maior a espécie, mais folhas estarão em sua dieta. A escolha da dieta, entretanto, irá variar de acordo com as estações do ano que podem afetar a disponibilidade dos alimentos (Pedro Luís Rodrigues De Moraes, 2014). O miqui-do-sul é o maior primata neotropical, com peso variando entre 9-15kg nos adultos, e se alimentará, preferencialmente, de frutas e flores quando disponível para maximizar o consumo de energia, mas alguns grupos acabam se alimentando mais de folhas devido à maior disponibilidade anual deste alimento, e para evitar conflitos com outras populações (Strier, 1991).

Inicialmente podia ser encontrado na Mata Atlântica entre os paralelos 25º e 13º, abrangendo sul da Bahia até norte do Paraná, com uma população esperada de mais de 400.000 indivíduos no período pré-colonial quando a espécie servia de alimento para tribos

indígenas e o bioma permitia este volume demográfico (Aguirre, 1971). Hoje, com menos de 16% de Mata Atlântica remanescente no Brasil, e ainda sendo degradada (Ribeiro *et al.*, 2009), as populações de *B. arachnoides* competem não mais de 2.000 indivíduos (Bonatto e Magnus, 2011).

1.2 Status de conservação do muriqui-do-sul

Um dos principais focos da conservação é a preservação da informação genética contida do DNA de cada indivíduo de uma espécie. Quanto maior a diversidade presente em uma população, maior será a heterozigosidade para quaisquer componentes genéticos. Essa característica permite uma população melhor se adaptar frente a alguma alteração ambiental e/ou evolutiva (Fagundes, 2005).

A fragmentação de habitat é umas das principais ameaças à conservação da biodiversidade devido à continua redução dos ecossistemas a manchas isoladas. Além de alterar processos físicos e biológicos do ambiente, esse efeito causa alterações na riqueza e dinâmica das populações (Young, Boyle e Brown, 1996).

Populações pequenas e isoladas são mais vulneráveis a perturbações ambientais. Eventos como efeitos gargalo associados a uma acentuada deriva genética influenciam a taxa de sobrevivência local da espécie, de maneira que alelos são fixados ou perdidos aleatoriamente reduzindo a variação genética desta população. O isolamento populacional e baixo fluxo gênico estão também associados a redução do tamanho populacional. Cruzamentos entre parentes são frequentes em pequenas populações, que juntamente com fixação de alelos cria um reduzido pool gênico, inserido em indivíduos homozigotos por descendência. Esses fatores criam um alto grau de endogamia que diminui o fitness de uma população, caracterizando grande risco para sua sobrevivência (Keller e Waller, 2002).

Obter dados demográficos de uma população nos permite inferir sobre a história de vida de um indivíduo e a dinâmica intra e intergrupos. Para espécies ameaçadas de extinção, é crucial saber diferenciar flutuações naturais no tamanho populacional de falsas flutuações causadas por fatores extrínsecos à dinâmica do grupo (Strier *et al.*, 2006). Essas informações podem ser usadas para avaliar como alterações ambientais estão afetando a reprodução e sobrevivência de uma população a longo prazo. Futuramente isso poderá ser usado para

elaboração de planos de manejo e estratégias de conservação da espécie (Miranda *et al.*, 2006).

Atualmente, tem havido relatos de ocorrência de populações de muriqui-do-sul no Parque Nacional da Serra dos Órgãos-RJ, Parque Estadual Três Picos-RJ, Parque Estadual do Desengano-RJ, Área de Proteção Ambiental do Caiçuru-RJ, Parque Nacional da Serra da Bocaina-RJ/SP, Parque Estadual Carlos Botelho-SP, Parque Estadual Intervales-SP, Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira-SP, Fazenda Barreiro Rico-SP, Parque Estadual da Serra do Mar-SP, Parque das Neblinas-SP, Área de Proteção Ambiental do Municipal de São Francisco Xavier-SP, Estação Ecológica Juréia-SP, Fazenda São Sebastiao do Rio Grande-SP e Fazenda Lagoa Alegre-PR, totalizando conjuntamente 751.488 hectares (ICMBIO, 2011) , sendo que o presente território do bioma Mata Atlântica possui um total de 29.473.484 hectares (Tabarelli *et al.*, 2005).

As principais ameaças às populações de *B. arachnoides* são perda de habitat para instalação de fazendas, gado, construção de rodovias e expansão urbana, represas; caça esportiva ilegal; mineração em áreas ao redor de fragmentos protegidos causando poluição de veios de rios, erosão e desmatamento; falta de um programa eficiente de reprodução em cativeiro; extração ilegal de palmito, onde os palmiteiros matam muriquis que são encontrados enquanto percorrem as matas (Talebi e Soares, 2005).

Essas atividades reduzem o tamanho populacional da espécie, e acabam, também, eliminando alelos do pool gênico, que podem nunca mais ser encontrados na população, causando perda de heteroziguidade. Manter a população com um tamanho populacional efetivo pode ajudar a prevenir e amenizar a perda de variabilidade (Fagundes, 2005). A viabilidade a curto e longo prazo de uma população que passou por alguma alteração ambiental ou demográfica vai depender da variação genética prévia ao estresse, e sua capacidade de se adaptar as novas condições. A genética molecular provê ferramentas para avaliar o processo evolutivo e desenvolver estratégias para a conservação (Crnoknak e Roff, 1999).

Atualmente a população de *Brachyteles arachnoides* mantidos em cativeiro no Brasil possui 23 indivíduos, mantidos no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), Instituto Estadual do Ambiente (INEA), Guapimirim/RJ (05), Passeio Público da Cidade de Curitiba/PR

(04), Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, Prefeitura Municipal de Sorocaba/SP (10), Criadouro Comercial Toca da Raposa, Juquitiba/SP (01), e Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), São Paulo/SP (03). Uma população deste tamanho, como qualquer outra, é afetada pelos efeitos da deriva e endogamia. Além disso, animais nascidos em cativeiro podem apresentar adaptações ao cativeiro e o relaxamento da seleção natural frequente na vida livre. Assim, mudanças ambientais severas podem colocar em risco, animais de cativeiro com baixa variabilidade genética quando vierem a ser inseridos na natureza através de um programa de reintrodução. O manejo e controle do bem-estar dessa população, assim como a formulação de uma estratégia de reprodução deve ser realizado imediatamente para assegurar a sobrevivência da mesma.

1.3 Genética de muriqui-do-sul

Barreiras ambientais, processos históricos e história de vida fazem parte da construção da estrutura genética de uma população. O conhecimento de como a variação genética está distribuída dentro de uma população pode conter informações importantes para entender não apenas a biologia e ecologia evolutiva, mas dados para construção de estratégias de conservação (Balloux e Lugon-Moulin, 2002).

O primeiro estudo genético envolvendo *Brachyteles arachnoides* foi realizado por Pope, (1998), onde ele realizou uma análise de aloenzimas de 10 indivíduos de *Brachyteles hypoxanthus* proveniente de Minas Gerais, e dois muriquis-do-sul, entretanto, ele tratou todas as amostras como sendo de uma única espécie, *B. arachnoides*. Apesar de ter encontrado altos índices de diversidade genética neste estudo inicial, é provável que tal resultado tenha sido obtido devido a utilização de duas espécies diferentes (Fagundes, 2005). Em 1990, Lemos de Sá e colaboradores realizaram um estudo genético e morfológico com muriquis, e embora tenha encontrado altos índices de variabilidade genética dentro e entre as populações estudadas, uma na Fazenda Esmeralda (MG) e outra na Fazenda Barro Rico (SP), o trabalho as definiu como sendo uma única espécie se divergindo evolutivamente, quando na verdade seriam duas populações já isoladas, geneticamente, de *B. hypoxanthus* e *B. arachnoides*.

Mesmo com a recente formulação de um plano de ação nacional para o muriqui, pouco se sabe sobre a diversidade genética das populações naturais e da população de cativeiro. Em

uma busca por trabalhos envolvendo genética de *Brachyteles arachnoides*, pouco se encontra, quando comparado aos estudos com *B. hipoxanthus*. Um trabalho de Cardoso (2011) utiliza DNA mitocondrial para um estudo de identificação de miquiqui-do-sul por meio de posicionamento de sequências parciais de um gene 16S com outras espécies de primatas e animais domésticos, onde encontraram um *primers* universal de 523 pares de base capaz de identificar todas as espécies estudadas no trabalho.

Chaves, (2006) utiliza sequências de DNA de *B. arachnoides hipoxanthus*, *B. hipoxanthus*, *Ateles paniscus* e *Lagothrix lagothricha* em um estudo comparativo e experimental, onde realizam testes de amplificação por PCR com diferentes concentrações de DNA e de BSA (*bovine serum albumine*), um importante reagente para um trabalho que usa amostras genéticas extraídas de fezes. Talebi, (2006) realizou um trabalho com amostras de 10 indivíduos de *B. arachnoides* com objetivo de comparar o polimorfismo presente nos genes de pigmentos visuais de *Alouatta* e *Brachyteles*, através da análise de éxons dos genes de opsinas cônicas M/L no cromossomo X, que conseguiu identificar 3 alelos para um único gene no gênero *Brachyteles*. Este resultado tem efeito direto na identificação de variedades alimentícias e fitness das espécies. Até o presente momento, o estudo genético mais completo de *B. arachnoides* é o trabalho de Magnus, (2011).

1.4 Marcadores moleculares como ferramenta para estudo genético

A cada ano o uso de microssatélites para análise e inferências filogenéticas tem se tornado algo comum e eficiente. Inicialmente desenvolvidos como determinantes para testes de paternidade, passaram a ser usados para análise de amostras limitadas de DNA. A distribuição randômica dos microssatélites no DNA e seu alto grau polimórfico facilita seu uso na construção de mapas genéticos.

Marcadores microssatélites são baseados na variação no número de repetições de simples e pequenas sequências de DNA onde um conjunto de 1-6 bases é repetida várias vezes. Essas sequências são muito diferentes entre indivíduos de taxas diferentes, mas podem variar também entre indivíduos. Usando a tecnologia da PCR (*polymerase chain reaction*) é possível amplificar pequenas amostras e sequências danificadas de DNA utilizando *primers* para a região onde será usado o microssatélite (Schlotterer, 2000).

Os loci de microssatélite são altamente polimórficos, fáceis de se pesquisar, e oferecem melhor entendimento sobre a estrutura de uma população. O número de microssatélites em um genoma, seu tamanho, composição, taxa de mutação e distribuição cromossômica pode variar entre indivíduos de uma mesma espécie. Eles fornecem dados sobre diversidade genética, fluxo genético e grau de parentesco (Slatkin, 1995). Em mamíferos as repetições de CA/GT são as sequências mais abundantes. Essas características fazem desse marcador molecular uma ótima ferramenta para identificação de espécies e estudos de variabilidade genética entre indivíduos, populações, além de poder estabelecer suas relações de parentesco e seus históricos evolutivos (Panaud, Chen e Mccouch, 1996).

1.5 O papel da conservação *ex situ* para a conservação animal

A palavra conservação pode conter diferentes significados dependendo do contexto em que é inserida. Quando falamos em conservação animal, duas áreas se destacam, a *in situ* – cujas estratégias são formuladas para uma ação no meio ambiente onde a população e encontra, com o propósito de assegurar sua sobrevivência por várias gerações – e a conservação *ex situ* – que ocorre fora do ambiente natural da espécie e não precisa necessariamente trabalhar com indivíduos vivos, envolvendo também gametas, células, embriões, fazendo uso de tecnologia de criopreservação, entre outras áreas como genética, saúde, comportamento (Woolliams, Matika e Pattison, 2008) -.

Muitas literaturas clássicas que abordam o tema “Conservação” dizem que a melhor estratégia para conservação das espécies seria nunca perturbar o ambiente natural, e a conservação *in situ* tenta remediar danos que um ecossistema possa ter sofrido por interferência do homem. Infelizmente, a destruição de habitat por meio de desmatamentos, queimada, caça e super-exploração dos recursos naturais tem aumentado, e somente com ações *in situ* não será possível o manejo do meio ambiente. Esforços para remediar a perda de diversidade devem ser fortalecidos por novas políticas ambientais, integração da biodiversidade e seu valor econômico no planejamento do uso de terra e tomadas de decisões (Butchart *et al.*, 2010).

O papel da conservação *ex situ* é estudar como essas alterações estão afetando as populações naturais, e quais serão suas consequências para suas gerações futuras. As populações em cativeiro (*ex situ*) permitem algumas abordagens para estudo que não seriam

possíveis com as populações naturais além de serem um importante banco de material genético.

Depressão endogâmica, baixa adaptabilidade a flutuações ambientais e extinção são algumas das características que vem atingindo espécies raras e ameaçadas de extinção, e as reduzidas populações de cativeiro. Uma maneira de reduzir estes efeitos é melhorando a bagagem genética que os parentais passam para a progênie. Pais com baixa coancestralidade elevam a diversidade genética da próxima geração. A preservação da variabilidade e redução de endogamia são uns dos principais objetivos dos programas de conservação de espécies ameaçadas.

O trabalho dos zoológicos e aquários transformou-se ao longo dos anos de um local para exibição de coleções animais para uma instituição moderna, e têm sido desde então, grandes agentes da conservação, pesquisas científicas além de polo social para educação ambiental e lazer.

A reprodução de animais de cativeiro é uma excelente ferramenta para a conservação, entretanto, apesar de serem encontradas mais de 10.000 espécies nos zoológicos e aquários pelo mundo todo, apenas 850 possuem um *studbook* e/ou um programa de reprodução em cativeiro, dos quais somente 118 estão ativos (Witzenberger e Hochkirch, 2011). Novos programas devem ser estabelecidos para as espécies que não o possuem e os *studbook* já existentes devem ser revisados e atualizados, contribuindo para a produção de estratégias de conservação.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Tendo visto o cenário acima descrito faz-se necessário um estudo genético dos animais da população de cativeiro, visando avaliar a variação genética e contribuir com informações úteis para o programa de conservação *ex situ* desses animais.

Considerando que a maioria dos indivíduos em cativeiro são originários de vida livre, nossa hipótese é que a variabilidade genética encontrada em populações naturais é bem representada pelos animais cativos.

3. OBJETIVOS

O objetivo neste trabalho é obter informações genéticas dos animais de cativeiro que se encontram em diversas instituições distribuídas pelo país, particularmente dos níveis de variação genética existentes e do grau de relacionamento entre os indivíduos, fazendo uso de marcadores moleculares, para auxiliar no desenvolvimento de um Plano de Ação para a conservação do Muriqui-do-sul. Desse modo, os objetivos específicos desta pesquisa são:

- Caracterizar geneticamente cada indivíduo de cativeiro;
- Caracterizar a diversidade genética da população de cativeiro;
- Esclarecer as relações de parentesco entre os indivíduos de cativeiro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Todas as 18 amostras de sangue e DNA foram fornecidas pelas instituições detentoras de animais da espécie *Brachyteles arachnoides*, mediante colaboração de seus respectivos responsáveis. Sendo estas, a Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), que forneceu amostras de DNA de seus três animais, já extraídas e armazenadas no laboratório da instituição; Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), fornecendo amostra de sangue de seus cinco indivíduos, devidamente identificados; Passeio público de Curitiba que enviou amostra de seus quatro animais (amostra armazenada em *vacutainer* contendo EDTA 3,6 mg); Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba-SP), colaborando com amostras de cinco indivíduos, e; o Criadouro Comercial Toca da Raposa (Juquitiba-SP), que colaborou cedendo amostra de um indivíduo (amostra armazenada em *vacutainer* contendo EDTA 3,6 mg).

As amostras foram nomeadas de acordo com seus números de microchip ou o nome dado aos animais em cativeiro, e enumeradas de 1 a 18 para facilitar o manuseio durante as análises genéticas (Tabela 1). Ao longo do projeto as amostras foram enviadas ou transportadas pelo pesquisador ao Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LabBMC), Departamento de Genética e Evolução, da Universidade Federal de São Carlos, *campus* São Carlos-SP.

Tabela 1: Caracterização das amostras de miquis-do-sul de cativeiro.

ID	Nome	Cativeiro de Origem	Origem Anterior	Sexo	Idade
A1	2583	CPRJ	Nascido em cativeiro	Macho	4 anos
A2	TOCA	Toca da Raposa	Resgatado em Juquitiba	Macho	10 anos
A3	3607	Zoológico de Sorocaba	Desconhecida	Macho	15 anos
A4	2263	CPRJ	Nascido em cativeiro	Macho	10 anos
A5	2434	CPRJ	Nascido em cativeiro	Macho	6 anos
A6	2049	CPRJ	Orquidário de Santos-SP	Fêmea	16 anos
A7	2506	CPRJ	Nascido em cativeiro	Macho	9 anos

A8	9548	Zoológico de Sorocaba	Desconhecida	Macho	-
A9	2425	Zoológico de Sorocaba	Desconhecida	Macho	2 anos
A10	FAEL	Zoológico de Sorocaba	Desconhecida	Macho	-
A11	JUCA	Zoológico de Sorocaba	Desconhecida	Macho	13 anos
A12	961	FPZSP	Zoológico de Sorocaba	Macho	14 anos
A13	962	FPZSP	Estação Ecológica Juréia-SP	Macho	3 anos
A14	963	FPZSP	Sete Barras-SP	Macho	4 anos
A15	FER	Curitiba	Nascida em cativeiro	Fêmea	12 anos
A16	9394	Curitiba	Apreendido pelo IBAMA	Macho	19 anos
A17	DAVID	Curitiba	Nascido em cativeiro	Macho	6 meses
A18	LEO	Curitiba	Litoral de SP	Macho	5 anos

FPZSP - Fundação Parque Zoológico de São Paulo; CPRJ - Centro de Primatologia do Rio de Janeiro; Curitiba - Passeio Público de Curitiba; Zoológico de Sorocaba - Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros; Toca da Raposa - Criadouro Comercial Toca da Raposa.

4.2. Análises moleculares

4.2.1. Extração de DNA

A extração de DNA dos indivíduos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo foi realizada a partir do kit de extração Wizard Genomic DNA Purification Kit da Promega, seguindo-se as recomendações do fabricante (ANEXO 1). A extração de DNA do restante das amostras de sangue foi realizada segundo protocolo de extração de Sambrook et al. (1989) modificado (ANEXO 1).

A quantidade e qualidade do material genômico foram analisadas por espectrofotometria (leitura das absorbâncias a 260 e 280 nm) e visualização em gel de agarose 1% utilizando o padrão de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultra-violeta. O DNA extraído foi padronizado a 50 ng/ μ L e armazenado em freezer a -20°C até o momento das amplificações.

4.2.2. Amplificação dos loci microssatélites

Escolhemos 28 *loci* microssatélites heterólogos para amplificação do DNA dos animais (TABELA 2). As amplificações dos primers foram realizadas por reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), baseadas no protocolo de Schuelke (2000) em que é adicionado um marcador universal fluorescente M13 de 18 pares de base (5' - TGTAACGACGGCCAGT - 3') na porção 5' do primer forward ou reverse (ANEXO 3). Os fluoróforos utilizados foram o FAM, NED e VIC (Applied Biosystems). Devido à inclusão da cauda M13 nas sequências dos primers, tivemos que testar a formação de *hairpins* e dímeros através do software online OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies). Esse procedimento permitiu decidir se a cauda M13 seria adicionada na extremidade 5' do primer forward ou do reverse.

Tabela 2: Sequências de marcadores microssatélites, constando identificação dos loci, espécie de origem, sequências dos pares de *primers* e temperaturas de anelamento.

<i>Loci</i>	Espécie	Primers Forward/Reverse (5' -3')		Ta
157 ¹	<i>Lagothrix lagotricha</i>	TGGCAAGTCTGGTTTCAAGC	TTCCAGACTGAGCTAGGATGC	55°C
D17S804 ²	<i>Homo sapiens</i>	GCCTGTGCTGCTGATAACC	CACTGTGATGAGATGTCATTCC	55°C
1110 ¹	<i>Lagothrix lagotricha</i>	GGTGAATGAGAGAATCAAAG	TATGTTCCACAGTAGAAAGC	55°C
LrP2BH6 ³	<i>Leontopithecus rosalia</i>	TCTGTTTGAATCCCCAGTCC	GCAGTCCCTCAAGGTTTTCT	50°C
LrP5BG3 ³	<i>Leontopithecus rosalia</i>	GCGATCAACCTGGGCAACAT	TCCCAGGTAGCTGGGACTAT	60°C
LrP5BE6 ³	<i>Leontopithecus rosalia</i>	TGTGCATGCTGCCTGTGTC	ATCTCACTGGACCCACCT	55°C
LrP3AF1 ³	<i>Leontopithecus rosalia</i>	CCATCCTGGCCAACATAGGT	GTAGCTGGGATTACAGGCAC	62°C
APM1 ²	<i>Alouatta palliata</i>	CACGTGTGTCCAGCTTGTCT	ATTCTGCTGCCCTTGAGTTC	50°C
Leon2 ⁴	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	CTGCTTCTTGTTCCTTCTCTC	GTTTGGGTGGTTGCCAAG	56°C
Leon15c85 ⁴	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	CTGATCCTTGAAGCAGCATTG	GGTTAAAGGGTTCGTTCTGTG	60°C
Leon3c20 ⁴	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	TCTGTTTGAATCCCCAGTCC	GCAGTCCCTCAAGGTTTTCT	60°C
Leon31c97 ⁴	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	GTGATTATTGTGTGGTACTTG	ATGTATTTTTCTGGTTTTACC	58°C
Leon11c72 ⁴	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	AGGATTACAGGTGCCAC	TTGCATATTGTGTTCAACTTC	60°C
Leon30c73 ⁴	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	CAGTTGAGGGAACAGGAATTA	CACTGCACTGACAGAGCAAG	60°C
Leon35c42 ⁴	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	GTGGAAAGGTTTCAGAATATC	TGCAGTTGTCCACACTTA	60°C
Leon26c10 ⁴	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	TTCATCTCAATGACACGAAAC	CATCGAGTGTCTGCTGT	55°C
Leon27c13 ⁴	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	TGGTCCAGAGAAATGATGTC	GTAATTCCTTGGATTTATGCC	60°C
Leon21c75 ⁴	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	CAGTTGAGGGAACAGGAATTA	CACTGCACTGACAGAGCAAG	50°C

AB06 ²	<i>Alouatta belzebul</i>	GTGATTATTGTGTGGTACTTG	ATGTATTTTTCTGGTTTTACC	50°C
L. chu 01 ⁵	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	GCTCAGGTGTTATTTATGTCCAAA	GTTTCTTGCAACTATCTTGCATGTTCTGC	58°C
L. chu 02 ⁵	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	AGATTCTGCCTCAAGAAATTCAGT	GTTTCTTTCTAGATCCAGGTCGGCAAT	58°C
L. chu 03 ⁵	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	AAGGCATGATGTATCTTGTTCTCA	GTTTCTTATCTTTCTGTATGTGTCTCCCTGTCT	58°C
L. chu 04 ⁵	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	TGACCAAAGAAAATGCAAAA	GTTTCTTGACAGGGTATTTAGCAGGA	55°C
L. chu 05 ⁵	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	TGATGCTAAAACAGAAGCATT	GTTTCTTGCTCTGATGTTACAAAACCT	55°C
L. chu 06 ⁵	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	GCCTTAATTAGCACCAGAACC	RGTTTCTTACCACTCCAAGCCTTCAGTA	55°C
L. chu 07 ⁵	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	TCTCATTTCTTCTCATGGACTC	GTTTCTTCTTGACTCACAGCATGACCT	55°C
L. chu 08 ⁵	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	CACGGCAATGTGGGAATAA	GTTTCTTTTCAGTAGTTGGGACTGGGATAA	58°C
L. chu 09 ⁵	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	TTCATTGTAGCATTGTTGGTCAT	GTTTCTTTTCAGTAGTTGGGACTGGGATAA	58°C

¹(Di Fiore e Fleischer, 2004); ²(Cortés-Ortiz, Mondragón e Cabotage, 2010); ³(Grativol, Ballou e Fleischer, 2001); ⁴(Perez-Sweeney *et al.*, 2005);

⁵(Galbusera e Gillemot, 2008).

As reações de PCR foram realizadas utilizando um volume total de 10 μL que incluiu 1 μL de DNA (50 ng), 1,34 μL de água ultrapura (q.s.p.), 0,1 μM de primer *forward*, 0,4 μM de primer *reverse*, 0,4 μM de primer M13, 1x (5 μL) de *Taq* DNA polimerase *GoTaq*[®] PROMEGA e 0,16 mg/mL de BSA (*Bovine Serum Albumine*). A reação de amplificação constou em uma fase de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, a temperatura de anelamento na tabela 1 por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, mais 8 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, terminando com um passo de extensão a 72°C por 10 minutos em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

As sequências amplificadas foram checadas em gel de agarose 1% e posteriormente genotipadas. As análises dos fragmentos foram realizadas em sequenciador automático ABI3730XL. Os resultados foram analisados através do pacote Geneious 6.1.9, o qual possui um *plug-in* específico para análise de *loci* microssatélites.

Adicionalmente, realizaram-se ampliações de todos os *loci* sem a utilização das fluorescências. Os produtos de PCR foram purificados segundo protocolo de precipitação induzida por Polietileno Glicol de (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2001) (Lis e Schleif, 1975; Mamiatis *et al.*, 1985) (ANEXO 2) e enviadas para a empresa supracitada para sequenciamento direto. Este procedimento foi realizado com o fim de comprovar a presença e caracterizar os *loci* microssatélites na espécie muriqui-do-sul, uma vez que os *loci* utilizados são todos heterólogos.

4.2.3. Análises de genética populacional

O teste de alelos nulos foi realizado pelo programa Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004). A partir dos genótipos dos *loci* microssatélites foi obtido o conteúdo de informação polimórfica (PIC) através do programa CERVUS 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007). De acordo com Botstein *et al.* (1980), cada *loci* foi classificado como pouco informativo (PIC < 0,25), informativo (0,25 < PIC < 0,50) ou altamente informativo (PIC > 0,50).

No software GENALEX 6.5 (Peakall e Smouse, 2012) foram calculados a frequência alélica, heterozigosidade observada e esperada. O coeficiente de endocruzamento F_{is} , desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, a riqueza alélica e o desequilíbrio de ligação entre os pares

de *loci* foram calculados pelo programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995). Para testes múltiplos os valores foram ajustados conforme correção de Bonferroni (Rice, 1989).

4.2.4. Parentesco

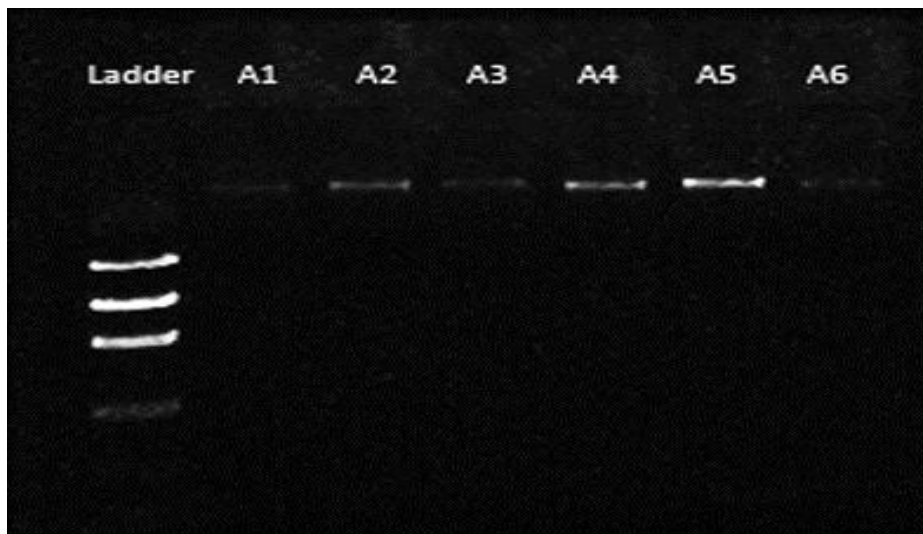
As análises de parentesco foram realizadas pelo programa COANCESTRY (Wang, 2011). Este utiliza o genótipo e frequências alélicas de todos os indivíduos, contabilizando erros de genotipagem e dados perdidos. Em uma simulação, o software propõe o melhor estimador (dentre sete estimadores de parentesco) para qualquer uma ou mais populações. A seleção do estimador se dá com base em um *True value*. O estimador que mais se aproximar do *true value* de 1,0 é considerado o melhor para o contexto da população proposta.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração e Qualidade do DNA

Conseguimos extrair com sucesso o DNA de todas as amostras coletadas utilizando o método de Sambrook et al. (1989). As extrações das amostras de sangue apresentaram uma média de 527 ng de DNA/ μ L com baixa variação, com exceção do indivíduo 18 do qual o gel apresentou degradação de DNA e não conseguimos amplificá-lo. A extração de DNA de alguns animais se mostra ilustrada a seguir (Figura 1).

Figura 1: Foto do gel de agarose, sob luz UV, contendo a extração do DNA de seis amostras de miquiqui-do-sul.



A1: 2583; A2: TOCA; A3: 3607; A4: 2263; A5: 2434; A6:2049.

5.2. Amplificação e Genotipagem dos *Loci* Microssatélites

O protocolo de reação de PCR selecionado já vinha sendo utilizado para outros primatas no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LabBMC; DGE-UFSCar), e conseguimos usá-lo também para as amostras de miquiqui-do-sul. Ainda, realizou-se testes de padronização de temperatura e concentração de DNA para as reações de PCR, usando 6 amostras e 3 *loci* a fim de verificar se os valores da literatura se mantinham nos miquiquis-do-sul. Foram utilizadas as concentrações de 5, 10, 25 e 50 ng/ μ L de DNA para os testes e

selecionou-se a maior concentração como a ótima para as amplificações. Para a padronização da temperatura de anelamento fez-se testes com variação de 54°C a 64°C para cada *loci*. Os valores ótimos obtidos e valores originais (descritos na literatura) se encontram na tabela 2.

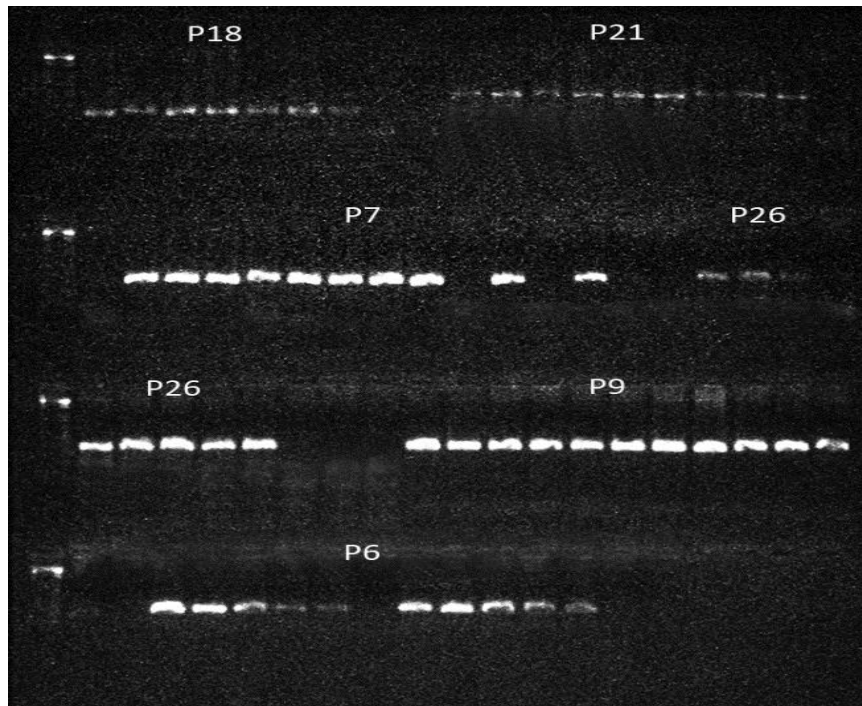
Tabela 3: Comparação das temperaturas de anelamento na literatura e temperaturas padronizadas para este estudo.

<i>Loci</i>	Espécie	Ta	Ta*
157	<i>Lagothrix lagotricha</i>	56º	55ºC
LrP2BH6	<i>Leontopithecus rosalia</i>	56º	50ºC
APM1	<i>Alouatta palliata</i>	56º	50ºC
Leon3c20	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	58º	60ºC
Leon31c97	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	56º	58ºC
Leon30c73	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	56º	60ºC
Leon27c13	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	60º	60ºC
Leon21c75	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	60º	50ºC
AB06	<i>Alouatta belzebul</i>	56º	50ºC
L. chu 06	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	58º	55ºC

Ta*- temperaturas da literatura

Do total de 28 *loci* selecionados inicialmente, foram utilizados apenas 10 *loci* microsatélites heterólogos (157, LrP2BH6, APM1, LEON21, AB06, LEON30, LEON31, LEON3c, LEON27 e Lchu6) para avaliar a variabilidade genética da população de *B. arachnoides*. Os primers 157, LrP2BH6, APM1, LEON21 e AB06 foram previamente testados em espécimes de *B. arachnoides* de vida livre por (Bonatto e Magnus, 2011), e os demais primers (LEON30, LEON31, LEON3c, LEON27 e Lchu6) foram selecionados após teste com 23 *loci* descritos para o gênero *Leontopithecus* existentes no LabBMC. Os *loci* Lchu04 e Lchu9 (Galbusera e Gillemot, 2008) foram excluídos, pois se mostraram monomórficos, e portanto, dispensáveis para nossas análises. Os primers 1110 (Di Fiore e Fleischer, 2004) e D17S804 (Cortés-Ortiz, Mondragón e Cabotage, 2010) também deixaram de ser utilizados, pois não conseguimos amplificá-los. Os demais *loci* foram excluídos do trabalho, pois apresentaram muitas bandas inespecíficas quando verificamos sua qualidade no gel de agarose.

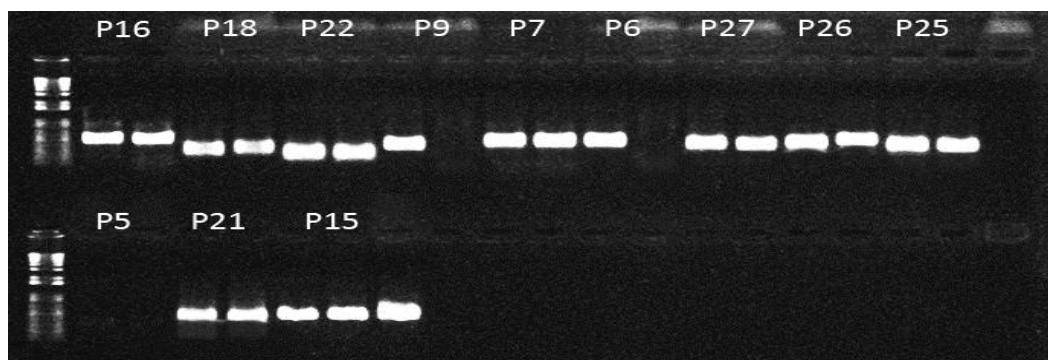
Figura 2: Foto do gel de agarose, sob luz UV, da reação de amplificação dos primers P18 (L.chu06), P21 (Leon21c75), P7 (Leon31c97), P26 (AB06), P9 (Leon30c73) e P6 (Leon3c20).



5.3. Caracterização dos *Loci* Microssatélites em Muriqui-do-Sul

Os produtos de PCR dos 10 *loci* selecionados para este trabalho foram purificados (FIGURA 3) e enviados para sequenciamento. Os dados obtidos a partir das sequências foram suficientemente bons para as análises, e permitiu a identificação da composição dos microssatélites em *B. arachnoides* (TABELA 4; FIGURA 4).

Figura 3: Foto do gel de PCR purificada contendo todos os loci amplificados.



P16 (L.Chu04); P18 (L.chu06); P22 (Lr2BH6); P9 (Leon30c73); P21 (Leon21c75), P7 (Leon31c97); P6 (Leon3c20); P27 (157); P26 (AB06); P25 (APM1); P5 (Leon27).

Tabela 4: Comparação entre *motif* encontrado na literatura descrita para cada *loci* espécie-específico e *motif* encontrado para o Muriqui-do-sul.

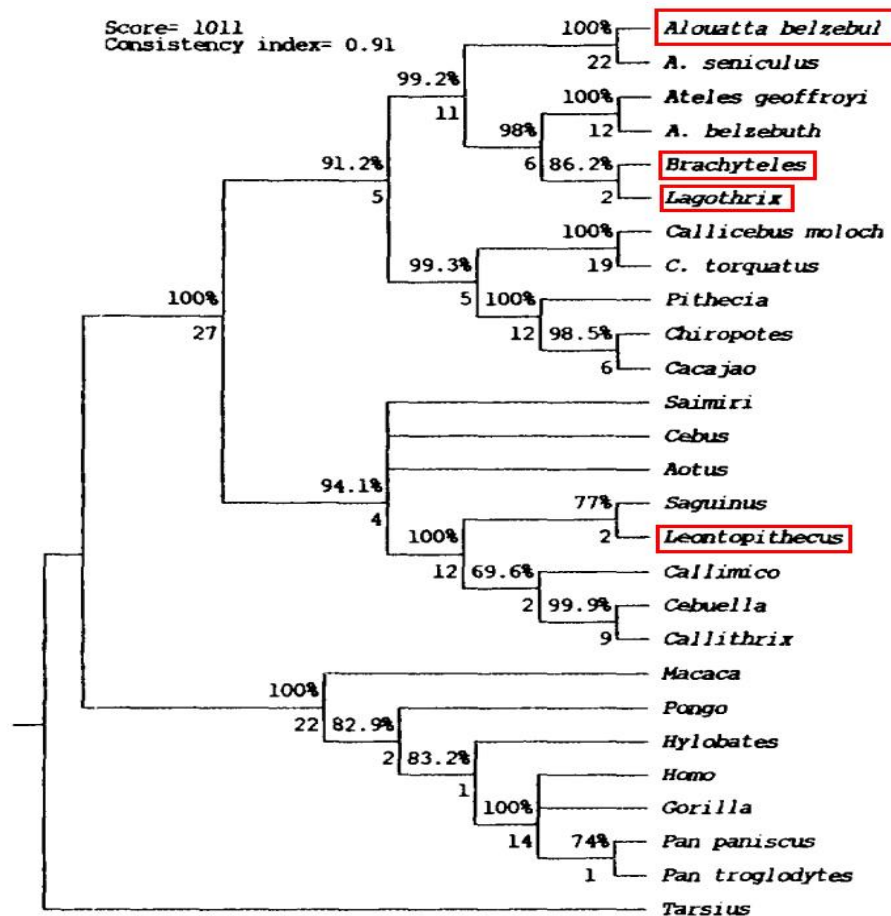
<i>Locí</i>	UR	<i>Motif</i> (literatura)	<i>Motif</i> (muriqui-do-sul)
Lchu6	2	(AC) ₁₅	(GT) ₂₀
Leon3c	2	(GT) ₂₂	(TG) ₂₀
Leon21	2	(GT) ₁₉ (NA) ₁ (GT) ₅	(TG) ₁₆
Leon30	2	(TC) ₂₅ (AA) ₁ (TC) ₁ (TG) ₁₆	(TC) ₃ (CA) ₁ (TC) ₃ (CA) ₁ (TC) ₃ (TG) ₁ (TC) ₅ (TG) ₂ (AT) ₁ (TG) ₅ (TT)(TG) ₂
Leon31	2	(GA) ₂ (CA) ₂ (GA) ₁₉ (TT) ₁ (GA) ₁ (CA)	(GA) ₂ (CA) ₁ (GA) ₂ (AA) ₁ (GA) ₃ (TT) ₁ (GA) ₁ (CA) ₄
Lrbh6	2	[CA] ₁₉	(GT) ₁₉
Leon27	2	(CA) ₁₁	-
Apm1	2	(TG) ₂₅	(CA) ₂₅
Abo6	2	(CT) ₉ TTT(CT) ₁₁ GTCTGTCTTAT (AC) ₁₆	(CT) ₂₅
157	2	(GA) ₄ [GT] ₄ [CT] / [GT] ₂ [AT] ₁ [GT] ₁₃ [GA] ₉ [GT] ₅	(AG) ₁₁ (TC)(TA)(TG) ₁₂ (AG) ₁₀ (TG) ₁₀

UR - unidade de repetição.

APM1*	190 - 208	200 - 216
AB06*	258 - 298	258 - 318
157*	217 - 235	243 - 257

pb – pares de bases; * – dados da literatura também baseados no miquiqui-do-sul.

Figura 5: Consenso da árvore de máxima parcimônia encontrada para 27 seqüências alinhadas do gene ϵ -globina de primatas (Schneider *et al.*, 1993).



Os gêneros *Alouatta*, *Brachyteles*, *Lagotrrix* e *Leontopithecus* se localizam proximamente na árvore filogenética o que pode justificar o uso de marcadores heterólogos para amplificação de DNA do miquiqui-do-sul, uma vez que microssatélites são regiões conservadas, intra e interespecíficas do genoma (Lopes *et al.*, 2010).

5.4. Caracterização da Variabilidade Genética do Miquiqui-do-Sul de Cativeiro

A variabilidade genética da população cativa de muriqui-do-sul (*B. arachnoides*) foi, inicialmente, avaliada por meio de 10 *loci* microssatélites previamente descritos para espécies heterólogas. Porém, alelos nulos foram identificados nos *loci* Leon31c97 e AB06, assim como desequilíbrio de ligação entre os mesmos. Estes *loci*, portanto, foram excluídos da estimativa de variabilidade genética. A presença de alelos nulos representa um problema quando se trabalha com análises de parentesco e diversidade genética de uma população, pois sua presença pode diminuir a frequência esperada de heterozigotos, superestimando a endogamia (Brookfield, 1996). Adicionalmente, o desequilíbrio de ligação entre *loci* nulos e *loci* 'não-neutros', evento conhecido como sequestro genético, também pode reduzir a frequência de heterozigotos na população (Ishibashi *et al.*, 1996). O desequilíbrio de ligação ocorre quando há diferença entre as frequências alélicas esperadas e observadas, e frequências genotípicas entre gerações. Isso pode ocorrer devido a associações ou dissociações de alelos em *loci* diferentes como resultado de recombinação, como pode ser resultado de isolamento geográfico, seleção natural (Agapow e Burt, 2001).

Todos os oito *loci* estudados produziram um total de 44 alelos, variando de 2 (*loci* Leon30) a 7 (*loci* LrP2BH6, Lchu6, 157 e APM1) alelos por *loci* (Tabela 8). O número médio de alelos por *loci* (N_a) foi 5,5. Esses valores foram similares a aqueles relatados por Magnus (2011), para populações de vida livre de muriqui-do-sul ($N_a=5,7$, variando de 2 a 12).

Abaixo apresentamos a tabela (6) de genótipos construída a partir dos dados de genotipagem de 17 indivíduos e 8 *loci* microssatélites.

Tabela 6: Panorama genético dos muriquis de cativeiro

Muriqui		Primers microssatélites															
Ind	Sexo	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2
		chu6	chu6	Leon3	Leon3	Leon21	Leon21	Leon30	Leon30	LrBH6	LrBH6	Leon27	Leon27	APM1	APM1	157	157
2583	M	183	183	303	303	391	393	0	0	109	121	224	224	220	224	247	249
TOCA	M	193	193	0	0	387	391	0	0	125	125	224	224	220	224	245	249
3607	M	183	199	0	0	391	391	255	255	109	121	224	224	220	224	241	249
2263	M	189	195	303	303	393	397	255	255	107	131	224	224	216	224	245	249
2434	M	183	189	293	293	389	397	255	291	125	131	224	224	216	220	245	249
2049	F	189	189	309	315	385	397	255	291	119	125	224	224	216	224	239	245
2506	M	179	191	303	303	387	387	255	255	107	109	224	254	224	224	235	239
9548	M	191	195	0	0	389	389	255	255	107	109	224	256	222	222	247	247
2425	M	183	191	303	315	387	393	255	255	0	0	224	254	220	224	245	245
FAEL	M	183	199	315	315	385	389	255	255	121	125	224	254	214	222	245	253
JUCA	M	195	195	303	303	387	391	255	255	109	125	224	224	214	222	245	249
0961	M	191	195	311	311	385	389	255	255	107	125	224	224	222	224	245	247
0962	M	191	195	311	311	385	389	255	255	109	125	224	224	220	226	247	253
0963	M	191	199	315	315	389	389	255	255	107	131	224	224	208	222	239	247
FER	F	183	191	315	315	389	391	255	255	123	125	0	0	222	224	245	245
9394	M	179	191	315	315	385	389	255	255	125	125	0	0	222	224	247	247
DAVID	M	191	191	315	315	385	389	255	255	125	125	0	0	222	224	239	245

Ind: indivíduo; Al-1: alelo 1; Al-2: alelo 2

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi superior a 0,5 e, portanto, altamente informativos, em 6 *loci*. O *loci* L.chu06 foi o mais informativo com valor de 0,837. Os *loci* Leon30c73 e Leon27c13 tiveram os menores valores de conteúdo informativo, 0,129 e 0,280. O PIC médio da população cativa de miquiqui-do-sul foi de 0,638, indicando que os *loci* escolhidos para este trabalho são bons representativos genéticos da espécie. Na literatura são encontrados valores divergentes de PIC para populações cativas de primatas. (Kanthaswamy *et al.*, 2006) encontrou, para 15 *loci*, um maior PIC médio de 0,744 em populações cativas de *Macaca mulata*. Porém, em uma população de mico-leão-preto (*Leontopithecus crhysopterus*) foi encontrado um menor valor médio de PIC (PIC = 0,440), para 15 *loci* microssatélites (BURBANO, 2015).

A diversidade genética do miquiqui-do-sul foi estimada através da riqueza alélica, heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada (Tabela 7). A heterozigosidade observada variou de 0,133 a 0,882, respectivamente para os *loci* Leon30c73 e APM1. A heterozigosidade observada média para a população foi de 0,562. Os valores de heterozigosidade esperada variaram de 0,124 (Leon30c73) a 0,811 (L.chu06), com média de 0,619. Estes valores foram inferiores aos encontrados por (Kanthaswamy *et al.*, 2006) ao analisarem 7211 indivíduos distribuídos em quatro populações cativas de *M. mulata*. Estes autores verificaram 0,788 e 0,810 de heterozigosidades observada e esperada, respectivamente. Nossos resultados, contudo, foram semelhantes àqueles encontrados para micos-leões de cativeiro (Oréfice, 2015; Burbano, 2015). Para uma população cativa de mico-leão-de-cara-dourada do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro foram encontrados os valores médios 0,668 e 0,650 de heterozigosidade observada e esperada e 0,575 e 0,550 nos animais da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (Oréfice, 2015). Essas comparações indicam que a diversidade genética encontrada no miquiqui-do-sul cativo está de acordo com estudos genéticos realizados em outras populações de primatas em cativeiro. Burbano (2015) também encontrou resultados semelhantes aos nossos, embora a heterozigosidade observada tenha sido maior que a esperada, com valores para os animais de cativeiro brasileiros, 0,740 e 0,489, e para os animais da Inglaterra, 0,715 e 0,489, respectivamente para heterozigosidade observada e esperada.

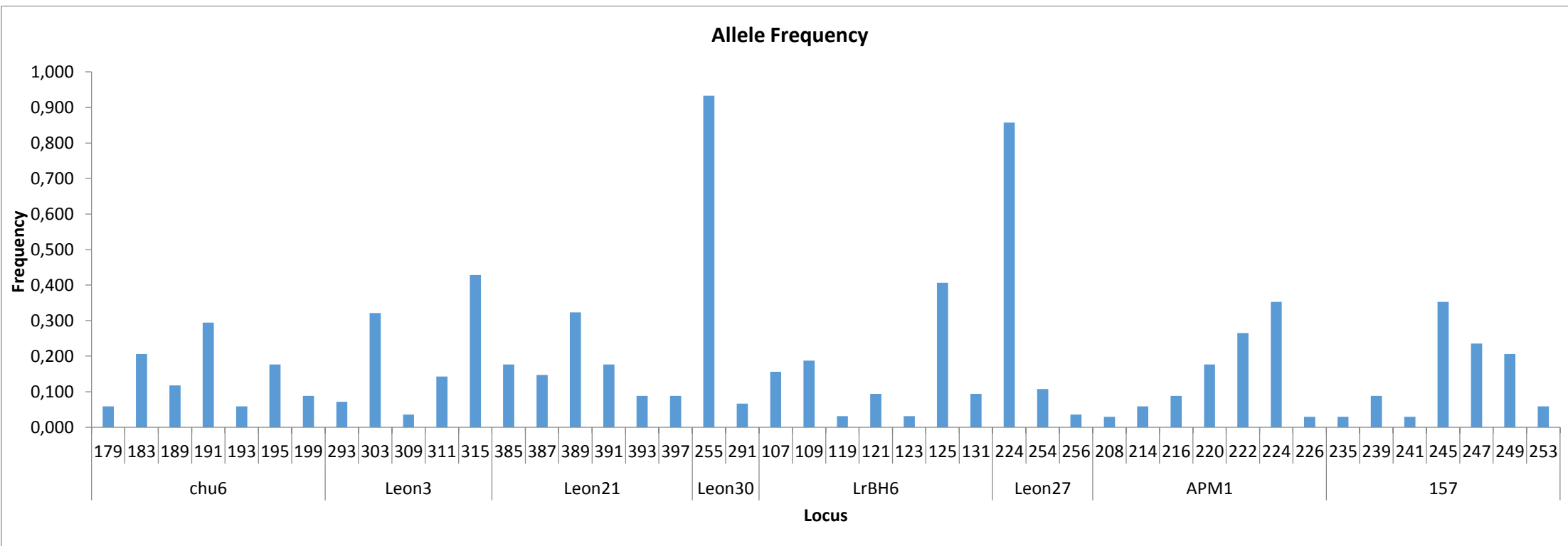
Tabela 7: Medidas de diversidade genética da população cativa de muriqui-do-sul.

<i>Loci</i>	N	Na	PIC	Ra	Ho	He	FIS
L.chu6	17	7	0,837	6,966	0,706	0,811	0.096
Leon3c20	14	5	0,711	4,000	0,143	0,686	0.805*
Leon21c75	17	6	0,810	5,970	0,765	0,796	0.061
Leon30c73	15	2	0,129	1,998	0,133	0,124	-0.037
LrBH6	16	7	0,766	6,851	0,813	0,756	0.045
Leon27c13	14	3	0,280	3,000	0,286	0,253	-0.095
APM1	17	7	0,788	6,617	0,882	0,761	-0.129
157	17	7	0,786	6,620	0,765	0,765	0.037
Média		5,5	0,638	5,253	0,562	0,619	0.127

N - Número de indivíduos; Na - Número de alelos; PIC – Conteúdo de Informação Polimórfica; FIS - Coeficiente de endogamia; Ho - Heterozigosidade observada; He - Heterozigosidade esperada; Ra - Riqueza alélica; * valores de probabilidade significativos após correção sequencial de Bonferroni [$p < 0,05$].

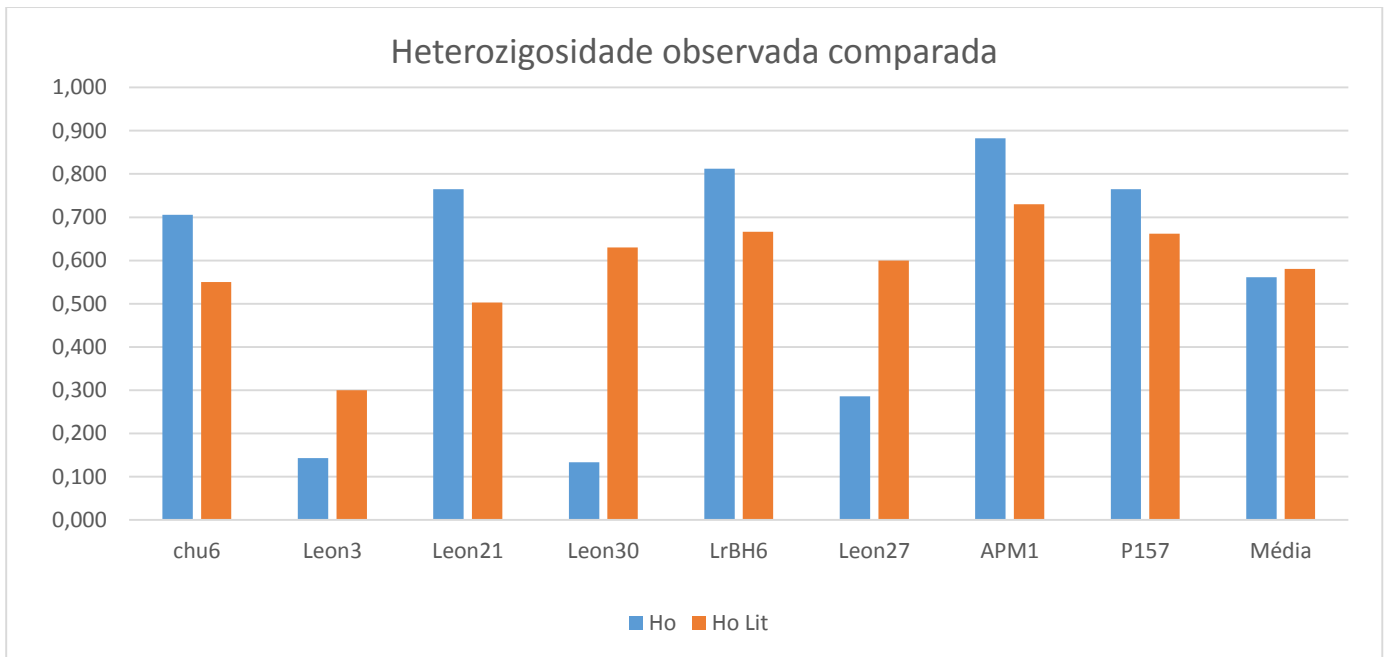
A riqueza alélica média variou de 1,99,0 a 6,96. O coeficiente de endogamia do sistema de acasalamento FIS foi negativo para os fragmentos Leon30c20, Leon27c13 e APM1 medindo, -0,037, -0,095 e -0,129 respectivamente, sugerindo um excesso de heterozigotos para esses *loci*, e encontramos déficit de heterozigotos nos *loci* Lchu6, Leon3c20, Leon21c75, Lr2BH6 e 157, portanto, com uma média total de 0,127 podemos inferir que esteja ocorrendo um déficit de heterozigotos na população.

Figura 6: Distribuição das frequências alélicas dos animais de cativeiro.



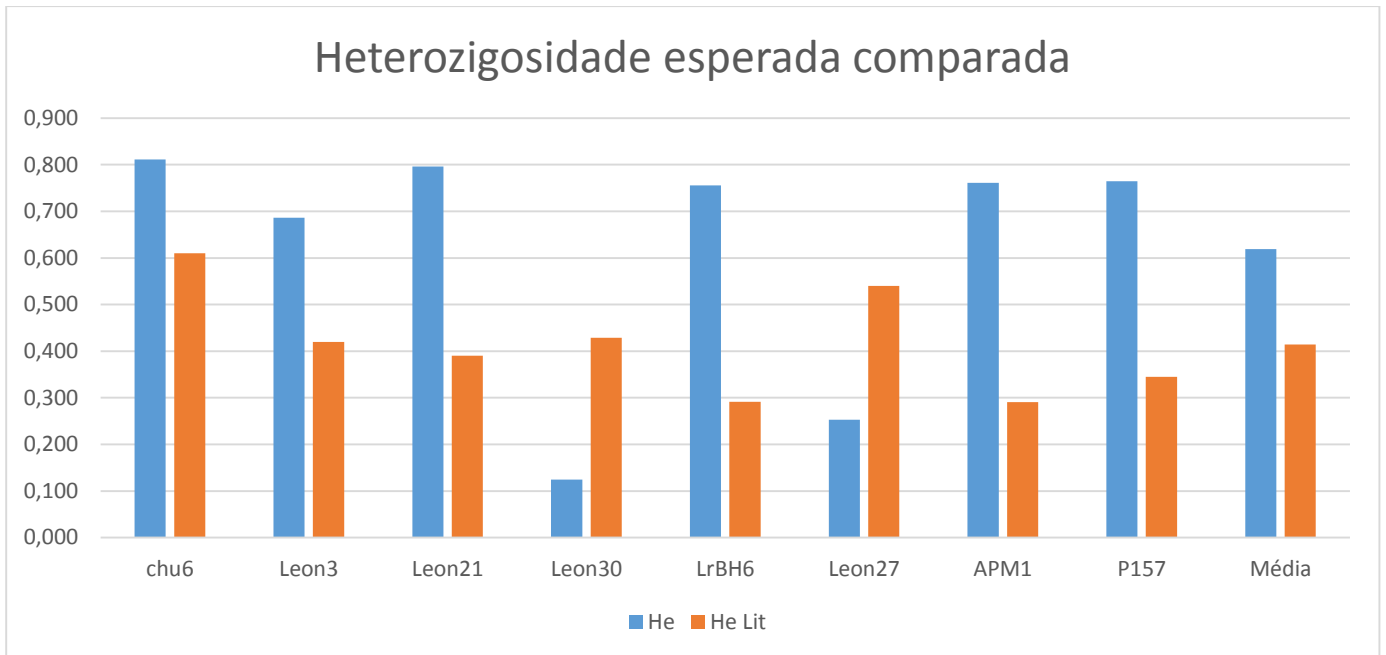
Os valores de diversidade genética da população cativa de muriqui-do-sul foram comparados com os valores obtidos da literatura para os mesmos *loci* (GRÁFICOS 1 e 2). A heteroziguidade observada foi maior em 62,5% dos *loci* nos muriquis de cativeiro, mas a média foi maior na literatura.

Figura 7: Heteroziguidade observada neste trabalho e heteroziguidade encontrada na literatura



Para a heteroziguidade esperada, 6 loci apresentaram valores de diversidade genética maiores neste trabalho.

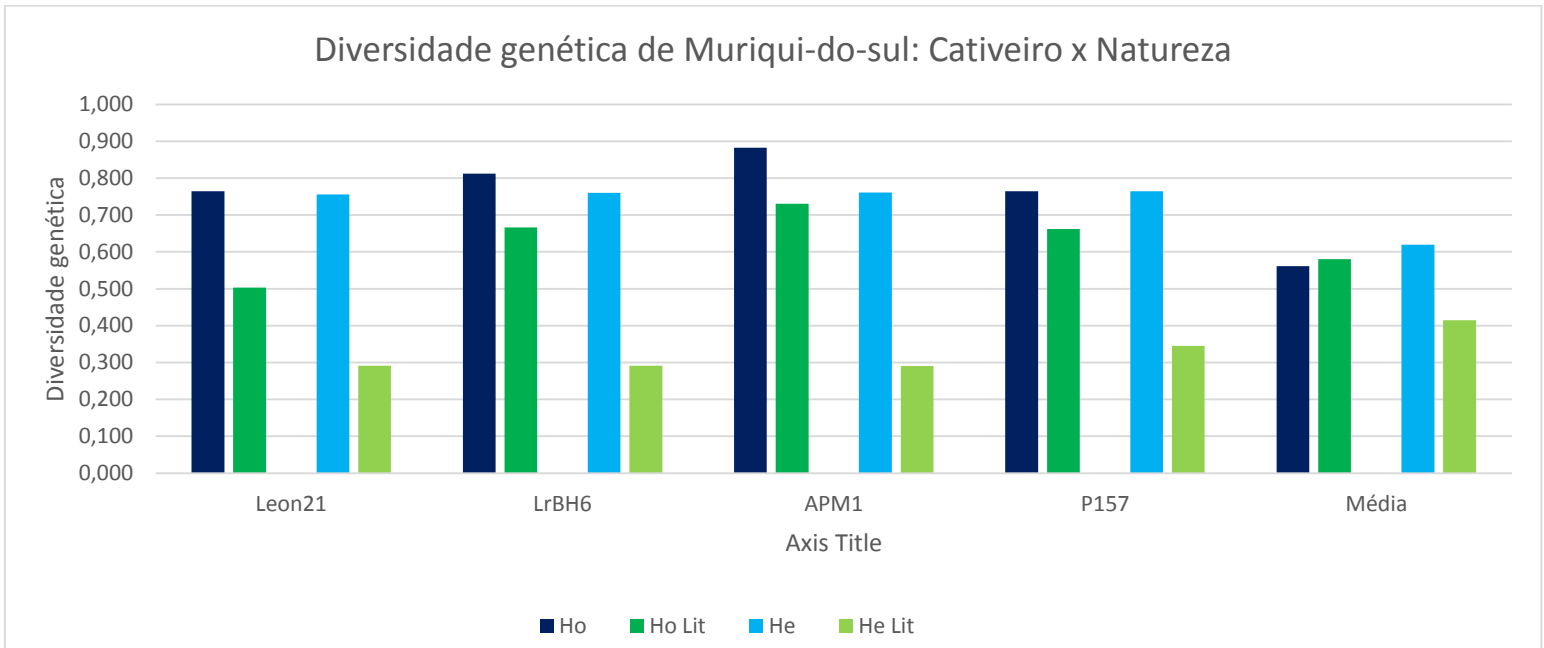
Figura 8: Heterozigosidade observada neste trabalho e heterozigosidade encontrada na literatura



Como demonstrado nas imagens acima, embora os valores de heterozigosidade esperada e observada variem bastante entre os animais muriquis de cativeiro e a literatura, as médias parecem favorecer os indivíduos de cativeiro e, portanto, sugerindo que estes seriam mais diversos do que os animais de vida livre, o que não é condizente com a maioria da literatura relacionada a conservação *in situ/ex situ*.

Para efeitos de comparação das medidas de diversidade genética da população de vida livre *versus* cativeiro, de *B. arachnoides*, realizamos uma nova análise considerando-se somente os loci coincidentes usados no presente trabalho e no trabalho de Magnus (2011).

Figura 9: Diversidade genética de Muriqui-do-sul: Cativo x Natureza



Novamente, os valores de heterozigosidade observada e esperada se mostraram muito próximos ou maiores, contradizendo a premissa de que populações naturais são mais diversificadas que as cativa. Os resultados observados podem ser explicados pelo fato de que os animais em cativeiro representam uma população recém-chegada ao cativeiro, em que quase todos os animais vieram de natureza e, portanto, nossa população não teve tempo de ter sido afetada por forças evolutivas como deriva e adaptação (ao cativeiro) que podem ser responsáveis por redução de variabilidade.

Essas populações não tiveram qualquer planejamento inicial, e foram fundadas, em alguns casos, por animais regatados do chão ou apreendidos por órgãos governamentais, direcionados aos zoológicos ou criadouros. Podemos até dizer que tivemos sorte, pois, mesmo com uma seleção tão aleatória de indivíduos, nossa população possui bons níveis de variabilidade genética e, portanto, uma boa representante como controle e reservatório genético das populações naturais.

5.5. Parentesco

Uma simulação realizada no programa Coancestry indicou o estimador de Queller & Goodnight como sendo o melhor estimador de parentesco para nossos dados, com um *true value* de 0,63401. Um teste empírico com nossos dados resultou nas possíveis relações de parentesco representadas da TABELA 8.

Tabela 8: Relações de parentesco na população como inferido pelo estimador de Queller & Goodnight usando o programa Coancestry.

Par	Ind-1	Ind-2	Q&G	Par	Ind-1	Ind-2	Q&G
1	2583	TOCA	HS	26	9548	0963	PO
2	2583	3607	PO	27	9548	FER	HS
3	2583	2263	HS	28	9548	9394	FS
4	2583	2506	HS	29	9548	DAVID	HS
5	2583	2425	HS	30	2425	FAEL	HS
6	2583	JUCA	HS	31	2425	FER	FS
7	TOCA	3607	HS	32	2425	DAVID	HS
8	TOCA	2434	HS	33	FAEL	0963	HS
9	TOCA	2049	HS	34	FAEL	FER	FS
10	TOCA	2425	HS	35	FAEL	9394	FS
11	TOCA	JUCA	HS	36	FAEL	DAVID	FS
12	TOCA	FER	HS	37	0961	0962	PO
13	TOCA	DAVID	HS	38	0961	0963	HS
14	3607	JUCA	HS	39	0961	FER	HS
15	2263	2434	HS	40	0961	9394	FS
16	2263	2049	HS	41	0961	DAVID	FS
17	2263	2506	HS	42	0962	9394	HS
18	2263	2425	HS	43	0962	DAVID	HS
19	2263	JUCA	FS	44	0963	FER	HS
20	2434	2049	FS	45	0963	9394	FS
21	2506	2425	FS	46	0963	DAVID	FS
22	2506	JUCA	HS	47	FER	9394	FS
23	9548	JUCA	HS	48	FER	DAVID	PO
24	9548	0961	FS	49	9394	DAVID	PO
25	9548	0962	HS				

IND-1 (Indivíduo 1); IND-2 (Indivíduo 2); Q&G (Queller & Goodnight); HS (Half-sibs/meios-irmãos); FS (Full-Sibs/Irmãos-completos); PO (Parent-Offspring/Parental-filhos)

Apesar de termos feito as análises de parentesco com o melhor estimador sugerido, acreditamos que algumas dessas relações possam estar equivocadas. Uma das possíveis razões para o erro, é o número de *loci* ou *loci* escolhidos para o trabalho, que não puderam resolver esta questão. Nossa hipótese nula para os indivíduos 2049, 2583, 2263 e 2434, é que a primeira, seria mãe (PO) dos outros, segundo informações providenciadas pelo Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, sendo os indivíduos 2434 e 2583 filhos do mesmo pai e, portanto, irmãos-completos (Full-Sibs). No entanto, a relação mãe-filhos não aparece na análise, tampouco a relação irmãos completos, e meio irmãos descritas acima. A tabela 9 representa o genótipo da 'família' do CPRJ.

Tabela 9: Genótipos da fêmea 2049, mãe dos indivíduos machos 2583, 2263 e 2434.

Muriqui		Primers microssatélites															
Ind	Sexo	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2	Al-1	Al-2
		chu6	chu6	Leon3	Leon3	Leon21	Leon21	Leon30	Leon30	LrBH6	LrBH6	Leon27	Leon27	APM1	APM1	157	157
2583	M	183	183	303	303	391	393	0	0	109	121	224	224	220	224	247	249
2263	M	189	195	303	303	393	397	255	255	107	131	224	224	216	224	245	249
2434	M	183	189	293	293	389	397	255	291	125	131	224	224	216	220	245	249
2049	F	189	189	309	315	385	397	255	291	119	125	224	224	216	224	245	249

Podemos inferir três hipóteses para explicar os parentescos encontrados baseados nos genótipos dos animais 2049, 2583, 2263 e 2434. A primeira se baseia na fusão genética conhecida como quimerismo. Bem conhecido em *Callitrichidae*, é um resultado de troca ou fusão de uma ou mais células entre embriões geneticamente distintos, gêmeos bi vitelínicos, muito comum nesta família, e em outras espécies como boi, gato, cavalo e nos humanos (Haig, 1999; Pineda-Krch e Lehtila, 2004; Pires *et al.*, 2010). Infelizmente não sabemos se cada um desses indivíduos, independentemente, tiveram um irmão gêmeo que nasceu morto ou foi abortado, corroborando o conceito do quimerismo. Nossa segunda hipótese, e talvez a mais provável de ter acontecido, é que existem erros na genotipagem desses indivíduos. Embora tenhamos repetido a própria amplificação de todas as amostras, a genotipagem e ter refeito a análise dos dados no programa, essa é uma hipótese que devemos ter sempre em mente, uma vez que os dados são produtos de inúmeras fases, desde a coleta do material biológico até a extração do seu DNA e análise. A terceira e última explicação para nossos dados, e enfatizamos nossa confiança em nossos parceiros, representa a chance de que a informação de parentesco sobre estes animais, provida *a priori*, estivesse equivocada.

Outra relação já conhecida é a paternidade de David, referente aos pais Fer e 9394 (animais provenientes do Passeio Público de Curitiba-PR), que se confirma com a avaliação de parentesco. Quaisquer outras relações sugeridas na tabela 8 são sugestões baseadas na probabilidade de relação baseada nos genótipos, sem qualquer confirmação prévia.

Embora o programa Coancestry seja bem conhecido e utilizado pela comunidade acadêmica, devemos ter em mente que seus resultados são tão robustos quanto os genótipos fornecidos, sendo necessário também o uso destes com os resultados de diversidade genética, quando tentar-se montar uma estratégia de manejo visando reprodução *ex situ*.

6. IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DO MURIQUI-DO-SUL

Geralmente as populações de cativeiro e conseqüentemente os programas de reintrodução animal são fundados com um número reduzido de indivíduos, comprometendo o pool genético dessas populações iniciais. A longo prazo, isso pode resultar em sérios problemas genéticos se não houve um controle reprodutivo dos indivíduos. O desafio, então, é manter uma população cativa saudável e diversa enquanto tentamos controlar eventos como endogamia, perda ou fixação de alelos, ou a evolução e adaptação ao cativeiro que distancia estas populações das naturais.

Os zoológicos no mundo inteiro têm essa responsabilidade, cuidando do bem-estar dos animais, incluindo controle genético e reprodução assistida. Essa manutenção, se feita corretamente, com certeza terá um grande impacto na conservação das espécies, em especial aquelas em perigo eminente de extinção, até o momento que seja possível realizar a reintrodução desses animais.

Diversas populações cativas que um dia eram compostas de vários animais, passaram por uma redução do seu tamanho devido à má conduta de seus responsáveis e, dentre outros motivos, um dos mais importantes no contexto dos animais em cativeiro é o fato de que as populações são tratadas como singulares e isoladas quando todo o plantel disponível nas diversas instituições deveria ser considerado uma única população. Os órgãos responsáveis pelos planos de ação das espécies em extinção deveriam impor o manejo adequado, altruísta, de modo que quando a troca ou cessão de animais for necessária para manutenção da variabilidade genética no cativeiro, estas sejam realizadas pelos Zoológicos, aquários e afins, tendo a espécie como prioridade, antes da fama dos plantéis.

Nossos dados sugerem que a população de cativeiro possui valores significativos de diversidade genética e, embora animados com esses resultados, não podemos relaxar e esperar que este status continuará constante deixando os indivíduos à mercê do acaso. O objetivo na manutenção de populações em cativeiro é assegurar que exista, no futuro, representantes de quaisquer espécies que escolhermos trabalhar disponíveis. Para mantermos a população diversa e saudável, devemos sempre monitorar os indivíduos para que possamos ter informações sobre paternidade, parentesco, saúde e diversidade, atualizados.

Embora nossa análise de parentesco não tenha produzido resultados mais refinados sobre as relações existentes entre os indivíduos, acreditamos que com os valores de diversidade, e conhecimento da origem de alguns dos indivíduos, pode-se criar um plano de reprodução em cativeiro, selecionando indivíduos menos aparentados, mas diferentes geneticamente, para acasalamento assistido, dessa forma amenizando possíveis chances de endogamia ou exogamia, conservando o pool genético da população.

Esses resultados são apenas um passo no caminho para construção de uma boa estratégia de conservação do muriqui-do-sul. Não podemos nos esquecer do principal motivo pelo qual este animal, e tantos outros, estão ameaçados de extinção. O desmatamento, caça ilegal, urbanização e poluição são uma realidade para o desafio de conservação das espécies animais e vegetais. O muriqui é só mais um dos afetados por esses problemas, uma vez que fragmentos de florestas nativas estão separados por grandes áreas não florestadas dificultando a expansão e dispersão desses animais que utilizam grandes áreas florestais para sobrevivência. Este trabalho, então, fornece mais uma ferramenta para conservação do muriqui-do-sul.

7. CONCLUSÕES

1. Os oito *loci* escolhidos foram representativos e suficientes para realizar as análises de variabilidade genética;
2. A diversidade genética encontrada nos indivíduos de cativeiro foi alta em comparação com outros estudos genéticos de animais de cativeiro e populações naturais;
3. A população em cativeiro apresenta um déficit de heterozigotos não significativo e desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg;
4. Fomos capazes de definir o parentesco entre dos indivíduos de cativeiro com os *loci* selecionados, embora existam algumas dúvidas;
5. A criação de um *studbook* para *Brachyteles arachnoides* é necessária para controle das populações cativas, assim como servirá de base para estratégias de manejo e possíveis pesquisas futuras.

8. REFERÊNCIAS

- AGAPOW, P.-M.; BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, n. 1-2, p. 101-102, 2001. ISSN 1471-8286.
- AGUIRRE, A. C. **O mono Brachyteles arachnoides (E. Geoff roy). Situação Atual da Espécie no Brasil.** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1971. 53.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Mol Ecol**, v. 11, n. 2, p. 155-65, Feb 2002. ISSN 0962-1083 (Print)0962-1083.
- BONATTO, S. L.; MAGNUS, T. Filogeografia do muriqui do sul, *Brachyteles arachnoides* (Primates, Atelidae). 2011 2011.
- BOUBLI, J. P.; COUTO-SANTOS, F. R.; MOURTHÉ, I. A quantitative assessment of habitat differences between northern and southern muriquis (Primates, Atelidae) in the Brazilian Atlantic Forest. **Ecotropica**, v. 16, p. 63-69, 2010.
- BREVES, P. et al. Uso do Chão por *Brachyteles arachnoides* No Parque Nacional Serra Dos Órgãos, Teresópolis, Brasil. <http://dx.doi.org/10.1896/044.020.0109>, 2014-05-19 2014.
- BROOKFIELD, J. F. Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 3, p. 453-455, 1996. ISSN 1365-294X.
- BUTCHART, S. H. M. et al. Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. **Science**, v. 328, n. 5982, p. 1164-1168, 2010.
- CARDOSO, M. L. V.; GARCIA, J. E. **MARCADORES MOLECULARES PARA A IDENTIFICAÇÃO DEMURIQUI (brachyteles arachnoides).** XIX CONIC; III CONITI; VII JOIC. UFPE 2011.
- CHAVES, P. B. et al. Noninvasive genetic sampling of endangered muriqui (Primates, Atelidae): efficiency of fecal DNA extraction. **Genet. Mol. Biol.**, v. 29, n. 4, p. 750-754, 00/2006 2006. ISSN 1415-4757.
- CORTÉS-ORTIZ, L.; MONDRAGÓN, E.; CABOTAGE, J. Isolation and characterization of microsatellite loci for the study of Mexican howler monkeys, their natural hybrids, and other Neotropical primates. **Conservation Genetics Resources**, v. 2, n. 1, p. 21-26, 2010. ISSN 1877-7252.
- CRNOKNAK, P.; ROFF, D. A. **Inbreeding depression in the wild.** The Genetical Society of Great Britain: Heredity. 83: 260-270 p. 1999.

DE MORAES, P.; DE CARVALHO, O., JR.; STRIER, K. Population Variation in Patch and Party Size in Muriquis (*Brachyteles arachnoides*). **International Journal of Primatology**, v. 19, n. 2, p. 325-337, 1998. ISSN 0164-0291.

DI FIORE, A.; FLEISCHER, R. C. Microsatellite markers for woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*) and their amplification in other New World primates (Primates: Platyrrhini). **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 2, p. 246-249, 2004. ISSN 1471-8286.

FAGUNDES, V. **CONSERVATION GENETICS OF THE MURIQUI: PAST, PRESENT AND FUTURE: Neotropical primates**. 13: 85-91 p. 2005.

FERRAZ, D. D. S. **Comportamento locomotor de uma população de muriquis-do-norte (*Brachyteles hipoxanthus*)**. 2013. 74 (Mestrado). UFV, Viçosa, MG.

GALBUSERA, P. 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, 2008. ISSN 1566-0621.

GRATIVOL, A. D.; BALLOU, J. D.; FLEISCHER, R. C. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). **Conservation Genetics**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2001. ISSN 1572-9737.

HAIG, D. What is a marmoset? **American Journal of Primatology**, v. 49, n. 4, p. 285-296, 1999. ISSN 1098-2345.

ISHIBASHI, Y. et al. Null microsatellite alleles due to nucleotide sequence variation in the grey-sided vole *Clethrionomys rufocanus*. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 4, p. 589-590, 1996. ISSN 1365-294X.

KALINOWSKI, S. T. et al. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, 2007. ISSN 1365-294X.

KANTHASWAMY, S. et al. Microsatellite markers for standardized genetic management of captive colonies of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **American Journal of Primatology**, v. 68, n. 1, p. 73-95, 2006. ISSN 1098-2345..

KELLER, L. F.; WALLER, D. M. **Inbreeding effects in wild populations: TRENDS in Ecology & Evolution**. 17: 230-241 p. 2002.

LEMOS DE SÁ, R. M.; GLANDER, K. E. Capture techniques and morphometrics for the woolly spider monkey, or muriqui (*Brachyteles arachnoides*, E. Geoffroy 1806). **American Journal of Primatology**, v. 29, n. 2, p. 145-153, 1993. ISSN 1098-2345.

LIS, J. T.; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. 1975-03-01 1975.

LOPES, D. M. et al. Comparative study on the use of specific and heterologous microsatellite primers in the stingless bees *Melipona rufiventris* and *M. mondury* (Hymenoptera, Apidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 390-393, 2010. ISSN 1415-4757.

MAMIATIS, T. et al. Molecular cloning—A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982, 545 S., 42 \$. **Acta Biotechnologica**, v. 5, n. 1, p. 104-104, 1985. ISSN 1521-3846.

MEIRELES, C. M. et al. Molecular Phylogeny of Ateline New World Monkeys (Platyrrhini, Atelinae) Based on γ -Globin Gene Sequences: Evidence That *Brachyteles* is the Sister Group of *Lagothrix*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, n. 1, p. 10-30, 1999. ISSN 1055-7903.

MIRANDA, J. M. D. et al. Three years on demography of a group of *Alouatta guariba clamitans* Cabrera (Primates, Atelidae): growth and fragmentation. **Rev. Bras. Zool.**, v. 23, n. 3, p. 703-706, 09/2006 2006. ISSN 0101-8175.

MOORE, S. S. et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v. 10, n. 3, p. 654-660, 1991. ISSN 0888-7543.

PANAUD, O.; CHEN, X.; MCCOUCH, S. R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Mol Gen Genet**, v. 252, n. 5, p. 597-607, Oct 16 1996. ISSN 0026-8925 (Print)0026-8925.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.

PEDRO LUÍS RODRIGUES DE MORAES, O. D. C. J., KAREN B. STRIER. Population Variation in Patch and Party Size in Muriquis (*Brachyteles*). **International Journal of Primatology**, v. 12, n. 2, p. 325-337, 2014.

PEREZ-SWEENEY, B. M. et al. Dinucleotide microsatellite primers designed for a critically endangered primate, the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 2, p. 198-201, 2005. ISSN 1471-8286.

PINEDA-KRCH, M.; LEHTILA, K. Costs and benefits of genetic heterogeneity within organisms. **J Evol Biol**, v. 17, n. 6, p. 1167-77, Nov 2004. ISSN 1010-061X (Print)1010-061x.

PINTO, L. P. S. et al. Habitat, Density and Group Size of Primates in a Brazilian Tropical Forest. **Folia Primatologica**, v. 61, n. 3, p. 135-143, 1993. ISSN 0015-5713.

PIRES, R. M. L. et al. Brown Swiss cattle cytogenetic analysis. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 67, n. 2, p. 151-155, 2010.

POPE, T. R. Genetic Variation in Remnant Populations of the Woolly Spider Monkey (*Brachyteles arachnoides*). **International Journal of Primatology**, v. 19, n. 1, p. 95-109, 1998. ISSN 1573-8604.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. v. 142, n. 6, p. 1141–1153, June 2009 2009.

RICE, W. R. C. F. P. D. J. Analyzing Tables of Statistical Tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223-225, 1989. ISSN 00143820, 15585646.

ROSS, C. L. et al. Rapid Divergence of Microsatellite Abundance Among Species of *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 7, p. 1143-1157, 2003.

RYLANDS, A. B. et al. The Diversity of the New World Primates (Platyrrhini): An Annotated Taxonomy. p. 23-54, 2014. ISSN 978-0-387-78705-3.

SCHLOTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v. 109, n. 6, p. 365-71, Sep 2000. ISSN 0009-5915 (Print)0009-5915.

SCHNEIDER, H. et al. Molecular Phylogeny of the New World Monkeys (Platyrrhini, Primates). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 2, n. 3, p. 225-242, 1993. ISSN 1055-7903.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, n. 1, p. 457-62, Jan 1995. ISSN 0016-6731 (Print)0016-6731.

STRIER, K. B. Diet in one group of woolly spider monkeys, or muriquis (*Brachyteles arachnoides*). **American Journal of Primatology**, v. 23, n. 2, p. 113-126, 1991. ISSN 1098-2345.

STRIER, K. B. et al. Population demography of Northern muriquis (*Brachyteles hypoxanthus*) at the Estacao Biologica de Caratinga/Reserva particular do Patrimonio Natural-Feliciano Miguel Abdala, Minas Gerais, Brazil. **Am J Phys Anthropol**, v. 130, n. 2, p. 227-37, Jun 2006. ISSN 0002-9483 (Print)0002-9483.

STRIER, K. B.; DEPARTMENT OF ANTHROPOLOGY, U. O. W. M., MADISON, WISCONSIN 53706. Atelinae adaptations: Behavioral strategies and ecological constraints. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 88, n. 4, p. 515-524, 2014. ISSN 1096-8644.

TABARELLI, M. et al. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132-138, 2005.

TALEBI, M.; BASTOS, A.; LEE, P. C. Diet of Southern Muriquis in Continuous Brazilian Atlantic Forest. **International Journal of Primatology**, v. 26, n. 5, p. 1175-1187, 2005. ISSN 0164-0291.

TALEBI, M.; SOARES, P. Conservation research on the southern murequi (*brachyteles Arachnoides*) in são paulo state, brazil. *Neotropical Primates*. 13: 53-59 p. 2005.

TALEBI, M. G. et al. Polymorphism of visual pigment genes in the murequi (Primates, Atelidae). *Molecular Ecology*, v. 15, n. 2, p. 551-558, 2006. ISSN 1365-294X.

TORRES DE ASSUMPÇÃO, C. Ecological and behavioural information on *Brachyteles arachnoides*. *Primates*, v. 24, n. 4, p. 584-593, 1983. ISSN 0032-8332.

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. ISSN 1471-8286.

WANG, J. COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Mol Ecol Resour*, v. 11, n. 1, p. 141-5, Jan 2011. ISSN 1755-098x.

WITZENBERGER, K.; HOCHKIRCH, A. Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodiversity and Conservation*, v. 20, n. 9, p. 1843-1861, 2011. ISSN 0960-3115.

WOOLLIAMS, J. A.; MATIKA, O.; PATTISON, J. Conservation of animal genetic resources: approaches and technologies for in situ and ex situ conservation. *Animal Genetic Resources / Ressources génétiques animales / Recursos genéticos animales*, v. 42, p. 71-85, 2008.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. **The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants:** *TREE*. 11: 413-418 p. 1996.

9. ANEXOS

ANEXO 1

Extração de DNA Wizard Genomic DNA Purification kit

- 1- Para 300µl de amostra adicionar 900µl de solução de lise em microtubo de 1,5ml.
- 2- Misturar 5-6 vezes por inversão
- 3- Incubar à temperatura ambiente por 10min e realizar 3 inversões durante esse tempo. Centrifugar a 13-16.000 x g, por 20 segundos em temperatura ambiente.
- 4- Descartar o sobrenadante sem remexer o pellet.
- 5- Se a amostra tiver sido congelada, repetir passos 1-4 até que o pellet fique claro. Se for usado EDTA para conservar a amostra não é necessário repetir os passos.
- 6- Ressuspender o pellet em vortex por 20 segundos
- 7- Adicionar 300µl de solução de lise nuclear ao tubo. Pipetar o misturado 6 vezes para lisar as células e incubar por 1 hora.
 - a. Se após incubação ainda houver aglomerados de células, adicionar 1,5µl de RNase, misturar e incubar por 15 minutos em temperatura ambiente.
- 8- Adicionar 100µl de solução de precipitação proteica e misturar em vortex por 20 segundos.
- 9- Centrifugar a 13-16.000 x g por 3 minutos.
- 10- Transferir o sobrenadante para novos tubos de 1,5ml contendo 300µl de isopropanol temperatura ambiente
- 11- Misturar gentilmente até visualizar aglomerado de DNA.
- 12- Centrifugar a 13-16.000 x g por 1 minuto. Poderá se observar um pellet branco de DNA
- 13- Remover o sobrenadante e adicionar 1 igual volume de etanol 70% à solução. Agitar gentilmente para lavar o DNA e centrifugar a 13-16.000 x g por 1 minuto.
- 14- Remover o sobrenadante com cuidado para não remover o pellet de DNA. Inverter o tubo em papel absorvente de deixar secar ao ar por 15 minutos.
- 15- Adicionar 100µl de solução reidratante de DNA e incubar a 65°C por 1 hora, ou incubar *overnight* em temperatura ambiente ou a 4°C
- 16- Estocar o DNA a 2-8°C.

ANEXO 2

Protocolo para extração de DNA de Sambrook et al (1989) modificado

- 1 Utilizar 100 µl de sangue. Misturar com 200 µl de Tampão de lise (Tris- HCl 10 mM, pH 8,5 e KCl 50 mM), 15 µl (5U) de Proteinase K e 20 µl de SDS 20% em tubos. Homogeneizar a mistura.
- 2- Incubar a mistura homogeneizada em termobloco (55°) por aproximadamente 12 h ou overnight.
- 3- Adicionar 250 µl de Fenol em cada tubo e agitar por 10 minutos, depois centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm (11.988 g).
- 4- Transferir o sobrenadante para tubos novos e adicionar 250 µl de Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1. Agitar os tubos vagorosamente por 5 minutos e centrifugar por 10 min a 12.000 rpm (11.988 g).
- 5- Transferir o sobrenadante para novos tubos e acrescentar 250 µl de CLOROFÓRMIO: ÁLCOOL ISOAMÍLICO 24:1. Agitar vagorosamente por 5 min e centrifugar a 12.000 rpm (11.988 g) por 10 min.
- 6- Passar o sobrenadante para tubos novos e adicionar 10% deste volume de Acetato de sódio 3M, e 2,5 vezes o volume de Etanol absoluto gelado. Inverta o tubo levemente.
- 7- Deixe o DNA precipitar no freezer a -20° por 2 horas ou overnight.
- 8- Centrifugue por 30 min. A 12.000 rpm. Coloque os tubos no freezer por 10-20 min a fim de que o pellet não desgrude do fundo
- 9- Descarte o sobrenadante e lave o DNA com 750 µl de Álcool 70%. Centrifugue por 10 min. A 12.000 rpm.
- 10- Repetir o passo anterior
- 11- Descartar o sobrenadante e deixar à temperatura ambiente para evaporar o etanol restante. Depois acrescentar 100 a 200 µl de água destilada para diluir o DNA.
- 12- Deixar eluindo o máximo de tempo possível

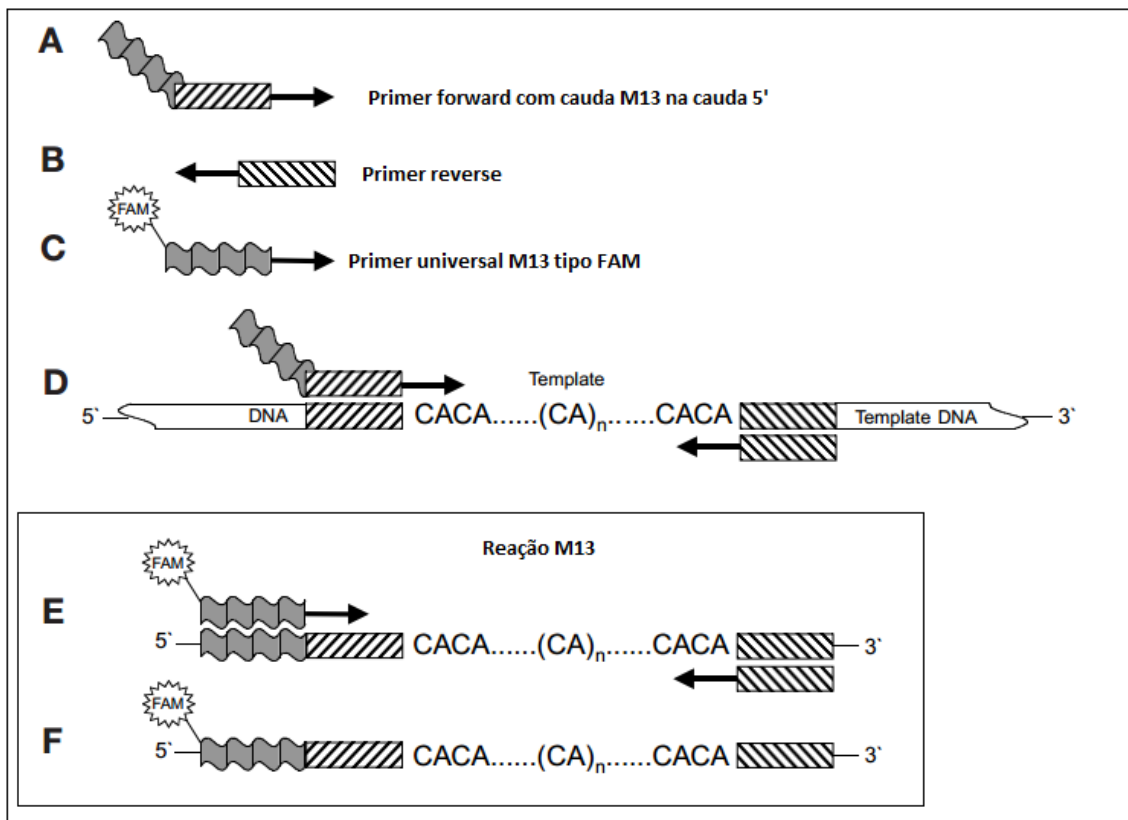
ANEXO 3**Protocolo de purificação e precipitação de DNA (Lis, 1975)**

- 1- Adicionar 0,4µl de glicogênio por amostra
- 2- Adicionar igual volume de solução de PEG 20%+Azure os ao produto de PCR e homogeneizar
- 3- Incubar em banho seco a 37°C por 20 minutos
- 4- Centrifugar por 15 minutos a 14.500rpm
- 5- Descartar o sobrenadante
- 6- Adicionar levemente 125 µl de etanol 80% gelado
- 7- Centrifugar por 10 minutos a 14.500rp
- 8- Repetir passos 5 e 6
- 9- Centrifugar por 10 minutos a 14.500rpm
- 10- Verter o álcool e manter os tubos a 37°C por 40 minutos
- 11- Adicionar 12-15 µl de água deionizada autoclavada ou TE

ANEXO 4

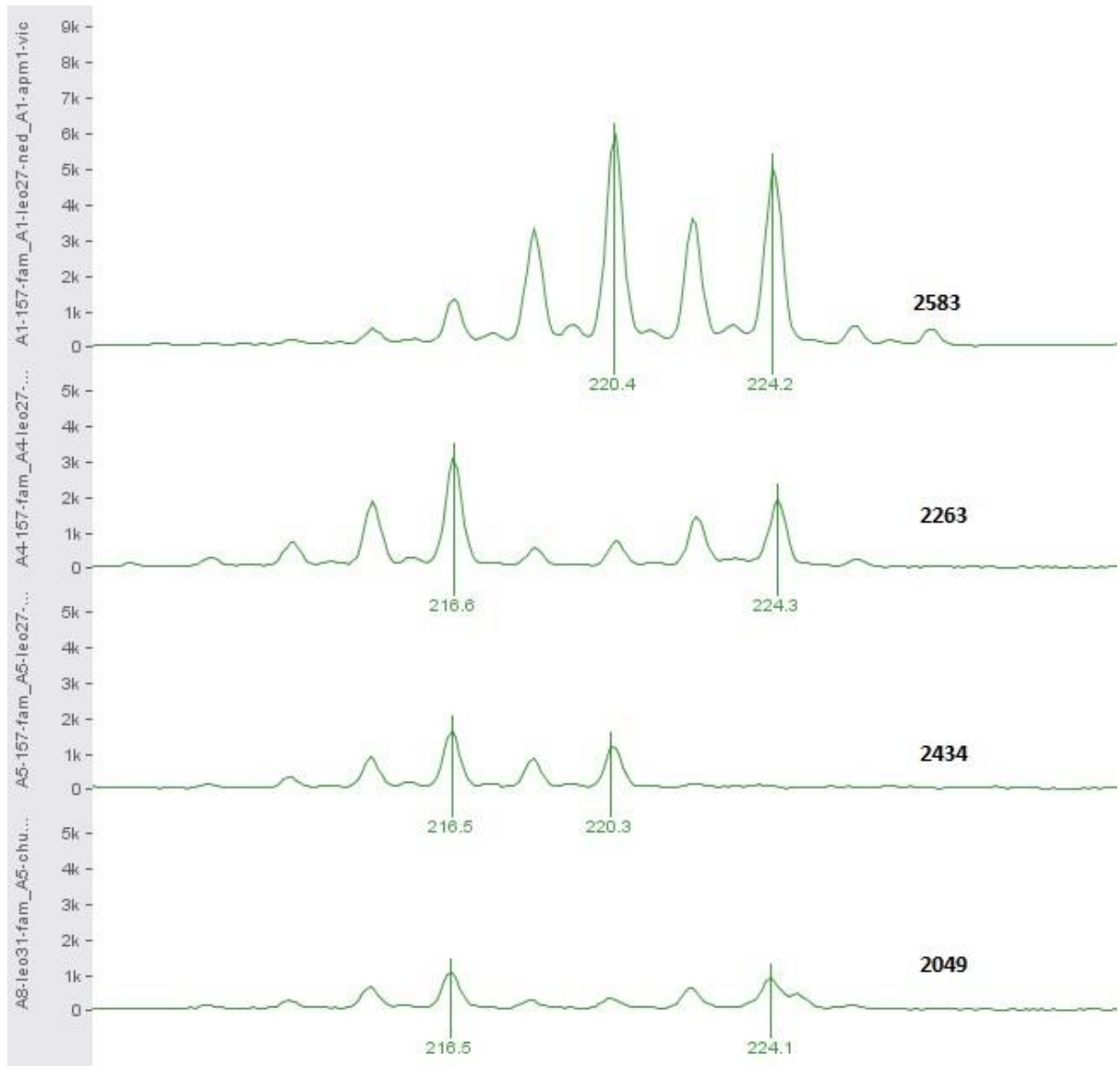
Amplificação utilizando reação única pela técnica de PCR.

(A,B) Primers microssatélites de interesse, (C) Sequência do primer universal M13 e fluoróforo FAM, (D) O primeiro ciclo de PCR incorpora o primer forward com a cauda M13 no produto de PCR, (E) O fluoróforo FAM é incorporado pela cauda M13 durante ciclos mais avançados à 53°C, (F) O produto final pode ser visualizado por sistema de detecção a laser.

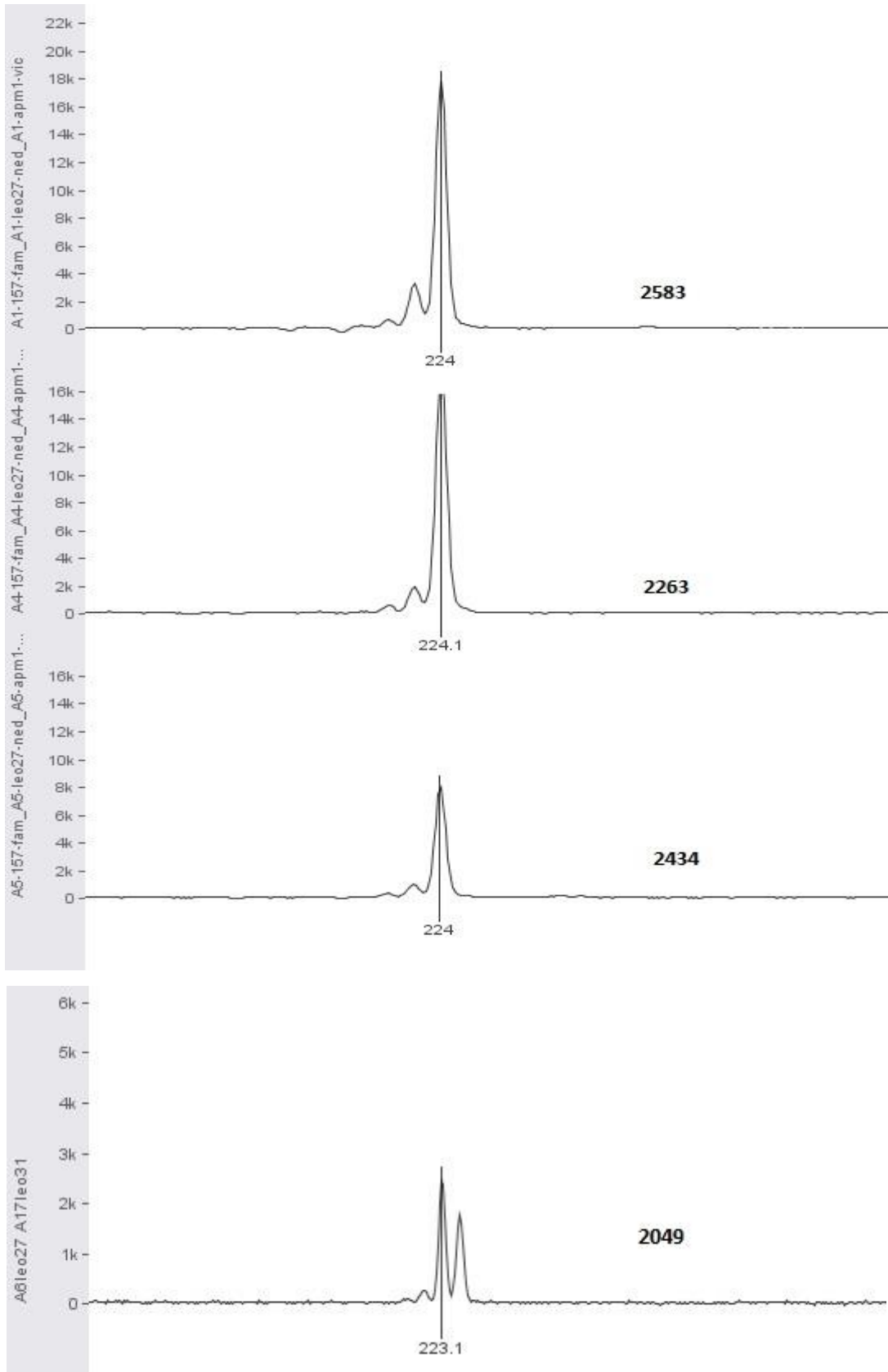


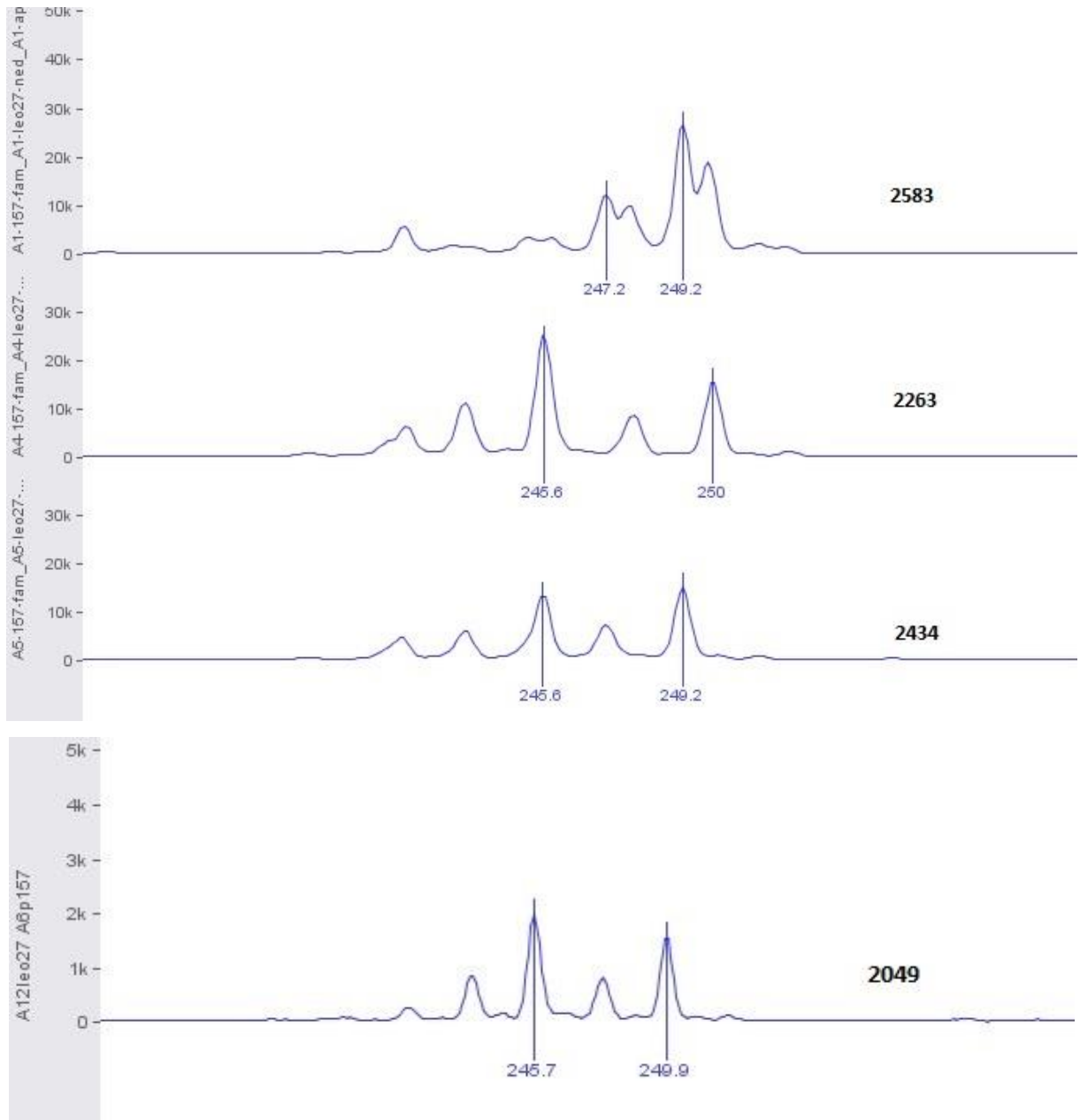
ANEXO 5

Imagens dos eletroferogramas de todos os *loci* utilizados nas análises de parentesco para cada um dos indivíduos 2583, 2263, 2434 e 2049.

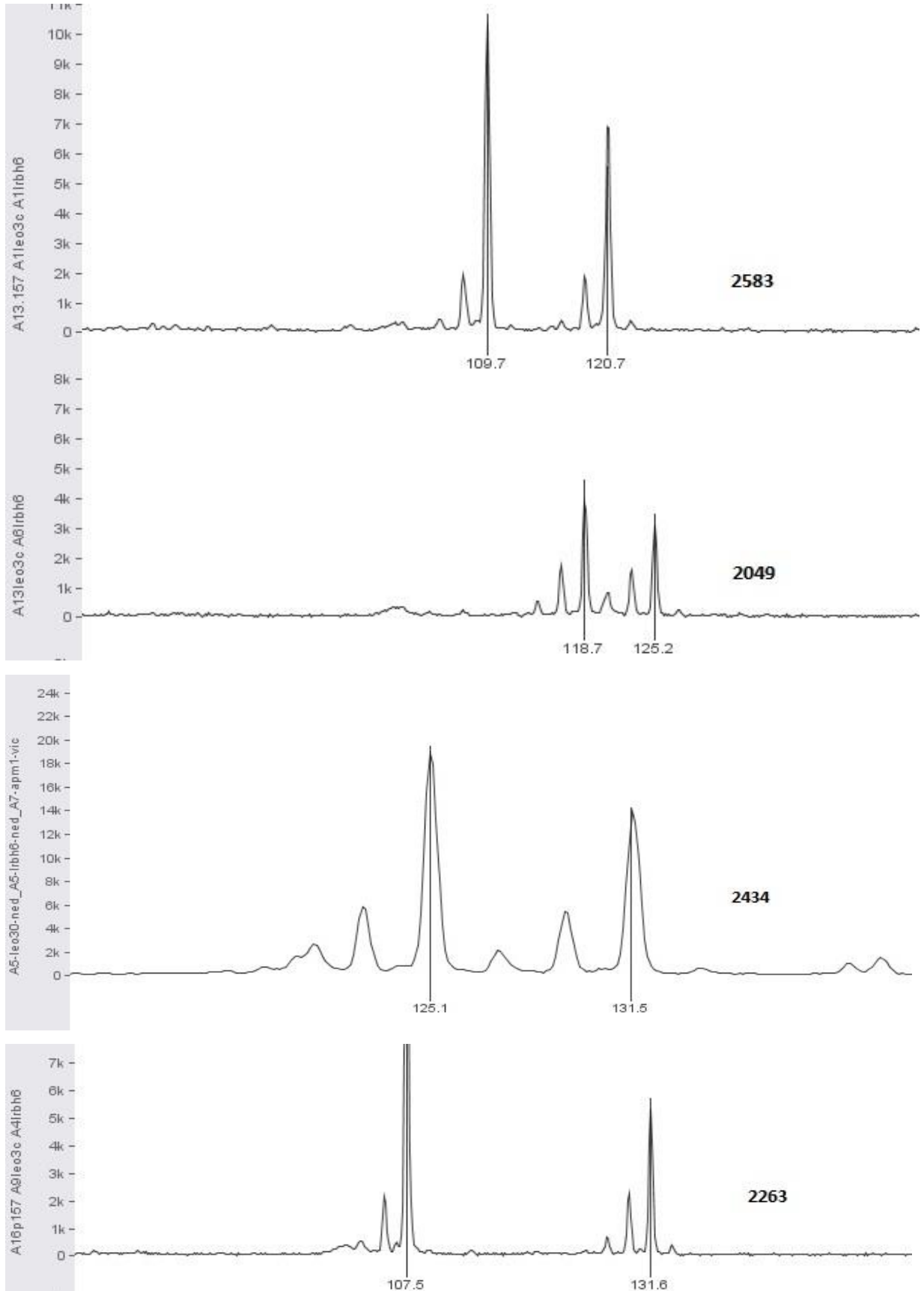
Locus APM1

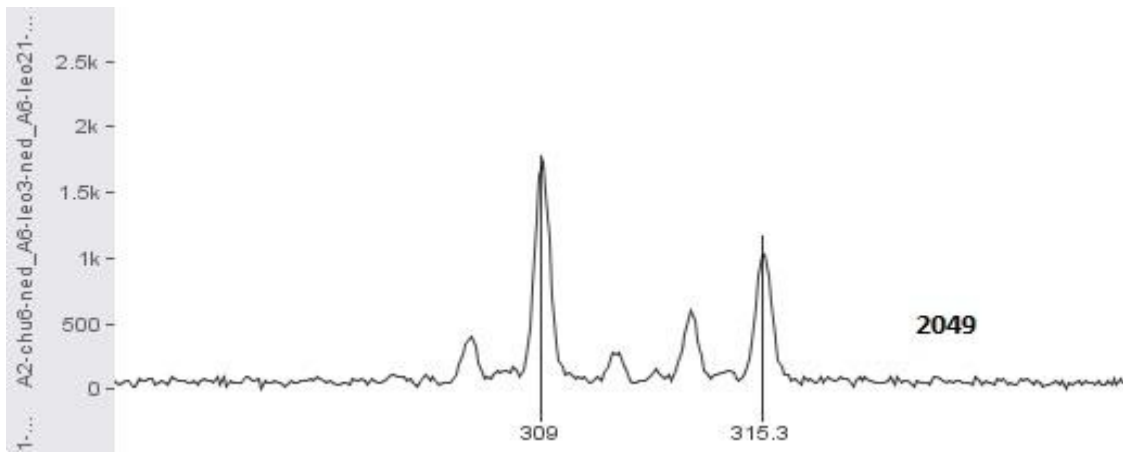
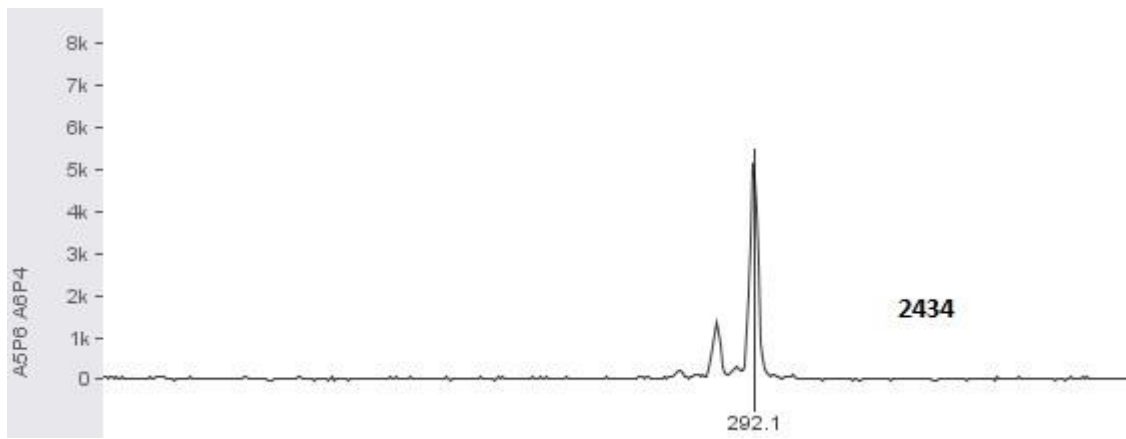
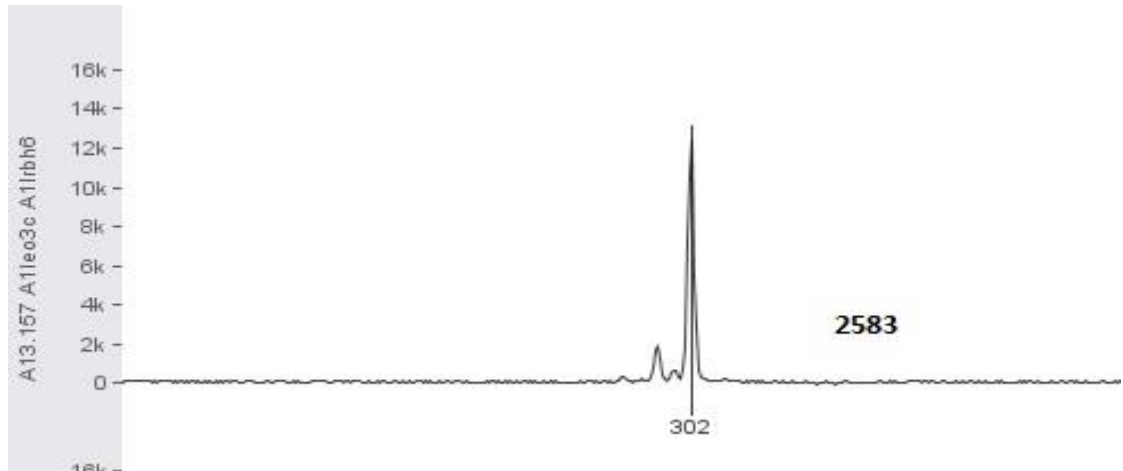
Locus Leon27c13

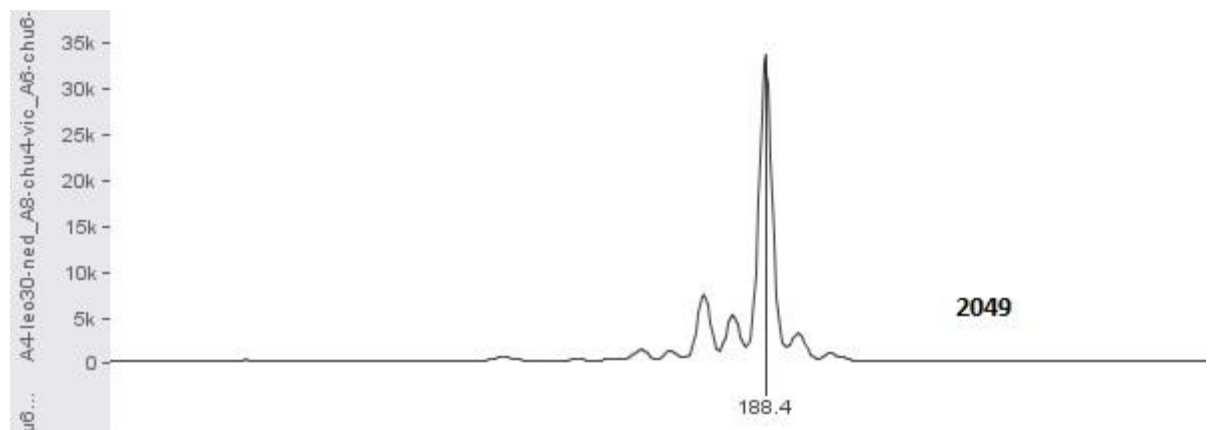
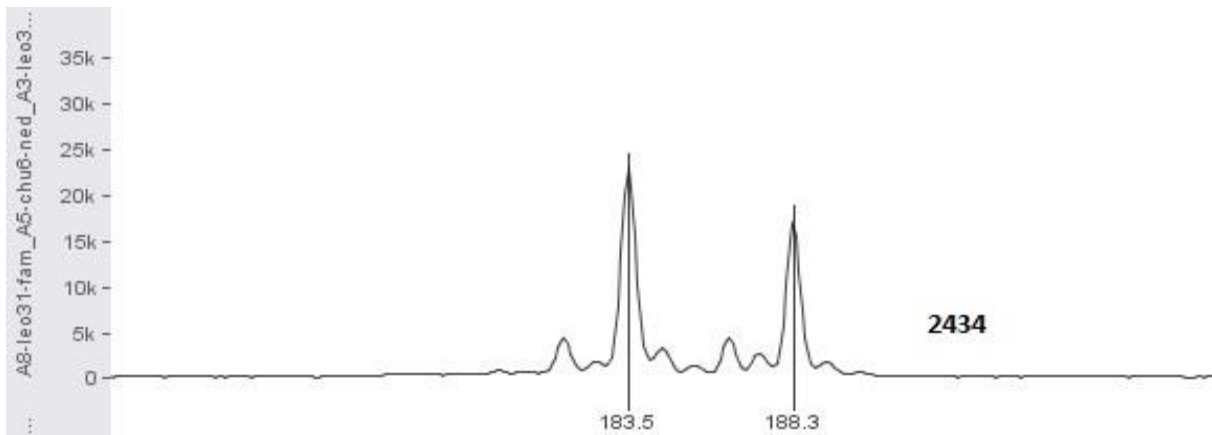
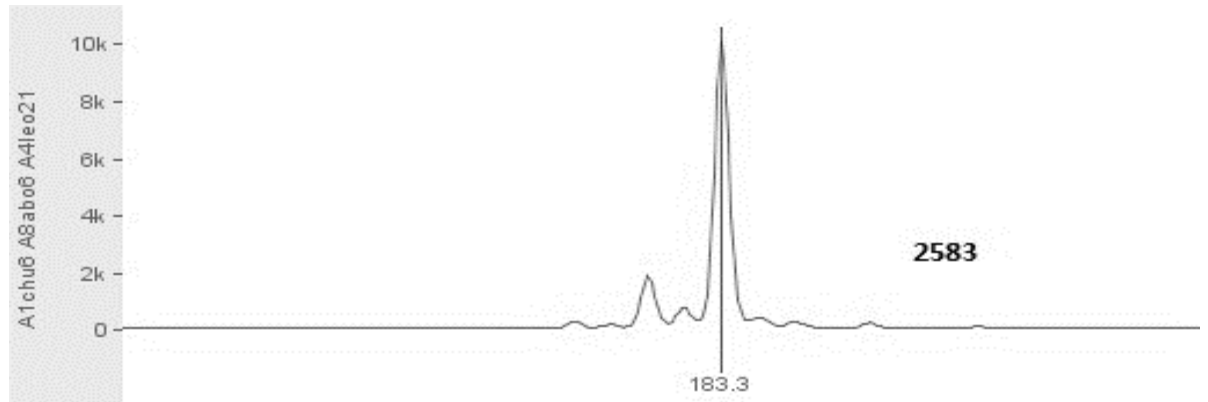


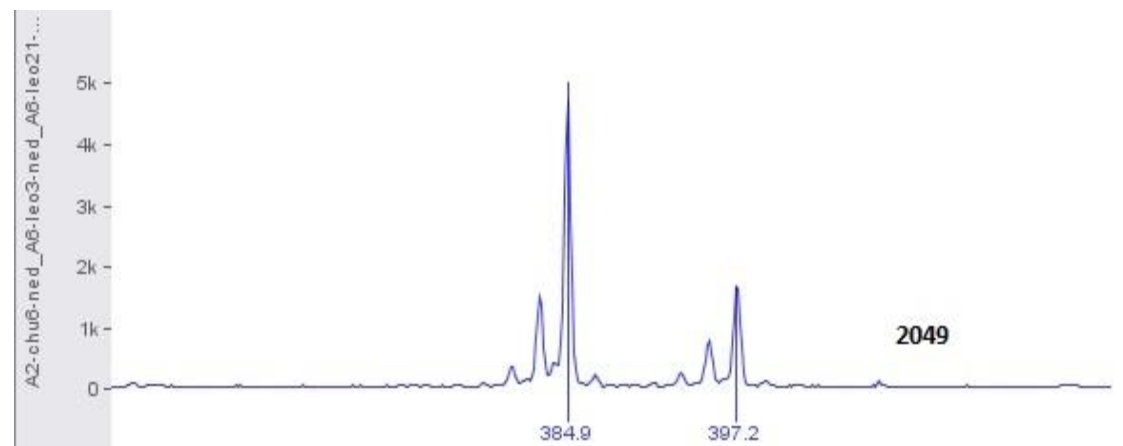
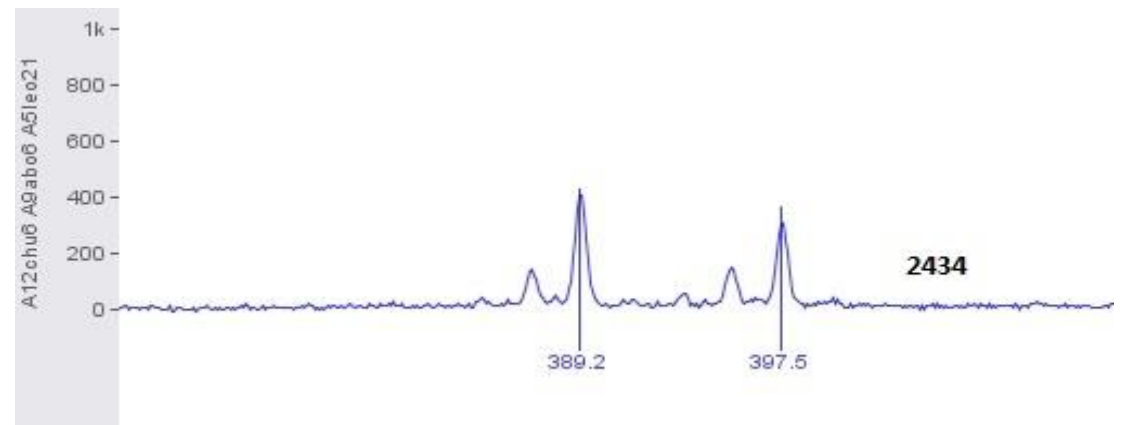
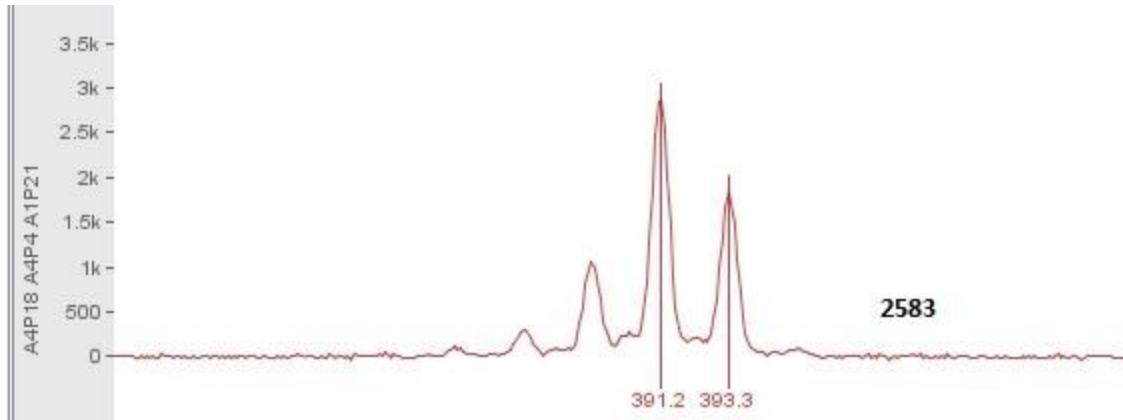
Locus 157

Locus LrP2BH6



Locus Leon3c20

Locus L.chu06

Locus Leon21c75

Locus Leon30c73

