

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**Caracterização genética de *Alouatta caraya* (Primates, Atelidae)
utilizando marcadores heterólogos do tipo microssatélites**

Ana Paula Daltoé Inglês

Brasília – DF
2006



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**Caracterização genética de *Alouatta caraya* (Primates, Atelidae)
utilizando marcadores heterólogos do tipo microssatélites**

Ana Paula Daltoé Inglês

Dissertação apresentada ao
Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília como
parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Biologia
Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira

Brasília – DF
2006

Alcançou o sucesso

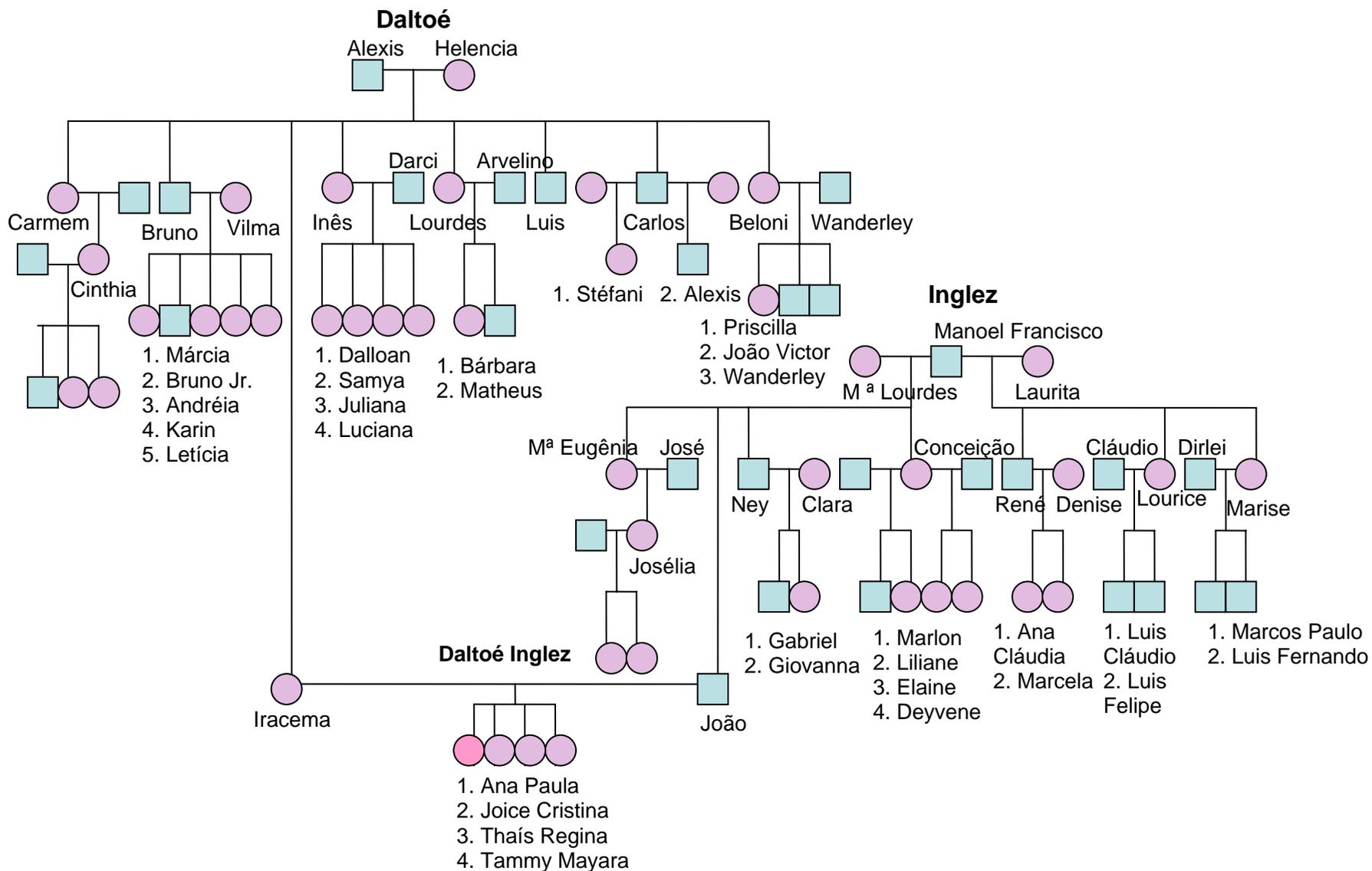
aquele que viveu bem,

riu com frequência

e amou muito.

DEDICO

Hereditograma da família Daltoé Inglez



Dedico esta dissertação à minha família: meus pais João e Iracema, minhas irmãs queridas Joice, Thaís e Tammy, pelo amor, apoio, educação, princípios e felicidade.

Tudo incondicionalmente.

Sem vocês, o mundo não teria tanta graça.

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. **Silviene F. Oliveira**, que me ensinou, durante quase seis anos de convivência, o que significa ter respeito, carinho, confiança e espírito pedagógico ao longo deste processo de aprendizagem. Muito obrigada, Sill!

À profa. Dra. **Maria Paula Schneider** e ao prof. Dr. **Evonnildo Costa Gonçalves** pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Polimorfismos de DNA da Universidade Federal do Pará (LPDNA – UFPa), sempre de portas abertas e com a mão estendida, me orientando e apoiando em tudo quanto fosse necessário, e ao prof. Dr. **Artur Silva**, em especial, por me acolher em sua casa durante este período com o coração, bons vinhos, amigos e risadas: tudo isso possibilitou a execução deste trabalho;

Aos membros da banca de avaliação, profa. Dra. **Maria Paula Schneider**, profa. Dra. **Maria de Nazaré Klautau-Guimarães** e profa. Dra. **Rosane Collevatti** por terem aceitado o convite e contribuído para a melhor finalização deste trabalho;

Ao **Heitor Burlamaqui Bastos** que deu continuidade aos experimentos práticos quando eu não mais pude estar em Belém. Minha gratidão, Heitor!

À **Equipe da Pró-Fauna** pela disponibilidade e gentileza no fornecimento das fichas morfométricas dos animais capturados que fizeram parte deste estudo;

À **CAPES**, ao **CNPq** e ao **Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da UnB**, pelo apoio financeiro;

Ao Programa de **Pós-Graduação em Biologia Animal** e à **Universidade de Brasília**, e aos **professores do Instituto de Ciências Biológicas** pela orientação acadêmica e amizade;

Aos funcionários da UnB, especialmente à **Nara**, **Ornil** e **Elisa** pela atenção e carinho nas atividades burocráticas e do laboratório, no dia a dia;

À **Nira** e **Socorro**, as técnicas do LPDNA – UFPa, por terem contribuído quando da genotipagem das amostras, me acompanhando em chuvas e domingos laborais;

Aos professores do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília (UnB), **Nazaré, César** e **Zulmira** pela atenção e importantes contribuições em minha formação acadêmica e também pela amizade;

Aos **colegas de laboratório do LPDNA – UFPa**, pois vocês não somente me apresentaram o LPDNA, mas também a maravilhosa Belém do Pará!

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília: **Gustavo, Neide, Carol, Sílvia, Guilherme, Gegê, Arthur, Gabriel, Mila, Neide, Rejane, Henry, Daniela, Juliana Ruas, Eduardo, Reginaldo, Ricardo, Diogo, Penha, Wellington** e **Leonora** que compartilharam tantas horas de bancada, dando apoio e mostrando a sua amizade em todos os momentos.

Aos amigos **Beto, Jójô, Bebel, Cláudio, Paulinho, Lorena, Vanessa, Rodrigo, Samuel, Will, José Roberto** e **Selma** pelas conversas que muito contribuíram para minha formação como ser humano e bióloga, discutindo teorias e dados e, mais ainda, pela amizade, apoio e carinho!

Ao **Alê**, pelos bons momentos, companheirismo, felicidade, alegria e amor!

Muito Obrigada!

RESUMO

Os *Alouatta*, conhecidos como bugios, estão distribuídos por toda a região Neotropical ocupando variados tipos de habitats. No presente trabalho, descrevemos a caracterização demográfica, a morfológica e a variabilidade genética de uma população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera, São Paulo, Brasil. Nas análises de caracterização demográfica, comparamos o número de machos e de fêmeas existentes na população total (N = 501) e nas diversas classes etárias: Adulto, Subadulto, Jovem e Infante. Os resultados mostram igualdade no número total de machos e de fêmeas na população total ($\chi^2 = 1,7786$, GL = 1, p = 0,1823) e na distribuição das diversas classes etárias, segundo o teste z aplicado. Em relação à morfologia, foram avaliados os parâmetros peso e comprimento total dos indivíduos, comparando-se as classes etárias. Os resultados indicam intenso dimorfismo sexual entre machos e fêmeas adultos, menor dimorfismo entre jovens e ausente dimorfismo entre infantes, corroborando o descrito na literatura para dimorfismo sexual e tamanho corpóreo da espécie.

A caracterização genética foi realizada utilizando marcadores de DNA do tipo microssatélites heterólogos desenvolvidos originalmente para *Alouatta belzebul*. O DNA genômico de 100 espécimes foi isolado utilizando um protocolo padrão fenol-clorofórmio e 20 marcadores foram testados e amplificados por reação em cadeia da polimerase, sendo genotipados em um seqüenciador automático ALFexpressTM II. Sete marcadores apresentaram ampliações positivas: Ab04, Ab06, Ab07, Ab09, Ab10, Ab17 e Ab12. Destes, os seis primeiros foram analisados para toda a população. A porcentagem de locos polimórficos foi 66,67% (DP = 0,47) e o número médio de alelos por loco foi de 7,83 (DP = 6,85). A heterozigose média observada foi 0,52 (DP = 0,38) e a esperada foi 0,48 (DP = 0,42). Todos os locos encontram-se em desacordo com as frequências esperadas no teorema do equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto Ab17 (p = 0,223). Os níveis de variabilidade genética aqui observados, embora menores que os descritos para *A. belzebul*, são relativamente elevados quando comparados a outros primatas Neotropicais e são coerentes com aqueles reportados para espécies com grande capacidade de dispersão e elevadas densidades populacionais.

ABSTRACT

Alouatta genus, usually known as howler-monkeys, is the most widely dispersed Neotropical monkeys. In the present work we describe the demographic, morphological and genetic characterization of an *Alouatta caraya* population from Porto Primavera, São Paulo, Brazil. The demographic characterizations were performed by the evaluation of the distribution of male and female in the entire population (N = 501) and between different age clusters: Adults, Subadults, Young and Infants. Our results showed equal distribution of males and females when total population are considered ($\chi^2 = 1,7786$, GL = 1, p = 0,1823). The same were observed using test z to compare the distribution among clusters. We also evaluate body weight and total size between clusters. The body weight and total body size comparisons corroborate the described in literature: intense sexual dimorphism between Adults, lower between Young and absent between Infants.

The genetic characterization was performed using heterologous microsatellite markers originally described to *Alouatta belzebul*. Genomic DNA of 100 specimens were isolated by a phenol-chlorophorm protocol and 20 markers were tested and amplified by PCR and genotyped in an ALFexpressTM II automated sequencer. Seven markers showed positive amplicons – Ab04, Ab06, Ab07, Ab09, Ab10, Ab17 and Ab12 – and were analyzed in Porto Primavera *Alouatta caraya* population, except Ab12. 66.67% (SD = 0.47) of the analyzed *loci* presented polymorphism. The number of alleles ranged between 1 – 17, and the average number of alleles by *locus* were 7.83 (SD = 6.85). Ab09 and Ab10 presented monomorphic to this population. The average heterozygosity observed were 0.52 (SD = 0.38) and the expected were 0.48 (SD = 0.42). All analyzed *loci* are in Hardy-Weinberg disequilibrium, except for Ab17 (p = 0.223). The genetic variability levels observed in the present work are relatively higher when compared to Neotropical primates and are similar to those reported to species with great dispersion capacity and elevated population densities.

ÍNDICE

I – INTRODUÇÃO	1
I.1. Ordem Primates e Macacos do Novo Mundo	1
I.2. Gênero <i>Alouatta</i> (Primates, Atelidae)	2
I.3. <i>Alouatta caraya</i>	4
I.4. Marcadores genéticos e variabilidade genética	6
I.5. Variabilidade genética em primatas Neotropicais: o gênero <i>Alouatta</i>	7
II – OBJETIVOS	10
Objetivo geral	10
Objetivos específicos	10
III – MATERIAL E MÉTODOS	11
III.1. Origem das amostras de <i>Alouatta caraya</i>	11
III.2. Amostragem	12
III.2.1. Demografia e morfometria	12
III.2.2. Material biológico: Processamento e Isolamento do DNA	12
III.3. Marcadores genéticos, condições de PCR e genotipagem	13
III.4. Análise dos dados	16
III.4.1. Caracterização Demográfica e Morfológica	16
III.4.2. Caracterização da variabilidade genética	18
IV – RESULTADOS	23
IV.1. Caracterização Demográfica e Morfológica de <i>Alouatta caraya</i> de Porto Primavera	23
IV.1.1. Dados demográficos	23
IV.1.2. Dados morfológicos	24
IV.2. Variabilidade genética de <i>Alouatta caraya</i> de Porto Primavera	28
IV.2.1. Teste dos marcadores microssatélites heterológos	28
IV.2.2. Análise Intraespecífica	30
Desequilíbrio de Ligação entre locos	36
IV.2.3. Análise Interespecífica	37
Análise de Coordenadas Principais (PCA)	37

V – DISCUSSÃO	39
V.1. Caracterização Demográfica e Morfológica de <i>Alouatta caraya</i> de Porto Primavera	39
V. 2. Variabilidade genética de <i>Alouatta caraya</i> de Porto Primavera	43
Amostragem	43
Variabilidade Genética	44
VI – CONCLUSÃO	51
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
VIII – ANEXO	63

LISTA DAS FIGURAS

- Figura I.1.** Distribuição das espécies de *Alouatta*, seguindo a classificação proposta por Groves (2001), de acordo com estimativas de distribuição a partir de Hill (1962) (Modificado de Cortés-Ortiz *et al.*, 2003).
-
- 3
- Figura I.2.** Dimorfismo sexual em *Alouatta caraya*. Os machos adultos são pretos e as fêmeas douradas.
-
- 5
- Figura III.1.** Localização geográfica da região da Usina Hidrelétrica Engenheiro Sérgio Motta (quadrado branco), origem das amostras de *Alouatta caraya* utilizadas neste estudo. As estrelas indicam capitais de estados brasileiros. Fonte: IBGE.
-
- 11
- Figura IV.1.** Distribuição por sexo e classes etárias dos 506 espécimes de *Alouatta caraya* capturados durante o enchimento do lago artificial de Porto Primavera – SP (Macho em azul e Fêmea em rosa).
-
- 23
- Figura IV.2.** Distribuição do peso em quilogramas para as classes etárias de Macho e de Fêmea na amostra de *A. caraya* de Porto Primavera – SP. A: Comparação das classes de Fêmea: Adulto, Jovem e Infante; B: Comparação das classes de Macho: Adulto, Subadulto, Jovem e Infante; C: Comparação entre o peso de Fêmea Adulto *versus* Macho Adulto; D: Comparação entre Fêmea Jovem *versus* Macho Jovem; E: Comparação entre Fêmea Infante *versus* Macho Infante.
-
- 25

Figura IV.3. Comparação entre o comprimento total dos espécimes que compuseram a amostra de *Alouatta caraya* oriunda de Porto Primavera (SP) utilizando o teste de Mann-Whitney. Acima valores de p e abaixo valores de U.

27

Figura IV.4. Comparação entre o comprimento total de Adulto e Jovem em Fêmea (A) e em Macho (B) de *A. caraya* da população de Porto Primavera (SP).

27

Figura IV.5. Comparação entre o comprimento total de Fêmea e Macho Adulto (A) e entre Fêmea e Macho Jovem (B) de *Alouatta caraya* da população de Porto Primavera (SP).

27

Figura IV.6. Genotipagem do loco Ab10: os picos em vermelho são do fragmento amplificado (microsatélite de interesse) em diferentes amostras. Os picos em verde são os calibradores internos de tamanho (*ladders*). Observe como o pico do microsatélite é separado, uniforme e com tamanho entre 100 e 300 pb.

29

Figura IV.7. Genotipagem do loco Ab16: os picos em vermelho são dos fragmentos amplificados que podem ou não corresponder ao microsatélite de interesse. Os picos em verde são os calibradores internos de tamanho (*ladders*). Observe como diversos picos foram selecionados apresentando curva uniforme e com tamanho entre 100 e 300 pb. Os marcadores que apresentaram este padrão de bandeamento foram considerados não confiáveis.

29

Figura IV.8. Distribuição das frequências alélicas para os quatro marcadores microssatélites polimórficos analisados: Ab04, Ab06, Ab07 e Ab17 para a população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP), evidenciando os alelos mais frequentes (tamanhos em pares de base).

35

Figura IV.9. Análise das coordenadas principais (PCA) comparando as populações de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP) com populações de *Alouatta belzebul* da hidrelétrica de Tucuruí (PA).

38

LISTA DAS TABELAS

- Tabela III.1.** Descrição dos 20 locos microssatélites desenvolvidos para a espécie *Alouatta belzebul* e testados para *Alouatta caraya* no presente trabalho. O nível de polimorfismo refere-se aos achados em *A. belzebul*. Os locos marcados com * foram publicados por Gonçalves *et. al.* (2004) e os demais foram gentilmente cedidos pelo LPDNA-UFPA.
-
- 14
- Tabela III.2.** Temperaturas de pareamento (TA) e número de repetições do ciclo de PCR utilizadas *Alouatta caraya* e descritas para *Alouatta belzebul* (Gonçalves *et al.*, 2004). Em grifo negrito as TA propostas para *A. caraya* no presente trabalho, que divergiram das descritas para *A. belzebul*.
-
- 16
- Tabela IV.1.** Distribuição de indivíduos da amostra de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP) por gênero e classe etária e resultado do teste z das comparações entre os gêneros.
-
- 24
- Tabela IV.2.** Peso corporal na amostra de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP) por gênero em classes etárias.
-
- 25
- Tabela IV.3.** Comprimento total (CT) em indivíduos de uma população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera, em centímetros, categorizados por sexo e classe etária.
-
- 26

Tabela IV.4. Caracterização dos microssatélites heterólogos descritos por Gonçalves <i>et al.</i> (2004) e testados em uma população de <i>Alouatta caraya</i> de Porto Primavera (SP).	31
Tabela IV.5. Distribuição genotípica observada dos marcadores do tipo microssatélite heterólogos para uma população de <i>Alouatta caraya</i> de Porto Primavera (SP).	32
Tabela IV.6. Freqüências alélicas dos marcadores do tipo microssatélite heterólogos para uma população de <i>Alouatta caraya</i> de Porto Primavera, SP.	34
Tabela IV.7. Teste da aderência ao EHW (teste exato de Guo & Tompson (1992) utilizando a cadeia de Markov) dos locos analisados para a população de <i>Alouatta caraya</i> de Porto Primavera.	36
Tabela IV.8. Valores de $p \pm$ desvio padrão da análise de desequilíbrio de ligação entre os marcadores microssatélites analisados para a população de <i>Alouatta caraya</i> de Porto Primavera (SP). Valores em grifo negrito correspondem às comparações entre locos que indicam desequilíbrio de ligação.	37
Tabela VIII.1. Marcadores genéticos (moleculares e protéicos) descritos para alguns primatas neotropicais. N = tamanho amostral.	Anexo

Tabela VIII.2. Dados originais relativos ao peso das fêmeas da espécie *Alouatta caraya* capturadas durante a formação do lago artificial da usina hidrelétrica Engenheiro Sergio Mota, Porto Primavera (SP) fornecidos pela equipe da Pró-Fauna. Peso em quilogramas.

Anexo

Tabela VIII.3. Dados originais relativos ao peso dos machos da espécie *Alouatta caraya* capturados durante a formação do lago artificial da usina hidrelétrica Engenheiro Sergio Mota, Porto Primavera (SP) fornecidos pela equipe da Pró-Fauna. Peso em quilogramas.

Anexo

Tabela VIII.4. Dados relativos ao Comprimento Total (CT) de espécimes de uma população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP) fornecidos pela equipe da Pró-Fauna (N total = 162).

Anexo

Tabela VIII.5. Comparação do tamanho dos fragmentos, número de alelos por loco e número de indivíduos genotipados para os microsatélites descritos por Gonçalves *et al.* (2004) em populações de *Alouatta belzebul* (Bastos *et al.*, com. pessoal) e uma população de *Alouatta caraya* (presente trabalho).

Anexo

Tabela VIII.6. Frequência alélica dos marcadores analisados para uma população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (PP) e para cinco populações de *Alouatta belzebul* da região de Tucuruí (PA): Ilha de Germoplasma – IG, Ilha de Cornélio – IC, Ilha da Base 4 – B4, Margem esquerda do rio Tocantins – ME e Margem direita do rio Tocantins – MD – Bastos *et al.* com. pessoal. Nesta análise computamos todos

os alelos descritos para o loco: ⁺ sinaliza os alelos exclusivos de *A. caraya* e • os alelos compartilhados com *A. belzebul*.

Anexo

© Lacépède



INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

I.1. Ordem Primates e Macacos do Novo Mundo

A Ordem Primates, a qual inclui os lêmures, os macacos e os homínídeos, divergiu a partir de pequenos mamíferos insetívoros terrestres há aproximadamente 70 milhões de anos atrás. Esses primeiros primatas – que originaram diversas linhagens – passaram a ocupar as árvores, o que mudou significativamente o hábito de vida e trouxe mudanças evolutivas importantes (Nowak, 1999).

Os primatas não-humanos estão distribuídos por quase todo o mundo e são divididos em dois grandes grupos: as Subordens Strepsirhini e Haplorhini. Os Strepsirhini são lêmures e lorises, considerados mais próximos dos ancestrais da Ordem Primates. Os Haplorhini são os macacos típicos e estão agrupados em Platyrrhini – conhecidos como macacos do Novo Mundo e Catarrhini – do Velho Mundo.

Os macacos do Novo Mundo distribuem-se desde o México até o sul da Argentina e compreendem a maior fauna de primatas do mundo. Os componentes da Infraordem Platyrrhini estão agrupados em três famílias – Cebidae, Pitheciidae e Atelidae – segundo a filogenia proposta por Schneider (2000) que compila dados moleculares de diversos autores (Canavez *et al.*, 1999; Chaves *et al.*, 1999; Meireles *et al.*, 1999^a; Porter *et al.*, 1999; von Dormam & Ruvolo, 1999; Porter *et al.*, 1997) e é coerente com a gerada a partir de dados parasitológicos, morfológicos e moleculares (Hugot, 1998). O clado monofilético Atelidae, do qual *Alouatta* faz parte, apresenta outros três gêneros: *Ateles*, *Lagothrix* e *Brachyteles*. *Alouatta* é considerado o gênero mais basal do grupo, tendo divergido dos demais Atelidae há cerca de 15 milhões de anos (Schneider, 2000; Rylands *et al.*, 2000; Rylands & Brandon-Jones, 1998).

I.2. Gênero *Alouatta* (Primates, Atelidae)

O gênero *Alouatta* apresenta a maior distribuição entre os gêneros de Macacos do Novo Mundo. É encontrado em toda a região Neotropical, desde o México até a Argentina (21°N a 30°S), em ao menos 19 países (Figura I.1, Cortés-Ortiz *et al.*, 2003). São encontrados desde o nível do mar até altitudes acima de 3.200 m e ocupam variados tipos de habitats, desde áreas pouco úmidas, como os sertões, até florestas sempre verdes, inundadas ou de terra firme, decíduas e não-decíduas, além de matas de galeria (Milton, 1980).

Os *Alouatta* são conhecidos popularmente como bugios ou guaribas e exibem características que permitem sua fácil identificação, como a cauda preênsil e o osso hióide bastante pronunciado, com o qual executam um rugido. São animais de hábitos diurnos, essencialmente arborícolas e classificados como generalistas herbívoros. *Alouatta* é considerado o gênero de primatas mais folívoro do novo mundo, com dieta de baixo conteúdo energético (Milton, 1998; Crockett, 1998; Calegari-Marques, 1992; Milton, 1980).

Apesar de ser um dos gêneros mais estudado dentre os macacos do Novo Mundo, a classificação taxonômica dos *Alouatta* ainda não foi completamente definida. Dois problemas permeiam esta indefinição: o número de espécies reconhecidas para o gênero e o relacionamento filogenético entre elas. Dependendo dos critérios utilizados, são reconhecidas seis (Hill, 1962), nove (Rylands *et al.*, 1995) ou dez (Groves, 2001) espécies para esse gênero. Neste estudo, foi aceita a classificação proposta por Groves (2001), que desconsidera as subespécies e reconhece dez espécies: *Alouatta palliata*, *A. pigra*, *A. seniculus*, *A. sara*, *A. macconelli*, *A. caraya*, *A. belzebul*, *A. nigerrima*, *A. guariba* e *A. coibensis* (Gregorin, 2006; Cortés-Ortiz *et al.*, 2003).

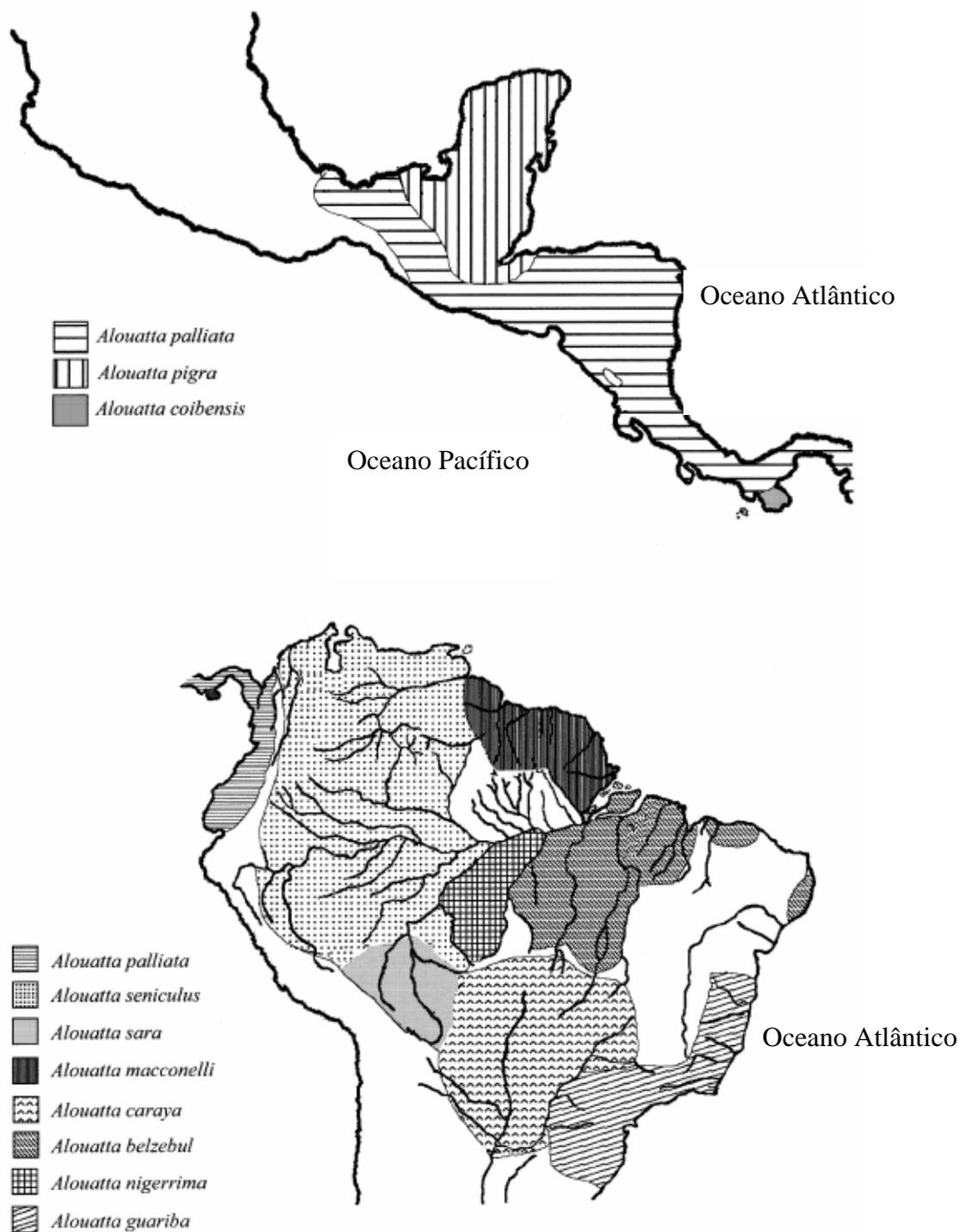


Figura I.1. Distribuição das espécies de *Alouatta*, seguindo a classificação proposta por Groves (2001), de acordo com estimativas de distribuição a partir de Hill (1962) (Modificado de Cortés-Ortiz *et al.*, 2003).

I.3. *Alouatta caraya*

A espécie *Alouatta caraya* apresenta a segunda maior distribuição do gênero ocupando áreas em pelo menos quatro países – Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina (norte) – sendo possivelmente encontrada também no Uruguai. Seu habitat é florestal, como florestas secas sazonais decíduas e semidecíduas, sempre verdes ou não, matas de galeria, áreas sempre secas e também inundáveis como as do Pantanal. No Brasil, ocupa principalmente dois biomas: o Cerrado, em matas de galeria, e o Pantanal mato-grossense, em matas próximas a lagoas (Bravo & Sallenave, 2003; Crockett, 1998; Emmons & Feers, 1997; Hill, 1962). Foram registradas ocorrências até o norte do estado do Tocantins e também até a bacia do Amazonas, nos rios Tapajós e Xingu, e à margem esquerda do rio Guaporé (Iwanaga & Ferrari, 2002).

Segundo as definições da IUCN, *A. caraya* é considerada uma espécie não ameaçada de extinção. Este diagnóstico deve-se ao grande contingente populacional da espécie (estimada em 100.000 indivíduos) e a sua grande versatilidade e resistência, pois mesmo em habitats muito degradados e antropizados encontram-se populações estáveis de *A. caraya* (Crockett, 1998; Horwich, 1998). Há uma correlação direta entre densidade da vegetação e tamanho dos grupos de *A. caraya*, onde maiores grupos são encontrados em florestas altas/sempre verdes. A maior densidade reportada para a espécie – 425 ind./km² – foi encontrada em florestas do Rio Paraná na Argentina (Kowalewski & Zunino, 2004; Bravo & Sallenave, 2003; Treves, 2001; Zunino *et al.*, 2001).

Alouatta caraya apresenta intenso dimorfismo sexual: os infantes são dourados, os machos adultos são pretos e as fêmeas dourado-oliva (Figura I.2). Os filhotes nascem com pelagem clara e, à medida que amadurecem sexualmente, ficam mais próximos da coloração dos adultos. São considerados de médio porte, sendo que o peso médio é de 7,5 kg para machos e 5,7 kg para fêmeas adultos, ocorrendo variações dependendo da população estudada (Milton, 1980). Um exemplo desta variação foi o reportado para populações da Argentina, com machos pesando 6,42 kg e fêmeas 4,33 kg, em média (Rumiz, 1990). Apresentam 36 dentes: incisivos 2/2, caninos 1/1, pré-molares 3/3 e molares 3/3 (Hill, 1962) e o padrão cromossomal da espécie é $2n = 52$ e cromossomos sexuais X_1X_2/Y_1Y_2 XX/XY (Mudry *et al.*, 1998).

Os grupos de *A. caraya* são formados por um número bastante variável de indivíduos. Foram descritos grupos com tamanho entre três e 20 indivíduos, sendo que a variação típica está entre cinco e nove (Treves, 2001; Chapman & Balcomb, 1998; Crockett & Eisenberg, 1987).



Figura I.2. Dimorfismo sexual em *Alouatta caraya*. Os machos adultos são pretos e as fêmeas douradas. http://www.honolulu zoo.org/howler_monkey.htm

O tamanho dos grupos depende de diversos fatores e a razão sexual (número de fêmeas por macho) varia entre 0,5 e 2,02, sendo a média 0,71 (Treves, 2001; Chapman & Balcomb, 1998). Geralmente, os grupos são compostos por um macho alfa (líder) e duas ou três fêmeas adultas (o que caracteriza a poliginia), além de outros indivíduos que não se reproduzem. O macho alfa é o único sexualmente ativo, sendo que os demais machos (jovens, subadultos e adultos com mais de quatro anos de idade), apesar de já estarem fisiologicamente aptos à atividade sexual, têm seu acesso às fêmeas restringido por sua posição hierárquica no bando, a qual é comumente definida com utilização de violência. As fêmeas atingem concomitantemente a maturidade sexual fisiológica e social por volta dos quatro anos de idade (Treves, 2001; Calegare-Marques, 1992; Neville *et al.*, 1988) e geralmente dão à luz um único filhote por parição, com gestação de aproximadamente seis meses.

Todo o bando auxilia no cuidado parental, sendo que os infantes são carregados nas costas por até dois anos ou uma nova gestação. O cuidado parental é também uma forma de estabelecimento de hierarquia e aceitação no bando. Fêmeas mais jovens podem ser mantidas ou expulsas do bando quando atingem a maturidade sexual. Oferecer-se para cuidado da cria de uma fêmea mais velha não só prepara a subadulta para a maternidade, como também favorece sua permanência no grupo.

Machos são expulsos do bando quando atingem a maturidade e, geralmente, não desafiam o macho alfa para embate no momento da exclusão. Os indivíduos excluídos do grupo podem formar novos grupos ou se unir a outros bandos, onde ocuparão posições de menor prestígio social. A frequência com que estes comportamentos ocorrem não foi avaliada na natureza (Kowalewski & Zunino, 2004; Chapman & Balcomb, 1998; Calegare-Marques, 1992).

I.4. Marcadores genéticos e variabilidade genética

São vários os fatores que alteram a variabilidade genética populacional (Pannel & Charlesworth, 2000): alguns estão associados ao aumento da variabilidade (mutação e fluxo gênico) e outros à sua diminuição (endocruzamento, reduções populacionais drásticas (*bottlenecks*), subestruturação populacional e seleção). Existem diversas formas de avaliar e mensurar a variabilidade genética. A mais utilizada é a distribuição de alelos de marcadores genéticos, como o polimorfismo de proteínas, as variações no DNA – tanto nuclear como extra-nuclear – a composição e estruturação dos genomas, além de algumas características fenotípicas.

Dentre os marcadores genéticos empregados destacam-se os microssatélites. Os marcadores hipervariáveis do tipo microssatélite ou STR são seqüências repetitivas em *tandem* de motivos curtos, que apresentam um número variável de alelos e estão distribuídos por todo o genoma, seja em regiões codificadoras como não-codificadoras. Os alelos são caracterizados pelo número de repetições do motivo. Esse tipo de marcador é o que apresenta o maior conteúdo informativo, sendo utilizado para avaliar a diversidade genética intra- e inter-populacional. A extensão e o padrão de variação apresentado pelos marcadores hipervariáveis podem fornecer informações sobre a história evolutiva recente da espécie (ou do grupo) e podem potencialmente estimar a importância de eventos demográficos (Hedrick, 2001).

Para localização destes marcadores no genoma de um dado organismo são desenvolvidas bibliotecas gênicas específicas para microssatélites, de onde são selecionados fragmentos de tamanho aproximado entre 300 e 1000 pb, ricos em resíduos de $(GAAA)_n$. Estes fragmentos são digeridos, clonados e hibridados com sondas com motivos $(GAAA)_8$ de modo que os fragmentos mais compatíveis (clones positivos) são selecionados e inseridos em plasmídios para posterior seqüenciamento. Em seguida, iniciadores específicos são desenhados. Esses iniciadores são então testados em indivíduos de uma população e os que produzem fragmentos amplificados são selecionados. Existe uma tendência intrínseca de os fragmentos gerados serem polimórficos, por terem sido selecionados a partir de uma biblioteca gênica de microssatélites. Após o teste na população, são verificados os índices de polimorfismo dos marcadores. Tais níveis de polimorfismo são válidos somente para a população testada, a princípio, mas podem servir de referência para toda a espécie.

I.5. Variabilidade genética em primatas Neotropicais: o gênero *Alouatta*

A importância da variabilidade genética intraespecífica está no potencial de as populações responderem à seleção natural e se adaptarem a alterações no ambiente. Avaliar esta variabilidade permite inferir elementos da biologia da espécie e também eventos evolutivos que marcaram a história das populações. Observa-se que o nível de variabilidade genética varia entre as diversas espécies de primatas, dependendo da história evolutiva bem como da categoria de marcadores genéticos utilizados na avaliação (Frankhan *et al.*, 2002).

Para avaliar a variabilidade genética das populações de primatas diversos parâmetros vêm sendo utilizados, como a porcentagem de locos polimórficos, a heterozigose média observada, a verificação de alelos exclusivos e a variação existente nas populações e nas espécies.

A avaliação da variabilidade genética de populações de *Alouatta* foi abordada com a utilização de marcadores genéticos, em especial proteínas e enzimas, principalmente nas décadas de 80 e 90 (*A. pigra* – James *et al.*, 1997; *A. seniculus* – Sampaio *et al.*, 1996; Bonvicino *et al.*, 1995; Pope, 1992; Lima *et al.*, 1990; *A. belzebul* – Schneider *et al.*, 1991; Barroso, 1988; Armada *et al.*, 1987). Com relação ao polimorfismo de fragmentos de DNA, o número de estudos ainda é pequeno e em geral com número reduzido de amostras, sendo a grande maioria gerada como subproduto de estudos de filogenia do gênero (Nascimento *et al.*, 2005; Villalobos *et al.*, 2004; Cortés-Ortiz *et al.*, 2003; Bonvicino *et al.*, 2001; Meireles *et al.*, 1999^b). A tabela VIII.1 do Anexo compila diversos marcadores genéticos descritos na literatura para primatas Neotropicais.

Os poucos estudos populacionais visando a avaliação da variabilidade genética de *Alouatta* têm utilizado variados tipos de marcadores como microssatélites, polimorfismos protéicos e DNA mitocondrial, o que dificulta comparações entre os resultados obtidos. Em se tratando de microssatélites, o desenvolvimento de iniciadores para *A. belzebul* (Gonçalves *et al.*, 2004) e *A. palliata* (Winkler *et al.*, 2004; Ellsworth & Hoelzer, 1998) são exemplos recentes da utilização destes marcadores. Estes mesmos iniciadores vêm sendo testados de maneira heteróloga, contribuindo para a análise da variabilidade genética em espécies congênicas como *A. seniculus*, *A. pigra*, *A. palliata* ou ainda de outros gêneros como *Ateles geoffroyi*, *Callimico goeldii* e *Cebus apella* (Winkler, *et al.*, 2004; Ellsworth & Hoelzer, 1998). Outras regiões com polimorfismo, a região controladora do mtDNA (5'), isso é, DNA extra-nuclear (Ascunce *et al.*, 2003) e para os genes ϵ – globina e IRBP situados no DNA nuclear (Harada *et al.*, 1995), foram descritas para diversas espécies.

Populações de *Alouatta palliata* (N = 80) da ilha de *Barro Colorado*, América Central, foram analisadas com relação às enzimas sanguíneas (22 proteínas no total, representando 25 locos), sendo somente três locos polimórficos, com heterozigose média de 0,16. Esta pequena variabilidade foi explicada por hipóteses associadas a fatores ecológicos e populacionais: a população era residente em uma ilha, houve um pequeno contingente populacional durante a colonização da área, foram relatadas epidemias de febre amarela com acentuada mortalidade de indivíduos além de aspectos próprios da biologia dos *Alouatta* como seu sistema de composição de bandos (Froelich & Thorington, 1982).

Populações venezuelanas de *Alouatta seniculus* (N = 137) foram estudadas com o objetivo de investigar a influência dos padrões de dispersão e sistemas de acasalamento na estrutura genética da espécie. Dos 29 locos protéicos analisados, dez (32,7%) apresentaram-se polimórficos e a heterozigose média foi estimada em 0,099 (heterozigose por loco entre 0,057 e 0,135), com grande variação entre os grupos e um excesso de heterozigotos (Pope, 1992). Posteriormente, a região controladora do mtDNA de 32 indivíduos destas populações foi seqüenciada, sendo observados 11 haplótipos no total. Destes, apenas um foi compartilhado entre as populações estudadas e o F_{ST} estimado foi de 0,28 (Pope, 1996).

Alouatta pigra foi avaliada para 36 alozimas (N = 41) verificando-se uma baixa variabilidade genética: dois locos polimórficos (P = 5,6%) e heterozigose média de 0,021 – havendo deficiência de heterozigotos para um dos locos. Foi analisado também o polimorfismo de sítios de clivagem do mtDNA (13 endonucleases testadas) observando-se apenas um sítio polimórfico em um único indivíduo (P = 0,2%). Estes resultados indicam baixa variabilidade genética, quando comparados a outros primatas neotropicais e foram associados à ocorrência de eventos de redução populacional drásticos e recentes, como furacões e contínua deriva genética, sem que se possa excluir a possibilidade de que a baixa variabilidade encontrada seja característica da espécie (James *et al.*, 1997). Outra constatação interessante foi a similaridade genética entre os grupos das populações estudadas.

Em *Alouatta guariba* do Rio Grande do Sul (Brasil) foi observada alta variabilidade genética na análise de seqüências da região controladora do mtDNA (5') e do segmento hipervariável. Foi verificada a presença de 15 haplótipos distintos em 16 indivíduos possivelmente de populações diferentes. Dentro deste contexto, diversas hipóteses foram traçadas buscando explicar esse resultado, incluindo a influência da biologia da espécie na distribuição desta variabilidade – uma vez que *A. guariba* apresenta subespécies e separação geográfica entre populações devido à fragmentação de habitats (Jerusalinsky, 2001).

No caso de *Alouatta caraya*, há escassez na literatura de trabalhos em nível populacional, o que impossibilita inferências sobre o fluxo gênico, a migração sexo-específico ou os padrões biogeográficos para a espécie (Nascimento *et al.*, 2005; Szapkievich *et al.*, 2004; Ascunce *et al.*, 2003; Bonvicino *et al.*, 2001; Salim *et al.*, 2001; Ellsworth & Hoelzer, 1998). Dentre estes, a análise de regiões do DNA mitocondrial de três indivíduos coletados em resgate de fauna na formação do lago de duas hidrelétricas – Serra da Mesa (Goiás, Brasil) e Manso (Mato Grosso, Brasil) – revelou uma variabilidade haplotípica muito baixa para espécie e uma baixa distância genética ($0,008 < p < 0,010$) (Bonvicino *et al.*, 2001).

Nascimento *et al.* (2005), contudo, reportaram uma variabilidade haplotípica maior do que a observada por Bonvicino *et al.* (2001), descrevendo a existência de 11 haplótipos de DNA mitocondrial em 25 indivíduos resgatados durante a formação do lago da hidrelétrica de Manso (Mato Grosso, Brasil). Quando avaliada utilizando-se marcadores protéicos e enzimáticos, a variabilidade genética estimada até o momento para a *A. caraya* sugere que esta é baixa em relação aos macacos em geral e semelhante ao observado em outras espécies do gênero *Alouatta* (Szapkievich *et al.*, 2004). No maior estudo de marcadores protéicos realizado com esta espécie, Szapkievich *et al.* (2004) avaliaram dez sistemas protéicos (14 locos) em 16 indivíduos de diferentes localidades (populações naturais resgatadas durante o enchimento do lago da represa *Yaciretá* (N = 11), de Ayolas, Paraguai (N = 1), Corrientes, Argentina (N = 3) e um indivíduo de origem desconhecida alocado no Zoológico de Buenos Aires). Dois locos foram polimórficos (Transferrina e Leucil-Amino Peptidase), apresentando porcentagem de locos polimórficos de 14% e heterozigose observada de 0,0359 – o que é semelhante ao reportado para *A. belzebul* e *A. seniculus*. Em outro estudo, as enzimas sanguíneas Esterase D e Fosfogluconato desidrogenase apresentaram-se monomórficas em uma população de *A. caraya* resultante de resgate de fauna para a formação do lago da usina hidrelétrica de Porto Primavera, São Paulo, Brasil (N = 100) segundo o reportado por Salim *et al.* (2001).

Outros estudos genéticos sugerem que *A. caraya* apresenta menor variabilidade que outras espécies do grupo como *A. seniculus* (Pope, 1992) e *A. belzebul* (Nascimento *et al.*, 2005), mas variabilidade semelhante ou maior que a observada em outros primatas Neotropicais como *A. palliata*, *A. palliata*, *Aotus*, *Callithrix*, *Saimiri*, *Cebus* e *Chiropotes* (Winkler *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 1995; Meireles *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1993; Schneider, 1988; Froelich & Thorington, 1982).



OBJETIVOS

II – OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar geneticamente uma população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera, São Paulo, Brasil.

Objetivos específicos

1. Caracterizar a população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP) utilizando informações gerais acerca da demografia e estrutura populacional como a proporção entre machos e fêmeas e a distribuição dos indivíduos em classes etárias, e caracteres morfológicos como o peso e comprimento total dos indivíduos;
2. Testar iniciadores heterólogos de marcadores moleculares do tipo microssatélite, desenvolvidos para a espécie *Alouatta belzebul*, quanto à amplificação de fragmentos por PCR, em uma população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP);
3. Estudar a diversidade genética de uma população de *A. caraya* quanto aos marcadores heterólogos que produzirem resultados positivos de amplificação, verificando presença de polimorfismo, número e tamanho dos alelos e distribuição das frequências alélicas e estimar índices de variabilidade genética que possibilitem a comparação com dados da literatura.



MATERIAL E MÉTODOS

III – MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Origem das amostras de *Alouatta caraya*

A coleta de dados morfológicos e amostras biológicas foi realizada durante uma expedição de salvamento de animais ao longo do processo de inundação do lago da Hidrelétrica Engenheiro Sérgio Motta. Essa hidrelétrica está situada no sudoeste do estado de São Paulo, município de Porto Primavera, que fica a leste do estado do Mato Grosso do Sul (Figura III.1). O reservatório foi formado pelo represamento da água do rio Paraná e conta com uma área inundada de 2.200Km². O procedimento de coleta foi realizado pela equipe da Pró-Fauna, entidade responsável pela identificação e posterior soltura dos indivíduos em áreas florestais próximas. Durante o resgate foram translocados animais de diversas espécies, incluindo cerca de 4.000 indivíduos da espécie *Alouatta caraya*.

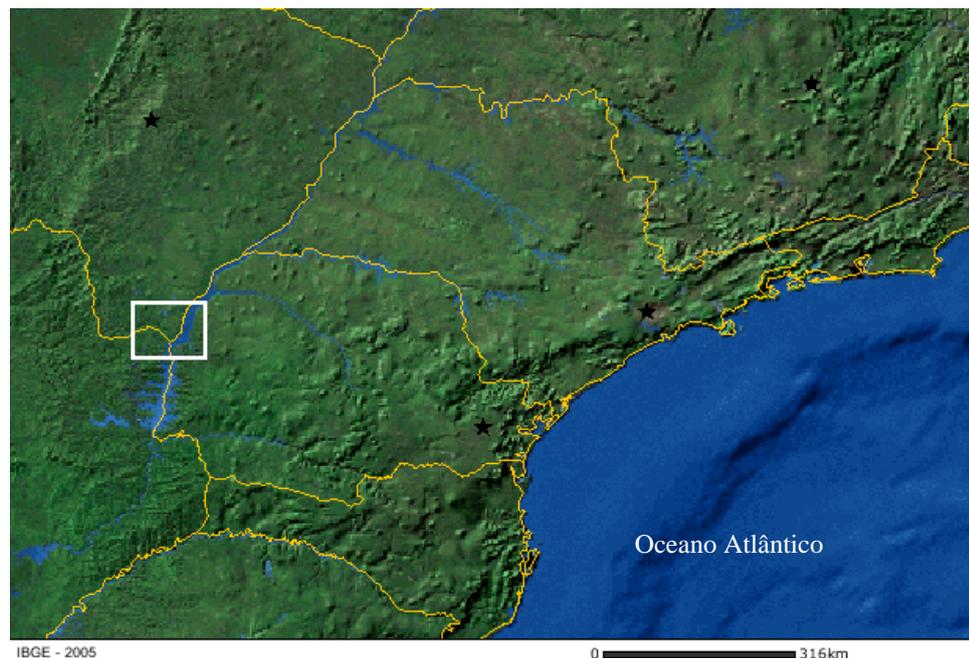


Figura III.1. Localização geográfica da região da Usina Hidrelétrica Engenheiro Sérgio Motta (quadrado branco), origem das amostras de *Alouatta caraya* utilizadas neste estudo. As estrelas indicam capitais de estados brasileiros. Fonte: IBGE.

A coleta ocorreu ao longo de 180 km, no curso do rio Paraná, em municípios situados às suas margens (Aneurilândia, Bataguassu, Bataiporã, Brasilândia e Santa Rita do Pardo em Mato Grosso do Sul; Rosana, Presidente Epitácio e Porto Primavera em São Paulo) em biomas pantanosos e florestais cujas altitudes variaram entre 276 e 328m acima do nível do mar (Labruna *et al.*, 2002). Os animais foram recolhidos principalmente em árvores ilhadas durante o processo de enchimento no período de junho de 2000 a junho de 2001, o que implica em variação temporal e espacial no conjunto amostral, além da possibilidade de mais de uma população ter sido amostrada.

III.2. Amostragem

Devido à dinâmica da operação de resgate de *A. caraya* em Porto Primavera (SP), a coleta de informações e de material biológico não foi obrigatoriamente realizada para os mesmos animais. Portanto, não há compatibilidade entre os dados morfológicos e biológicos.

III.2.1. Demografia e morfometria

Após a captura, os animais foram sedados para a coletada de informações gerais de saúde, peso, sexo, idade estimada e parâmetros morfológicos como comprimentos total, rostro-anal, do tórax e da cabeça, entre outros. A idade dos indivíduos foi estimada com base em evidências comportamentais, na presença de indícios fisiológicos de lactação e/ou filhotes, dentre outras (Labruna *et al.*, 2002). Para o presente trabalho foram utilizados os dados de sexagem, idade e peso relativo (N = 506; Tabelas VIII.2 e Tabela VIII.3 do Anexo) e de comprimento total (N = 162; Tabela VIII.4 do Anexo).

III.2.2. Material biológico: Processamento e Isolamento do DNA

Foram selecionados 105 indivíduos que tiveram material biológico (sangue) coletado. O sangue foi separado em duas frações: plasma e fração celular (hemácias e fração leucocitária), por centrifugação (2.000 rpm durante 10 min). À fração celular foi acrescentada solução salina isotônica (NaCl 0,9%) e a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento de lavagem por duas vezes. À fração celular, na proporção de 1:1, foi acrescentado solução tampão de estocagem

(citrato de tripotássio, fosfato bibásico de potássio, fosfato monobásico de potássio) com glicerol a 40% em temperatura ambiente, que em seguida foi homogeneizada. As frações foram armazenadas em freezer à temperatura -20°C em microtubos de polipropileno de 1,5 mL novos, livres de DNA e DNases, devidamente identificados.

O DNA das amostras foi isolado utilizando-se um protocolo fenol-clorofórmio padrão descrito no Anexo. A quantificação e a qualidade das amostras foram verificadas em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio e visualizados em transluminador UV. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília.

III.3. Marcadores genéticos, condições de PCR e genotipagem

Foram testados 20 pares de iniciadores de amplificação para regiões de marcadores do tipo microssatélite desenvolvidos pela equipe do Laboratório de Polimorfismos de DNA da Universidade Federal do Pará (LPDNA-UFPA) para *Alouatta belzebul* (Gonçalves *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.* comunicação pessoal), espécie próxima a *Alouatta caraya*. A seqüência dos iniciadores específicos e a unidade de repetição dos locos microssatélites testados para *A. caraya* estão listados na Tabela III.1. O teste e a genotipagem dos marcadores microssatélites heterólogos foram realizados no LPDNA-UFPA.

Os marcadores heterólogos do tipo microssatélite foram amplificados para as amostras de *A. caraya* utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) seguindo o protocolo apresentado a seguir, o qual difere parcialmente do proposto por Gonçalves *et al.* (2004). Todas as reações de PCR foram realizadas com volume final de reação de 20µL: 1,0µL dos dNTP (0,25mM), 0,8µL de MgCl₂ (2,0mM), 2,0µL Tampão Tris-HCl em solução de trabalho (1x), 0,1µL de *TaqDNApolimerase* Amershan Bioscience® (0,5 U), 0,1µL dos iniciadores a 10pmol (iniciador direto marcado com Cy5) e 13,6µL de água milli-Q. O ciclo básico utilizado no termociclador foi: 1) 94°C – 5min; 2) 94°C – 1min; 3) temperatura de pareamento (TA) específica do marcador analisado (Tabela III.2) – 1min; 4) 72°C – 1min. O número de repetições do ciclo (passos 2, 3 e 4) foi igual ao descrito por Gonçalves *et al.* (2004) para *A. belzebul* (Tabela III.2). Após as repetições, um último passo de alongação para finalização dos fragmentos foi executado a 72°C – 5min. Foram utilizados diferentes termocicladores, todos apresentando o mesmo resultado quanto ao sucesso de amplificação.

Tabela III.1. Descrição dos 20 locos microssatélites desenvolvidos para a espécie *Alouatta belzebul* e testados para *Alouatta caraya* no presente trabalho. O nível de polimorfismo refere-se aos achados em *A. belzebul*. Os locos marcados com * foram publicados por Gonçalves *et. al.* (2004) e os demais foram gentilmente cedidos pelo LPDNA-UFPA.

Loco	Seqüência do iniciador (5'→3')	Unidade de Repetição	TF	TA (°C)	Nível de Polimorfismo
Ab01	AGAAGTTTGAGGATGCAGAG GAGGTTGTTTGGAAGACTGG	(A) ₁₈ GAATCAG(AAG) ₃ G(AGG) ₅ TAAA(GA) ₂	268 pb	56	monomórfico
Ab02	AAGACAGGAGGCAGAGG GGGAGCTTGGGGATT	(AGG) ₇ AAGAGGAGA(AGG) ₃ (AAG) ₄ (AGG) ₄ (AAG) ₃	200 pb	53	monomórfico
Ab03	ACTCCTCTCCGTGCCATCTT GCACTCCAACCTGAACAACAG	(GAA) ₂ ^a (GAA) ₂ G(GAA) ₃ G(GAA) ₄	244 pb	60	polimórfico
Ab04*	AGCGCCTCTCCTGGTTTTTAC AAAAATTCCCAAACCCACC	(GA) ₂ AA(GA) ₁₂ AG	156 pb	62	polimórfico
Ab05	CCTCTATCCCTTTCCCTGCAGC TGCTGGCCCAACTTGTTAATCAA	(AC) ₅ (AG) ₃ (GA) ₉ GGGAAG(GA) ₈ AG(GA) ₇ AG(GA) ₄	164 pb	66	monomórfico
Ab06*	GTGATTATTGTGTGGTACTTG ATGTATTTTCTGGTTTTACC	(CT) ₉ TTT(CT) ₁₁ GTCTGTCTTAT(AC) ₁₆	283 pb	50	polimórfico
Ab07*	ACCCCCATCTCTTAAAACACAC CCTACTGCCTAAGTCTCCAAC	(AC) ₂₁	194 pb	60	polimórfico
Ab08	GAATGAGAAAAGGGTAGAACTGC AGAGAGCCTTGAAGATGAAAAGAA	(CT) ₉	276 pb	60	monomórfico
Ab09*	AATGAAGACAACAAACGAC TGAAGAACACACCTGAGG	(GAAA) ₁₈	196 pb	53	polimórfico
Ab10*	TATTTTAAAAAGCCTTCCAGGTGA GCAAGACTCCATCTTAAAAAAGAAA	(GAAA) ₂₂	257 pb	56	polimórfico
Ab11	GCGGGACTCTGTCTCAAAAAA ATTCAGAGAGGAGCTGGAGGG	(GAAA) ₂₀	183 pb	60	polimórfico
Ab12*	AAATCAAGGCCACAGGG CAAAGGCAAGAAAGCAAGAAG	(GAAA) ₁₄	231 pb	60	polimórfico

Loco	Seqüência do iniciador (5'→3')	Unidade de Repetição	TF	TA (°C)	Nível de Polimorfismo
Ab13*	CTTCTGGAGGAAAAAAAAA CCCACCAGGAAGAATACT	(GAAA) ₉ GAA(GAAA) ₁₃ A(GAAA) ₂	237 pb	52	polimórfico
Ab14	AAACCCCATCCCTATTA GCACTCCAGAATTCACAG	(GA) ₂₄	196 pb	55	polimórfico
Ab15	ACCCTGTCTCAACAACA ATCTCTTCATCTTTTTGGCC	(GAAA) ₃ (GA) ₇ (GAAA) ₁₈ AA(GAAA) ₅	313 pb	58	polimórfico
Ab16*	AGGAGGTTGAGGCAAGAGAA ACAAACCAGTACAGCCAGA	(GAAA) ₁₁ GAAGAAAGAAGGAAAGAA(GAAA) ₂	218 pb	58	polimórfico
Ab17*	GGAAACAGTGGAAAGACAAAAGGAG AGATGGCCAAAGATAAAGACATGTAAAA	(GAAA) ₂ G(GAAA) ₂ GAGAAAAA(GAAA) ₁₄	211 pb	63	polimórfico
Ab18	GAACATGATGCCTCCAG' GAAGTTCCAGACCAACC	(CTTT) ₁₄ CTT(CTTT) ₅	354 pb	54	polimórfico
Ab19	GGTACAAAACAGAAGAAATGG CTAAACATGAAAACAAACAAG	(AC) ₁₇	105 pb	54	polimórfico
Ab20*	GTGTGGTGGTGGGTGCGC TTGCTTTTCCCCTTTTGTGTTTGC	(GAAA) ₁₆	266 pb	67	polimórfico

TF = tamanho dos fragmentos; TA = temperatura de pareamento dos iniciadores em *A. belzebul*.

Tabela III.2. Temperaturas de pareamento (TA) e número de repetições do ciclo de PCR utilizadas *Alouatta caraya* e descritas para *Alouatta belzebul* (Gonçalves *et al.*, 2004). Em grifo negrito as TA propostas para *A. caraya* no presente trabalho, que divergiram das descritas para *A. belzebul*.

Loco	<i>A. caraya</i>		<i>A. belzebul</i>	
	TA	número repetições do ciclo	TA	
Ab04	62,0°C	25 repetições	62,0°C	
Ab06	50,0°C	25 repetições	50,0°C	
Ab07	63,4°C	25 repetições	60,0° C	
Ab09	54,3°C	25 repetições	53,0° C	
Ab10	56,0°C	25 repetições	56,0°C	
Ab12	63,7°C	30 repetições	60,0°C	
Ab17	63,0°C	25 repetições	63,0°C	

A avaliação dos fragmentos amplificados foi realizada em um sequenciador semi-automático AlfExpress™ II da Amersham Biosciences®, em gel de poliacrilamida 8%, conforme protocolo sugerido pelo fabricante. A análise dos resultados visando a genotipagem das amostras foi realizada utilizando o software AlleleLocator versão 1.03, também da Amersham Biosciences®.

III.4. Análise dos dados

III.4.1. Caracterização Demográfica e Morfológica

A caracterização demográfica da população foi realizada considerando-se as quatro classes etárias constantes na classificação efetuada no trabalho de campo para machos e fêmeas: Adulto, Subadulto, Jovem e Infante. Para avaliar se a proporção entre machos e fêmeas era similar na amostra analisada foi utilizado o teste de qui-quadrado simples com nível de significância de 5%.

Para avaliar se a distribuição de indivíduos era similar nas classes etárias observadas foi utilizado o teste z. A estimativa de z foi realizada segundo a fórmula:

$$z = \frac{p_2 - p_1}{\sqrt{p_{\text{chap}} \cdot (1 - p_{\text{chap}}) \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

sendo

$$p_{\text{chap}} = \frac{(n_1 \cdot p_1) + (n_2 \cdot p_2)}{(n_1 + n_2)}$$

onde n_1 é o número amostral do conjunto 1 e p_1 a proporção de determinada classe no conjunto 1, n_2 é o número amostral do conjunto 2 e p_2 a proporção de determinada classe em no conjunto 2. Para todos os casos foi considerada como hipótese nula a igualdade entre as proporções e um nível de significância de 5%. O programa Microsoft Office Excel 2003 foi utilizado na geração de gráficos e para a realização do teste z.

Para avaliar a distribuição de peso em machos e fêmeas nas diversas classes etárias foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e os pós-testes de Dunn. O teste de Kruskal-Wallis é um teste não paramétrico para comparação entre três ou mais grupos não pareados. É semelhante a ANOVA (Análise de Variância), onde é estimada a variância em um conjunto de amostras. A resposta do teste reflete a comparação entre as medianas: se os *rankings* apresentam a mesma mediana, qual é a chance, randomicamente, de amostrarem-se parâmetros que resultem em medianas muito distintas? Se o valor de p for muito pequeno, a hipótese nula de que as diferenças observadas entre as amostras são ao acaso é rejeitada. Este resultado somente é válido se o N amostral for maior do que sete. O pós-teste de Dunn compara as diferenças nas somas dos *rankings* entre duas colunas da amostra com a diferença esperada nas médias. A hipótese nula é de que todos os dados foram amostrados de populações com distribuição similar, então as diferenças observadas devem-se ao acaso e o p será maior que 5%. Esta análise se aplica somente às comparações par a par e não ao conjunto amostral total.

Para a comparação do peso entre machos e fêmeas de uma mesma classe etária foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O teste de Mann-Whitney é um teste não paramétrico que compara dois grupos. Basicamente, este teste responde à mesma pergunta do teste de Kruskal-Wallis, só que a comparação é feita somente entre dois grupos da amostra. Se o valor de p é menor que 5%, a hipótese de que a diferença entre as medianas ocorre ao acaso é rejeitada. Os testes de Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn e Mann Whitney, assim como a geração de gráficos

que compilam as informações mais descritivas como a mediana e a distribuição dos caracteres avaliados/indivíduos nas classes, foram realizados utilizando o programa GraphPad (Motulsky, 2003).

Na avaliação do comprimento total dos indivíduos, as classes etárias foram agrupadas em duas: Adulto (associação das classes Adulto e Subadulto) e Jovem (associação das classes Jovem e Infante). O comprimento total dos indivíduos foi comparado entre as classes utilizando o teste de Mann-Whitney executado utilizando o programa GraphPad (Motulsky, 2003), tendo a aproximação do p estimada em curva de Gauss bi-caudada.

III.4.2. Caracterização da variabilidade genética

A variabilidade genética foi caracterizada utilizando avaliações intraespecíficas e interespecíficas. Os parâmetros intraespecíficos foram as frequências alélicas, a porcentagem de locos polimórficos, o número médio e efetivo de alelos observados por loco, o número de heterozigotos por loco, a heterozigose observada e esperada por loco e a heterozigose média. A aderência ao teorema do equilíbrio de Hardy-Weinberg, o desequilíbrio de ligação entre locos e o coeficiente de endogamia foram também estimados. Com relação aos interespecíficos, os dados foram comparados aos obtidos por Bastos *et al.* (comunicação pessoal) pela análise das coordenadas principais (PCA – *Principal Coordinate Analysis*).

Estatísticas Intraespecíficas

Frequências Alélicas e Heterozigose

As frequências alélicas obtidas para cada loco para a população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP) foram estimadas por contagem direta, utilizando-se o programa GenAlEx6 “*Genetic Analysis in Excel*” (Peakall & Smouse, 2006). Representando-se o número de indivíduos que apresentam genótipo A_iA_j por N_{xy} , a frequência do alelo x é dada por:

$$f_x = \frac{2 N_{xx} + N_{xy}}{2N}$$

onde N é o número de indivíduos genotipados para o loco, N_{xx} é o número de indivíduos homocigotos para o alelo x e N_{xy} é o número de indivíduos heterocigotos portadores do alelo x .

O número médio de alelos por loco foi estimado utilizando o programa GDA “*Genetic Data Analysis*” (Lewis & Zaykin, 2001), fazendo-se a somatória do número de alelos observados em cada um dos locos analisados em uma dada população e dividindo o valor encontrado pelo número total de locos. A porcentagem de locos polimórficos foi estimada manualmente e é dada por:

$$P = \frac{n_p}{r}$$

onde n_p é o número de locos polimórficos e r é o número de locos analisados.

O desvio padrão (DP) do cálculo da porcentagem de locos polimórficos foi estimado por:

$$DP = \sqrt{\frac{P(1-P)}{r}}$$

O número de heterocigotos observados por loco foi obtido por contagem direta e a média de heterocigotos por loco foi estimada manualmente por média aritmética, considerando todos os locos analisados.

O número de alelos efetivos (N_e) foi obtido por:

$$N_e = \frac{1}{1 - HO_o}$$

onde HO_o é a homocigose observada para o loco. Esse parâmetro foi estimado utilizando o programa GenAlEx (Peakall & Smouse, 2006) e é considerado uma medida interessante por permitir comparações de diversidade alélica entre os locos com distribuição de frequência alélica diferente. Esta medida também é útil por estimar o número de alelos mais frequentes em uma população ideal com a homocigose equivalente à observada na população em estudo.

A heterocigose esperada (H_s) foi estimada seguindo o proposto por Nei (1978):

$$H_s = 1 - \sum_{i=1}^r x_i^2 \cdot \frac{2n}{(2n-1)}$$

onde são computados a frequência do alelo x no i -ésimo loco em r locos analisados. A H_s corresponde a 1 menos a homocigose observada (HO_o) para o alelo x da população.

A heterozigose média esperada (Hs média) foi estimada, segundo o algoritmo proposto por Nei (1978):

$$H_s = \sum_{i=1}^r H_{O_i} / r$$

onde H_{O_i} é o valor da heterozigose observada para o i -ésimo loco estudado, em r locos estudados e os valores da heterozigose observada variam entre zero e um. Para as estimativas de heterozigose foi utilizado o programa GDA (Lewis & Zaykin, 2001).

Teste de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para verificar a aderência ao teorema do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi realizado o teste exato de Guo e Thompson (1992) utilizando o programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). Esse teste é análogo ao teste exato de Fisher, com a diferença de podermos utilizar uma matriz de contingência de tamanho arbitrário e foi desenvolvido para amenizar um problema comum: a ausência ou baixa frequência de genótipos na análise de marcadores multialélicos como os microssatélites. Como a fase gamética não é conhecida no conjunto de dados, somente foram realizados testes loco a loco, assumindo-se independência entre os locos utilizados. O teste exato foi feito pelo método da cadeia de Markov (“*Markov chain*”) modificado, realizando-se um total de 100.000 permutações, com 1000 passos de *desmemorização* (número de passos realizados *antes* de começar a comparar as tabelas observada e alternativa da cadeia de Markov e sua respectiva probabilidade. De fato, esta tabela gerada por *randomização* é independente da tabela observada no *input*), obtendo-se, desta maneira, um erro padrão médio de 0,0037. Neste teste, a hipótese nula é de união aleatória dos gametas.

Desequilíbrio de Ligação entre locos

Para estimar o desequilíbrio de ligação entre os locos estudados foi utilizado o programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). A hipótese nula é de que a distribuição genotípica em um loco é independente da distribuição em outro loco. Esta análise foi aplicada para verificar desvios do esperado pela regra de multiplicação entre pares de locos localizados em diferentes cromossomos. A palavra “ligação” neste caso pode ou não estar relacionada com associação

física em um cromossomo, uma vez que a localização exata dos marcadores não foi descrita até o momento. Como a fase gamética não era conhecida no conjunto de dados, a significância do desequilíbrio de ligação foi testada pelo método de *razão de verossimilhança* (“*likelihood ratio*”), onde a amostra analisada sob a hipótese de não associação entre locos (equilíbrio de ligação) é comparada com a amostra realizada assumindo associação (Slatkin & Excoffier, 1996). A significância é obtida computando a distribuição nula desta *razão* sob a hipótese de desequilíbrio. Importante ressaltar que o teste de desequilíbrio de ligação assume que o conjunto de dados encontra-se em aderência ao EHW.

Coefficiente de endogamia

A endogamia, que indica se existe deficiência de heterozigotos em uma dada população, foi estimada pelo programa GDA (Lewis & Zaykin, 2001), segundo o proposto por Cockerham (1969, 1973), a partir da variância dos componentes. O GDA estima os índices F de forma análoga ao proposto por Wright (1959): $f = F_{IS}$ e $\theta = F_{ST}$ (Weir, 1996).

Nesta estimativa, f é calculado a partir do seguinte algoritmo:

$$f = \frac{F - \theta}{1 - \theta}$$

onde:

$$F = \frac{\sigma_P^2 + \sigma_I^2}{\sigma_P^2 + \sigma_I^2 + \sigma_G^2}$$

e

$$\theta = \frac{\sigma_P^2}{\sigma_P^2 + \sigma_I^2 + \sigma_G^2}$$

Estatísticas Interespecíficas

Os parâmetros de variabilidade genética estimados para *A. caraya* – frequências alélicas para cada loco analisado, porcentagem de locos polimórficos e heterozigose média – além da especificidade de alelos, considerando a amostra utilizada no presente estudo, foram comparados aos mesmos parâmetros estimados a partir dos dados originais de Bastos *et al.* (comunicação pessoal) para populações de *A. belzebul* considerando os mesmos marcadores do tipo microssatélite aqui analisados. As amostras de *A. belzebul* utilizadas por Bastos *et al.* foram coletadas durante o enchimento do lago da hidrelétrica de Tucuruí, situada ao nordeste do estado do Pará, Brasil (comunicação pessoal).

PCA

No intuito de avaliar o padrão de distribuição da variabilidade genética observada para os marcadores microssatélites estudados nas duas espécies, foi realizada uma análise das coordenadas principais (PCA – *Principal Coordinate Analysis*). Uma vez que existiu compartilhamento de alelos para os marcadores analisados entre *A. caraya* e *A. belzebul*, foi realizada uma análise baseada nas distâncias genéticas entre indivíduos visando observar se existiria sobreposição ou proximidade entre as espécies. A análise das coordenadas principais (PCA) é uma técnica que permite determinar e plotar padrões gerais em um conjunto amostral e é, essencialmente, a localização da variação em um conjunto de dados em dois eixos principais. As análises de comparação entre populações de *A. caraya* e *A. belzebul* foram feitas utilizando o programa GenAlEx6 (Peakall & Smouse, 2006) utilizando uma matriz de distância genética como *input* de dados.

© Guto Bertagnolli



RESULTADOS

IV – RESULTADOS

IV.1. Caracterização Demográfica e Morfológica de *Alouatta caraya* de Porto Primavera

IV.1.1. Dados demográficos

A amostra analisada de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP) foi composta por 506 indivíduos, sendo 268 fêmeas e 238 machos. A razão sexual foi 1,13, porém não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quanto ao número de indivíduos total entre os gêneros nessa amostra ($\chi^2 = 1,7786$, GL = 1, p = 0,1823).

A distribuição dos indivíduos em quatro classes etárias – Adulto, Subadulto, Jovem e Infante – por gênero está apresentada na Figura IV.1. O conjunto que apresenta maior número de indivíduos é Fêmea Adulto (N = 158) e o que apresenta menor, à exceção de Fêmea Subadulto (N = 0), é Fêmea Infante (N = 31). O número de indivíduos machos e fêmeas em cada classe etária (considerando os indivíduos adultos e subadultos como sendo uma classe), não mostrou diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das análises par a par (teste z Tabela IV.1).

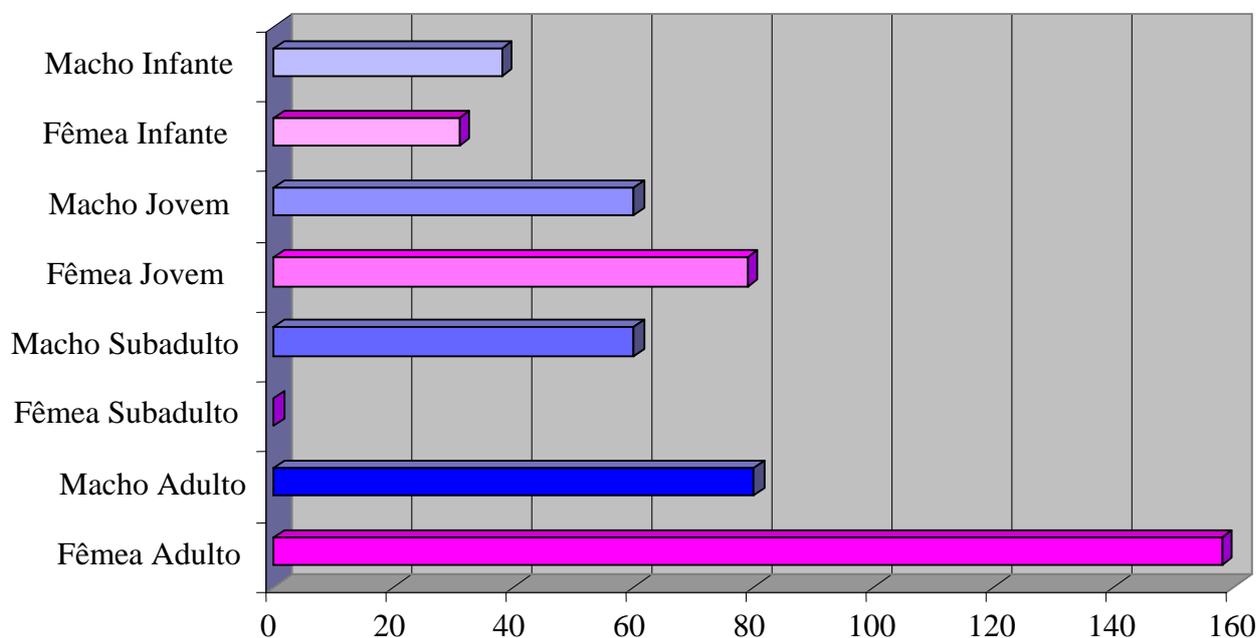


Figura IV.1. Distribuição por sexo e classes etárias dos 506 espécimes de *Alouatta caraya* capturados durante o enchimento do lago artificial de Porto Primavera – SP (Macho em azul e Fêmea em rosa).

Tabela IV.1. Distribuição de indivíduos da amostra de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP) por gênero e classe etária e resultado do teste z das comparações entre os gêneros.

Classes Etárias	Fêmea	Macho	Teste z (p)
Adulto e Subadulto	158	140	0,03 (0,9761)
Jovem	79	60	1,07 (0,2846)
Infante	31	38	-1,44 (0,1499)
N	268	238	506

N = número de indivíduos. p em curva bi-caudada.

IV.1.2. Dados morfológicos

Na Tabela IV.2 encontram-se compilados os resultados quanto ao peso dos 506 espécimes amostrados, divididos por gênero e classe etária. Entre os machos, o menor peso observado foi de 0,2 kg (classe Infante) e o maior foi de 8,9 kg (classe Adulto). Com relação às fêmeas, o menor peso observado foi 0,1 kg (classe Infante) e o maior de 8,0 kg (classe Adulto).

A distribuição do peso entre as diversas classes etárias de Fêmea (Figura IV.2 – A) apresentou diferença estatisticamente significativa segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$, $KW = 181,5$), bem como a comparação entre as medianas ($p < 0,05$). Apesar de haver sobreposição nos conjuntos amostrais, o pós-teste de Dunn evidenciou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre as classes Adulto *versus* Jovem, Adulto *versus* Infante e Jovem *versus* Infante.

Com relação ao peso de Macho nas diversas classes etárias (Figura IV.2 – B), também foram observadas diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$; $KW = 207,4$), bem como a comparação entre as medianas ($p < 0,05$). O pós-teste de Dunn evidenciou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre Adulto *versus* Subadulto, Adulto *versus* Jovem, Adulto *versus* Infante, Subadulto *versus* Jovem, Subadulto *versus* Infante e Jovem *versus* Infante.

Quanto a comparação da distribuição de peso na classe etária Adulta entre os gêneros (Figura IV.2 – C), foram observadas diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Mann-Whitney ($p < 0,0001$, $U = 159$). Esta diferença foi inexistente com relação à classe etária Jovem (Figura IV.2 – D; $p = 0,8433$, $U = 2294$) e infante ($p = 0,8531$, $U = 558$; Figura IV.2 – E).

Tabela IV.2. Peso corporal na amostra de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP) por gênero em classes etárias.

Parâmetros	Adulto		Subadulto		Jovem		Infante	
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
Peso Médio	4,16	6,94	–	4,77	2,34	2,37	1,04	0,89
DP	0,78	1,03	–	1,10	0,67	0,77	0,82	0,41
Variância	0,61	0,55	–	1,21	0,45	0,59	0,67	0,79
EP	0,06	0,11	–	0,14	0,08	0,05	0,15	0,07
Peso Mínimo	1,50	5,25	–	2,00	1,05	1,00	0,10	0,20
Peso Máximo	8,00	8,90	–	7,25	5,75	4,00	4,00	1,80
Mediana	4,00	7,00	–	4,75	2,25	2,25	1,00	1,00
IC superior	4,28	7,24	–	5,05	2,49	3,00	1,34	0,75
IC inferior	4,04	6,79	–	4,48	2,19	1,75	0,74	1,03
N	158	80	0	60	79	60	31	38

N = número de indivíduos amostrados; DP = Desvio Padrão; EP = Erro padrão; IC = Intervalo de confiança.

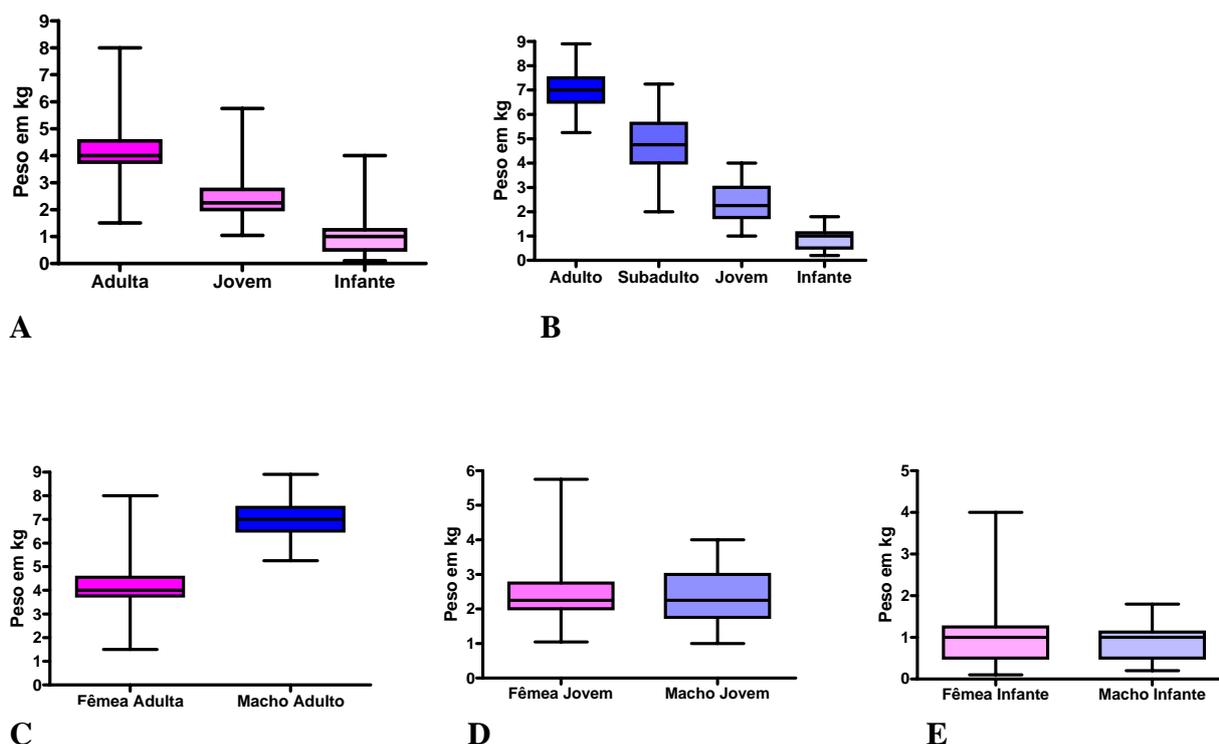


Figura IV.2. Distribuição do peso em quilogramas para as classes etárias de Macho e de Fêmea na amostra de *A. caraya* de Porto Primavera – SP. A: Comparação das classes de Fêmea: Adulto, Jovem e Infante; B: Comparação das classes de Macho: Adulto, Subadulto, Jovem e Infante; C: Comparação entre o peso de Fêmea Adulto *versus* Macho Adulto; D: Comparação entre Fêmea Jovem *versus* Macho Jovem; E: Comparação entre Fêmea Infante *versus* Macho Infante.

Os dados relativos ao comprimento total (CT) de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (N = 162), considerando como classes etárias Adulto (Adulto + Subadulto) e Jovem (Infante + Jovem), encontram-se na Tabela IV.3 (dados originais completos na Tabela VIII.3 do Anexo). Todas as comparações entre as medianas do CT, considerando gênero e classe etária, foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$; Figura IV.3). Essa diferença foi noticiada tanto quando se comparam as classes etárias do mesmo gênero quanto entre os gêneros na mesma classe etária.

Na comparação entre Fêmea Jovem e Adulto quanto ao CT, foi observada sobreposição entre o comprimento mínimo em Adulto e o máximo em Jovem (Tabela IV.3 e Figura IV.4 – A). A sobreposição também foi observada na comparação entre Macho Jovem e Adulto (Tabela IV.3 e Figura IV.4 – B) similarmente às fêmeas.

Quando o CT de Macho e de Fêmea Adulto foi comparado, 75% das fêmeas apresentaram tamanho menor que o mínimo observado em Macho (Figura IV.5 – A). Já em Jovem foi observada maior similaridade de tamanho corporal entre Macho e Fêmea, sendo que o tamanho mínimo foi bastante semelhante entre os dois sexos (Figura IV.5 – B). Contudo, o tamanho máximo de Jovem é bastante diferente entre Macho e Fêmea, sendo o da Fêmea inferior ao do Macho (16 cm de diferença).

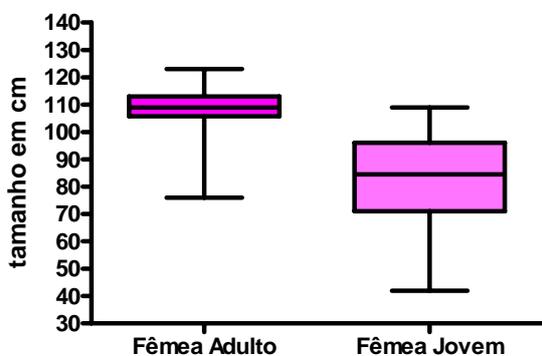
Tabela IV.3. Comprimento total (CT) em indivíduos de uma população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera, em centímetros, categorizados por sexo e classe etária.

Parâmetros	Sexo		Fêmea		Macho	
	Adulto	Jovem	Adulto	Jovem	Adulto	Jovem
CT Médio	108,00	82,70	119,10	83,71		
DP	9,08	18,50	8,96	20,14		
Variância	82,39	340,67	80,16	405,43		
EP	1,25	3,12	1,45	3,36		
CT Mínimo	76,00	42,00	90,00	39,00		
CT Máximo	123,00	109,00	131,00	127,00		
Mediana	109,00	84,50	121,50	87,25		
IC superior	106,00	76,30	122,00	90,52		
IC inferior	111,00	89,00	116,10	76,90		
N	53	35	38	36		

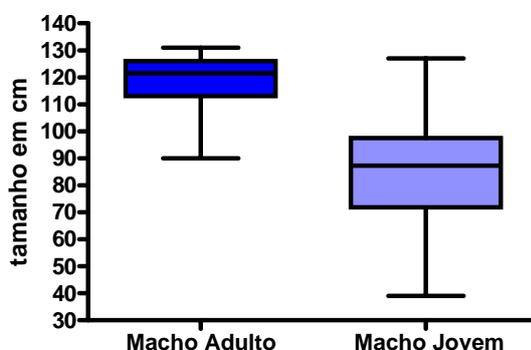
N = número de indivíduos amostrados; DP = Desvio Padrão; EP = Erro padrão; IC = Intervalo de confiança.

Figura IV.3. Comparação entre o comprimento total dos espécimes que compuseram a amostra de *Alouatta caraya* oriunda de Porto Primavera (SP) utilizando o teste de Mann-Whitney. Acima valores de p e abaixo valores de U.

	Macho Adulto	Macho Jovem	Fêmea Adulto	Fêmea Jovem
Macho Adulto	****	p<0,0001	p<0,0001	*
Macho Jovem	118	****	*	p = 0,0440
Fêmea Adulto	140	*	****	p<0,0001
Fêmea Jovem	*	635	138	****

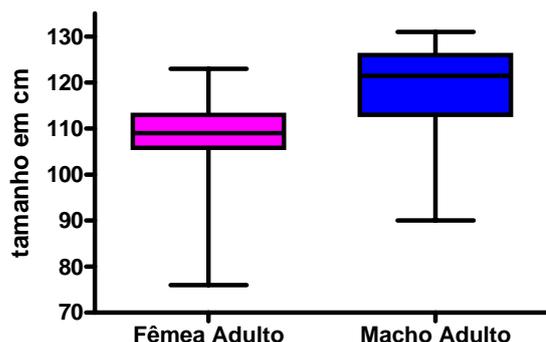


A

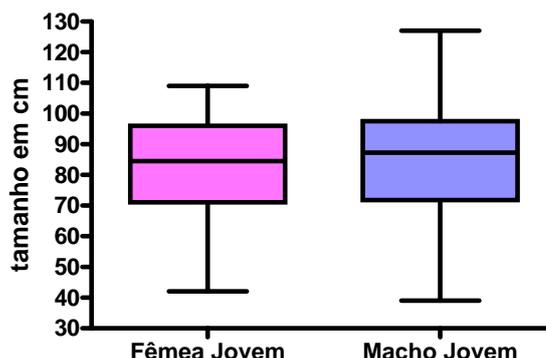


B

Figura IV.4. Comparação entre o comprimento total de Adulto e Jovem em Fêmea (A) e em Macho (B) de *A. caraya* da população de Porto Primavera (SP).



A



B

Figura IV.5. Comparação entre o comprimento total de Fêmea e Macho Adulto (A) e entre Fêmea e Macho Jovem (B) de *Alouatta caraya* da população de Porto Primavera (SP).

IV.2. Variabilidade genética de *Alouatta caraya* de Porto Primavera

IV.2.1. Teste dos marcadores microssatélites heterológos

Foram testados 10 pares de iniciadores para marcadores microssatélites nucleares desenvolvidos originalmente para a espécie *Alouatta belzebul* por Gonçalves *et al.* (2004) e 10 outros desenvolvidos para a mesma espécie, porém ainda não publicados (Gonçalves *et al.* comunicação pessoal). As condições de amplificação foram testadas e padronizadas. Dos 20 pares de iniciadores de amplificação testados, sete – Ab04, Ab06, Ab07, Ab09, Ab10, Ab12 e Ab17 – resultaram em amplificações confiáveis para a população de *A. caraya*, isto é, geraram produtos que forneceram picos de tamanhos de fragmentos de boa qualidade, dentro do tamanho esperado (100 a 300 pb) e com reprodutibilidade. Os iniciadores Ab13 e Ab16 geraram material de amplificação, porém foram considerados não confiáveis, pois apresentaram picos de tamanhos variados – o que impossibilitou a identificação do fragmento do marcador – mesmo após diversas mudanças nas temperaturas de pareamento e no protocolo de PCR. Os 10 iniciadores não publicados apresentaram resultados negativos para *A. caraya*. Os resultados de amplificação de um iniciador considerado confiável (Ab10) e de um não confiável (Ab16) estão apresentados nas Figuras IV.6 e IV.7.

Os volumes, concentrações dos reagentes e condições de amplificação foram especialmente padronizados para utilização na análise da espécie *A. caraya*. As temperaturas de pareamento (TA) utilizadas para amplificação do DNA das amostras de *A. caraya* estão descritas na Tabela III.2 (ver Material e Métodos) bem como as utilizadas para *A. belzebul*. As temperaturas padronizadas foram diferentes das descritas para *A. belzebul* para os locos Ab07, Ab09 e Ab12, para os quais as TA foram superiores para *A. caraya* 1,2° C, em média. Para os locos Ab04, Ab06, Ab10 e Ab17 as TA foram iguais as descritas para *A. belzebul*.

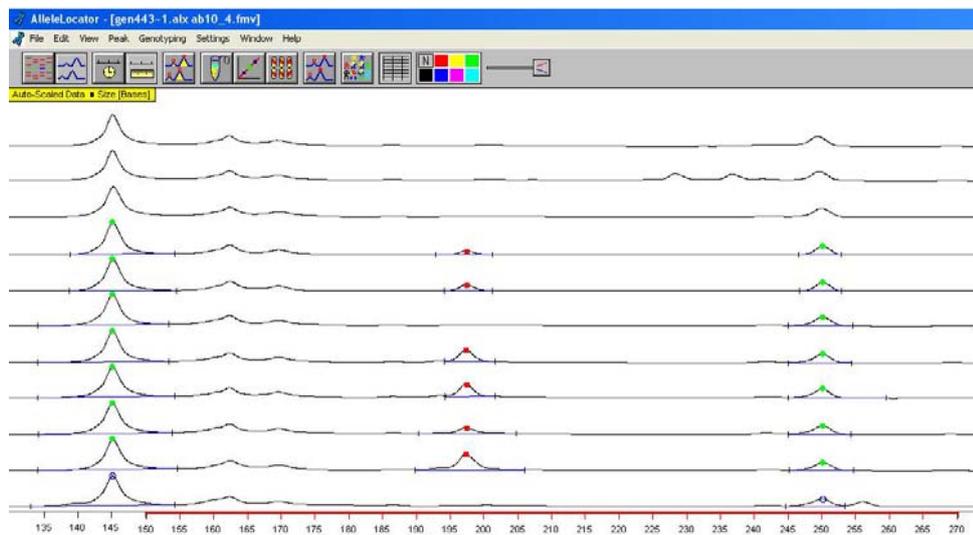


Figura IV.6. Genotipagem do loco Ab10: os picos em vermelho são do fragmento amplificado (microsatélite de interesse) em diferentes amostras. Os picos em verde são os calibradores internos de tamanho (*ladders*). Observe como o pico do microsatélite é separado, uniforme e com tamanho entre 100 e 300 pb.

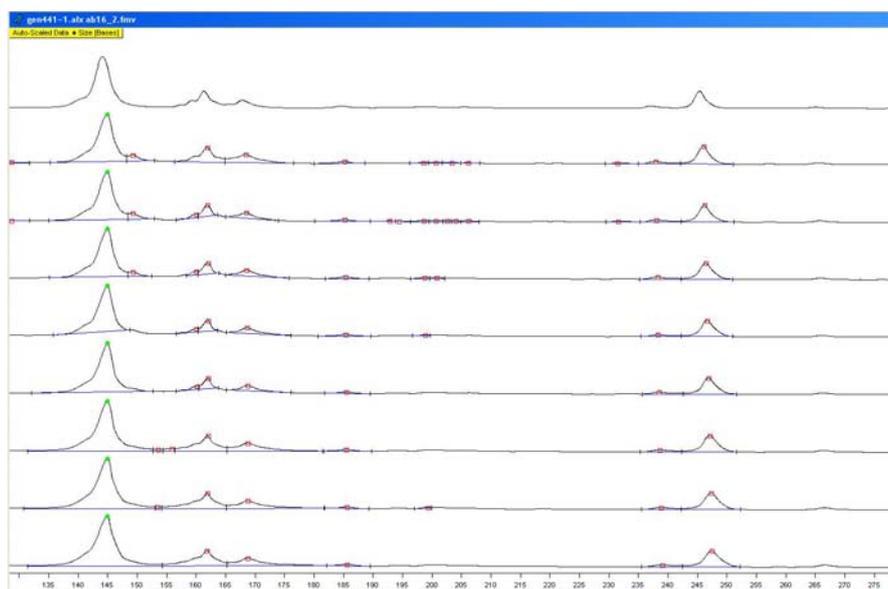


Figura IV.7. Genotipagem do loco Ab16: os picos em vermelho são dos fragmentos amplificados que podem ou não corresponder ao microsatélite de interesse. Os picos em verde são os calibradores internos de tamanho (*ladders*). Observe como diversos picos foram selecionados apresentando curva uniforme e com tamanho entre 100 e 300 pb. Os marcadores que apresentaram este padrão de bandeamento foram considerados não confiáveis.

No intuito de caracterizar geneticamente a população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP) foi analisada uma amostra de 105 espécimes. O protocolo utilizado para extração de DNA resultou em material em boa quantidade e qualidade.

Devido a problemas com o marcador de peso molecular, cerca de 70% das amostras foram genotipadas em duplicata. Após a primeira genotipagem, que ocorreu no momento de padronização dos marcadores e na qual o marcador de peso molecular estava com erro de tamanho, o seqüenciador automático apresentou problemas. A intenção inicial era genotipar duas vezes o mesmo resultado de PCR, para confirmar o tamanho dos fragmentos. No entanto, houve demora no conserto do aparelho, o que implicou em perda da fluorescência dos fragmentos e na realização de nova PCR para a certeza de resultado. Não foram encontrados resultados significativamente discrepantes entre as duas genotipagens (14 discrepâncias). Quando houve diferenças, o resultado da segunda genotipagem foi escolhido por apresentar maior confiabilidade.

IV.2.2. Análise Intraespecífica

A Tabela IV.4 descreve a caracterização dos locos para a população *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP). O tamanho dos fragmentos variou entre 138pb e 305pb e foi observado um total de 53 alelos na análise dos microssatélites com amplificação confiável. Dos sete locos, cinco apresentaram polimorfismo, isto é, presença de pelo menos dois alelos com frequências alélicas superiores a 1%: Ab04, Ab06, Ab07, Ab12, Ab17 (71,4% dos locos analisados, DP = 0,2021). O número de alelos para o marcador Ab12 foi estimado em seis durante a padronização (N = 15).

Dentre os sete marcadores que apresentaram amplificação confiável, seis foram analisados para a população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera: Ab04, Ab06, Ab07, Ab09, Ab10 e Ab17. Os locos Ab10 e Ab09 apresentaram monomorfismo. Portanto, dentre os locos analisados 66% foram polimórficos (DP = 0,47). Ab06 foi o que apresentou o maior número de alelos (17) e Ab07, o menor (quatro), quando consideramos somente os locos polimórficos, sendo que o número de alelos efetivos variou de 1,5 a 9,1. Observou-se uma média de 11,25 alelos por loco polimórfico e de 7,83 (DP = 6,85) alelos por loco considerando-se todos os locos.

As seqüências-motivo não foram averiguadas e a diferença entre os alelos foi considerada como de dois pares de base (2pb). O marcador Ab04 apresentou a série alélica completa

enquanto que Ab06, Ab07 e Ab17 não, sendo que em todos os casos a variação entre pelo menos dois alelos próximos da série é de 2pb. Por exemplo, o marcador Ab07 apresentou os alelos 184pb, 186pb e 192pb, faltando os tamanhos intermediários de alelos como 188pb e 190pb.

Na Tabela IV.5 estão apresentados os genótipos e o número de homozigotos observados para os locos polimórficos: Ab04, Ab06, Ab07, Ab12 e Ab17. As frequências alélicas para os locos analisados na população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP) estão descritas na Tabela IV.6. A distribuição das frequências apresentou-se unimodal para o loco Ab07 (alelo modal: 180) e multimodal para os demais. Os alelos modais para o loco Ab04 foram o 159 e o 171, para o Ab06, alelos 275, 279 e 301, para o Ab17, alelos 236 e 238 (Figura IV.8). Todos os locos encontram-se em desacordo com as frequências esperadas no teorema do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) exceto Ab17 (Tabela IV.7).

A diversidade genética total ou heterozigose total observada para todos os locos analisados foi de 0,52 (DP = 0,38) e a esperada, 0,48 (DP = 0,42). Foi observada deficiência de heterozigotos e excesso de homozigotos para todos os locos analisados.

Tabela IV.4. Caracterização dos microssatélites heterólogos descritos por Gonçalves *et al.* (2004) e testados em uma população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP).

Parâmetros	TF	Na	Nae	N
Loco				
Ab04	157–175	10	5,1	84
Ab06	275–305	17	9,1	65
Ab07	180–190	04	1,5	100
Ab09	138	01	1,0	103
Ab10	192	01	1,0	103
Ab12	253– 265	06	4,84	17
Ab17	220–246	14	6,3	100
Média	–	7,8	4,0	95
Desvio Padrão	–	6,9	3,4	–

TF = tamanho dos fragmentos, em pares de base; Na = Número de alelos observados para o loco; Nae = número de alelos efetivos; N = número de indivíduos genotipados.

Tabela IV.5. Distribuição genotípica observada dos marcadores do tipo microsatélite heterólogos para uma população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP).

Ab04			Ab06			Ab07			Ab12			Ab17		
Genótipos	N	HOo	Genótipos	N	HOo	Genótipos	N	HOo	Genótipos	N	HOo	Genótipos	N	HOo
157/157	3	3	261/303	1		180/180	72	72	253/253	1	1	218/238	1	1
157/159	4		263/287	1		180/182	4		253/261	2		218/240	1	
157/161	2		263/293	2		180/188	9		253/265	1		220/234	1	
157/163	1		263/301	1		180/190	5		257/257	1	1	222/222	1	1
157/167	1		273/273	2	2	182/182	4	4	257/261	1		222/226	1	
157/169	2		273/301	2		182/188	2		259/259	2	2	222/226	1	
157/171	7		273/303	1		182/190	3		261/263	2		222/228	1	
157/175	1		275/275	2	2	188/188	1	1	263/263	2	2	222/230	2	
159/159	8	8	275/277	1					265/265	4	4	222/234	1	
159/163	2		275/279	1								222/236	3	
159/169	2		275/285	4								222/238	3	
159/171	10		275/287	1								222/240	1	
159/173	1		275/289	6								226/226	1	1
161/161	1	1	275/291	2								226/230	2	
161/169	1		275/293	2								226/234	1	
161/171	3		275/299	2								226/236	2	
161/173	3		275/301	4								226/238	2	
163/167	1		275/303	3								228/234	1	
163/171	4		277/277	1	1							230/230	2	2
163/173	1		277/289	1								230/234	3	
165/165	1	1	277/291	1								230/236	4	
165/169	1		277/303	1								230/238	8	
165/173	1		279/279	1	1							230/240	2	
167/167	1	1	279/287	1								230/242	1	
169/169	1	1	279/293	3								232/234	4	
169/171	1		279/295	1								232/236	2	

Ab04			Ab06			Ab07			Ab12			Ab17		
Genótipos	N	HOo	Genótipos	N	HOo	Genótipos	N	HOo	Genótipos	N	HOo	Genótipos	N	HOo
171/171	15	15	279/301	3								234/234	3	3
171/173	3		279/303	1								234/236	3	
173/173	2	2	279/305	1								234/238	5	
			281/285	1								234/240	2	
			285/303	1								236/236	10	10
			289/301	2								236/238	7	
			291/291	1	1							236/240	4	
			293/293	1	1							236/244	2	
			293/299	1								238/238	8	8
			293/301	1								238/240	1	
			293/303	1								238/242	1	
			295/295	1								238/246	2	
			301/301	2	2									
Total	84	32		65	10		100	77		16	10		100	26

HOo = número de homocigotos observados.

Tabela IV.6. Frequências alélicas dos marcadores do tipo microssatélite heterólogos para uma população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera, SP.

Loco	Ab04		Ab06		Ab07		Ab09		Ab10		Ab17	
	Alelo	f										
	157	0,143	261	0,008	180	0,810	138	1,000	192	1,000	218	0,010
	159	0,208	263	0,031	182	0,085					220	0,005
	161	0,065	273	0,054	188	0,065					222	0,070
	163	0,054	275	0,231	190	0,040					226	0,050
	165	0,024	277	0,046							228	0,010
	167	0,030	279	0,100							230	0,130
	169	0,054	281	0,008							232	0,040
	171	0,339	285	0,046							234	0,135
	173	0,077	287	0,023							236	0,235
	175	0,006	289	0,069							238	0,230
			291	0,038							240	0,055
			293	0,092							242	0,010
			295	0,023							244	0,010
			299	0,023							246	0,010
			301	0,131								
			303	0,069								
			305	0,008								
f_T		1,000		1,000		1,000		1,000		1,000		1,000
N	100		84		65		100		100		100	

f = frequência do alelo na população; f_T = somatório das frequências; N = número de indivíduos analisados por loco.

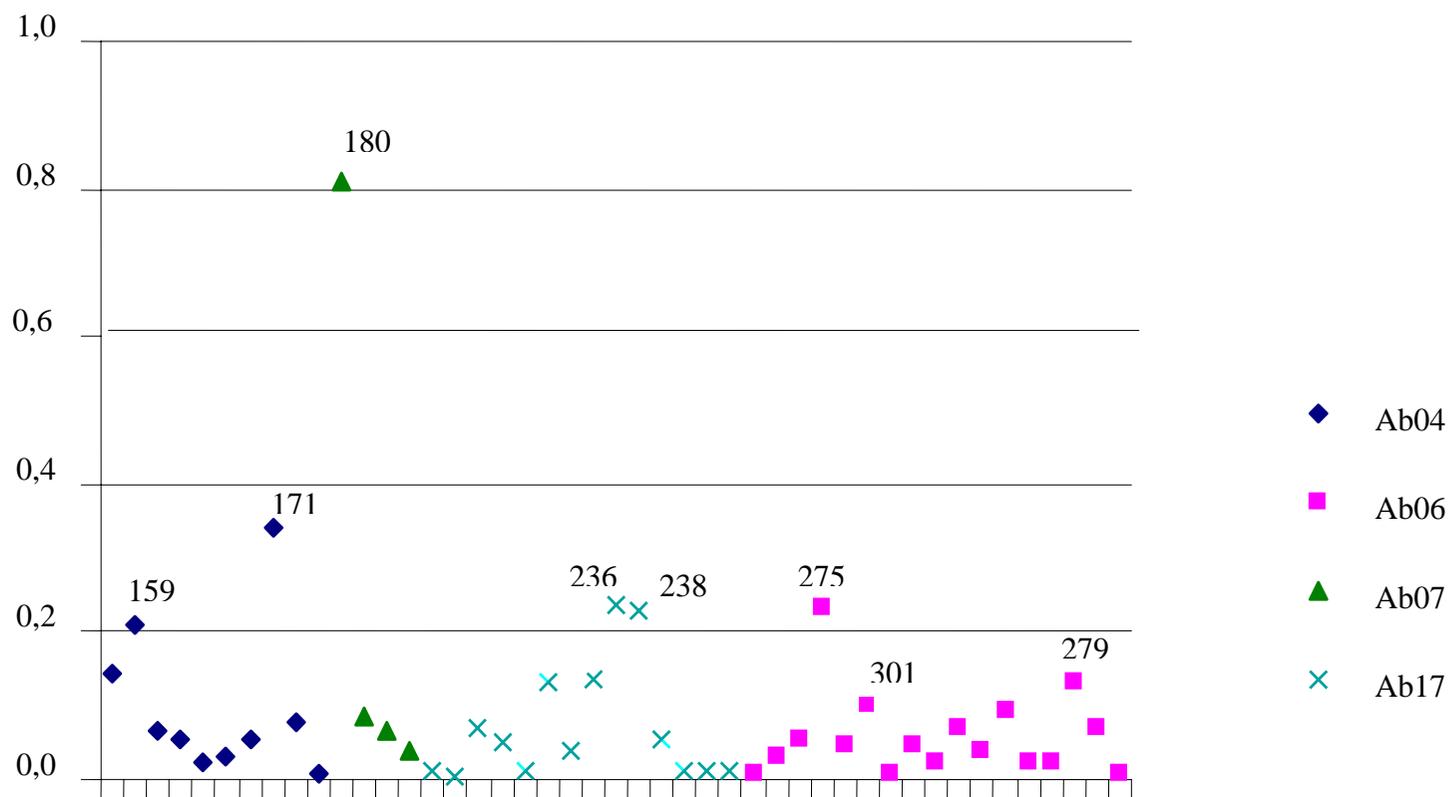


Figura IV.8. Distribuição das frequências alélicas para os quatro marcadores microsatélites polimórficos analisados: Ab04, Ab06, Ab07 e Ab17 para a população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP), evidenciando os alelos mais frequentes (tamanhos em pares de base).

Tabela IV.7. Teste da aderência ao EHW (teste exato de Guo & Tompson (1992) utilizando a cadeia de Markov) dos locos analisados para a população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera.

Loco	N	<i>H. Observado</i>	<i>H Esperado</i>	p	DP
AB04	84	0,631	0,809	0,001	0,000
AB06	65	0,831	0,899	0,012	0,000
AB07	100	0,230	0,341	0,000	0,000
AB09	100	–	–	–	–
AB10	100	–	–	–	–
AB17	100	0,740	0,848	0,223	0,001

N = número de indivíduos utilizados na análise. *Observado* e *Esperado* se referem à heterozigose;

DP = Desvio Padrão de p.

Desequilíbrio de Ligação entre locos

Foram observados dois desvios propondo a hipótese de que a distribuição alélica em um loco é independente da distribuição em outro loco considerando um nível de significância de 0,05 (Tabela IV.8). Em ambos os casos o loco Ab04 apresentou desequilíbrio em relação a um outro: Ab04 *versus* Ab06 e Ab04 *versus* Ab17. Estes desvios representam 13% dos testes realizados. Considerando que, efetivamente, somente os locos polimórficos (quatro) foram avaliados, este desvio representou 33% das comparações (seis testes).

Tabela IV.8. Valores de $p \pm$ desvio padrão da análise de desequilíbrio de ligação entre os marcadores microssatélites analisados para a população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP). Valores em grifo negro correspondem às comparações entre locos que indicam desequilíbrio de ligação.

Loco	Ab04	Ab06	Ab07	Ab09	Ab10
Ab06	0,0011±0,0003	–			
Ab07	0,0982±0,0030	0,8679±0,0036	–		
Ab09	*	*	*	–	
Ab10	*	*	*	*	–
Ab17	0,0043±0,0007	0,7028±0,0046	0,3153±0,0043	*	*

* comparações com locos monomórficos

Coefficiente de endogamia

As estimativas de endogamia para a população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera, São Paulo, indicam a deficiência de heterozigotos na amostra analisada: $f = 0,1583$ – confirmando o evidenciado pela heterozigose total observada para os locos analisados = 0,4811 – em relação ao esperado.

IV.2.3. Análise Interespecífica

Análise de Coordenadas Principais (PCA)

A análise das coordenadas principais (PCA) comparando a população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP) com populações de *Alouatta belzebul* da hidrelétrica de Tucuruí, PA (Gonçalves *et. al.* comunicação pessoal) mostrou que 74,1% da variação encontrada entre as amostras pode ser descrita em dois eixos (Figura IV.9). Cerca de 81% de toda a variação encontrada foi descrita nos três primeiros eixos (eixo 1 = 62,96%; eixo 2 = 11,11% e eixo 3 = 7,35%).

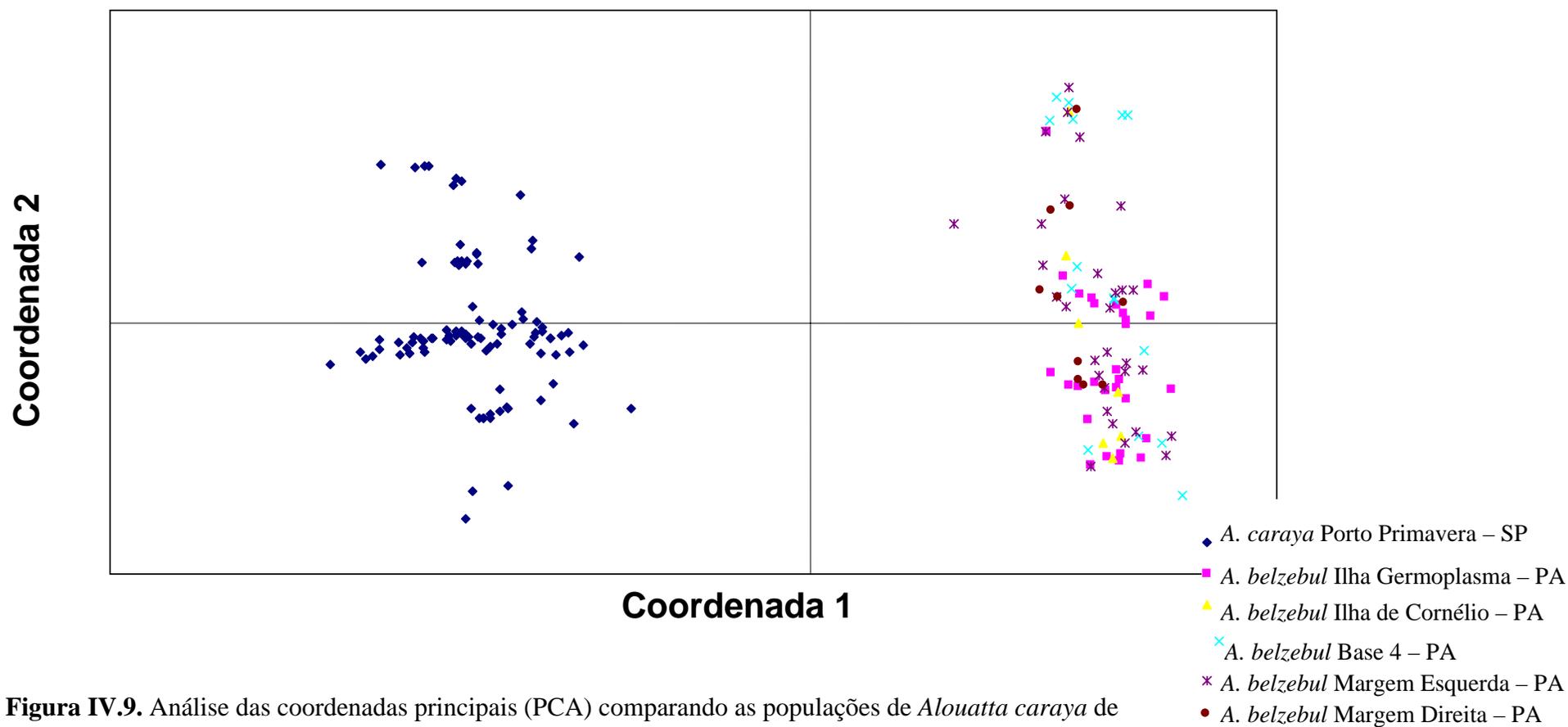


Figura IV.9. Análise das coordenadas principais (PCA) comparando as populações de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (SP) com populações de *Alouatta belzebul* da hidrelétrica de Tucuruí (PA).

© Roberto Okamura



DISCUSSÃO

V – DISCUSSÃO

V.1. Caracterização Demográfica e Morfológica de *Alouatta caraya* de Porto Primavera

A razão sexual de *Alouatta caraya* observada na amostra de Porto Primavera (1,13) corrobora a poliginia, isto é, mais de uma fêmea por macho, descrita na literatura para os grupos familiares em populações naturais dessa espécie (Treves, 2001; Chapman & Balcomb, 1998). A ocorrência de poliginia tem sido reportada sempre associada à habilidade do macho em controlar os acasalamentos das fêmeas, onde a contribuição masculina para os filhotes é primordialmente genética, ou ao grande investimento energético de ambos os pais mesmo após o acasalamento, o que propicia melhores condições de as fêmeas criarem a prole (Ricklefs, 1996). Em *Alouatta* observa-se o cuidado parental de ambos os pais (Calegari-Marques, 1992), sendo que os efeitos da poliginia na variabilidade genética são desconhecidos (Winkler, *et al.*, 2004; James *et al.*, 1997; Froelich & Thorington, 1982).

Os grupos familiares de *A. caraya* são formados por número variável de indivíduos (entre cinco a nove indivíduos por bando), onde as fêmeas sempre estão em maior número e, geralmente, ocorre apenas um macho alfa (líder) – o único sexualmente ativo. Os demais machos não estão reprodutivamente ativos, pois têm seu acesso às fêmeas restringido por sua posição hierárquica no bando (Treves, 2001; Calegari-Marques, 1992; Neville *et al.*, 1988). Estes jovens são expulsos do bando e formam grupos temporários, que não são necessariamente poligínicos, e que geralmente tendem a se dissolver com o completo amadurecimento dos indivíduos e possível incorporação a outros grupos mais estáveis. São pouco frequentes estudos comportamentais em grupos de machos/fêmeas isolados no momento em que são expulsos do bando, assim como não foi avaliada a ocorrência deste comportamento na natureza (Kowalewski & Zunino, 2004; Chapman & Balcomb, 1998; Calegari-Marques, 1992).

O desvio verificado na proporção de machos em relação às fêmeas observado no presente estudo, com maior número de fêmeas amostradas especialmente na classe Adulto, corrobora o descrito na literatura tanto em relação à poliginia como para a razão sexual observada em *A. caraya*, uma vez que diversos estudos reportam variação entre 0,5 e 2,2 na razão sexual, dependendo da população estudada (Chapman & Balcomb, 1998).

A questão da razão sexual tem sido mais enfocada em análises de composição de grupos estáveis de *Alouatta*, sendo traçadas diversas hipóteses para explicar a presença de um maior número de fêmeas do que machos (Chapman & Balcomb, 1998). Uma dessas hipóteses é a predação (Treves, 2001), uma vez que os machos seriam responsáveis pela proteção do bando.

Alouatta são essencialmente folívoros e a cobertura vegetal está relacionada a variações no peso e na capacidade reprodutiva dos indivíduos (Kowalewski & Zunino, 2004), além da densidade total de indivíduos em determinada área. A comparação do peso dos indivíduos por sexo e classe etária na população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera revelou o esperado: intenso dimorfismo sexual entre as classes Adulto e Subadulto de Macho e de Fêmea (Smith & Cheverud, 2002; Smith & Jungers, 1997), e menor dimorfismo quando comparamos Fêmea e Macho Jovem e Infante.

A média de peso de Adulto, tanto para Fêmea como para Macho, na população de Porto Primavera (Fêmea: 4,16 kg e Macho: 7,02 kg), foi próxima ao observado por Rumiz (1990) em florestas inundadas do nordeste da Argentina (4,33 kg e 6,42 kg para a população do nordeste da Argentina). Considerando a distribuição do peso nas classes etárias de Fêmea foi observada uma marcante diferença, mesmo havendo sobreposição entre elas. Com relação ao peso médio, esperava-se que as fêmeas de Porto Primavera (SP) apresentassem maior média, pois as fêmeas em atividade reprodutiva não foram excluídas da análise, como no estudo conduzido por Rumiz (1990). Usualmente as fêmeas em atividade reprodutiva (grávidas ou lactando) são excluídas de estudos de peso corpóreo, pois o metabolismo reprodutivo induz a um aumento das demandas energéticas do indivíduo, o que leva a um aumento de massa corporal (Smith & Junger, 1997; Rumiz, 1990). Em algumas espécies, o aumento de massa corporal total chega a 20% durante a gravidez e varia ao longo da situação reprodutiva (gestação, recém-parto, lactante, desmame).

Dentre os indivíduos que apresentavam ficha de morfometria mais completa (N = 53), havia o registro de 20 fêmeas em atividade reprodutiva (ver Tabela VIII.4 do Anexo), o que representa cerca de 12% da amostra total de fêmeas adultas (N = 158) avaliadas em relação ao peso. Quando comparamos o peso médio observado neste estudo com o reportado por Rumiz (1990), que considerava somente as fêmeas sem indícios de atividade reprodutiva, as fêmeas de Porto Primavera (SP) apresentam menor peso corpóreo. Notadamente, a região de florestas úmidas da Argentina mostra alta densidade populacional o que indiretamente significa que existe recurso de alimento disponível em abundância para esta localidade, sendo que há relatos de que a densidade chega a 425 indivíduos/km² em algumas áreas dessas florestas (Kowalewski &

Zunino, 2004). Por outro lado, os habitats florestais de Porto Primavera (SP) teoricamente não seriam restritivos a um maior peso dos indivíduos, uma vez que estes habitats são semelhantes a outros descritos na literatura como as florestas inundáveis da Argentina, em um morfoclima um pouco mais seco (Labruna *et al.*, 2002; Zunino *et al.*, 2001).

A variação na abundância de recursos alimentares – que seria reflexo do morfoclima mais seco – não pode, portanto, justificar este resultado para Fêmea Adulta, o que é corroborado pelo observado para Macho Adulto nesta população, uma vez que foi verificado maior peso médio que o descrito por Rumiz (1990). Outro ponto a ser considerado é que existem diferenças regionais entre as populações de primatas, além de variações na forma como as amostras são coletadas, o que pode influenciar nos valores encontrados para machos e fêmeas de diferentes populações (Smith & Jungers, 1997).

Existe uma dificuldade intrínseca de se classificar os indivíduos quanto a idade, especialmente em grupos de primatas que atingem a maturidade sexual antes do término do crescimento. Indivíduos adultos, conceitualmente, são indivíduos que terminaram o período de crescimento corpóreo, independentemente de terem atingido a maturidade sexual, que está relacionada à capacidade reprodutiva do indivíduo (Smith & Jungers, 2001). Em fêmeas de *A. caraya*, o principal fator que determina o início da atividade reprodutiva é o amadurecimento sexual, que acontece junto com o amadurecimento social – independentemente do término do crescimento. Em muitas espécies existem pressões seletivas que atuam favorecendo a maturidade sexual precoce (cães e humanos, dentre outros). Dessa forma, a maturação sexual é induzida sem que o indivíduo tenha atingido seu tamanho corpóreo máximo, isto é, a idade adulta (Smith & Jungers, 2001).

No banco de dados morfológicos (ver Tabela VIII.4 do Anexo) estão listadas várias fêmeas com filhotes, dado esse que foi utilizado para classificar tais fêmeas como adultas. Porém, podemos considerar que parte destas fêmeas estão aptas a reprodução, mas não totalmente adultas pois ainda devem estar em fase de crescimento. A ausência de amostragem de fêmeas subadultas reflete uma provável tendência na classificação etária dos indivíduos quando da captura/translocação, onde as subadultas foram classificadas como adultas. Estes indícios são corroborados pela distribuição do comprimento total dos indivíduos quando comparamos as fêmeas adultas e jovens: apesar de a maior parte das amostras não apresentar sobreposição, o tamanho mínimo amostrado nas fêmeas consideradas adultas (76,0 cm) é muito próximo do

descrito para fêmeas jovens tanto na mediana (84,5 cm) como na média (82,7 cm, DP = 18,5 cm), para os valores de comprimento total.

Quando comparados os grupos de machos adultos e jovens na amostra de *A. caraya* de Porto Primavera (SP) existiu uma diferenciação significativa. Isto indica que a classificação etária dos machos foi melhor estabelecida que a das fêmeas quando da coleta de informações morfológicas. Provavelmente este fato está relacionado ao amadurecimento tardio de machos, uma vez que, além da capacidade fisiológica para a reprodução, é necessário também capacidade de embate com o macho líder em um sistema de acasalamento poligínico (Treves, 2001; Calegari-Marques, 1992; Neville *et al.*, 1988). Machos são expulsos quando atingem a maturidade e, geralmente, não desafiam o macho alfa para embate no momento da exclusão. Este fato também está associado à força do indivíduo recém-adulto, que não apresenta força (massa corpórea) suficiente para uma luta com um macho maior (Kowalewski & Zunino, 2004; Chapman & Balcomb, 1998; Calegari-Marques, 1992). Portanto, entre os machos fica clara a classificação etária e entre as fêmeas esta classificação necessita ser melhor avaliada, uma vez que o parâmetro relativo à capacidade reprodutiva mostrou-se não adequado na definição de indivíduos subadultos.

Primates Neotropicais de maneira geral apresentam grande variação no tamanho corporal e intenso dimorfismo sexual. Ford (1994) sugere que possíveis causas/elementos correlatos que contribuem para este dimorfismo sexual intenso podem estar relacionados com estratégias de sobrevivência e exploração ambiental, à seleção sexual, à hábitos de vida ou simplesmente à inércia filogenética. Já Weckerly (1998) propôs que existe forte correlação entre dimorfismo sexual e poliginia observada em vários grupos de mamíferos. No gênero *Alouatta*, este dimorfismo parece estar especialmente associado à inércia filogenética uma vez que é observado em todas as espécies do gênero avaliadas na literatura (Gordon, 2006; Gregorin, 2006; Smith & Jungers, 1997). *Alouatta caraya* segue um padrão de seleção sexual positiva entre adultos, onde machos são maiores que as fêmeas. Tanto os resultados das análises sobre o peso dos indivíduos nas classes etárias, como os de comprimento total dos indivíduos corroboram o descrito na literatura para o intenso dimorfismo sexual entre machos e fêmeas adultos/subadultos e pequeno ou ausente dimorfismo sexual entre os jovens e os infantes.

V. 2. Variabilidade genética de *Alouatta caraya* de Porto Primavera

Amostragem

O resgate de fauna, como o procedimento realizado em Porto Primavera, é um tipo de coleta de amostras bastante comum para diversos grupos animais. Em decorrência da dinâmica da operação, a amostragem de espécimes de *Alouatta caraya* utilizada no presente estudo foi realizada sem o registro do local exato de captura e dos grupos aos quais estes animais pertenciam, o que implicou em perda de informação relacionada à estrutura populacional e à estrutura familiar. Outro ponto é que a amostra analisada para morfometria e a utilizada para avaliação da variabilidade genética não são essencialmente a mesma, o que impossibilita o cruzamento de informações e inferências mais precisas sobre processos evolutivos que pudessem ser detectados através da análise conjunta dos caracteres morfológicos e genéticos.

A coleta de amostras por grupo de mamíferos no hábitat natural, especialmente para o grupo dos primatas Neotropicais, que se organizam em grupos familiares, tem comportamentos hierárquicos (a maioria dos gêneros, incluindo *Alouatta*) e hábitos tanto diurnos como noturnos, apresenta diversos empecilhos e dificuldades. Dentre estas, existe a possibilidade de dispersão da estrutura familiar durante a coleta, o que aumenta o risco de predação e desestrutura da hierarquia do grupo como um todo. Com a captura de todo o grupo há a possibilidade da perda de territórios – influenciando a taxa de sobrevivência dos indivíduos –, entre outros aspectos de natureza ecológica, quando da devolução dos indivíduos pós-coleta.

No enchimento de lagos artificiais, o resgate de fauna é a alternativa escolhida na tentativa de minimizar os enormes danos que estão sendo causados ao ambiente, uma vez que a maior parte dos indivíduos das áreas afetadas não resistiria ao alagamento. Neste contexto, há uma oportunidade de coleta de amostras biológicas para estudos genéticos, especialmente para os grupos de difícil acesso como os primatas. Este tipo de coleta torna-se interessante na medida em que informações genéticas são escassas para a maioria das espécies silvestres sul-americanas.

No caso de *A. caraya*, dois tipos de amostragem têm sido utilizadas para a geração de informações genéticas: amostras coletadas de animais em cativeiro ou obtidas por resgate de fauna, sendo que a maioria pertence à segunda categoria (Nascimento *et al.*, 2005; Szapkievich *et al.*, 2004; Bonvicino *et al.*, 2001; Salim *et al.*, 2001; Meireles *et al.*, 1999^b). A amostra utilizada no presente estudo provavelmente não reflete apenas uma população, uma vez que o

material biológico foi coletado ao longo dos 180 km de margem do Rio Paraná durante a formação do lago artificial e, certamente, não é a mais precisa fonte de informações genéticas associadas à dinâmica populacional e à estruturação em famílias desta espécie, dificultando análises mais profundas de estrutura populacional, por exemplo.

Considerando estes fatos, pode-se argumentar por outra perspectiva que este é o maior estudo realizado com uma população natural de *A. caraya* até o presente momento e que as informações sobre a variabilidade genética desta espécie são escassas, o que justifica a utilização destas amostras para a caracterização genética proposta no presente trabalho.

Variabilidade Genética

A importância da variabilidade genética está no representativo potencial de as populações responderem à seleção natural e se adaptarem a alterações no ambiente (Frankhan *et al.*, 2002). Avaliar esta variabilidade permite inferir elementos da biologia da espécie e também eventos evolutivos que marcaram a história das populações. Diversos parâmetros vêm sendo utilizados para avaliar esta variabilidade. Em estudos com primatas, os principais índices de variabilidade são a porcentagem de locos polimórficos e a heterozigose média observada. A porcentagem de locos polimórficos demonstra indiretamente a riqueza de alelos – outra medida comum para avaliarmos a variabilidade genética geralmente associada à verificação de alelos exclusivos.

No caso de *Alouatta caraya*, dos 20 pares de iniciadores de amplificação desenvolvidos para *Alouatta belzebul* testados, sete resultaram em amplificações confiáveis, isto é, que geraram produtos que forneciam picos de tamanhos de fragmentos de boa qualidade, dentro do tamanho esperado (100 a 300 pb). Os tamanhos dos fragmentos amplificados obtidos para *A. caraya* foram diferentes dos descritos para *A. belzebul* por Gonçalves *et al.* (2004). Na Tabela VIII.5 do Anexo está apresentada uma comparação entre os tamanhos dos fragmentos dos locos microssatélites assim como os aqui analisados.

A população de Porto Primavera apresentou menos alelos quanto aos locos microssatélites analisados (seis) do que os descritos originalmente para *A. belzebul*: 47 alelos, o que corresponde a 66% dos alelos já identificados para *A. belzebul*. Porém, foram observados alelos exclusivos para a população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP) que não haviam sido descritos previamente para as populações de *A. belzebul* de Tucuruí (PA) por Gonçalves *et al.* (2004). Os alelos e respectivas frequências encontrados para os marcadores analisados, tanto

para *A. belzebul* como para *A. caraya*, estão descritos na Tabela VIII.6 do Anexo. Foi observada ainda uma média de alelos menor em *A. caraya* (7,83) do que em *A. belzebul* (11,83). Por outro lado, quando apenas os locos polimórficos são considerados, a diversidade de alelos é semelhante para as duas espécies: 11,25 em *A. caraya* e 11,83 em *A. belzebul*.

Os níveis de variabilidade encontrados para *A. caraya* em termos de número de alelos, apesar de menores que os observados para *A. belzebul*, estão acima do observado para outros primatas Neotropicais como *A. palliata*, *A. pigra*, *A. seniculus*, *Ateles geoffroyi*, *Cebus apella*, *Callimico goeldi* (Winkler *et al.*, 2004; Ellsworth & Hoelzer, 1998). Porém, como somente uma população de *A. caraya* foi analisada, não é possível afirmar que os alelos descritos no presente trabalho são os únicos existentes para a espécie, se são exclusivos para esta população ou compartilhados pela espécie como um todo.

A. caraya e *A. belzebul* apresentaram alelos compartilhados quanto aos locos Ab04, Ab06 e Ab07. Dos 14 alelos observados para o loco Ab04 considerando as duas espécies, quatro foram exclusivos para a população de *A. caraya* de Porto Primavera e seis compartilhados com *A. belzebul*. Foram observados 21 alelos para o marcador Ab06 no total, sendo que oito alelos foram exclusivos e nove compartilhados. Dos 13 alelos descritos para Ab07 não foram observados alelos exclusivos em *A. caraya*: todos os quatro alelos encontrados para *A. caraya* estão presentes também em *A. belzebul*. Os locos Ab09 e Ab10 apresentaram-se monomórficos em *A. caraya*, sendo que os alelos encontrados são exclusivos das espécies, não compartilhando os 16 e 23 alelos, respectivamente, descritos para *A. belzebul* por Gonçalves *et al.* (2004).

Para o marcador Ab17, nenhum dos 14 alelos descritos para *A. caraya* foi compartilhado pelas duas espécies foram observados. No entanto, é digno de nota que a diferença entre os alelos descritos para *A. caraya* e *A. belzebul* é de apenas uma base. Caso essa variação não ocorresse *A. caraya* apresentaria somente um alelo exclusivo em relação à *A. belzebul*. Em todos os sistemas, exceto Ab04 que apresentou variabilidade similar em termos do número de alelos, foi observado redução no número total de alelos na população de *A. caraya* em relação a *A. belzebul*.

Essa diferença na diversidade de alelos (riqueza alélica) é acentuada pela observação de monomorfismo para os locos Ab09 e Ab10 em *A. caraya*, os quais apresentaram com 16 e 22 alelos, respectivamente, em *A. belzebul*. É possível que o loco Ab12, sem dados populacionais, apresente um maior número de alelos do que o estimado até o momento. Ab12 é o loco mais polimórfico para *A. belzebul* dentre os marcadores testados, o que lança a expectativa de que também apresente muitos alelos em *A. caraya*.

O fenômeno de diminuição do número de alelos parece estar intensamente relacionado com o tipo de marcador analisado, uma vez que em estudos com enzimas eritrocitárias Szapkievich *et al.* (1998) reportaram variabilidade de alelos semelhante para *A. caraya* em relação ao descrito para outras espécies. Segundo este autor, à exceção de *A. palliata*, que apresenta índices de heterozigose baixos, todas as espécies de *Alouatta* apresentam valores de diversidade genética semelhantes ao observado para outros gêneros de primatas Neotropicais como *Aotus* (Schneider, 1988), *Callithrix* (Meireles *et al.*, 1992), *Saimiri* (Silva *et al.*, 1993) e *Chiropotes* (Schneider *et al.*, 1995). Por outro lado, a biologia de *A. caraya* permite argumentar que estes macacos não sofreriam reduções em seus tamanhos populacionais, uma das principais causas da perda de variabilidade genética, devido à alta taxa de fecundidade e à flexibilidade na dieta.

A diminuição do número de alelos observados ocorre provavelmente pela transposição dos marcadores de uma espécie para outra, isso porque os genomas podem ter evoluído de maneira diversa após a separação das espécies. Primmer *et al.* (1996) relatou que marcadores do tipo microssatélite isolados em várias espécies apresentam polimorfismo em grupos filogeneticamente relacionados, porém a riqueza alélica não necessariamente é igual. De fato, o menor número de alelos em *A. caraya* pode estar relacionado à especificidade no desenvolvimento dos marcadores do tipo microssatélite e pode refletir uma subestimativa da variabilidade real da espécie. Essa subestimativa seria um reflexo da metodologia de desenvolvimentos dos marcadores, que são espécie-específicos, selecionando fragmentos polimórficos para indivíduos da espécie estudada e que posteriormente são testados em populações.

No caso da utilização de marcadores heterológos, existe uma tendência de que os marcadores sejam também polimórficos nas populações de outras espécies, sempre dependendo da proximidade filogenética entre elas: quanto mais próximas, maior o compartilhamento da evolução dos genomas e maior a probabilidade de que fragmentos variáveis semelhantes estejam presentes (Primmer *et al.*, 1996). Um fator que influencia na amplificação é a temperatura de pareamento (TA) dos iniciadores: quanto mais baixa a TA, maior a chance de amplificação, porém maior a chance de amplificação inespecífica. As TA para amplificação de três dos marcadores – Ab07, Ab09 e Ab12 – para *A. caraya* foram superiores as descritas para *A. belzebul*, por Gonçalves *et al.* (2004). O fato de a TA ser superior para amplificações em *A.*

caraya (aproximadamente 1,2° C em média), contribui para inferência da especificidade de amplificação dos fragmentos.

Ellsworth & Hoelzer (1998) testaram marcadores do tipo microssatélite desenvolvidos para *A. palliata* em outras espécies do gênero *Alouatta*, como *A. pigra* e *A. seniculus*, e verificaram uma diminuição no número de alelos, a exemplo do observado para *A. caraya* em relação aos marcadores desenvolvidos para *A. belzebul*. Mesmo quando consideram-se marcadores homólogos este fenômeno de diminuição do número de alelos pode ser verificado. Winkler *et al.* (2004) descreveram um menor número de alelos em outras populações de *A. palliata* quando os marcadores desenvolvidos por Ellsworth & Hoelzer (1998) para esta espécie foram utilizados. Fato é que *A. palliata* apresenta diferenças em termos de estruturação populacional, uma vez que foram descritos eventos de intensa redução populacional (*bottleneck*) para esta espécie no último século, como, por exemplo, epidemias de febre amarela na Ilha de Barro Colorado que dizimaram as populações naturais ali existentes, o que pode ter contribuído para maiores diferenças entre as populações analisadas para os mesmos marcadores (Crockett, 1998).

Em análises de populações humanas também há uma série de exemplos de diminuição de alelos na literatura. Por exemplo, Mendes-Júnior (2001) reportou uma baixa variabilidade em populações indígenas da Amazônia brasileira quanto a marcadores do tipo microssatélites desenvolvidos para europeus. Apesar de serem populações isoladas e formadas por migrações recentes (aproximadamente 100.000 anos atrás), a variabilidade encontrada foi menor que o esperado – foram identificados 31 alelos dos 80 já descritos para os seis microssatélites analisados. Esta tendência à diminuição de diversidade é confirmada por achados em outras populações muito diferentes das européias, como asiáticas e outras populações sul-americanas (Zago *et al.*, 1996; da Silva, *et al.*, 1999).

As frequências alélicas observadas na população de *A. caraya* de Porto Primavera encontram-se em desacordo com o esperado pelo teorema de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para todos os locos analisados, exceto Ab17, segundo o teste exato de Guo & Thompson (1992). O desvio ao EHW ocorre devido a causas diversas como fragmentação populacional, migração, seleção e endocruzamento ou até mesmo erros de genotipagem (Yonan *et al.*, 2006; Wigginton *et al.*, 2005; Leal, 2005; Frankhan *et al.*, 2002). Dentre as causas citadas, os erros de genotipagem provavelmente podem ser descartados, uma vez que alta proporção das amostras foi

analisada em duplicata. Essa prática diminui a probabilidade de ocorrência de falsos homozigotos, alelos nulos e erros que ocorrem por excesso de reagentes na PCR.

Uma possível explicação para o desequilíbrio observado no caso da população de *A. caraya* de Porto Primavera está na deficiência de heterozigotos verificada para todos os locos analisados, incluindo o Ab17. Vários autores reportam deficiência de heterozigotos em populações naturais, sendo que esta deficiência pode estar relacionada com processos ecológicos que ocorrem para o gênero *Alouatta* de forma geral, como a organização dos grupos (James *et al.*, 1997; Winkler *et al.*, 2004). Essencialmente, os grupos de *A. caraya* implicam que haja cruzamento de um macho com várias fêmeas. Grupos melhor estabelecidos restringem a entrada de novos indivíduos, tendendo ao cruzamento entre aparentados (endocruzamento), o que é uma das principais causas de desvios no EHW, juntamente com pressões evolutivas diversas. Resultados semelhantes foram encontrados por Bastos *et al.* (com. pessoal), que analisou 14 locos microssatélites para populações de *A. belzebul*. Os autores encontraram desvios no EHW para todas as populações estudadas relacionados à elevada endogamia. Esses resultados apontam para uma inércia filogenética do grupo *Alouatta* ou a intensa ocorrência de endocruzamento associado à poliginia.

Em *Alouatta*, as fêmeas usualmente permanecem em seus grupos natais e ocasionalmente dispersam para o estabelecimento de outros grupos ou inclusão à grupos já existentes, sempre em posições hierárquicas inferiores (Pope, 1992). Dentro deste sistema de estrutura social, espera-se que seja observado um excesso de heterozigotos e grande diferenciação entre os grupos (Pope, 1992; Chesser, 1991). É interessante lançar hipóteses do por quê *A. pigra* (James *et al.*, 1997) e *A. caraya* (presente estudo) desviam destas expectativas, uma vez que estas espécies tem biologia um pouco diferenciada em relação aos hábitos reprodutivos de outras espécies de *Alouatta* como *A. seniculus*, especialmente no sentido das fêmeas migrarem para outros grupos após a maturação sexual. As análises realizadas por James *et al.* (1997) indicam baixa variabilidade genética nas populações de *A. pigra*, quando comparada a outros primatas Neotropicais. Tais resultados foram associados à ocorrência de eventos de redução populacional drásticos e recentes, como furacões e contínua deriva genética. Esses eventos poderiam não afetar diretamente a distribuição de heterozigotos dentro dos grupos estudados, porém levariam indiretamente ao resultado observado pela diminuição na variabilidade genética como um todo, o que dificulta as estimativas de endogamia (Nei, 1978).

O endocruzamento é um desvio relacionado à premissa do teorema do EHW no que tange ao cruzamento ao acaso dentro das populações, sendo caracterizado pelo acasalamento em grupos fechados. No caso de *A. caraya*, não são conhecidos os efeitos do endocruzamento na frequência dos alelos (que podem ser as mesmas ou diferentes entre os grupos). Como o presente estudo não considerou a distribuição dos animais em grupos e sim como uma única população, é provável que esteja ocorrendo o efeito Wahlund. Isto se reflete na distribuição de homozigotos como um acréscimo em sua ocorrência e uma deficiência de heterozigotos. A consequência destes sub-agrupamentos populacionais é a diminuição da heterozigose na população total (Frankham *et al.*, 2002).

Visto que o tamanho populacional total de *A. caraya* é estimado em 100.000 indivíduos (Crockett, 1998), o endocruzamento não parece ser grande problema em curto prazo, exceto para populações isoladas. Nestas o número efetivo é reduzido o que pode torná-las mais suscetíveis aos efeitos deletérios da homozigose de alelos raros (que tem sua chance aumentada no endocruzamento) e da deriva genética (Frankham, 2003). A ocorrência de subestruturação (endogamia) poderá se tornar uma preocupação relevante no futuro no caso da população de Porto Primavera, visto que os animais foram re-introduzidos em áreas próximas e os efeitos sobre a população em termos de variabilidade genética somente serão conhecidos nas gerações futuras.

Outro dado que corrobora a hipótese de endocruzamento é o desequilíbrio de ligação observado em 33% das comparações realizadas entre os seis locos analisados para a população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP). Segundo Frankham *et al.* (2002), o desequilíbrio de ligação ocorre mais frequentemente em populações com pequeno número de indivíduos e populações que sofreram reduções populacionais intensas (*bottlenecks*) – situações essas que levam ao endocruzamento ou são efeito de mistura entre subpopulações diferenciadas.

Os casos descritos acima como situações que induzem ao desequilíbrio de ligação possivelmente não explicam o encontrado para a população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP). As populações desta espécie têm grandes contingentes, sendo que a população de Porto Primavera (SP) apresenta índices normais ou altos de diversidade genética, como a riqueza alélica observada, a proporção de locos polimórficos e a heterozigose observada quando comparada com outras populações de primatas Neotropicais (Ruiz-Garcia, 2005; Bastos *et al.*, comunicação pessoal; Szapkievich *et al.*, 1998; James *et al.*, 1997; Pope, 1992). Além disso, não é possível no momento descartar que o desequilíbrio observado seja decorrente de ligação física

entre os locos, visto que a localização genômica desses marcadores ainda não é completamente conhecida e que uma das premissas deste teste é o EHW na população analisada. Dos locos que apresentaram desequilíbrio, somente um respeita a premissa. Destarte, os resultados acerca do desequilíbrio de ligação não são conclusivos.

O principal índice que reflete o endocruzamento, a estimativa de F_{IS} (coeficiente de endogamia da população), foi de 0,1583 para a população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP). Esse valor é semelhante ao observado para a maioria das populações de *A. belzebul* analisadas até o momento (Bastos *et al.*, comunicação pessoal). Desvios positivos no F_{IS} indicam aumento no número de homozigotos, deficiência no número de heterozigotos, subdivisão da população, casamentos preferenciais ou seleção natural (direcionada, disruptiva ou direcionadora). F_{IS} menor que ou igual a zero é indicativo de exogamia, casamentos ao acaso na população ou seleção natural estabilizadora. Os valores aqui observados são considerados níveis intermediários de endocruzamento, não chegando ao ponto de afetar as populações em termos de baixa na capacidade reprodutiva ou redução no *fitness* adaptativo da espécie. A baixa capacidade reprodutiva devido ao endocruzamento está associada com a diminuição da variabilidade genética, o que não foi observado na população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP), diminuição do tamanho médio dos indivíduos, igualmente não observado, e aumento da presença de alelos deletérios (Frankhan, 2003).

Com relação à diversidade interpopulacional, ocorreu o esperado para a comparação entre duas espécies. A população de *A. caraya* diferiu significativamente de todas as populações de *A. belzebul* testadas, em todas as matrizes de distância analisadas, e os valores de distância genética encontrados são compatíveis com o esperado para populações que divergiram há longo tempo, como o predito na literatura para estas espécies. De acordo com Nascimento *et al.* (2005), a divergência entre as espécies ocorreu há cerca de 5,3 milhões de anos atrás enquanto que Cortés-Ortiz *et al.* (2003) concluíram que o evento ocorreu há cerca de 4,0 milhões de anos atrás. Esta divergência também foi explicitada pela PCA, uma vez que, mesmo havendo compartilhamento de alelos entre as espécies, as amostras de *A. caraya* ficaram situadas em um quadrante distinto das de *A. belzebul* – dado esse que reflete a variabilidade observada considerando que as duas espécies apresentaram constituições genéticas distintas.

© Julio Cesar Bicca-Marques



CONCLUSÃO

VI – CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo de genética de populações realizado em uma população de número amostral elevado para primatas Neotropicais, a partir de uma amostra coletada durante a formação de um lago artificial de uma usina hidrelétrica. Dos dados levantados podemos concluir que:

1. A população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP) apresenta razão sexual de 1,13 fêmeas por macho (poliginia), semelhante ao descrito na literatura para outras populações de *Alouatta*.
2. Tanto os resultados das análises sobre o peso dos indivíduos nas classes etárias, como os de comprimento total dos indivíduos, corroboram o descrito na literatura para o intenso dimorfismo sexual entre machos e fêmeas adultos/subadultos e pequeno ou ausente dimorfismo sexual entre os jovens e os infantes.
3. A classificação etária dos indivíduos de Porto Primavera entre os machos foi bastante clara e entre as fêmeas esta classificação necessita ser melhor avaliada, uma vez que o parâmetro relativo à capacidade reprodutiva mostrou-se não adequado para definição de indivíduos subadultos.
4. A população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP) apresenta diversidade genética semelhante à encontrada em outros primatas Neotropicais;
5. Os desvios no EHW observados ainda não afetam diretamente o *fitness* ou o sucesso reprodutivo da população, uma vez que o peso e o tamanho dos indivíduos observados na análise morfológica são considerados normais para esta espécie;
6. As comparações com populações de uma espécie próxima analisada para os mesmos marcadores, *A. belzebul*, mostraram que a população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP) apresentou índices de variabilidade alélica menores do que os observados para aquela espécie.
7. No caso da população de Porto Primavera (SP), os valores de diversidade genética encontrados reportam a uma relativa estabilidade populacional. No entanto, são necessários maiores estudos para confirmar se os dados de riqueza

de alelos, heterozigose observada, tamanho dos fragmentos observados para esta população podem ser extrapolados para toda a espécie.

Os resultados aqui apresentados, em associação com futuros trabalhos com maiores amostras, número de populações e número de marcadores, podem servir de referência em avaliações quanto ao impacto causado pela translocação de indivíduos em termos de estrutura populacional e variabilidade genética. Complementarmente, podem ainda contribuir para a descrição dos efeitos da inércia filogenética no gênero *Alouatta* e para um melhor entendimento do efeito da poliginia sobre a distribuição dos caracteres hereditários.

© www.howlerprimates.com



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armada, JLA; Barroso, CML; Lima, MMC; Muniz, JAPC; Seuánez, HN. (1987) Chromosome studies in *Alouatta belzebul*. *American Journal of Primatology*, **13**: 283 – 296.
- Ascunce, MS; Cortés-Ortiz, L; Mudry, MD. (2003) The mitochondrial control region of the black howler monkey, *Alouatta caraya* (Primates, Platyrrhini), and the development of new primers. *Molecular Ecology Notes*, **3**: 372 – 375.
- Barroso, CML; Sampaio, MIC; Schneider, MPC; Hamel, AR; Salzano, FM; Seuánez, H. (1988) Adenosine deaminase isozyme variation in *Alouatta belzebul* with review of data from other primates. *Revista Brasileira de Genética*, **11**: 643 – 652.
- Bonvicino, CR; Lemos, B; Seuánez, HN. (2001) Molecular phylogenetics of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): A comparison with karyotypic data. *Chromosoma*, **110**: 241 – 246.
- Bonvicino, CR; Fernandes, MEB; Seuánez, HN. (1995) Morphological analysis of *Alouatta seniculus* species group (Primates, Cebidae). A comparison with biochemical and karyological data. *Human Evolution*, **10**: 169 – 176.
- Bravo, SP & Sallenave, A. (2003) Foraging behavior and activity patterns of *Alouatta caraya* in the northeastern Argentinean flooded forest. *International Journal of Primatology*, **24(4)**: 825 – 846.
- Calegari-Marques, C. (1992) Comportamento social de um grupo de *Alouatta caraya* (Primates, Cebidae) em Alegrete, RS, Brasil. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. 184 p.
- Canavez, FC; Moreira, MAM; Ladasky, JJ; Pissinatti, A; Parham, P; Seuánez, HN. (1999) Molecular phylogeny of New World Primates (Platyrrhini) based on β_2 -microglobulin DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **12(1)**: 74 – 82.
- Chapman, CA & Balcomb, SR. (1998) Population characteristics of howlers: ecological conditions or group history. *International Journal of Primatology*, **19(3)**: 385 – 403.
- Chaves, R; Sampaio, I; Schneider, MPC; Schneider, H; Page, SL; Goodman, M. (1999) The place of *Callimico goeldii* in the Callitrichine phylogeny tree: Evidences from

- von Willebrand factor gene intron II sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(2): 392 – 404.
- Chesser, RK. (1991) Influence of gene flow and breeding tactics on gene diversity within populations. *Genetics*, 129: 573 – 583.
- Cockerham, CC. (1973) Analyses of gene frequencies. *Genetics*, 74: 679 – 700.
- Cockerham, CC. (1969) Variance of gene frequencies. *Evolution*, 23: 72 – 84.
- Cortés-Ortiz, L; Bermingham, E; Rico, C; Rodríguez-Luna, R; Sampaio, I; Ruiz-García, M. (2003) Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 64 – 81.
- Crockett, CM. (1998) Conservation Biology of genus *Alouatta*. *International Journal of Primatology*, 19(3): 549 – 578.
- Crockett, CM & Eisenberg, JF. (1987) Howlers: variations on group size and demography. In: Smuts, BB; Cheney, DL; Seyfarth, RM; Wrangham, RW; Struhsaker, TT. (editores) *Primates societies*. University of Chicago Press, Chicago.
- da Silva, WA; Bortolini, MC; Meyer, D; Salzano, FM; Elion, J; Krishnamoorthy, R; Schneider, MP; de Guerra, DC; Layrissa, Z; Castellano, HM; Weimer, TD; Zago, MA. (1999) Genetic diversity of two African and sixteen South American populations determined on the basis of six hypervariable *loci*. *American Journal of Physical Anthropology*, 109(4): 425 – 437.
- Ellsworth, JA & Hoelzer, GA. (1998) Characterization of microsatellite *loci* in a New World Primate, the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*). *Molecular Ecology*, 7: 657 – 658.
- Emmons, LH & Feer, F. (1997) *Neotropical Rain Forest Mammals – A Field Guide*. University of Chicago Press, Chicago.
- Excoffier, L; Laval, G; Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47 – 50.
- Ford, SM. (1994) Evolution of sexual dimorphism in body weight in Platyrrhines. *American Journal of Primatology*, 34 (2): 221–244.
- Frankhan, R. (2003) Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies*, 326: S22 – S29.

- Frankham, R; Ballou, JD; Briscoe, DA. (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Froelich, JW & Thorington Jr, RW. (1982) The genetic structure and socio-ecology of howler monkeys (*Alouatta palliata*) on Barro Colorado Island. In: *The Ecology of a Neotropical Forest*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Gonçalves, EC; Silva, A; Barbosa, MSR, Schneider, PC. (2004) Isolation and characterization of microsatellite *loci* in Amazonian red-handed howlers *Alouatta belzebul* (Primates, Platyrrhini). *Molecular Ecology Notes*, **4**: 406 – 408.
- Gordon, A. (2006) Scaling of size and dimorphism in Primates I: Microevolution. *International Journal of Primatology*, **27**(1): 27 – 61.
- Gregorin, R. (2006) Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. *Revista brasileira de Zoologia*, **23**(1): 64 – 144.
- Groves, CP. (2001) *Primate taxonomy*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, USA.
- Guo, SW & Thompson, EA. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48**: 361 – 372.
- Harada, ML; Schneider, H; Schneider, MPC; Sampaio, I; Czelusniak, J; Goodman, M. (1995) DNA evidence on the phylogenetic systematics of New World monkeys: support for the sister-group of *Cebus* and *Saimiri* from two unlinked nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **4**(3): 331 – 349.
- Hedrick, PW. (2001) Conservation genetics: where are we now? *TRENDS in Ecology & Evolution*, **16**: 629 – 636.
- Hill, WCO. (1962) *Primates: Comparative anatomy and taxonomy*. Volume 5. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Horwich, RH. (1998) Effective solutions for howler conservation. *International Journal of Primatology*, **19**(3): 579 – 598.
- Hugot, J-P. (1998) Phylogeny of Neotropical monkeys: the interplay of morphological, molecular and parasitological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9**(3): 408 – 413.

- Iwanaga, S & Ferrari, SF. (2002) Geographic distribution of red howlers (*Alouatta seniculus*) in Southwestern Brazilian Amazonia, with notes on *Alouatta caraya*. *International Journal of Primatology*, 23(6): 1.245 – 1.256.
- James, RA; Leberg, PL; Quattro, JM; Vrijenhoek, RC. (1997) Genetic diversity in black howler monkeys (*Alouatta pigra*) from Belize. *American Journal of Physical Anthropology*, 102: 329 – 336.
- Jerusalinsky, L. (2001) Diversidade em seqüências mitocondriais do bugio-ruivo (*Alouatta guariba*): implicações para a história evolutiva e a conservação da espécie. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Kowalewski, M & Zunino, GE. (2004) Birth seasonality in *Alouatta caraya* in Northern Argentina. *International Journal of Primatology*, 25(2): 383 – 400.
- Labruna, MB; de Paula, CD; Lima, TF; Sana, DA. (2002) Ticks (Acari: Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera Hydroelectric Power Station area, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(8): 1.133 – 1.136.
- Leal, SM. (2005) Detection of genotyping errors and pseudo-SNPs via deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. *Genetic Epidemiology*, 29(3): 204 – 214.
- Lewis, PO & Zaykin, D. (2001) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.
- Lima, MMC & Seuánez, HN. (1991) Chromosome studies in the red howler monkey, *Alouatta seniculus stramineus* (Platyrrhini, Primates): description of an X₁X₂Y₁Y₂/X₁X₁X₂X₂ sex chromosome system and karyological comparisons with other subspecies. *Cytogenetics Cell Genetics*, 57: 151 – 156.
- Lima, MMC; Sampaio, MIC; Schneider, MPC; Scheffrahn, W; Schneider, H; Salzano, FM. (1990) Chromosome and protein variation in red howler monkeys. *Revista Brasileira de Genética*, 13: 789 – 802.
- Meireles, CM; Czelusniack, J; Schneider, MPC; Muniz, JAPC; Brigido, MC; Ferreira, HS; Goodman, J. (1999^a) Molecular phylogeny of Ateline New World monkeys (Platyrrhini, Atelinae) based on γ -globin gene sequence: evidences that *Brachyteles* is the sister group of *Lagothrix*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12(1): 10 – 30.

- Meireles, CM; Czelusniack, J; Ferrari, SF; Schneider, MPC; Goodman, M. (1999^b) Phylogenetic relationships among Brazilian howler monkeys, genus *Alouatta* (Platyrrhini, Atelidae), based on γ -globin pseudogene sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 22(3): 337 – 344.
- Meireles, CM; Sampaio, MIC, Schneider, H, Schneider, MPC. (1992) Protein variation, taxonomy and differentiation in five species of Marmosets (Genus *Callithrix* EXRLEBEN, 1977). *Primates*, 33(2): 227 – 238.
- Mendes-Júnior, C. (2001) Freqüências alélicas de polimorfismos de DNA do tipo STR em indígenas da Amazônia brasileira. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- Milton, K. (1998) Physiological ecology of howlers (*Alouatta*): energetic and digestive considerations and comparison with the Colobinae. *International Journal of Primatology*, 19(3): 513 – 548.
- Milton, K. (1980) *The foraging strategy of howler monkeys*. Columbia University Press, Nova Iorque.
- Motulsky, HJ. (2003) *Prism 4 statistical analyses for laboratory and clinical researches*. GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA. www.graphpad.com
- Mudry, MD; Rahn, M; Gorostiaga, M; Hick, A; Merani, MS; Solari, AJ. (1998) Revised karyotype of *Alouatta caraya* (Primates, Platyrrhini) based on synaptonemal complex and banding analyses. *Hereditas*, 128: 9 – 16.
- Nascimento, FF; Bonvicino, CR; da Silva, FCD; Schneider, MPC; Seuánez, HN. (2005) Cytochrome *b* polymorphisms and population structure of two species of *Alouatta* (Primates). *Cytogenetic and Genome Research*, 108: 106 – 111.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583 – 590.
- Neville, MK; Glander, KE; Braza, F; Rylands, AB. (1988) The howling monkeys, genus *Alouatta*. In: Mittermeier, RA; Rylands, AB; Coimbra-Filho, AF; da Fonseca, GAB (editores) *Ecology and behavior of Neotropical primates*, Volume 2. World Wild Fund, Washington, DC – EUA.
- Nowak, RM. (1999) *Walker's Mammals of the World*. 6^a Edição, 2 Volumes. Baltimore: Johns Hopkins University Press.

- Pannel, JR & Charlesworth, B. (2000) Effects of metapopulation process on measures of genetic diversity. *The Royal Society*, **355**: 1.851 – 1.864.
- Peakall, R & Smouse, PE. (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 288 – 295.
- Pope, TR. (1996) Influence of social dynamics on mtDNA diversity in red howler monkey populations. *American Journal of Physical Anthropology*, **22(Suppl.)**: 188.
- Pope, TR. (1992) The influence of dispersal patterns and mating system on genetic differentiation within and between populations of the red howler monkeys (*Alouatta seniculus*). *Evolution*, **46**: 1.112 – 1.128.
- Porter, CA; Czelusniak, J; Schneider, H; Schneider, MPC; Sampaio, I; Goodman, M. (1999) Sequences from the 5' flanking region of the epsilon-globin gene support the relationship of *Callicebus* with the Pitheciins. *American Journal of Primatology*, **48**: 69 – 75.
- Porter, CA; Czelusniak, J; Schneider, H; Schneider, MPC; Sampaio, I; Goodman, M. (1997) Sequences of the primate epsilon-globin gene: implications for systematics of the marmosets and other New World primates. *Gene*, **205**: 59 – 71.
- Primmer, CR; Moller, AP; Ellegren, HA. (1996) A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, **5**: 365 – 378.
- Ricklefs, RE. (1996) *A economia da natureza*, 3 ed. Editora Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro, RJ.
- Ruiz-Garcia, M. (2005) The use of several microsatellite *loci* applied to 13 Neotropical primates revealed a strong recent bottleneck event in the woolly monkey (*Lagothrix Lagotricha*) in Colombia. *Primate Report*, **71**: 27 – 55.
- Rumiz, DI. (1990) *Alouatta caraya*: Population density and demography in Northern Argentina. *American Journal of Primatology*, **21**: 279 – 294.
- Rylands, AB; Schneider, H; Langguth, A; Mittermeier, RA; Groves, CP; Rodríguez-Luna, E. (2000) An assessment of the diversity of New World primates. *Neotropical Primates*, **8(2)**: 61 – 93.
- Rylands, AB & Brandon-Jones, D. (1998) Scientific nomenclature of the red howlers from the northeastern Amazon in Brazil, Venezuela and the Guianas. *International Journal of Primatology*, **19(5)**: 879 – 904.

- Rylands, AB; Mittermeier, RA; Rodriguez-Luna, E. (1995) A species list for the new world primates (Platyrrhini): Distribution by country, endemism, and conservation status according to the Mace-Land System. *Neotropical Primates*, 3(Suppl.): 113 – 160.
- Salim, DC; Saraiva, P; Klautau-Guimarães N. (2001) Variabilidade enzimática em *Alouatta caraya* (Primates, Cebidae) In: 47º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, São Paulo, cd rom.
- Sampaio, I; Schneider, MPC; Schneider, H. (1996) Taxonomy of the *Alouatta seniculus* group: biochemical and chromosome data. *Primates*, 37(1): 65 – 73.
- Schneider, H. (2000) The current status of the New World Monkey Phylogeny. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 72(2): 165 – 172.
- Schneider, H; Sampaio, MIC; Barroso, CML; da Silva, BTF; Warzbort, R; Matayoshi, T; Howlin, E; Nasazzi, N; Nagle, C; Seuánez, H. (1988) Genetic variability in a natural population of *Cebus apella paraguayanus* (Cebidae, Primates). *Revista Brasileira de Genética*, 11(1): 89 – 96.
- Schneider, H; Sampaio, MIC; Schneider, MPC; Ayres, JM; Barroso, CML; Hamel, A; Silva, BTF; Salzano, FM. (1991) Coat color and biochemical variation in Amazonian wild population of *Alouatta belzebul*. *American Journal of Physical Anthropology*, 85: 85 – 93.
- Schneider, MPC. (1988) Variação protéica em primatas da Amazônia e seu significado evolutivo. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Schneider, MPC; Schneider, H; Sampaio, MIC; Carvalho-Filho, NM; Encarnación, F; Montoya; Salzano, FM. (1995) Biochemical diversity and genetic distance in the Pitheciine subfamily (Primates, Platyrrhini). *Primates*, 36: 129 – 134.
- Silva, BTF; Sampaio, MIC; Schneider, H; Schneider, MPC; Montoya, E; Encarnación, F, Callegari-Jacques, SM; Salzano, FM. (1993) Protein eletrophoretic variability in *Saimiri* and the question of its species status. *American Journal of Primatology*, 29: 183 – 193.
- Slatkin M & Excoffier L. (1996) Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity*, 76: 377 – 383.

- Slatkin, M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139(4): 457 – 462.
- Smith, RJ & Cheverud, JM. (2002) Scaling of sexual dimorphism in body mass: A phylogenetic analysis of Rensch's rule in Primates. *International Journal of Primatology*, 23(5): 1.095 – 1.135.
- Smith, RJ & Jungers, WL. (1997) Body mass in comparative primatology. *Journal of Human Evolution*, 32: 523 – 559.
- Szapkievich, VB; Comas, CI; Zunino, GE; Mudry, MD. (1998) Análisis de variabilidad proteica en *Alouatta caraya* y *Cebus apella* (Primates: Platyrrhini). *Mastozoología Neotropical*, 5(1): 53 – 59.
- Treves, A. (2001) Reproductive consequences of variation in the composition of howler monkey (*Alouatta* spp.) groups. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, DOI 10.1007/s002650100329
- Villalobos, F; Valério, AA; Retana, AP. (2004) A phylogeny of howler monkeys (Cebidae: *Alouatta*) based on mitochondrial, chromosomal and morphological data. *Revista de Biología Tropical*, 52(3): 665 – 677.
- von Dorman, M & Ruvolo, M. (1999) Phylogenetic relationships of the New World monkeys (Primates, Platyrrhini) based on nuclear G6PD DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(3): 459 – 476.
- Weir, BS. (1996) *Genetic Data Analysis II: methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, Inc. pp.177
- Wigginton, JE; Cutler, DJ; Abecasis, GR. (2005) A note on exact tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. *American Journal of Human Genetics*, 76: 887 – 893.
- Weckerly, FW. (1998) Sexual-size dimorphism: influence of mass and mating systems in most dimorphic mammals. *Journal of Mammalogy*, 79(1): 33 – 52.
- Winkler, LA; Zhang, X; Ferrell, R; Wagner, R; Dahl, J; Peter, G; Sohn, R. (2004) Geographic microsatellite variability in Central American howling monkeys. *International Journal of Primatology*, 25(1): 197 – 210.
- Wright, S. (1978) *Evolution and genetics of populations*. Vol. 4. Variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press.

- Yeh, FC & Boyle, TBJ. (1997) POPGENE Microsoft Windows – based software for Population genetic analysis. www.ualberta.ca/~fyeh/
- Yonan, AL; Palmer, AA; Gillian, TC. (2006) Hardy-Weinberg disequilibrium identified genotyping error of serotonin transporter (SLC6A4) promoter polymorphism. *Psychiatric Genetics*, 16(1): 31 – 34.
- Zago, MA; Silva Junior, WA; Tavella, MH; Santos, SE; Guerreiro, JF; Figueiredo, MS. (1996) Interpopulational and intrapopulational genetic diversity of Amerindians as revealed by six variable number of tandem repeats. *Human Heredity*, 46(5): 274 – 289.
- Zunino, GE; González, V; Kowalewski, MM; Bravo, SP. (2001). *Alouatta caraya* relations among habitat, density and social organization. *Primate Report*, 61: 37 – 46.

Sítios na Internet

- http://www.honolulu zoo.org/howler_monkey.htm acesso em 28 de junho de 2005
- <http://www.mapas.ibge.gov.br/> acesso em 30 de julho de 2006
- <http://www.profauna.com.br>, profauna@profauna.com.br

© Honolulu Zoo



ANEXO

VIII – Anexo

VIII.1. Isolamento de DNA nuclear

O DNA foi extraído utilizando o protocolo a seguir, gentilmente cedido por Silvanira Barbosa responsável técnica do LPDNA – UFPA.

PROTOCOLO DAS SOLUÇÕES PARA ISOLAMENTO DE DNA

Tampão de homogeneização –100mL

1mL de Tris 1M pH 8.0

6mL de NaCl 1M

2mL EDTA 0,5M pH 8.0

5g de sacarose

1. Agitar bastante em 80mL de água mili-Q até a sacarose dissolver.
2. Ajustar o volume para 100mL.
3. Autoclavar por 20 minutos.

Tampão de Lise – 500mL

150mL de Tris 1M pH 9.0

10mL de EDTA 0,5M – pode ser o pH 8.0

125mL de Sucrose 20%

62,5mL de SDS 10% pH 7.2

1. Agitar os três primeiros reagentes com de água mili-Q até um volume de 437,5mL.
2. Autoclavar por 20 minutos.
3. Preparar a solução de SDS a partir do pó.
4. Depois de frio, acrescentar o SDS.

TE

1mL de Tris 1M pH 8.0

1mL de EDTA 0,1M pH 8.0

1. Ajustar o volume para 100mL com água mili-Q
2. Autoclavar por 20 minutos.

STE

100mL de NaCl 1M

10mL de Tris 1M pH 8.0

10mL de EDTA 10mM

1. Ajustar volume para 1L de água mili-Q.
2. Autoclavar por 20 minutos.

Tamponamento de Fenol

1. Colocar o fenol (1L) para aquecer a 68 graus em banho-maria na própria garrafa até ficar totalmente líquido.
2. Transferir para um erlenmeyer grande com capacidade para 2L e adicionar igual volume de Tris 1M pH8.0 (1L) e 1g/L de 8-hidroxyquinolina.
3. Deixar agitando em agitador magnético por aproximadamente 12 horas para que fique homogêneo.
4. No outro dia tirar da agitação e deixar em repouso até as duas fases se separarem.
5. Aspirar com pipeta a fase superior e desprezar.
6. Adicionar novamente mais 1 L de Tris e fazer o mesmo procedimento acima por mais duas vezes.
7. Na segunda vez, adicionar 1/10 de Tris 0,1M pH8.0 e 0,2% de beta-mercaptoetanol.
8. Guardar em geladeira em garrafa escura.

Isolamento de DNA nuclear através do protocolo rápido em *epENDORF* de 1,5mL

Material necessário:

1. Amostra:

sangue total, camada de leucócitos ou tecido

2. Reagentes:

1. Tampão de homogeneização
2. Tampão de lise, RNase 10mg/mL
3. Proteinase K 10mg/mL
4. Fenol – Clorofórmio – Álcool Isoamil na proporção de 25:24:1 (volume)
5. Clorofórmio – Álcool isoamil na proporção 24:1 (volume)
6. Acetato de sódio 3M pH 4,8
7. Álcool isopropílico
8. Etanol 70%
9. Tampão TE.

1. Distribuir em eppendorf de 1,5mL 300µL de sangue total ou 100µL de amostras de leucócitos ou um pequeno pedaço de tecido
2. Adicionar 300µL de tampão de homogeneização e igual quantidade de tampão de lise.
3. Acrescentar 15µL de Proteinase K (10mg/mL) para sangue ou 30µl para tecido
4. Adicionar 15µl de RNase (10mg/mL) na mesma proporção
5. Agitar gentilmente por 10 minutos e submetido a incubação de 56°C por no mínimo 30 minutos ou deixar de um dia para o outro.
6. Retirar as amostras do bloco e deixar esfriar a temperatura ambiente.

A partir desta etapa a extração segue-se na capela.

7. Adicionar 600µl de Fenol clorofórmio álcool isoamil.
8. Agitar manualmente por 10 minutos, de modo que o material fique homogêneo
9. Centrifugar por de 10 minutos a 13.000 RPM.
10. Transferir o sobrenadante, cuidadosamente, para um tubo limpo, de modo que a camada de proteína não seja removida.

11. Repetir a extração com um volume de Clorofórmio álcool isoamil, agitar manualmente por 10 minutos.
12. Centrifugar por de 10 minutos a 13.000 RPM.
13. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo.
14. Adicionar 100µL de acetato de sódio 3M pH 4.8 e 500 µL de álcool isopropílico.
15. Agitar gentilmente até a visualização do DNA.
16. Centrifugar por de 2 minutos a 13.000 RPM.
17. Descartar o sobrenadante cuidadosamente para não perder o pellet
18. Adicionar 500 µl de etanol a 70% e centrifugar por de 5 minutos a 13.000 RPM.
19. Descartar o sobrenadante e secar o pellet em estufa a 37^oC por 15 minutos
20. Diluir o pellet em 100 a 300µl de TE

Em alguns casos não ocorre a visualização do DNA. Nesses casos, deve-se levar as amostras ao freezer -70^oC por aproximadamente 15 minutos e posteriormente centrifugar por 10 minutos a 13.000 RPM e seguir o protocolo normal a partir do passo 17. A estas amostras adicionar 50 µl de TE.

Tabela VIII.1. Marcadores genéticos (moleculares e protéicos) descritos para alguns primatas neotropicais. N = tamanho amostral.

Gênero	Espécies	N		Tipo	Nome do marcador	Descrito por
<i>Alouatta</i>	<i>Alouatta caraya</i>	100	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	Ab04, Ab 06, Ab07, Ab09, Ab10, Ab12 e Ab17	Presente trabalho
		10	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	Ap68 e Ap74	Inglez <i>et al.</i> (não publicados)
		1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	γ – globina	Meireles <i>et al.</i> , 1999 ^a
		6	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Bonvicino <i>et al.</i> , 2001
		28	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Nascimento <i>et al.</i> , 2005
		3	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		3	mtDNA	seqüência	ATP <i>sintase</i> 6 e 8	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		3	DNA nuclear	seqüência	Calmodulina	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		3	DNA nuclear	seqüência	Recombination activating gene 1 RAG – 1	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		16	proteína	polimorfismo	Lactato desidrogenase (LDH)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998
		16	proteína	polimorfismo	Esterase α e β	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998
		16	proteína	polimorfismo	Malato desidrogenase (MDH)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998
		16	proteína	polimorfismo	Isocitrato desidrogenase (IDH)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998
		16	proteína	polimorfismo	Superóxido dismutase (SOD)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998
		16	proteína	polimorfismo	Fosfogluconase desidrogenase (PGD)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998
		16	proteína	polimorfismo	Esterase D	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998
		16	proteína	polimorfismo	Leucil amino peptidase (AMP)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998
		16	proteína	polimorfismo	Albumina (ALB)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998
		16	proteína	polimorfismo	Transferrina (TF)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998
		100	proteína	polimorfismo	Fosfogluconase desidrogenase (PGD)	Salim <i>et al.</i> , 2001
		100	proteína	polimorfismo	Esterase D	Salim <i>et al.</i> , 2001
		1	mtDNA	seqüência	CCR – Região de Controle do mtDNA	Ascunce <i>et al.</i> , 2003
<i>Alouatta</i>	<i>Alouatta seniculus</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	γ – globina	Meireles <i>et al.</i> , 1999 ^a
		1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		2	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Bonvicino <i>et al.</i> , 2001

Gênero	Espécies	N		Tipo	Nome do marcador	Descrito por	
<i>Alouatta</i>	<i>Alouatta seniculus</i>	3	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	Ap6, Ap20, Ap40, Ap68 e Ap74	Ellsworth & Hoelzer, 1998	
		2	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	D5S111, D5S117, D6S260, D8S165, D14S151, D17S804	Ellsworth & Hoelzer, 1998	
		5	mtDNA	Seqüência	Citocromo <i>b</i>	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003	
		5	mtDNA	Seqüência	ATP <i>sintase</i> 6 e 8	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003	
		5	DNA nuclear	Seqüência	Calmodulina	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003	
	5	DNA nuclear	seqüência	Recombination activating gene 1 RAG – 1	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003		
	<i>Alouatta belzebul</i>	1	DNA nuclear	Seqüência	γ – globina	Meireles <i>et al.</i> , 1999 ^a	
		1	DNA nuclear	Seqüência	ϵ – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995	
		1	DNA nuclear	Seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995	
		7	mtDNA	Seqüência	Citocromo <i>b</i>	Bonvicino <i>et al.</i> , 2001	
		23	mtDNA	Seqüência	Citocromo <i>b</i>	Nascimento <i>et al.</i> , 2005	
		91	DNA nuclear	microsatélite	Ab04, Ab 06, Ab07, Ab09, Ab10, Ab12 e Ab17	Gonçalves <i>et al.</i> , 2004	
		9	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003	
		9	mtDNA	seqüência	ATP <i>sintase</i> 6 e 8	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003	
		9	DNA nuclear	seqüência	Calmodulina	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003	
		9	DNA nuclear	seqüência	Recombination activating gene 1 RAG – 1	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003	
		2	mtDNA	seqüência	CCR – Região de Controle do mtDNA (heterólogo)	Ascunce <i>et al.</i> , 2003	
		<i>Alouatta stramineus</i>	1	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Bonvicino <i>et al.</i> , 2001
		<i>Alouatta macconnelli</i>	2	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Bonvicino <i>et al.</i> , 2001
	3		mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003	
	3		mtDNA	seqüência	ATP <i>sintase</i> 6 e 8	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003	
	3		DNA nuclear	seqüência	Calmodulina	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003	
	3		DNA nuclear	seqüência	Recombination activating gene 1 RAG – 1	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003	
<i>Alouatta coibensis</i>	4	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003		
	4	mtDNA	seqüência	ATP <i>sintase</i> 6 e 8	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003		
	4	DNA nuclear	seqüência	Calmodulina	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003		
	4	DNA nuclear	seqüência	Recombination activating gene 1 RAG – 1	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003		

Gênero	Espécies	N		Tipo	Nome do marcador	Descrito por
<i>Alouatta</i>	<i>Alouatta fusca</i>	1	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Bonvicino <i>et al.</i> , 2001
	<i>Alouatta pigra</i>	20	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	Ap6, Ap20, Ap40, Ap68 e Ap74	Ellsworth & Hoelzer, 1998
		2	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	D5S111, D5S117, D6S260, D8S165, D14S151, D17S804	Ellsworth & Hoelzer, 1998
		7	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		7	mtDNA	seqüência	ATP <i>sintase</i> 6 e 8	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		7	DNA nuclear	seqüência	Calmodulina	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		7	DNA nuclear	seqüência	Recombination activating gene 1 RAG – 1	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		10	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	D5S111, D5S117, D6S260, D8S165, D14S151, D17S804, D16S403, D7S646, D16S403, D7S646	Winkler, <i>et al.</i> , 2004
	<i>Alouatta fusca clamitans</i>	2	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Bonvicino <i>et al.</i> , 2001
	<i>Alouatta nigerrima</i>	1	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Bonvicino <i>et al.</i> , 2001
	<i>Alouatta palliata</i>	40	DNA nuclear	microsatélite	Ap6, Ap20, Ap40, Ap68 e Ap74	Ellsworth & Hoelzer, 1998
		10	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	D5S111, D5S117, D6S260, D8S165, D14S151, D17S804	Ellsworth & Hoelzer, 1998
		15	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		15	mtDNA	seqüência	ATP <i>sintase</i> 6 e 8	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		15	DNA nuclear	seqüência	Calmodulina	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		15	DNA nuclear	seqüência	Recombination activating gene 1 RAG – 1	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		29	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	D5S111, D5S117, D6S260, D8S165, D14S151, D17S804, D16S403, D7S646, D16S403, D7S646	Winkler, <i>et al.</i> , 2004

Gênero	Espécies	N		Tipo	Nome do marcador	Descrito por
		29	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	Ap20, Ap40, Ap68 e Ap74	Winkler, <i>et al.</i> , 2004
		3	mtDNA	seqüência	CCR – Região de Controle do mtDNA (heterólogo)	Ascunce <i>et al.</i> , 2003
<i>Alouatta</i>	<i>Alouatta sara</i>	3	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
		3	mtDNA	seqüência	ATP <i>sintase</i> 6 e 8	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
		3	DNA nuclear	seqüência	Calmodulina	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
		3	DNA nuclear	seqüência	Recombination activating gene 1 RAG – 1	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
<i>Aotus</i>	<i>Aotus trivirgatus</i>	2	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
	<i>Aotus azarae</i>	1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		1	DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995
	<i>Aotus nancymai</i>	1	DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995
<i>Ateles</i>	<i>Ateles fusciceps</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		2	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
		2	mtDNA	seqüência	ATP <i>sintase</i> 6 e 8	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
		2	DNA nuclear	seqüência	Calmodulina	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
		2	DNA nuclear	seqüência	Recombination activating gene 1 RAG – 1	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
	<i>Ateles geoffroyi</i>	1	DNA nuclear	seqüência	γ – globina	Meireles <i>et al.</i> , 1999 ^a
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		3	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	Ap6, Ap20, Ap40, Ap68 e Ap74	Ellsworth & Hoelzer, 1998
		2	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	D5S111, D5S117, D6S260, D8S165, D14S151, D17S804	Ellsworth & Hoelzer, 1998
		8	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
		8	mtDNA	seqüência	ATP <i>sintase</i> 6 e 8	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
		8	DNA nuclear	seqüência	Calmodulina	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
		8	DNA nuclear	seqüência	Recombination activating gene 1 RAG – 1	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003

Gênero	Espécies	N		Tipo	Nome do marcador	Descrito por
	<i>Ateles paniscus</i>	1	DNA nuclear	seqüência	γ – globina	Meireles <i>et al.</i> , 1999 ^a
		1	mtDNA	seqüência	CCR – Região de Controle do mtDNA (heterólogo)	Ascunce <i>et al.</i> , 2003
<i>Ateles</i>	<i>Ateles chamek</i>	1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
	<i>Ateles belzebuth</i>	1	DNA nuclear	seqüência	ε – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		1	DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995
<i>Brachyteles</i>	<i>Brachyteles arachnoides</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	γ – globina	Meireles <i>et al.</i> , 1999 ^a
		1	DNA nuclear	seqüência	ε – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		1	DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995
		1	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Bonvicino <i>et al.</i> , 2001
		3	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		3	mtDNA	seqüência	ATP <i>sintase</i> 6 e 8	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		3	DNA nuclear	seqüência	Calmodulina	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
		3	DNA nuclear	seqüência	Recombination activating gene 1 RAG – 1	Cortés-Ortis <i>et al.</i> , 2003
<i>Cacajao</i>	<i>Cacajao rubicundus</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
	<i>Cacajao calvus</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ε – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		7	Proteína sangüínea	polimorfismo	ADA – Adenosina deaminase	Schneider <i>et al.</i> , 1995
		7	Proteína sangüínea	polimorfismo	ADA – Adenosina deaminase	Schneider <i>et al.</i> , 1995
<i>Callicebus</i>	<i>Callicebus moloch</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ε – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		1	DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995

Gênero	Espécies	N		Tipo	Nome do marcador	Descrito por
	<i>Callicebus personatus</i>	1	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Bonvicino <i>et al.</i> , 2001
	<i>Callicebus torquatus</i>	1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		1	DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995
<i>Callimico</i>	<i>Callimico goeldii</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		3	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	Ap6, Ap20, Ap40, Ap68 e Ap74	Ellsworth & Hoelzer, 1998
		2	DNA nuclear	microsatélite heterólogo	D5S111, D5S117, D6S260, D8S165, D14S151, D17S804	Ellsworth & Hoelzer, 1998
<i>Callithrix</i>	<i>Callithrix jacchus</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Porter <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		1	DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995
	<i>Callithrix geoffroyi</i>	1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Porter <i>et al.</i> , 1999
	<i>Callithrix mauesi</i>	1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
	<i>Callithrix argentata</i>	1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Porter <i>et al.</i> , 1999
	<i>Callithrix humeralifer</i>	1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
<i>Cebus</i>	<i>Cebus albifrons</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
	<i>Cebus kaapori</i>	1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		1	DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995

Gênero	Espécies	N		Tipo	Nome do marcador	Descrito por
	<i>Cebus olivaceus</i>	1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
	<i>Cebus paella</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
<i>Cebus</i>	<i>Cebus capucinus</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	mtDNA	seqüência	Citocromo <i>b</i>	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
		1	mtDNA	seqüência	ATP <i>sintase</i> 6 e 8	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
		1	DNA nuclear	seqüência	Calmodulina	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
<i>Cebus</i>	<i>Cebus capucinus</i>	1	DNA nuclear	seqüência	Recombination activating gene 1 RAG – 1	Cortés-Ortiz <i>et al.</i> , 2003
	<i>Cebus apella</i>	12	proteína	polimorfismo	Lactato desidrogenase (LDH)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998
12		proteína	polimorfismo	Esterase α e β	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998	
12		proteína	polimorfismo	Malato desidrogenase (MDH)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998	
12		proteína	polimorfismo	Superóxido dismutase (SOD)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998	
12		proteína	polimorfismo	Fosfoglutonato desidrogenase (PGD)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998	
12		proteína	polimorfismo	Esterase D	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998	
12		proteína	polimorfismo	Leucil Amino peptidase (AMP)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998	
12		proteína	polimorfismo	Albumina (ALB)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998	
12		proteína	polimorfismo	Transferrina (TF)	Szapkievich <i>et al.</i> , 1998	
3		DNA nuclear	microsatélite heterólogo	Ap6, Ap20, Ap40, Ap68 e Ap74	Ellsworth & Hoelzer, 1998	
2		DNA nuclear	microsatélite heterólogo	D5S111, D5S117, D6S260, D8S165, D14S151, D17S804	Ellsworth & Hoelzer, 1998	
		<i>Cebus nigrivittatus</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E
1	DNA nuclear		seqüência	ϵ – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995	
1	DNA nuclear		seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995	
<i>Cebuella</i>	<i>Cebuella pygmaea</i>	2	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Porter <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
<i>Chiropotes</i>	<i>Chiropotes satanas</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ϵ – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		1	DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995

Gênero	Espécies	N		Tipo	Nome do marcador	Descrito por
		12	Proteína sangüínea	polimorfismo	ACPI – Fosfatase ácida	Schneider <i>et al.</i> , 1995
		12	Proteína sangüínea	polimorfismo	CAI – Anidrase carbônica	Schneider <i>et al.</i> , 1995
<i>Lagothrix</i>	<i>Lagothrix lagothricha</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	γ – globina	Meireles <i>et al.</i> , 1999 ^a
		1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ε – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
<i>Lagothrix</i>	<i>Lagothrix lagothricha</i>	1	DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995
<i>Leontopithecus</i>	<i>Leontopithecus rosalia</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ε – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
<i>Pithecia</i>	<i>Pithecia pithecia</i>	2	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
	<i>Pithecia irrorata</i>	1	DNA nuclear	seqüência	ε – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		1	DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995
<i>Saguinus</i>	<i>Saguinus fuscicollis</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
	<i>Saguinus bicolor</i>	1	DNA nuclear	seqüência	Fator de von Willebrand	Chaves <i>et al.</i> , 1999
	<i>Saguinus midas</i>	1	DNA nuclear	seqüência	ε – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
<i>Saimiri</i>	<i>Saimiri boliviensis</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
		1	DNA nuclear	seqüência	ε – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995
		1	DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995
		1	mtDNA	seqüência	CCR – Região de Controle do mtDNA (heterólogo)	Ascunce <i>et al.</i> , 2003
	<i>Saimiri oerstedii</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
	<i>Saimiri sciureus</i>	1	DNA nuclear	seqüência	G6PD – introns D e E	von Dormam & Ruvolo, 1999
2		DNA nuclear	seqüência	ε – globina	Harada <i>et al.</i> , 1995	
1		DNA nuclear	seqüência	IRBP	Harada <i>et al.</i> , 1995	

Gênero	Espécies	N	Tipo	Nome do marcador	Descrito por
--------	----------	---	------	------------------	--------------

Observação: muitos nomes científicos de espécies aqui citadas já foram revistos em trabalhos mais recentes. No entanto, estes foram aqui mantidos pela fidelidade à descrição no trabalho original.

Tabela VIII.2. Dados originais relativos ao peso das fêmeas da espécie *Alouatta caraya* capturadas durante a formação do lago artificial da usina hidrelétrica Engenheiro Sergio Mota, Porto Primavera (SP) fornecidos pela equipe da Pró-Fauna. Peso em quilogramas.

Adulto		Jovem		Infante		
Registro	Peso	Registro	Peso	Registro	Peso	
	1	3,50	159	2,75	238	0,90
	2	3,75	160	2,50	239	1,50
	3	3,75	161	1,25	240	0,50
	4	3,75	162	3,00	241	0,50
	5	4,00	163	1,50	242	1,25
	6	3,00	164	1,75	243	0,75
	7	3,50	165	2,00	244	1,50
	8	5,50	166	2,50	245	1,00
	9	4,00	167	3,00	246	1,00
	10	4,00	168	2,00	247	3,50
	11	4,00	169	2,50	248	4,00
	12	4,25	170	5,75	249	0,50
	13	3,50	171	3,00	250	1,00
	14	4,70	172	2,25	251	0,70
	15	3,75	173	2,00	252	0,75
	16	4,00	174	3,50	253	1,00
	17	4,00	175	2,20	254	0,50
	18	8,00	176	2,00	255	1,00
	19	4,30	177	2,25	256	1,00
	20	4,00	178	2,50	257	1,00
	21	4,00	179	1,75	258	0,50
	22	4,00	180	1,50	259	0,25
	23	4,00	181	1,75	260	1,00
	24	4,00	182	1,75	261	0,45
	25	4,00	183	2,25	262	1,25
	26	1,50	184	2,00	263	0,25
	27	4,50	185	2,25	264	0,70
	28	4,00	186	3,00	265	0,10
	29	4,50	187	2,20	266	1,25
	30	3,00	188	1,50	267	1,50
	31	6,00	189	2,00	268	1,25
	32	2,00	190	2,00		
	33	4,00	191	2,25		

Adulto		Jovem		Infante	
Registro	Peso	Registro	Peso	Registro	Peso
	34		192		1,75
	35		193		2,10
	36		194		2,25
	37		195		2,25
	38		196		2,25
	39		197		2,25
	40		198		2,25
	41		199		2,00
	42		200		1,75
	43		201		3,25
	44		202		2,00
	45		203		3,00
	46		204		2,25
	47		205		3,25
	48		206		1,75
	49		207		2,25
	50		208		2,00
	51		209		3,00
	52		210		1,75
	53		211		3,25
	54		212		2,90
	55		213		1,05
	56		214		2,00
	57		215		2,50
	58		216		2,25
	59		217		2,00
	60		218		2,75
	61		219		3,00
	62		220		3,00
	63		221		2,00
	64		222		3,25
	65		223		2,00
	66		224		2,50
	67		225		2,00
	68		226		2,75
	69		227		3,25
	70		228		2,00
	71		229		1,50
	72		230		3,30
	73		231		2,75

Adulto		Jovem		Infante	
Registro	Peso	Registro	Peso	Registro	Peso
	74		232		2,60
	75		233		1,90
	76		234		1,75
	77		235		2,75
	78		236		2,50
	79		237		1,50
	80				4,25
	81				5,00
	82				4,00
	83				5,00
	84				4,25
	85				5,25
	86				4,00
	87				3,75
	88				4,60
	89				5,00
	90				3,75
	91				4,50
	92				4,25
	93				4,25
	94				4,00
	95				4,25
	96				3,05
	97				4,20
	98				4,50
	99				3,50
	100				5,00
	101				3,50
	102				4,25
	103				3,75
	104				4,50
	105				4,50
	106				4,50
	107				4,75
	108				3,75
	109				4,50
	110				5,00
	111				4,50
	112				4,00
	113				4,00

Adulto		Jovem		Infante	
Registro	Peso	Registro	Peso	Registro	Peso
	114		3,00		
	115		4,75		
	116		4,25		
	117		3,50		
	118		3,50		
	119		4,00		
	120		4,75		
	121		4,75		
	122		4,75		
	123		4,75		
	124		3,75		
	125		4,75		
	126		4,75		
	127		4,75		
	128		4,75		
	129		4,75		
	130		4,00		
	131		4,75		
	132		4,50		
	133		5,00		
	134		5,50		
	135		3,50		
	136		3,75		
	137		4,50		
	138		3,50		
	139		3,90		
	140		5,50		
	141		5,00		
	142		5,00		
	143		3,60		
	144		4,00		
	145		4,50		
	146		5,00		
	147		3,90		
	148		5,00		
	149		3,75		
	150		4,50		
	151		5,00		
	152		5,70		
	153		4,75		

Adulto		Jovem		Infante	
Registro	Peso	Registro	Peso	Registro	Peso
	154	3,50			
	155	4,25			
	156	4,00			
	157	3,60			
	158	4,75			

Tabela VIII.3. Dados originais relativos ao peso dos machos da espécie *Alouatta caraya* capturados durante a formação do lago artificial da usina hidrelétrica Engenheiro Sergio Mota, Porto Primavera (SP) fornecidos pela equipe da Pró-Fauna. Peso em quilogramas.

Adulto		Subadulto		Jovem		Infante	
Registro	Peso	Registro	Peso	Registro	Peso	Registro	Peso
269	5,25	349	3,00	409	2,50	469	0,50
270	7,00	350	2,00	410	4,00	470	1,00
271	6,75	351	4,25	411	1,00	471	1,50
272	7,00	352	6,00	412	1,00	472	1,80
273	8,00	353	6,40	413	2,00	473	1,40
274	6,75	354	7,25	414	1,00	474	1,00
275	6,00	355	6,75	415	3,25	475	1,50
276	6,50	356	3,50	416	2,50	476	1,00
277	8,00	357	4,25	417	2,25	477	1,00
278	7,30	358	3,25	418	4,00	478	1,00
279	7,20	359	2,75	419	2,25	479	1,50
280	6,75	360	4,00	420	1,50	480	0,50
281	8,00	361	4,00	421	2,50	481	1,00
282	7,00	362	3,75	422	1,50	482	1,00
283	6,00	363	4,25	423	2,75	483	1,25
284	6,00	364	6,00	424	1,75	484	1,00
285	7,25	365	5,25	425	2,25	485	5,75
286	6,50	366	5,00	426	2,00	486	0,50
287	7,50	367	4,75	427	3,00	487	1,25
288	6,75	368	3,25	428	1,50	488	0,75
289	6,20	369	5,25	429	2,00	489	1,00
290	5,75	370	4,50	430	2,00	490	0,50
291	6,00	371	3,25	431	1,50	491	1,00
292	6,25	372	3,25	432	2,00	492	1,00

Adulto		Subadulto		Jovem		Infante	
Registro	Peso	Registro	Peso	Registro	Peso	Registro	Peso
293	7,00	373	6,05	433	1,75	493	0,50
294	7,00	374	5,00	434	2,00	494	0,75
295	6,00	375	3,50	435	1,50	495	0,25
296	6,75	376	6,00	436	1,75	496	0,50
297	7,20	377	4,00	437	1,75	497	0,75
298	6,70	378	4,75	438	3,25	498	0,75
299	7,50	379	5,75	439	2,00	499	1,25
300	6,00	380	6,00	440	2,25	500	0,25
301	5,75	381	5,02	441	3,00	501	0,90
302	7,50	382	5,00	442	3,00	502	0,90
303	8,00	383	4,00	443	3,75	503	0,25
304	6,00	384	6,00	444	2,25	504	0,20
305	5,25	385	4,75	445	3,75	505	1,50
306	5,50	386	5,75	446	3,00	506	0,25
307	6,25	387	4,75	447	2,00		
308	7,00	388	5,50	448	1,75		
309	5,75	389	4,50	449	2,50		
310	7,00	390	4,25	450	2,50		
311	7,75	391	4,75	451	1,25		
312	7,50	392	5,00	452	2,75		
313	7,00	393	4,75	453	2,00		
314	7,75	394	5,75	454	2,00		
315	6,75	395	4,25	455	2,00		
316	6,25	396	6,00	456	3,00		
317	7,00	397	5,25	457	2,75		
318	7,75	398	5,00	458	1,50		
319	8,00	399	4,50	459	1,50		
320	7,75	400	5,50	460	3,00		
321	7,00	401	7,00	461	4,00		
322	7,50	402	4,50	462	2,90		
323	6,50	403	5,50	463	2,90		
324	7,75	404	4,00	464	3,00		
325	6,75	405	3,00	465	2,50		
326	8,00	406	4,25	466	3,50		
327	8,00	407	4,75	467	2,75		
328	7,00	408	5,75	468	3,00		
329	7,25						
330	7,25						

Adulto		Subadulto		Jovem		Infante	
Registro	Peso	Registro	Peso	Registro	Peso	Registro	Peso
331	6,50						
332	7,50						
333	6,50						
334	6,75						
335	6,50						
336	7,00						
337	6,50						
338	7,25						
339	7,75						
340	7,00						
341	7,00						
342	6,30						
343	6,75						
344	7,20						
345	8,90						
346	7,25						
347	8,50						
348	7,50						

Tabela VIII.4. Dados relativos ao Comprimento Total (CT) de espécimes de uma população de *A. caraya* de Porto Primavera (SP) fornecidos pela equipe da Pró-Fauna (N total = 162).

Registro*	Sexo	Idade	Condição Reprodutiva	CT
1	F	A	Lactante c/filhote	76,00
2	F	A		79,00
3	F	A	Lactante	90,00
4	F	A		92,00
5	F	A		98,50
6	F	A		99,00
7	F	A		101,00
8	F	A	Lactante	103,50
9	F	A	Lactante c/filhote	104,00
10	F	A		104,50
11	F	A		105,00
12	F	A	Lactante c/filhote	105,00
13	F	A		105,50
14	F	A	Lactante c/filhote	106,00
15	F	A		106,50

Registro*	Sexo	Idade	Condição Reprodutiva	CT
16	F	A	Gestante	107,00
17	F	A		107,00
18	F	A		107,00
19	F	A		107,00
20	F	A	Lactante c/filhote	107,00
21	F	A		107,00
22	F	A		107,50
23	F	A	Lactante c/filhote	108,00
24	F	A		108,00
25	F	A		108,50
26	F	A	Lactante	109,00
27	F	A	Lactante c/filhote	109,00
28	F	A	Lactante c/filhote	109,00
29	F	A		110,00
30	F	A	Lactante c/filhote	110,00
31	F	A		110,50
32	F	A	Lactante c/filhote	110,50
33	F	A		111,00
34	F	A	Lactante c/filhote	111,00
35	F	A		112,00
36	F	A		112,00
37	F	A	Lactante c/filhote	112,00
38	F	A		112,00
39	F	A		112,00
40	F	A		113,00
41	F	A		113,00
42	F	A		113,00
43	F	A		115,00
44	F	A		115,50
45	F	A		116,00
46	F	A		116,00
47	F	A	Lactante c/filhote	119,00
48	F	A	Gestante	119,50
49	F	A	Gestante	119,50
50	F	A	Gestante	119,50
51	F	A		120,00
52	F	A		123,00
53	F	A		123,00
54	F	I		42,00
55	F	I		43,50
56	F	I		44,00
57	F	I		53,00
58	F	I		58,00
59	F	I		66,00
60	F	I		69,00
61	F	I		71,00
62	F	I		71,00

Registro*	Sexo	Idade	Condição Reprodutiva	CT
63	F	I		72,00
64	F	I		76,00
65	F	I		83,00
66	F	I		89,00
67	F	J		78,00
68	F	J		79,00
69	F	J		80,00
70	F	J		82,00
71	F	J		84,50
72	F	J		84,50
73	F	J		86,50
74	F	J		90,00
75	F	J		92,00
76	F	J		92,00
77	F	J		93,00
78	F	J		95,50
79	F	J		95,50
80	F	J		96,00
81	F	J		96,00
82	F	J		99,00
83	F	J		102,50
84	F	J		103,00
85	F	J		106,00
86	F	J		108,50
87	F	J		109,00
88	F	J		103,00
89	M	A		110,00
90	M	A		110,50
91	M	A		111,00
92	M	A		112,00
93	M	A		113,00
94	M	A		114,50
95	M	A		115,00
96	M	A		117,00
97	M	A		118,50
98	M	A		119,00
99	M	A		122,00
100	M	A		123,00
101	M	A		124,00
102	M	A		126,00
103	M	A		126,00
104	M	A		126,00
105	M	A		126,00
106	M	A		126,00
107	M	A		127,00
108	M	A		127,00
109	M	A		127,00

Registro*	Sexo	Idade	Condição Reprodutiva	CT
110	M	A		127,00
111	M	A		128,00
112	M	A		129,00
113	M	A		131,00
114	M	I		39,00
115	M	I		45,00
116	M	I		48,50
117	M	I		51,00
118	M	I		59,50
119	M	I		60,00
120	M	I		63,00
121	M	I		66,00
122	M	I		70,00
123	M	I		73,50
124	M	I		78,50
125	M	I		79,00
126	M	I		84,00
127	M	I		86,50
128	M	I		88,00
129	M	J		78,00
130	M	J		80,00
131	M	J		81,00
132	M	J		82,00
133	M	J		88,00
134	M	J		88,00
135	M	J		88,50
136	M	J		95,00
137	M	J		96,00
138	M	J		96,50
139	M	J		96,50
140	M	J		97,00
141	M	J		98,00
142	M	J		98,50
143	M	J		101,00
144	M	J		102,00
145	M	J		102,00
146	M	J		105,00
147	M	J		108,00
148	M	J		114,00
149	M	J		127,00
150	M	S		90,00
151	M	S		96,00
152	M	S		109,00
153	M	S		112,00
154	M	S		113,00
155	M	S		113,00
156	M	S		116,50

Registro*	Sexo	Idade	Condição Reprodutiva	CT
157	M	S		119,00
158	M	S		121,00
159	M	S		124,00
160	M	S		125,00
161	M	S		125,00
162	M	S		126,00

M: macho; F: fêmea; A: indivíduo adulto; S: indivíduo subadulto; J: indivíduo jovem; I: indivíduo infante; CT: comprimento total.

* Registro independente das Tabelas anteriores.

Tabela VIII.5. Comparação do tamanho dos fragmentos, número de alelos por loco e número de indivíduos genotipados para os microssatélites descritos por Gonçalves *et al.* (2004) em populações de *Alouatta belzebul* (Bastos *et al.*, com. pessoal) e uma população de *Alouatta caraya* (presente trabalho).

Espécie	<i>A. caraya</i>			<i>A. belzebul</i>		
	TF	Na	N	TF	Na	N
Loco						
Ab04	157-175	10	84	147-165	10	87
Ab06	275-305	17	65	265-293	14	87
Ab07	180-190	04	100	182-200	13	87
Ab09	138	01	103	168-200	16	87
Ab10	192	01	103	234-276	22	87
Ab12	253- 265	06	16	225-293	33	87
Ab17	220-246	14	100	193-263	23	87

TF = tamanho dos fragmentos, em pares de base; Na = Número de alelos do loco; N = número de indivíduos genotipados.

Tabela VIII.6. Frequência alélica dos marcadores analisados para uma população de *Alouatta caraya* de Porto Primavera (PP) e para cinco populações de *Alouatta belzebul* da região de Tucuruí (PA): Ilha de Germoplasma – IG, Ilha de Cornélio – IC, Ilha da Base 4 – B4, Margem esquerda do rio Tocantins – ME e Margem direita do rio Tocantins – MD – Bastos *et al.* com. pessoal. Nesta análise computamos todos os alelos descritos para o loco: ⁺ sinaliza os alelos exclusivos de *A. caraya* e • os alelos compartilhados com *A. belzebul*.

Alelo	PP	IG	IC	B4	ME	MD
Ab04						
147	–	0,054	–	–	–	–
149	–	0,107	–	–	–	–
153	–	0,036	–	–	–	–
155	–	0,089	–	0,200	–	–
157•	0,143	0,411	0,571	0,333	0,400	0,333
159•	0,208	0,036	0,214	0,433	0,267	0,333
161•	0,065	0,107	0,214	0,033	0,250	0,333
163•	0,054	0,054	–	–	0,017	–
165•	0,024	0,089	–	–	0,050	–
167•	0,030	0,018	–	–	0,017	–
169 ⁺	0,054	–	–	–	–	–
171 ⁺	0,339	–	–	–	–	–
173 ⁺	0,077	–	–	–	–	–
175 ⁺	0,006	–	–	–	–	–
Ab06						
261 ⁺	0,008	–	–	–	–	–
263 ⁺	0,031	–	–	–	–	–
265	–	0,034	–	–	–	–
269	–	0,017	–	–	–	–
271	–	0,103	–	–	–	–

Alelo	PP	IG	IC	B4	ME	MD
273 ⁺	0,054	–	–	–	–	–
275•	0,231	0,017	0,214	–	0,033	–
277•	0,046	0,034	0,143	0,067	0,033	0,111
279•	0,100	0,069	0,071	0,367	0,183	0,111
281•	0,008	0,259	–	0,100	0,133	0,111
283	–	0,190	0,143	0,033	0,150	0,111
285•	0,046	0,086	0,143	0,033	0,167	0,167
287•	0,023	0,155	–	0,067	0,050	0,056
289•	0,069	0,017	0,214	0,333	0,183	–
291•	0,038	0,017	–	–	0,033	0,111
293•	0,092	–	0,071	–	0,033	0,222
295 ⁺	0,023	–	–	–	–	–
299 ⁺	0,023	–	–	–	–	–
301 ⁺	0,131	–	–	–	–	–
303 ⁺	0,069	–	–	–	–	–
305 ⁺	0,008	–	–	–	–	–
Ab07						
178	–	–	–	0,033	–	0,056
180•	0,810	–	–	–	0,017	–
182•	0,085	–	0,214	0,033	0,217	0,167
184	–	0,069	–	0,067	0,117	0,389
186	–	0,052	0,071	–	0,350	–
188•	0,065	0,259	0,071	0,200	0,117	0,056
190•	0,040	0,224	0,214	0,200	0,083	0,056
192	–	0,207	0,286	0,100	0,050	0,056
194	–	0,103	–	–	0,033	–
196	–	0,052	0,143	0,167	–	0,056
198	–	0,017	–	0,133	0,017	–
200	–	–	–	0,067	–	0,167
202	–	0,017	–	–	–	–

Alelo	PP	IG	IC	B4	ME	MD
Ab09						
138 ⁺	1,000	–	–	–	–	–
168	–	–	–	–	0,033	–
174	–	0,034	–	–	–	–
176	–	0,069	–	0,036	0,017	0,056
178	–	0,034	–	–	–	0,056
180	–	0,052	0,071	0,107	0,067	0,167
182	–	0,069	–	0,250	–	0,056
184	–	0,155	0,071	0,071	0,167	0,111
186	–	0,017	0,071	0,214	–	0,056
188	–	0,103	0,357	0,143	0,267	0,167
190	–	0,069	0,071	0,143	–	0,056
192	–	0,172	0,214	–	0,183	0,111
194	–	0,069	–	0,036	–	–
196	–	0,138	0,071	–	0,100	0,111
198	–	0,017	–	–	0,050	0,056
200	–	–	–	–	0,117	–
204	–	–	0,071	–	–	–
Ab10						
192 ⁺	1,000	–	–	–	–	–
228	–	0,074	–	–	–	–
230	–	0,056	0,143	–	–	–
234	–	–	–	–	0,017	–
236	–	0,037	–	–	0,017	–
238	–	0,037	–	–	0,033	–
242	–	0,019	–	0,067	0,133	0,050
246	–	–	0,214	0,067	0,067	0,100
248	–	0,111	–	–	–	–
250	–	0,167	0,143	0,433	0,183	0,100
252	–	0,037	–	–	–	–
254	–	0,148	0,214	0,100	0,067	0,200

Alelo	PP	IG	IC	B4	ME	MD
256	–	–	–	–	0,033	0,050
258	–	0,148	0,143	0,100	0,117	0,350
260	–	–	–	–	0,033	–
262	–	0,056	–	0,067	0,117	0,100
264	–	–	0,143	0,133	0,033	–
266	–	0,037	–	–	0,067	–
270	–	0,037	–	0,033	0,017	–
272	–	0,037	–	–	–	–
274	–	–	–	–	0,033	–
276	–	–	–	–	0,033	–
284	–	–	–	–	–	0,050
Ab17						
193	–	0,017	–	–	–	0,056
195	–	–	0,143	0,033	0,069	–
199	–	–	0,071	0,033	0,034	–
203	–	–	–	0,033	–	–
205	–	–	–	–	0,017	0,111
207	–	–	–	–	0,034	–
209	–	0,017	0,143	0,067	0,052	–
213	–	0,103	0,214	0,133	0,069	–
215	–	0,034	–	–	0,017	–
217	–	0,034	0,143	0,267	0,086	0,222
218 ⁺	0,010	–	–	–	–	–
219	–	–	–	–	0,017	–
220 ⁺	0,005	–	–	–	–	–
221	–	0,259	0,071	0,200	0,138	0,222
222 ⁺	0,070	–	–	–	–	–
225	–	0,138	–	0,033	0,172	0,167
226 ⁺	0,050	–	–	–	–	–
227	–	0,052	–	–	–	–
228 ⁺	0,010	–	–	–	–	–

Alelo	PP	IG	IC	B4	ME	MD
229	–	0,103	0,143	0,167	0,138	0,167
230 ⁺	0,130	–	–	–	–	–
231	–	0,017	–	–	–	–
232 ⁺	0,040	–	–	–	–	–
233	–	0,121	–	–	0,069	0,056
234 ⁺	0,135	–	–	–	–	–
235	–	0,017	–	–	–	–
236 ⁺	0,235	–	–	–	–	–
237	–	0,034	–	–	–	–
238 ⁺	0,230	–	–	–	–	–
240 ⁺	0,055	–	–	–	–	–
241	–	–	–	–	0,017	–
242 ⁺	0,010	–	–	–	–	–
243	–	0,017	–	–	–	–
244 ⁺	0,010	–	–	–	–	–
246 ⁺	0,010	–	–	–	–	–
255	–	–	0,071	0,033	0,069	–
263	–	0,034	–	–	–	–
