

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**ATUALIZAÇÕES SOBRE BIOLOGIA E MANEJO
CONSERVACIONISTA EM PRIMATAS ATELÍDEOS DA
ESPÉCIE *Lagothrix cana***

MARCELO ROCHA CARNEIRO

Botucatu – SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ATUALIZAÇÕES SOBRE BIOLOGIA E MANEJO
CONSERVACIONISTA EM PRIMATAS ATELÍDEOS DA
ESPÉCIE *Lagothrix cana***

MARCELO ROCHA CARNEIRO

Tese apresentada à Banca de Defesa
do Programa de Pós-Graduação em
Animais Selvagens, como exigência
parcial para a obtenção do título de
Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lígia Souza Lima
Silveira da Mota

Botucatu – SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Carneiro, Marcelo Rocha.

Atualizações sobre biologia e manejo conservacionista em primatas atelídeos da espécie *Lagothrix cana* / Marcelo Rocha Carneiro. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Lígia Souza Lima Silveira da Mota

Capes: 50501011

1. Animais silvestres. 2. DNA. 3. Primatas.

Palavras-chave: Animais selvagens; D-Loop; DNA; Extrapolação alométrica; *Lagothrix*.

MARCELO ROCHA CARNEIRO

ATUALIZAÇÕES SOBRE BIOLOGIA E MANEJO CONSERVACIONISTA EM
PRIMATAS ATELÍDEOS DA ESPÉCIE *Lagothrix cana*

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

Prof^a Dr^a Lígia Souza Lima Silveira da Mota – Orientadora

Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Prof. Dr. Vidal Haddad Júnior

Prof^a Dr^a Lisiane de Almeida Martins

Dr. Caio Henrique Paganini Burini

Membros Suplentes:

Prof^a Dr^a Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt

Prof. Dr. Paulo Rogério Mangini

Dr. Augusto Kluczkovski Junior

Data da Defesa: 10 de Dezembro de 2018.

Às minhas filhas...

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, Profs. José Candido Rocha (*in memorian*) e Levy Miró Carneiro (*in memorian*), eternos exemplos nas áreas de pesquisa e docência em ciências da saúde, sempre pautando as ações na ética e na humildade.

À minha esposa, minhas filhas, meus pais e minhas irmãs, pela confiança e pela compreensão em meus períodos de ausência.

Aos Professores que me inspiraram, excepcionalmente à minha orientadora, Prof^a Dr^a Lúgia Silveira da Mota, pela paciência, pela compreensão e pelo exemplo de esforço e resiliência.

Aos Professores Carlos Roberto Teixeira e Sheila Canavese Rahal, por me acolherem, quando eu passava por um momento extremamente delicado.

A meu eterno conselheiro, Prof. Pós-Dr. José Ricardo Pachaly, pela paciência e presteza com que sempre se dispôs a me atender, pelos sapientíssimos conselhos, pela franqueza, às vezes áspera e pela competência, que sempre marcaram todos os seus trabalhos; e, acima de tudo, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Fabiano Montiani-Ferreira, pela providencial ajuda com as análises estatísticas.

Aos colegas de Manaus, Augusto e Laerzio e às equipes de apoio do CETAS Sauim Castanheiras e Fundação Floresta Viva, pela oportunidade de estar tão próximo a essa emblemática espécie.

À toda equipe do Laboratório de Genética Animal, do Instituto de Biociências – UNESP, principalmente à M.Sc. Talita Roberto Aleixo de Almeida, pelo apoio e pela atenção.

Ao amigo e colega, Dr. Newton Lucchiari e à sua doce família, pela acolhida e pelo carinho de sempre.

Aos meus colegas de graduação, Lucacin, Bagé, Vila, Rui, Pé-de-Boi, Tim, Ênio, Aluizio, Juliano, Deusnildo, Bugrão, Cabelo, Tigela, Jeca, Grego,

Pirajú, Chico, Beto, Arturo, Milão, Tomitam, Abdala, Bob, e, em especial, a meu amigo Peão, pelo apoio incondicional.

A meus amigos de infância, principalmente, àqueles que já nos deixaram.

A todos os parceiros de trabalho, com quem convivi, nessas duas décadas de vida profissional.

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

"O saber, a gente aprende com os mestres e com os livros;

A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes..."

(Cora Coralina)

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x.
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xi.
LISTA DE ABREVIATURAS	xii.
RESUMO	xiv.
ABSTRACT	xv.
1 INTRODUÇÃO	1.
2 REVISÃO DA LITERATURA	5.
2.1 Medicina da Conservação	5.
2.2 Classificação Taxonômica dos Primatas Platyrrhinos	6.
2.3 Família <i>Atelidae</i> (Gray, 1825)	7.
2.4 Gênero <i>Lagothrix</i>	8.
2.5 <i>Lagothrix cana</i> (Geoffroy, 1812)	12.
2.6 Contenção Farmacológica	13.
3 OBJETIVOS	16.
3.1 Gerais	16.
3.2 Específicos	16.
3.3 Autorizações	17.
4 MATERIAIS E MÉTODO	17.
4.1 Local	17.
4.2 Animais	17.

4.3	Extração de DNA e avaliação da qualidade do material obtido	21.
4.4	Reação de amplificação (PCR) e purificação do produto.....	22.
4.5	Sequenciamento Nucleotídico	23.
4.6	Análise dos dados / Edição e Alinhamento das Sequências.....	24.
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24.
5.1	Quanto à contenção farmacológica	24.
5.2	Quanto à obtenção do material biológico	26.
6	CONCLUSÕES	32.
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33.
8	ANEXOS	42.
8.1	Cópia de artigo publicado durante o período do Doutorado	42.
8.2	Cópia de artigo aceito para publicação produzido durante o período do Doutorado	51.
8.3	Cópia da carta de aceite de publicação de artigo produzido durante o período do Doutorado	68.
8.4	Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Biociências – <i>Brazilian Journal of Biosciences</i>	69.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

FIGURA 1 - Imagem de um macaco barrigudo (<i>Lagothrix cana</i>) infante, utilizando a cauda prênsil como apoio	7.
FIGURA 2 - Distribuição geográfica dos cinco morfotipos reconhecidos atualmente de macacos- barrigudos	8.
FIGURA 3 - Imagem de uma fêmea lactente de macaco- barrigudo (<i>Lagothrix cana</i>), com filhote às costas	9.
FIGURA 4 - Imagem de uma fêmea lactente de macaco- barrigudo (<i>Lagothrix cana</i>), com filhote às costas	9.
FIGURA 5 - Imagem de um exemplar adulto de macaco- barrigudo (<i>Lagothrix cana</i>) evidenciando a coloração da pelagem dos membros	12.
FIGURA 6 - Imagem do procedimento prévio à contenção de um macaco- barrigudo (<i>Lagothrix cana</i>) adulto, por meio da utilização de zarabatana para propulsão de dardo artesanal pressurizado contendo a solução ZAD-50	18.
FIGURA 7 - Imagem de dardo confeccionado artesanalmente para execução de captura de macacos-barrigudos (<i>Lagothrix cana</i>)	18.
FIGURA 8 - Venopunção da veia braquial para colheita de sangue em macaco-barrigudo (<i>Lagothrix cana</i>)	19.
FIGURA 9 - Tubo de ensaio contendo anticoagulante (EDTA), após colheita de amostra de sangue de exemplar de macaco-barrigudo (<i>Lagothrix cana</i>)	19.
FIGURA 10 - Exemplar adulto de macaco-barrigudo (<i>Lagothrix cana</i>) sendo monitorado quanto à temperatura corporal e oximetria de pulso.....	20.
FIGURA 11 - Exemplo de ficha anestésica utilizada na monitorização de macacos-barrigudos (<i>Lagothrix cana</i>), durante o trabalho de pesquisa.....	21.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Página

QUADRO 1 - Frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e saturação parcial de oxigênio (SpO ₂) de 21 primatas adultos da espécie <i>Lagothrix cana</i> , submetidos a contenção farmacológica e anestesia dissociativa de campo pela associação de Zoletil®, Atropina e Detomidina (“ZAD-50”), em doses calculadas por meio de extrapolação alométrica interespecífica (média ± desvio padrão)	25.
QUADRO 2 - Relação de amostras obtidas de macacos-barrigudos (<i>Lagothrix cana</i>) submetidas à avaliação de integridade das amostras e quantificação de DNA	27.
TABELA 1 - Sítios variáveis em 567 pares de bases do gene COII do DNA mitocondrial em <i>Lagothrix. cana</i> , <i>L. lagothricha</i> e <i>L. poeppigii</i>	28.
TABELA 2 - Sítios variáveis em 567 pares de bases do gene COII do DNA mitocondrial em <i>Lagothrix. cana</i> e <i>Ateles fusciceps</i>	29.
TABELA 3 - Sítios variáveis em 429 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (D-Loop) em 09 indivíduos da espécie <i>Lagothrix cana</i>	30.

.LISTA DE ABREVIATURAS

“ZAD-50” – Solução anestésica contendo Zoetel® + Cloridrato de Detomidina + Sulfato de Atropina

°C – Graus Celsius

μl - Microlitro

μM – Micromolar

ATP - Trifosfato de adenosina

Bpm – Batimentos por Minuto

CETAS - Centro de Triagem de Animais Silvestres

COI – Citocromo C Oxidase I

COII - Citocromo C Oxidase II

COIII - Citocromo C Oxidase III

CytB - Citocromo B

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio)

IUCN - União Internacional para a Conservação da Natureza

Kb - kilo (quilo) pares de bases = 1.000 pb

mg/kg – miligramas por kilograma

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MPI – Minutos Pós Injeção

Mpm – Movimentos por Minuto

mtdna - DNA mitocondrial

NADH - “Dinucleotideo de nicotinamida e adenina hidrogenado

NCBI - National Center for Biotechnology Information

ng/μL – Nanogramas por Microlitro

nm - Nanômetro

pb - Pares de Bases

pb – Pares de Bases

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RNA – Ácido Ribonucleico

RPE - Reação Postural de Endireitamento

Rpm – Rotações por Minuto

r_s Coeficiente de Correlação de Postos de Spearman

SISBio - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SISGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SpO₂ - Saturação Parcial de Oxigênio

TAE - Tris-Ácido acético-EDTA

TM - Marca Registrada

U/mL – Unidades por Microlitro

ρ - coeficiente de variação

RESUMO

Este trabalho relata preliminarmente, a caracterização genética de primatas da espécie *Lagothrix cana* (macacos-barrigudos cinza), por meio de sequenciamento genético e análise de DNA mitocondrial do segmento D-Loop, após extração do DNA com a utilização da técnica do fenol/clorofórmio. Aliado a isso, é reportada uma revisão bibliográfica acerca dos dados anatômicos, fisiológicos, clínicos, reprodutivos e comportamentais, já disponíveis em literatura especializada sobre a espécie. Também, é validado um protocolo de contenção farmacológica executável e eficiente para procedimentos da rotina dos profissionais que desenvolvem ações, na área de medicina da conservação e atuam com primatas cativos deste gênero. Foram utilizados 21 primatas adultos da espécie *Lagothrix cana* (macaco-barrigudo), pesando $5,24 \pm 1,66$ kg, sendo 14 fêmeas e sete machos, para a validação deste protocolo. Os fármacos utilizados foram a tiletamina, o zolazepam, a atropina e a detomidina, em associação, com suas doses calculadas por meio de extrapolação alométrica interespecífica. Os fármacos foram combinados numa preparação concentrada que foi denominada “ZAD-50” (Zoletil/50[®] + Atropina + Detomidina), obtendo-se volume final exato de 3,0 ml de ZAD-50, com a associação de fármacos numa concentração que permite a contenção farmacológica de um mamífero placentário que pese 10,0 Kg com um volume de 0,6 ml, por exemplo. 567 pares de bases de DNA mitocondrial foram utilizadas, e conseguiu-se caracterizar os indivíduos como pertencentes à espécie *Lagothrix cana*, além de realizar o sequenciamento do segmento “D-Loop” do DNA mitocondrial, para esta espécie.

Palavras Chave: DNA, *Lagothrix*, extrapolação alométrica, animais selvagens, “D-Loop”, Atelídeos

ABSTRACT

This manuscript reports, at first, the genetic characterization of primates *Lagothrix cana* (“gray woolly-monkeys”), by means of DNA sequencing and mitochondrial DNA analysis of the D-Loop section, after the extraction with the phenol/chloroform method, described by Sambrook e Russel (2001). In addition, is related a wide vision of the scientific data available bibliographic about the anatomical, physiological, medical, reproductive and behavioural existing data, about the specie. Also is related a performable and efficient chemical restraint protocol to permit usual procedures for professionals of conservation medicine, who works with captive primates of *Lagothrix sp.* genus. The study evaluate the chemical restraint and field anesthesia of 21 woolly-monkeys (*Lagothrix cana*: Atelidae) weighing $5,24 \pm 1,66$ kg, being fourteen female and seven male. There was employed the combination of tiletamine, zolazepam, atropine, and detomidine, in allometrically scaled dosages. The drugs were combined in a concentrate preparation called “ZAD-50” (Zoletil/50® + Atropine + Dormiun-V®). and give an accurate final volume of 3.0 mL of ZAD-50, with the combination of drugs at a concentration that allows the pharmacological restraint of a placental mammal weighing 10.0 kg with a volume of 0.6 ml, for example. 567 base pairs of mitochondrial DNA samples was utilized and was realized the classification of the specimens as *Lagothrix cana*, after the comparison with *L. poepigii* and *L. lagothricha* data. Besides that, the characterization of the D-Loop segment of mitochondrial DNA for this species was described.

Key Words: DNA, *Lagothrix*, allometric scaling, wild animals, D-Loop, Atelids

1 INTRODUÇÃO

O número total de espécies conhecidas no Brasil oscila entre 170 e 210 mil, sendo que 103 a 134 mil, se referem a espécies do reino Animal e, cerca de 43 a 49 mil, correspondem ao Reino Vegetal. Dentre as espécies de animais, 7 mil correspondem a vertebrados, com estimativa de 3.420 espécies de peixes, 1.696 de aves, 687 de anfíbios, 633 de répteis, e 541 de mamíferos, porém, acredita-se que este número possa ser bem maior (LEWINSOHN e PRADO, 2005). Dados de 2011, dos Centros Nacionais de Pesquisa e Conservação do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) alteraram estes números para 8.200 espécies de vertebrados descritas, sendo 4.100 peixes, 1.826 aves, 875 anfíbios, 721 répteis e 713 mamíferos, distribuídos em cinco biomas distintos (PERES et al., 2011).

O principal desafio na rotina dos profissionais envolvidos em ações conservacionistas é a escassez de dados científicos confiáveis ou, na maioria dos casos, da ausência destes dados, para balizar o planejamento e desenvolvimento destas ações. Estes profissionais, muitas das vezes, acabam optando por lançar mão dos dados disponíveis para espécies que se encontrem o mais próximo possível, na escala taxonômica, da espécie em questão, e termina por adaptar estes dados, pela ausência de parâmetros específicos para a espécie, com a qual está trabalhando. Muitas das vezes, nem isso é possível. Este panorama não é diferente para a espécie objeto deste estudo, o macaco-barrigudo da espécie *Lagothrix cana*. Os dados específicos existentes na literatura especializada são raros, e sob o ponto de vista da caracterização genotípica de seus indivíduos, não constam registros com esta descrição, até a atualidade. Da mesma forma, não se encontram registros específicos, referentes às características de anatomia e fisiologia reprodutivas, apenas de outras espécies do gênero *Lagothrix*, como, por exemplo, *Lagothrix poeppigii* (MAYOR et al., 2012a; MAYOR et al., 2012b; ANDRADE et al., 2018). Também não há registro de planejamento ou execução de um plano de manejo reprodutivo específico para *Lagothrix cana*. O que existe são tentativas empíricas de cruzamento entre indivíduos cativos, sem nenhum critério de distinção genética. Na maioria das vezes, estes trabalhos são apenas pautados, na origem geográfica de indivíduos provenientes de ação de fiscalização do tráfico ilegal,

sem nenhum planejamento que previna o aumento da prevalência da consanguinidade dentre os plantéis. É sabido, também, que animais desta espécie, nascidos em cativeiro, dificilmente chegam à idade reprodutiva, pois, as fêmeas cativas não desenvolvem comportamentos condizentes com uma habilidade materna proficiente. Acredita-se que tal fato se deva ao fato de que estas fêmeas não observam este comportamento nas outras fêmeas do plantel, para repeti-lo. Apesar do cativeiro ser, atualmente, um recurso cada vez mais necessário para a conservação de espécies ameaçadas, seja pela manutenção do banco genético, seja na educação ambiental, é sabido que o efeito estressante do cativeiro e a capacidade de adaptação da espécie neste ambiente, ocasiona reações de ordens somática, endocrinológica e comportamental, entre outras. que afetam a higidez dos indivíduos cativos (ORSINI e BORDAN, 2014).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, a partir da década de 80, tornou-se possível a manipulação de ácidos nucleicos, o que levou à análise de diferentes tipos de marcadores moleculares. Tais marcadores moleculares podem corresponder a qualquer loco gênico, ou seu próprio produto, que apresente polimorfismos inerentes e que possam ser aplicados em estudos que buscam compreender um questionamento biológico. De maneira mais ampla, marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de qualquer outro segmento específico de DNA (AVISE, 2004). Com o desenvolvimento da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pelo bioquímico Kary Mullis, em 1985, elevou-se, e muito, a eficiência na detecção de tais polimorfismos. Este progresso se deve a redução do tempo de execução dos experimentos, de custo e de sua complexidade (CURI et al., 2002). A técnica de PCR se baseia na síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, por meio da amplificação em ciclos e na presença da enzima DNA polimerase.

Para a seleção do segmento específico de DNA a ser amplificado é necessário o emprego de sequências de oligonucleotídeos iniciadores chamado de *primers*, delimitando assim a sequência-alvo. Os primers são sintetizados artificialmente sendo, suas sequências de nucleotídeos, complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo no DNA (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2001). Um ciclo da reação envolve a desnaturação da dupla fita do DNA alvo por meio da elevação da temperatura, seguida do anelamento

dos *primers* por meio da diminuição da temperatura e de sua extensão pela ação da DNA polimerase. Este ciclo é repetido por cerca de 30 a 40 vezes, sendo que a quantidade de DNA alvo dobra seguindo uma progressão geométrica (BROWN, 2003).

Os dados resultantes de análises genéticas embasadas em diferentes tipos de marcadores moleculares, sejam estes nucleares ou mitocondriais, podem fornecer informações sobre a estrutura genética populacional, níveis de fluxo gênico, relações filogenéticas, biogeografia de grupos definidos e análise de parentesco (AVISE, 1994). Dessa forma, os marcadores genéticos representam ferramentas poderosas e informativas para ecólogos e geneticistas da conservação definirem, por exemplo, a escala geográfica e a área adequada para realização de monitoramento e manejo das populações. Dentre os marcadores mais utilizados em análises genéticas populacionais, destacam-se a região controle do DNA mitocondrial (mtDNA) e os microssatélites, por serem altamente polimórficos e possuírem altas taxas de mutação (SCHLÖTTERER, 2004).

O genoma mitocondrial em animais é constituído de uma molécula fita dupla de DNA circular, de pequeno tamanho e que codifica aproximadamente 5% de toda a maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria (NAHUM, 2001). Dependendo do tipo da célula, podem ser encontrados mais de mil genomas mitocondriais (mtDNA). Nos animais, este possui em média 18 kilo pares de bases (Kb) de comprimento, sendo herdado maternalmente e geralmente não apresentando recombinação gênica (AVISE, 1994). O mtDNA está organizado em 37 genes codificantes, dos quais 22 resultam em RNAs transportadores, 2 são para RNAs ribossomais e 13 são transcritos em RNAs mensageiros e traduzidos, principalmente, nos complexos proteicos responsáveis pela dinâmica da cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa (AVISE, 2000). Dentre os 13 genes, sete codificam subunidades da enzima NADH desidrogenase (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 e 6), três codificam subunidades da enzima citocromo C oxidase (COI, II e III), dois codificam subunidades da ATP sintetase (ATP 6 e 8) e, em uma única sequência, o gene que codifica o citocromo B (NAGATA et al., 2005). Nos vertebrados existe uma região não codificadora conhecida como “alça D” (D-loop) que contém o controle da replicação e transcrição desse genoma (BOORE, 1999).

Os marcadores moleculares baseados em DNA mitocondrial (mtDNA) possuem apenas herança materna, ao contrário dos nucleares que possuem herança biparental. De acordo com Olson et al. (2009), pelo fato da herança materna estar altamente conservada, em muitos dos genes localizados no genoma mitocondrial, estes marcadores, muitas vezes, podem ser usados para resolver as relações que medem períodos de tempo muito longos e são relevantes quando se considera questões de filogenia e importância taxonômica. Assim, uma característica importante do mtDNA é a sua alta taxa de evolução, a qual acredita-se ser 10 vezes superior à de um gene nuclear de cópia única. A explicação para este fenômeno se encontra no fato da baixa capacidade de reparo da enzima DNA polimerase e a alta exposição desta molécula aos agentes oxidativos gerados durante o processo de respiração celular (MEYER, 1993).

A taxa de evolução do mtDNA não é homogênea entre os seus diferentes genes. Alguns genes acumulam mais rapidamente essas substituições de bases, dentre os quais encontramos os genes codificadores das subunidades da NADH desidrogenase, citocromo C oxidase e dos RNAs transportadores. Os genes codificadores para as subunidades ribossômicas e para o citocromo B estão entre os mais conservados entre os organismos (SACCONE, 1994). A região controle D-loop é a que mais acumula mutações podendo elevar sua taxa de evolução de duas a cinco vezes em relação a dos genes que codificam proteínas (MEYER, 1993). Esta mesma taxa é um dado importante na escolha do(s) gene(s)-chave(s) para resolver questões filogenéticas, taxonômicas e de genética de populações, no entanto, em pesquisas de eventos mais antigos, como a formação de espécies, gêneros e famílias, os genes mais conservados podem ser bons indicadores. A ausência de recombinação e a herança materna aliados à sua alta taxa de evolução, heterogênea entre seus genes, fazem com que o mtDNA seja um excelente marcador para estudos filogenéticos e de taxonomia molecular, sendo empregado largamente para estudos de populações e em relações inter e intra-espécies.

Frente a uma grande variedade de regiões gênicas e não gênicas do mtDNA, o desenvolvimento acelerado das técnicas de sequenciamento de nucleotídeos, nos últimos anos, permitiu uma grande revolução no uso de ferramentas moleculares. Atualmente, no campo da genômica, diversos genes e genomas

mitocondriais completos de uma grande variedade de organismos já têm suas sequências depositadas em bancos públicos de dados. Toda essa informação disponibilizada pela ciência genômica só é possível de ser organizada, analisada e interpretada com o apoio da informática, o que constitui uma nova ciência, a bioinformática. Atualmente a bioinformática é imprescindível para a manipulação dos dados biológicos e sua associação às ferramentas de biologia molecular favorece o desenvolvimento de marcadores genéticos nas mais diferentes áreas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Medicina da Conservação

A Medicina da Conservação constitui uma nova ciência, voltada para enfrentar a ameaça crescente que agentes etiológicos, dos mais diversos tipos, afligem sobre a riqueza biológica do planeta. Possui como pilares básicos, pesquisa e ação e se pauta no conceito da transdisciplinaridade dos profissionais envolvidos nesses dois quesitos. Atuar em medicina da conservação é trabalhar para manter a diversidade biológica e, conseqüentemente, a qualidade de vida para pessoas, espécies domésticas e selvagens, sobretudo com intenção de manter em um ambiente favorável à plena saúde ecológica (MANGINI & SILVA, 2006). Esta manutenção da diversidade biológica depende intimamente da qualidade dos estudos realizados para a produção de dados e subsequente planejamento e execução dessas ações. A premente necessidade de um banco genético confiável, proveniente de animais puros (não hibridizados), em nível de gênero, espécie ou subespécie é o mais desejável, pois, do contrário, perpetuar-se-á a heterogeneidade gênica, fugindo ao princípio conservacionista, ou melhor, retroagindo no sentido do objetivo conservacionista. Somente desta forma se conseguirá atingir os objetivos propostos pelo conceito da Medicina da Conservação: Saúde Ambiental (conjunção entre Saúde Humana, Saúde Vegetal e Saúde Animal) e Saúde do Ecossistema (TABOR, 2002).

2.2 Classificação Taxonômica dos primatas Platyrrhinos

A classificação taxonômica dos chamados primatas “do novo mundo” (Platyrrhini)¹ é bastante controversa e ainda gera muita discussão a seu respeito, mesmo com a adoção do conceito de espécie filogenética, e com os estudos citogenéticos e moleculares (RYLANDS, MITTERMEIER & SILVA JR., 2011). Historicamente, dividia estes primatas eram divididos em duas grandes famílias: Callitrichidae e Cebidae. Anos se passaram, e Hershkowitz (1977) incluiu nessa classificação, uma terceira família (Callimiconidae) e Groves (2005) alterou significativamente essa divisão, ao sugerir a famílias para os platirrinos: Aotidae, Atelidae, Cebidae e Pitheciidae. Nenhum desses sistemas é considerado sob o ponto de vista filogenético, pois contêm um ou mais grupos não-monofiléticos. Rylands *et al.* (2000, 2006, 2009), Groves (2001a, 2005), Rylands & Mittermeier (2008), e Cortés-Ortiz (2009) apresentaram revisões na taxonomia dos primatas platirrinos.

Após o advento da análise e sequenciamento do DNA, e havendo maior suporte para recompilação dos dados, concluiu-se que, atualmente, existem descritas 152 espécies, e 204 espécies e subespécies de Platirrinos. A utilização do conceito de espécie filogenética, considerado mais prático e objetivo que o conceito de espécie biológica (GROVES, 2001a, 2004) tem sido responsável por muito do acréscimo do número de espécies, aliado a outras características, como comportamento, vocalização, etc., não mais limitando a pesquisa a quesitos fenotípicos (morfométricos, por exemplo). O uso da genética molecular estabelece estas diferenças filogenéticas às espécies, solucionando dúvidas, demonstrando a validade de diferenças entre espécies distintas, anteriormente classificadas como uma só espécie, e trazendo à tona “espécies críticas”.

Utilizando-se o conceito de espécie filogenética e compilando dados moleculares e de citogenética, os platirrinos foram subdivididos, mais recentemente, em 3 clados: (a) Atelidae, (b) Pitheciidae e (c) Cebidae (absorvendo os Callimicos, Callitriquídeos e *Aotus* spp.). Na atualidade, a lista da International Union for Conservation of Nature/Species Survival Commission (IUCN/SSC - Primate Specialist Group) totaliza 464 espécies e 676 espécies e subespécies de Primatas.

¹ Alguns pesquisadores consideram equivocada esta nomenclatura, porém, devido à ocorrência da mesma em muitas referências bibliográficas, foi mantida entre parênteses (Nota do Autor).

2.3 Família Atelidae (Gray, 1825)

Atelídeos correspondem às espécies que atingem as maiores massas corporais, dentre os Platyrrinos. Possuem uma cauda prênscil (Figura 1), que funciona como um quinto membro, auxiliando no equilíbrio durante sua movimentação. A fórmula dentária dos adultos é representada por $2 \text{ X } 1 \frac{2}{2}; \text{ C } 1/1; \text{ P } 3/3; \text{ M } 3/3$.

A família Atelidae é composta por 4 gêneros: *Alouatta* (bugios) compreendendo 10 espécies; *Ateles* (macacos-aranha) compreendendo 7 espécies; *Lagothrix* (macacos-barrigudos) representado por 4 espécies; e *Brachyteles* (muriquis), representado por 2 espécies (SCHNEIDER, 2000; OPAZO *et al.*, 2006; WILDMAN *et al.*, 2009).

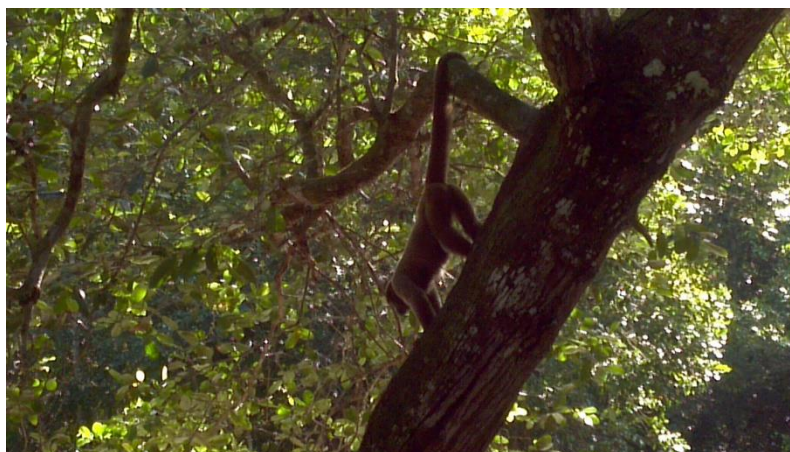


FIGURA 1. Imagem de um macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*) infante, utilizando a cauda prênscil como apoio.

2.4 Gênero *Lagothrix*

Os macacos-barrigudos (*Lagothrix* spp.) são primatas da família Atelidae, que ocupam alguns segmentos do território amazônico (Figura 2), abrangendo áreas nos seguintes países: Peru, Colômbia, Venezuela, Equador, Bolívia e Brasil (FOODEN, 1963).

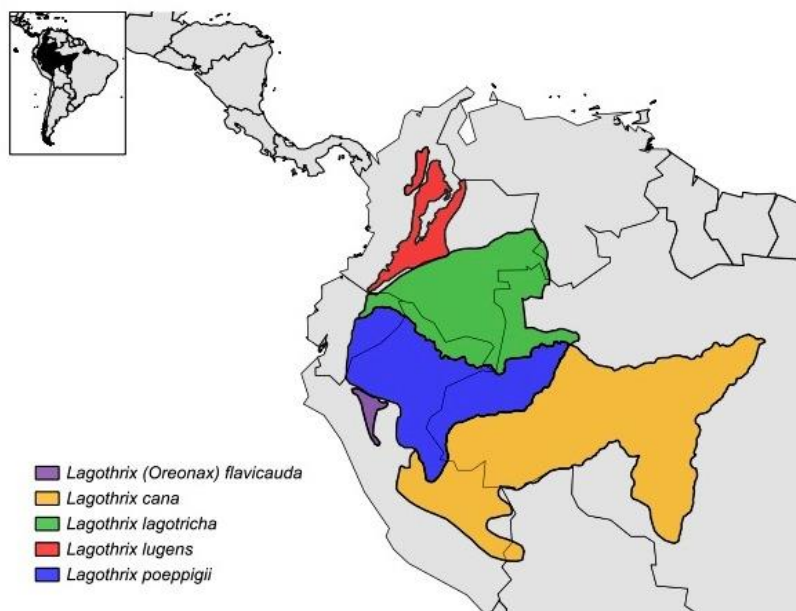


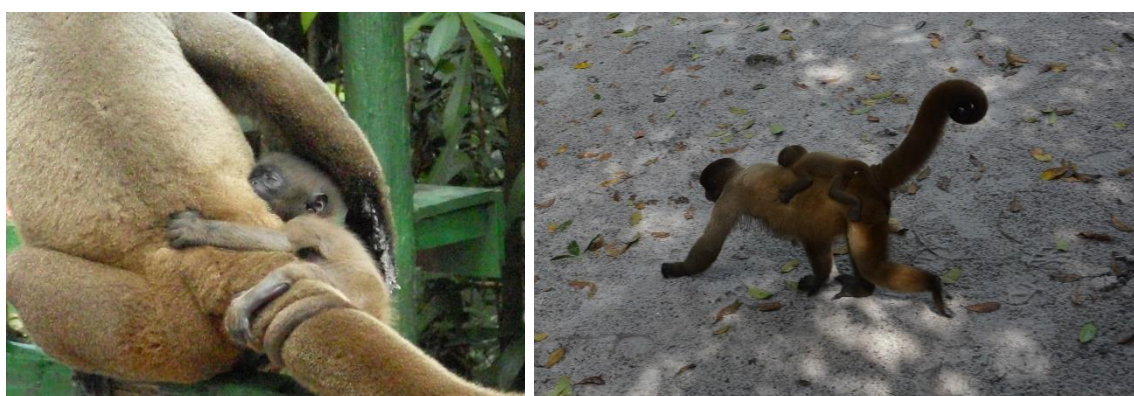
FIGURA 2. Distribuição geográfica dos cinco morfotipos reconhecidos atualmente de macacos-barrigudos. (Adaptado de A. Di Fiore et al. /Molecular Phylogenetics and Evolution)

O gênero contém espécies classificadas, segunda a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), em “Vulneráveis” (*L. lagotricha* e *L. poeppigii*), “Em Perigo” (*L. cana*) e “Em Perigo Extremo” (*L. lugens*), e como suas populações continuam decaindo, programas de manejo reprodutivo em indivíduos cativos são fundamentais como ferramenta para elaboração e execução de ações de conservação para estes gêneros. Apesar disso, a manutenção e a reprodução em animais cativos destas espécies têm se demonstrado muito difícil (ANGE-VAN HEUGTEN et al., 2008; MOONEY & LEE, 1999), e sua biologia reprodutiva e parâmetros históricos são pouco conhecidos (DI FIORE et al., 2010; MOONEY & LEE, 1999).

Na realidade, os registros clássicos sobre dados morfológicos remontam ao período entre 1930 e 1950 e, ainda assim, permanecem como fonte principal de citações em produções científicas, mesmo sabendo-se que a maioria está relacionado a Primatas do Velho Mundo, e em condições de cativeiro.

Macacos-barrigudos possuem hábitos diurnos (PERES, 1994). Ocupam principalmente áreas de floresta primária, circulando entre todos os níveis e dificilmente descem ao solo, pois bebem a água acumulada em folhas, bromeliáceas e outras estruturas vegetais. Formam grupos de até 40 indivíduos, mas existem relatos ocasionais de indivíduos solitários. Dormem nas copas das

árvores, em cima de galhos, mas não necessariamente em um mesmo local, quase sempre próximos às fontes de alimento. Geralmente, enquanto a maioria do grupo se alimenta, alguns indivíduos atuam como sentinelas contra eventuais predadores (ANDRADE et al., 2017). São primariamente frugívoros, e, portanto excelentes dispersores de sementes. O comportamento alimentar de aproximadamente 40 indivíduos, foi estudado durante 11 meses, na região de Tefé (Amazonas, Brasil), em 3298 registros de alimentação, constatando-se que a dieta se compõe principalmente por frutos maduros (83%) e sementes (7%). Pode ocorrer variação estacional, e em períodos em que há escassez de frutos a composição da dieta pode variar, incluindo folhas verdes, seiva e flores, sendo que alimentos de origem animal (artrópodes e outras presas) não constituem mais que 0,1% da ingesta (PERES, 1994). Bodmer e Robinson (2004), após estudar durante quatro meses o comportamento de 18 indivíduos semicativos, observaram que o descanso consome 45% do tempo, sendo forrageamento a atividade mais frequente (29%), seguido por deslocamento (23%), interações sociais (3%) e *grooming* (1%). A maturidade sexual ocorre entre cinco e oito anos, a gestação dura aproximadamente 225 dias, e o período de lactação varia entre nove meses e um ano, sendo que a expectativa de vida em cativeiro é de aproximadamente 25 anos (MAYOR et al., 2017). Somente as fêmeas carregam os filhotes (Figuras 3 e 4), primeiramente agarrados ao ventre e, após algum tempo de desenvolvimento, em suas costas (VOSS e FLECK, 2011).



FIGURAS 3 e 4. Imagens de uma fêmea lactente de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*), com filhote às costas.

Seus principais predadores são os grandes rapinantes, os grandes felídeos e os humanos, por serem muito apreciados como alimento por algumas

comunidades indígenas. Na região amazônica, a caça de animais selvagens é uma atividade tradicional, que visa prover as necessidades das populações locais em termos de alimentação de subsistência e outros itens (FITZ GIBBON, 1998), e os *Lagothrix* são os primatas mais frequentemente caçados na região Amazônica (PUERTAS e BODMER, 2004). Além da caça predatória, a destruição do habitat natural e o tráfico de exemplares para serem utilizados como *pets* contribuem para a diminuição substancial das populações em vida livre. A pressão antrópica é tão devastadora que já existem relatos de indivíduos transpondo os limites de sua distribuição geográfica original, numa tentativa de busca de um ambiente favorável para sua manutenção (NUNES e ORSINI, 2016). A escassez de maiores informações a respeito das características reprodutivas da espécie também constitui um fator limitante à execução de atividades de manejo com vistas ao repovoamento das áreas que ainda não foram degradadas (BODMER e ROBINSON, 2004).

A classificação taxonômica dos macacos-barrigudos, como a dos outros atelídeos, também é bastante controversa. Fooden (1963) propôs a existência de 2 espécies: *L. flavicauda*, para o macaco-barrigudo da cauda amarela (“yellow tailed wooly monkey”) e *L. lagotricha* para todas as demais, baseando-se em características como coloração, morfometria, e diferenças osteológicas que considerou qualitativas. Até hoje, ainda não se tem evidência adicional que prove a existência de 3 espécies como proposto primariamente por Groves (2001, 2005). No mesmo trabalho, Fooden (1963) agregou *L. flavicauda* à família Atelidae, porém, em gênero distinto de *Lagothrix*, como um gênero distinto. Essas variações taxonômicas dificultam a determinação da relação de *L. flavicauda* com outras espécies de *Lagothrix* e de outros Atelídeos. Posteriormente, estudos realizados por meio da análise do sequenciamento de genes mitocondriais (*mtCOI* e *mtCOII*) de 141 indivíduos de variadas espécies de *Lagothrix* (RUIZ-GARCÍA, PINEDO-CASTRO & SHOSTELL, 2014), obtiveram várias conclusões: (a) *L. flavicauda* apresentou diversidade genética igual a zero, enquanto que *L. poeppigii* e *L. lugens* apresentaram a maior diversidade genética, quando comparados entre si, e *L. lagotricha* e *L. cana* apresentaram um grau mais modesto de diversidade, quando comparadas as suas amostras; (b) A hipótese da ocorrência de duas espécies (*L. lagotricha* e *L. flavicauda*) se comprova a nível molecular, avaliando-se a introgressão genética

e a hibridização recente. Neste caso, *L. lagotricha* apresentaria 4 subespécies. Esta conclusão contraria a hipótese de Groves (2001) e corrobora a proposta de Fooden (1963); (c) *L. poeppigii* foi a primeira espécie dentre os indivíduos da espécie do táxon *L. lagotricha* que experimenta diversificação mitocondrial haplótipa, enquanto que *L. cana* e *L. lagotricha* apresentam essa diversificação, mais recentemente; (d) *L. poeppigii* e *L. lagotricha* foram os taxa que apresentaram a maior evidência de expansão populacional em diferentes períodos do Pleistoceno, enquanto *L. lugens* apresentou um declínio populacional nos últimos 25.000 anos. Isto demonstra a necessidade premente da realização de ensaios laboratoriais abrangendo o uso da genética molecular com finalidade de obter uma classificação taxonômica mais objetiva e precisa para as espécies em questão, e amplia significativamente os horizontes da pesquisa científica, na atualidade.

2.5 *Lagothrix cana* (Geoffroy, 1812)

A classificação taxonômica atual de *Lagothrix cana* é classificado atualmente como pertencente ao Reino Animalia, Filo Chordata, Classe Mammalia, Ordem Primates, Subordem Haplorrhini, Infraordem Simiiformes, Parvordem Platyrrhini, Família Atelidae, Subfamília Atelinae, Gênero *Lagothrix*, Espécie *Lagothrix cana* e possui vários nomes populares, entre eles: “macaco-barrigudo”, “macaco-barrigudo cinza”, e em alguns casos, é citado como “Geoffroy’s woolly monkey”.

O macaco-barrigudo dessa espécie possui uma pele grossa e densa, com coloração acinzentada e preta (Figura 5), em seus membros (ROWE, 1996). Apesar de seu grande tamanho e conformação robusta, os macacos-barrigudos são capazes de locomover-se habilmente sobre as árvores, com a ajuda de sua longa cauda prênscil.

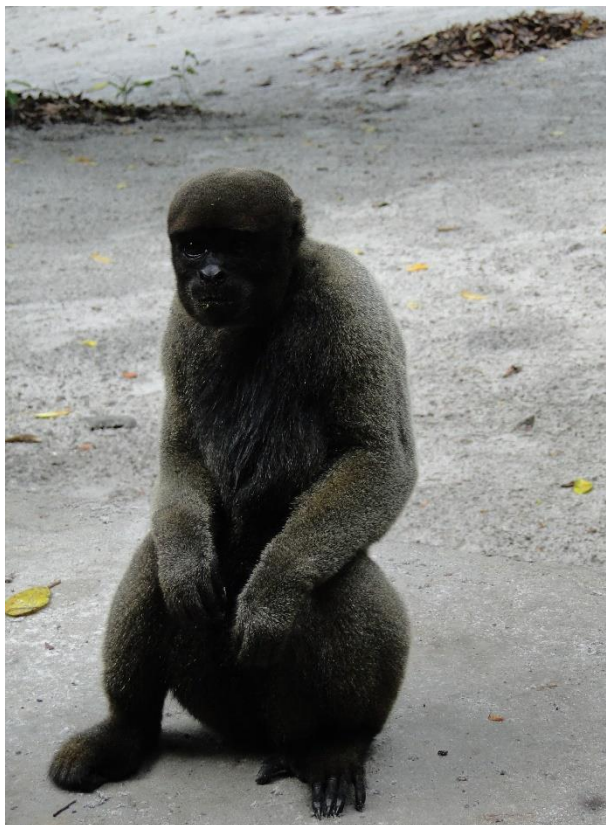


FIGURA 5. Imagem de um exemplar adulto de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*) evidenciando a coloração da pelagem dos membros.

A espécie está classificada como “Em perigo (EN)” na lista vermelha da IUCN, e, em geral, os machos são maiores que as fêmeas, podendo alcançar 65 cm, da cabeça à base da cauda e massa corporal de aproximadamente 9,5 Kg, enquanto que as fêmeas não ultrapassam 58 cm e 7,7 Kg. Atualmente existem 18 áreas de proteção que abrangem a espécie no Brasil, mas nenhuma ação de preservação contempla a utilização dos animais cativos em plantéis de Zoológicos e criadouros, com reintrodução de espécimes na natureza.

2.6 Contenção Farmacológica

A associação de anestésicos dissociativos a agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 é utilizada em medicina veterinária desde a década de 1960, e continua a ser o protocolo geral mais empregado na contenção farmacológica e anestesia injetável de animais selvagens (PACHALY & VOLTARELLI-PACHALY, 2011).

Dos anestésicos dissociativos, os mais comuns são a cetamina e a

tiletamina, fármacos que promovem sedação e analgesia por interromper a transmissão ascendente das porções cerebrais inconscientes para as conscientes, ao mesmo tempo em que produzem um estado cataléptico (PACHALY, 2000). O início da ação é rápido, e quando usados em conjunto com agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2, a indução geralmente é tranquila, sendo que os efeitos cardiovasculares dos agonistas são em parte compensados pelo agente dissociativo (MUIR, SKARDA & MILNE, 1977; MATTHEWS et al., 1993; PACHALY, 1994). É comum se observar um padrão respiratório apnéustico, caracterizado por uma pausa após a inspiração, podendo também ocorrer hipertonia muscular (LIN, 1996; LIN et al., 1992).

O cloridrato de tiletamina é um anestésico dissociativo mais potente que o cloridrato de cetamina, porém apresenta maior capacidade de causar convulsões (DINIZ, 1999). Por isso, é produzido sempre em associação a um potente benzodiazepínico, o zolazepam, que possui ação anticonvulsivante e miorrelaxante, minimizando as ações cataleptóides da tiletamina (DINIZ, 1999). A duração de ação da tiletamina é três vezes mais longa que a da cetamina, sendo mais eficaz na indução da anestesia em primatas e gatos que em outras espécies (BRANSON, 2003).

A utilização de agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 potencializa os efeitos da associação tiletamina-zolazepam, resultando em aumento do plano anestésico (SELMÍ et al., 2003). Tais fármacos são sedativos e causam depressão dose-dependente pela estimulação de receptores adrenérgicos alfa-2 no sistema nervoso, tanto central quanto periférico (CORTOPASSI, 2004). Os agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 atuam impedindo a liberação da noradrenalina, e não existindo quantidade suficiente de noradrenalina na fenda sináptica, a transmissão do impulso nervoso fica inibida (PACHALY, 2000). É importante frisar que se o paciente estiver previamente excitado ou sob situação de alto índice de estresse, o efeito farmacológico dos agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 fica diminuído, tanto isoladamente quanto em combinação com anestésicos (PACHALY, 2000).

A detomidina é um dos agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 atualmente mais utilizados na sedação e medicação pré-anestésica em equinos (CHAMBERS et al., 1993), outros autores, indicam-na para intervenções cirúrgicas na posição quadrupedal (FEITOSA et al., 1990). Também tem sido

usada em associação a diversos outros fármacos, aparentemente com pequenas diferenças em relação à xilazina, para sedação pré-anestésica (CLARKE & TAYLOR, 1986; MATTHEWS et al., 1991; MATTHEWS et al., 1993; FANTONI et al., 1999; PACHALY et al., 2011a). Existe aparentemente um “efeito platô” na sedação, sendo que um aumento da dose de detomidina pode melhorar a analgesia e aumentar a duração de seu efeito, mas não leva a um aumento concomitante na intensidade da sedação (JÖCHLE, 1989; PACHALY et al., 2011b). Em função do relativo aumento da potência e efeito prolongado de sua ação, pode ocorrer sedação residual (MATTHEWS et al., 1991; MATTHEWS et al., 1993; PACHALY et al., 2011a). Sua utilização, isoladamente ou em associação a outros fármacos sedativos e anestésicos, para contenção farmacológica de diversas espécies de mamíferos selvagens placentários não xenartros (PACHALY et al., 2011a). A associação denominada “ZAD” já foi utilizada para contenção farmacológica de leões (PACHALY & VOLTARELLI-PACHALY, 2011), quatis (PACHALY et al., 2013) e onças (OSILHEIRE et al., 2012), bem como em cães (CIANCA et al., 2014) e gatos domésticos (ANDO et al., 2015), além de pequenos roedores, como o hamster-sírio (PACHALY et al., 2014a).

Em anestesiologia, o sulfato de atropina é empregado para reduzir secreções do trato respiratório e das glândulas salivares, e para inibir os efeitos da estimulação vagal sobre os sistemas respiratório e cardiovascular (SOMA, 1971; SOMA & PENNEY, 1975). Age bloqueando o estímulo vagal induzido por respostas reflexas à tração de vísceras, à estimulação laríngea direta e o induzido por diversos agentes anestésicos e pré-anestésicos (SOMA & PENNEY, 1975; HOLZ, HOLZ & BARNETT, 1994). Tem também ação broncodilatadora, relaxando a musculatura lisa bronquial e traqueal, mas não produz alterações importantes na pressão sanguínea (SOMA & PENNEY, 1975). Diminui o peristaltismo e reduz a atividade secretora do trato digestório (MASSONE, 1988), e em muitas espécies produz midríase (SOMA & PENNEY, 1975). Sua utilização evita efeitos adversos dos agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2, como bradicardia, hipotensão e bloqueio atrioventricular (PACHALY, 1995).

Estando os animais submetidos à anestesia de campo, é fundamental a monitorização dos parâmetros vitais como frequência cardíaca e respiratória, e embora a frequência cardíaca diminua após a administração de agonistas de

receptores adrenérgicos alfa-2, geralmente retorna ao normal após a administração do anestésico dissociativo (LIN, 1992; PACHALY & VOLTARELLI-PACHALY, 2011; OSILHEIRE et al., 2012; PACHALY et al., 2013). Empregando a combinação de anestésicos dissociativos a agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2, também não é incomum, se observar padrão respiratório apnêustico, caracterizado por uma pausa após a inspiração (AUBIN & MAMA, 2002; LIN, 1996). Entretanto, à medida que a profundidade anestésica se torna menos intensa, a respiração se torna mais regular e laboriosa. Na avaliação da profundidade anestésica, essa mudança no padrão respiratório pode ser bastante útil, sendo que é pouco comum a necessidade de ventilação assistida quando são usadas as combinações de anestésicos dissociativos a agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 (AUBIN & MAMA, 2002). Também pode ocorrer hipertonia muscular (LIN, 1992).

Tradicionalmente, doses de fármacos são calculadas e expressas em quantidade por unidade de massa corporal (mg/kg). O emprego desse padrão metodológico, que usa proporcionalidade direta, pode levar a problemas graves relacionados com subdosagens ou dosagens excessivas, devido à grande disparidade de tamanhos e padrões fisiológicos encontrados em algumas espécies (PACHALY, 2006; PACHALY, 2009). O método de extrapolação alométrica, entretanto, calcula e expressa doses como quantidade por unidade de energia consumida por um determinado animal em situação de metabolismo basal (mg/kcal). Uma vez que absorção, distribuição e eliminação de todas as drogas ocorrem em função da taxa metabólica basal, o método alométrico permite, pelo conhecimento das taxas metabólicas basais de dois diferentes vertebrados, extrapolar matematicamente para um deles doses de medicamentos indicadas para outro, para o qual já tenham sido realizados estudos laboratoriais de experimentação farmacocinética e farmacodinâmica (PACHALY, 2006; PACHALY, 2009). O objetivo prático mais evidente, em medicina veterinária, é a extrapolação das doses de drogas entre animais de formas, tamanhos e massas diferentes, possibilitando o uso de dados farmacológicos obtidos em um animal-modelo, para o qual o fármaco foi desenvolvido e estudado, para a farmacoterapia em um animal-alvo, que pode ser qualquer paciente doméstico ou selvagem (PACHALY, 2006; PACHALY, 2009; SEDGWICK & POKRAS, 1988).

No que tange, especificamente à contenção farmacológica de primatas não-humanos, a associação de anestésico dissociativo, benzodiazepínico, atropina e agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 já havia se mostrado efetivamente segura para procedimentos semelhantes aos que foram objeto deste estudo, quando na ocasião, a xilazina, foi a droga utilizada como representante da classe dos agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 (CARNEIRO, 2011; PACHALY et al., 2011b).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo capturar indivíduos cativos da espécie *Lagothrix cana* para validação de um protocolo anestésico factível para o manejo e manipulação dos mesmos, colher e armazenar amostras biológicas e realização de pequenos procedimentos.

3.2 Objetivos Específicos

Padronizar um método confiável de extração de DNA, para as amostras colhidas, para posterior análise e sequenciamento genético, abordando: a caracterização gênica, análises gênicas para características taxonômicas parentais, bem como confrontar os resultados com os dados referentes à espécie, que constam na literatura especializada. Isto irá fomentar a retroalimentação científica e servir de referência para futuras ações, no âmbito da reprodução e conservação da mesma.

Comparar os resultados com outros dados referentes a outras espécies de Primatas Atelídeos, dentro e fora do Gênero *Lagothrix*, com vistas a avaliar a distância filogenética, entre as mesmas.

3.3 Autorizações

Este projeto se encontra registrado no Instituto de Pesquisa, Estudos e

Ambiência Científica da Universidade Paranaense (IPEAC/UNIPAR), sob nº 20.047/2011, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (CEUA/FMVZ – UNESP), sob número de registro geral 174/2015. Seu número de Registro, junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), é o nº 52027, e seu cadastro, junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGen), é o A98EF86, na categoria Acesso ao Patrimônio Genético.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Local

Os animais foram submetidos aos procedimentos no Centro de Triagem de Animais Selvagens (CETAS) Sauim Castanheiras e nas instalações da Fundação Floresta Viva, no município de Manaus (AM). As amostras foram trazidas ao Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UNESP, *campus* Botucatu – Laboratório de Genética Animal para a realização das análises genéticas.

4.2 Animais

Para este estudo, preliminarmente, foram capturados, aproximadamente 21 indivíduos, supostamente pertencentes à espécie *Lagothrix cana*, provenientes dos plantéis do CETAS Sauim Castanheiras (Prefeitura Municipal de Manaus – AM e da Fundação Floresta Viva (Manaus – AM), para realização de procedimentos de rotina

O protocolo para esta contenção utilizado foi a base de solução de sulfato de atropina + cloridrato de detomidina + cloridrato de tiletamina + cloridrato de zolazepam (“ZAD-50”). Os animais foram contidos por injeção intramuscular profunda, após contenção física em puçá/rede ou por dardos pressurizados propelidos por zarabatana (Figuras 6 e 7), conforme PACHALY et al. (2011). O método de planejamento terapêutico de doses de fármacos utilizado foi o da

extrapolação alométrica interespecífica (PACHALY, 2009).



FIGURA 6. Imagem do procedimento prévio à contenção de um macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*) adulto, por meio da utilização de zarabatana para propulsão de dardo artesanal pressurizado contendo a solução ZAD-50.

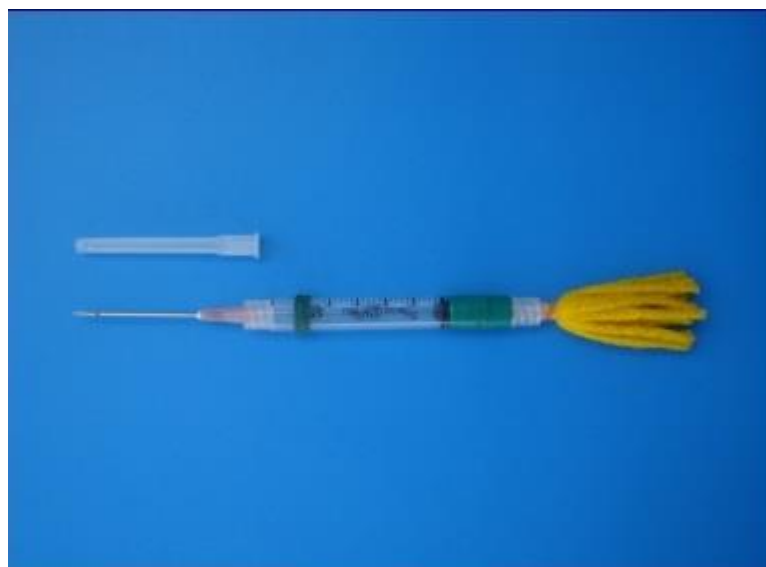


FIGURA 7. Imagem de dardo confeccionado artesanalmente para execução de captura de macacos-barrigudos (*Lagothrix cana*). Fonte: Prof. Luiz Paulo Cobra Monteiro Filho.

Foram realizados os procedimentos de captura, transporte, exame físico, marcação por microchip, colheita de amostras de sangue, tratamento de feridas contaminadas e suturas cutâneas, procedimentos odontológicos (periodontia, exodontia, endodontia e dentística restauradora). Os machos foram submetidos a deferentectomia, com o protocolo associado a anestesia local. Após a punção

da veia braquial (Figura 8), as amostras de sangue foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo anticoagulante (EDTA) (Figura 9) e acondicionadas em caixa térmica contendo gelo reciclável, e posteriormente congeladas e mantidas a uma temperatura média de -25°C .



FIGURA 8. Venopunção da veia braquial para colheita de sangue em macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*).



FIGURA 9. Tubo de ensaio contendo anticoagulante (EDTA), após colheita de amostra de sangue de exemplar de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*).

Os animais foram monitorizados durante todo o período anestésico (figura 10), com atenção especial ao retorno de reações conscientes, retorno da reação postural de endireitamento (RPE), e o retorno à ambulação normal, para serem liberados aos recontos. Os dados eram todos anotados em fichas anestésicas individuais (Figura 11).



FIGURA 10. Exemplar adulto de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*) sendo monitorado quanto à temperatura corporal e oximetria de pulso.

02


 982009106557992

Projetos de Pesquisa – ANESTESIOLOGIA EXPERIMENTAL – Prof. Marcelo Rocha Carneiro, M.V., M.Sc.

FICHA ANESTESIOLOGICA PADRONIZADA RESUMIDA	Cão[] Gato[] Cavalo[] Muar[] Bovino[] Caprino[] Ovino[]
	Selvagem: <u>Macaco Barrigudo</u> Brinco[] Chip[]
	Nome científico: <u>Lagothrix cana</u>
	Nome popular: <u>Macaco Barrigudo</u>

Cidade: Menezes Proprietário: Fundação Floresta Viva ZOO [] Criatório [X]

Data: 15/01/2015 Peso estimado: 3,5 Kg Aluno(s) Encarregado(s): Teixeira Guimarães Nogueira

Peso Real: 4,250 Kg Sexo: M [] F [X] Manhã [] Tarde [X] Temperatura Ambiente: 28 °C

Hora da Injeção: 2:15 Perda da R.P.E.: 2:17 Início da Anestesia: _____

Reações Conscientes: 46 min Retorno da R.P.E.: _____ Retorno Ambul. Norm.: _____

Droga	Dose em ml	Droga	Dose em ml
Zoletil: 50[] 166.6[]		Atropina 0,05[] 1%[]	
Detomidina / tabela		loimbina 0,25[] 1%[]	
Cetamina – (S ⁺)		Azaperone	
Xilazina		<u>EAD-50</u>	<u>0,275 + 0,25</u>

Tempo	F.Card. (x 4)	F.Resp. x 4	Temp. (°C)	pSO ₂	P. A.	Dados Anestesiológicos			Observações Clínicas
Prévio	—	—	—	—	—	Miorrelax A - B - C	Sensibilid M.Torácic A - B - C	Sensibilid M.Pélvico A - B - C	
5	152	36	38,9			A	A	A	
10	132	52	39	83	^{18/12} 130	A	A	A	
20	132	48	38,5	85	^{18/12} 134	A	B	A	17' + 0,25
30	132	48	38,1	83	^{18/12} 134	A	A	A	
40	132	44	37,5	88	^{18/12} 130	A	B	A	
50									
60									
70									
80									
90									
100									
110									
120									
130									
140									
150									

Atenção: Preencha a ficha com a maior clareza possível. Se necessário, anote dados adicionais no verso →

FIGURA 11. Exemplo de ficha anestésica utilizada na monitorização de macacos-barrigudos (*Lagothrix cana*), durante o trabalho de pesquisa.

4.3 Extração de DNA e avaliação da qualidade do material obtido

No laboratório, as amostras foram descongeladas e a extração de DNA total foi realizada por meio da técnica empregando fenol/clorofórmio, segundo

protocolo descrito em Sambrook e Russel (2001).

A quantidade e a qualidade do DNA foram avaliadas em espectrofotômetro (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific), por meio de absorbância a 260-280 nm e, em gel de agarose a 1,0%, corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1 µL/10mL) imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA) e visualizados em digitalizador de imagens, sob luz ultravioleta.

4.4 Reação de amplificação (PCR) e purificação do produto

Para a determinação da(s) espécie(s) referente às amostras colhidas, empregou-se segmentos da região controladora do DNA mitocondrial (D-Loop) e do COII, obtidos utilizando os *primers* L15400 (5' - TCCACCATTAGCACCCAAAG-3') e H15940 (5' - CCTGAAGTCGGAACCAGATG-3') (KOCHER et al., 1989), L6955 (5'-AACCATTTTCATAACTTTGTCAA-3) e H7766 (5'-CTCTTAATCTTTAACTTAAAAG-3) (ASHLEY e VAUGHN, 1995; COLLINS e DUBACH, 2000), respectivamente.

As reações de amplificação (PCR - Polymerase Chain Reaction) foram feitas em um volume final de 11 µl, contendo:

- 5 µl de água milliQ autoclavada;
- 4 µl de GoTaq (Promega) (mix pronto 1x contendo 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA Polimerase);
- 0,5 µl de cada primer (10 µM);
- 1 µl de DNA (20-50 ng/µL)

As condições de amplificação para o mtCOII foram as seguintes: desnaturação inicial a 95° C, por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95° C, por 30 segundos; 50° C por 30 segundos e 72° C, por 30 segundos, com um passo final de extensão a 72° C, por 5 minutos.

As condições de amplificação, para a região controle, foram as seguintes: desnaturação inicial a 95° C, por 10 minutos, seguida de 35 ciclos a 94° C, por

35 segundos; 55° C, por 35 segundos e 70° C, por 30 segundos, com um passo final de extensão a 72° C, por 10 minutos.

O rendimento do produto da amplificação foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 1,5% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com Gel Red™ e visualizado em transluminador, sob luz ultravioleta.

Posteriormente, cerca de 5 µl de cada produto de amplificação foi purificado com a adição de 0,5 µl de fosfatase alcalina de camarão (1 U/µl) (Affymetrix, Inc.) e 0,4 µl de exonuclease I (10 U/ µl) (Affymetrix, Inc.) e incubado por 45 minutos a 37° C. Feito isto, este foi incubado a 80° C, por 15 minutos.

4.5 Sequenciamento Nucleotídico

As reações de sequenciamento do produto de PCR foram realizadas pelo sequenciador Applied Biosystems 3500 no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu. Os produtos de amplificação foram sequenciados nos sentidos direto e reverso para garantir uma maior confiabilidade dos resultados.

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Para cada reação, foram utilizados 1,2 µl de solução Big Dye, 1 µl de primer (10 µM) e 5 µl do produto mitocondrial. As reações foram colocadas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96° C, por 1 minuto; seguida de 25 ciclos a 96° C, por 10 segundos; 50° C, por 30 segundos e 60° C, por 4 minutos; com um passo final de extensão a 72° C, por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 4 µl de água MilliQ autoclavada e 16 µl de etanol 95%. A solução foi misturada em agitador de tubos e mantida por 15 minutos à temperatura ambiente (~25° C). A amostra foi centrifugada por 30 minutos, a 12000 rpm e o sobrenadante retirado. O precipitado foi lavado com cerca de 200 µl de etanol 70%, e a solução foi misturada em um agitador de tubos e novamente centrifugada por 7 minutos, a 12000 rpm. A amostra foi seca a 90° C, durante 2 minutos e mantida a -20° C.

O produto do sequenciamento foi dissolvido em 1,6 µl de formamida:dextran azul 25 mM EDTA (5:1), ressuspenso e desnaturado por 2 minutos a 90° C, em banho seco. As sequências das duas fitas de DNA de cada

amostra foram editadas e alinhadas no programa Sequence Navigator (Applied Biosystems).

4.6 Análise dos dados / Edição e Alinhamento das Sequências

A visualização dos eletroferogramas da sequência nucleotídica dos fragmentos de DNA mitocondrial foi realizada por meio do programa computacional Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, 2007), o qual permite a leitura de diversas extensões do sequenciamento. A amplitude e os espaçamentos dos picos foram devidamente observados para atestar a qualidade das sequências e verificar se as mutações eram reais ou se poderiam ser artefatos da técnica do sequenciamento.

Utilizando o programa computacional Geneious 4.8.5 (DRUMMOND et al., 2009), as sequências obtidas no Chromas Lite 2.01 foram editadas e alinhadas e os respectivos eletroferogramas verificados. Cada resultado foi analisado individualmente e comparado ao seu respectivo eletroferograma pelo menos duas vezes. Os alinhamentos foram realizados utilizando a ferramenta (algoritmo) MUSCLE do programa Geneious 4.8.5 (EDGARD, 2004). Os alinhamentos foram também verificados manualmente, pelo menos duas vezes, e comparados aos seus eletroferogramas para a certificação da posição de bases nitrogenadas nas sequências obtidas. Para confirmar a identidade das sequências foi utilizado o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al. 1990), através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), o qual relaciona sequências por meio de similaridade entre bases nitrogenadas. Todas as amostras foram alinhadas entre si gerando um arquivo que foi utilizado na realização de testes estatísticos posteriores.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quanto ao protocolo de contenção farmacológica

Os animais perderam expressivamente a RPE em $2,52 \pm 0,74$ MPI, e

apresentaram início da anestesia aos $3,57 \pm 0,74$ MPI. O retorno de reações conscientes foi observado em $102,0 \pm 66,72$ MPI, com recuperação da RPE, aos $118,0 \pm 62,46$ MPI, e retorno à ambulação normal aos $237,5 \pm 3,53$ MPI. Os dados referentes aos parâmetros fisiológicos frequência cardíaca, frequência respiratória, saturação parcial de oxigênio (SpO_2) e temperatura retal aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos do período anestésico são apresentados na Tabela 1. A análise global da frequência cardíaca mostrou redução significativa ($p < 0.05$) com relação ao passar do tempo e ponto de redução pontual mais crítica entre 10 e 60 MPI ($p = 0,0248$). A frequência respiratória não mostrou diferença significativa em nenhum dos momentos da anestesia. Já no que se diz respeito à temperatura retal, observou-se queda global significativa ($p < 0.05$) a partir de 10 MPI, com a redução pontual mais crítica entre 40 e 50 MPI ($p < 0,05$). Finalmente, a saturação parcial de oxigênio não apresentou diferenças globais significativas durante todo o período anestésico. Houve, no entanto, diferença significativa pontual dos valores obtidos entre 30 e 60 MPI ($p = 0,0334$).

QUADRO 1. Frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e saturação parcial de oxigênio (SpO_2) de 21 primatas adultos da espécie *Lagothrix cana*, submetidos a contenção farmacológica e anestesia dissociativa de campo pela associação de Zoletil®, Atropina e Detomidina ("ZAD-50"), em doses calculadas por meio de extrapolação alométrica interespecífica (média $\pm$ desvio padrão).

Minutos pós-injeção	Frequência Cardíaca (bpm)	Frequência Respiratória (mpm)	Temperatura retal ($^{\circ}C$)	SpO_2 (%)
10	147 ± 29	51 ± 14	$39,0 \pm 0,7$	89 ± 4
20	143 ± 14	50 ± 10	$38,9 \pm 0,8$	88 ± 4
30	141 ± 13	48 ± 10	$38,7 \pm 0,8$	87 ± 4
40	139 ± 15	48 ± 11	$38,3 \pm 1,0$	84 ± 8
50	141 ± 25	51 ± 15	$38,0 \pm 1,0$	84 ± 11
60	131 ± 14	47 ± 12	$37,8 \pm 1,2$	87 ± 10

(mpm = movimentos por minuto; bpm = batimentos por minuto)

A frequência cardíaca, na avaliação estatística pelo teste de Spearman, mostrou moderada correlação negativa significativa com o tempo ($r_s = -0,6$; $p = 0,0003$), ou seja, diminuindo conforme passava o tempo. Quanto à frequência respiratória, a análise dos dados pelo teste de Spearman mostrou fraca

correlação negativa significativa entre o tempo e a frequência respiratória ($r_s = -0,3$, $p = 0,02$). No que diz respeito à temperatura retal, houve forte correlação negativa com o tempo ($r_s = -0,9$, $p = 0,0001$), diminuindo intensamente conforme passava o tempo. No que tange à saturação parcial de oxigênio, não houve correlação pelo teste de Spearman ($p = 0,38$).

A qualidade da contenção farmacológica, da analgesia e do miorrelaxamento foi considerada excelente, e durante anestesia, os parâmetros fisiológicos apresentaram características compatíveis com o esperado. Não houve variação na frequência respiratória, enquanto a frequência cardíaca se manteve estável na maior parte do tempo anestésico, apresentando uma diminuição dos batimentos entre 10 MPI e 60 MPI, podendo estar relacionada com o estresse prévio à contenção, que favorece o aumento da frequência cardíaca. A temperatura retal caiu progressivamente a partir de 10 MPI e a saturação parcial de oxigênio não apresentou diferenças significativas durante a anestesia. A qualidade da recuperação foi considerada excelente em todos os casos.

5.2 Quanto à obtenção do material biológico

Quanto à extração do DNA, foram colhidas um total de 21 amostras biológicas provenientes do CETAS Sauim Castanheiras e da Fundação Floresta Viva, durante o todo o período.

A quantificação e a verificação da integridade das amostras de DNA foram feitas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific. Esse equipamento quantifica o DNA total contido em cada amostra individual, além de verificar se há contaminação por proteína por meio da razão de absorbância da luz na faixa de 260/280 nm (Quadro 2).

QUADRO 2. Relação de amostras obtidas de macacos-barrigudos (*Lagothrix cana*) submetidas à avaliação de integridade das amostras e quantificação de DNA.

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO DE DNA (ng/μL)	ABSORBÂNCIA 260/280
3	22,0	1,25
6	20,0	1,40
35	28,4	1,53
83	30,9	1,88
89	18,0	1,32
110	43,9	1,87
111	12,9	1,50
138	10,8	1,41
164	5,8	1,39
216	21,9	1,65
291	25,8	1,83
341	16,2	1,30
371	30,9	1,48
484	48,9	1,88
623	16,7	1,53
629	39,1	1,94
676	23,4	1,80
699	8,6	1,24
798	35,3	2,00
841	5,3	1,33
850	38,6	1,35
860	27,7	1,19
873	6,9	1,63
891	28,1	1,96
992	19,0	1,31

Os genes mitocondriais COII e *D-Loop* foram amplificados por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) empregando amostras de DNA obtidas a partir de 19 indivíduos. Na amplificação do gene COII utilizando os *primers* L6955 e H7766 (COLLINS e DUBACH, 2000) a reação foi positiva para 10 indivíduos (003, 006, 089, 098, 110, 629, 699, 873, 922, 992), gerando fragmentos de aproximadamente 700pb (pares de bases). Na amplificação do gene *D-Loop* empregando os *primers* L15400 e H15940 (ASHLEY e VAUGHN, 1995) a reação foi positiva para 09 indivíduos sendo os mesmos elencados para o marcador mitocondrial COII com exceção do indivíduo 922, gerando fragmentos de aproximadamente 500pb.

Os resultados do sequenciamento foram analisados no programa computacional Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, 2007) a fim de verificar

a qualidade das leituras das sequências de DNA obtidas. A amplitude e os espaçamentos dos picos foram devidamente observados verificando se as mutações eram reais ou se poderiam ser artefatos da técnica do sequenciamento.

Subsequente a essa análise, as sequências obtidas para os genes COII e *D-Loop* foram alinhadas e as sequências consensos de 567pb e de 429pb respectivamente, foram submetidas a comparações com demais sequências de DNA mitocondriais depositadas no GenBank por meio do método de algoritmo de BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990).

Na comparação do alinhamento das sequências obtidas para o fragmento do gene mitocondrial COII entre os 10 animais analisados com as sequências depositadas no GenBank para as espécies *Lagothrix cana*, *L. lagothricha* e *L. poeppigii* observou-se 100% de similaridade com *Lagothrix cana* confirmando assim que esses animais são comprovadamente pertencentes a esta espécie. A comparação dessas sequências nucleotídicas permitiu determinar 8 sítios variáveis entre as espécies *L. cana* e *L. lagothricha* e de 9 sítios variáveis entre *L. cana* e *L. poeppigii* (Tabela 1).

TABELA 1. Sítios variáveis em 567 pares de bases do gene COII do DNA mitocondrial em *Lagothrix cana*, *L. lagothricha* e *L. poeppigii*

	Sequências											
	3	3	6	3	3	4	4	4	4	5	5	
	0	9	9	2	9	1	3	7	7	1	3	
Indivíduos				1	9	5	2	1	7	9	4	
<i>L. cana</i>	T	T	A	T	T	T	T	C	C	A	C	
003	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
699	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
873	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
922	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
629	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
110	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
006	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
089	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
098	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
992	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>L. lagothricha</i>	C	.	G	C	C	C	C	.	T	.	T	
<i>L. poeppigii</i>	.	C	G	C	C	C	C	T	T	G	.	

Apresenta-se na tabela 2 a comparação das sequências nucleotídicas já descritas no quadro 1, porém incluindo a espécie *Ateles fusciceps*, (macaco-aranha). Esta comparação teve, por intuito, mostrar o maior número de polimorfismos (58) quando alinhamos sequências oriundas entre 2 gêneros distintos que, neste caso são *Lagothrix* e *Ateles*.

TABELA 2. Sítios variáveis em 567 pares de bases do gene COII do DNA mitocondrial em *Lagothrix. Cana* e *Ateles fusciceps*

		Sequências																
		3	1	3	3	6	6	7	8	9	9	1	1	1	1	1	1	1
			8	0	9	2	9	5	5	3	9	1	2	2	3	3	5	5
													1	0	7	5	8	6
																	9	2
																	5	
Indivíduos																		
<i>L. cana</i>		T	C	T	T	C	A	A	T	C	T	T	T	G	C	C	A	T
<i>A. fusciceps</i>		C	T	.	.	A	.	T	C	T	C	C	C	A	T	T	T	C

		Sequências																
		1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		7	8	8	8	8	9	9	1	1	2	2	2	3	6	7	8	9
		8	0	6	7	9	2	5	3	6	0	5	8	7	7	9	2	1
Indivíduos																		
<i>L. cana</i>		T	G	C	C	G	C	G	A	C	T	A	T	T	T	A	C	C
<i>A. fusciceps</i>		C	A	T	T	A	T	A	G	T	C	C	C	C	C	G	T	T

		Sequências																
		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4
		2	2	3	5	5	6	6	9	9	9	0	1	1	3	4	5	5
		1	7	6	4	7	6	9	0	3	9	5	1	5	2	7	1	2
Indivíduos																		
<i>L. cana</i>		T	A	T	C	T	T	T	T	G	T	C	T	T	T	C	A	C
<i>A. fusciceps</i>		.	T	C	T	C	C	A	C	A	C	A	C	.	.	T	G	T

Sequências	
	4 4 4 4 5 5 5 5 5 5
	7 8 8 9 0 1 1 3 4 6
	7 3 7 8 4 6 9 4 6 1
Indivíduos	
<i>L. cana</i>	C C T A T T A C C C
<i>A. fusciceps</i>	. T C G A C . T T T

Para o gene mitocondrial *D-Loop* não foi encontrada sequência depositada no GenBank para o *Lagothrix cana*. Na comparação do alinhamento das sequências obtidas para este fragmento entre os 09 animais analisados observou-se um total de 05 polimorfismos distribuídos em 04 haplótipos (Tabela 3). Estes resultados serão submetidos ao banco de dados GenBank de forma a disponibilizá-los publicamente para pesquisas futuras. Observa-se que o haplótipo 2 formado pelos animais 089, 6873, 110, 699, 992 foi o mais frequente representando cerca de 55,6% das amostras analisadas.

TABELA 3. Sítios variáveis em 429 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (D-Loop) em 09 indivíduos da espécie *Lagothrix cana*

	8 1 1 2 3
	2 1 1 5 0
	4 5 6 0
Indivíduos	
003	C G G C A
098	
089	T A . T G
873	T A . T G
110	T A . T G
699	T A . T G
992	T A . T G
006	. A A T G
629	T A A . .

A região controle do DNA mitocondrial, que inclui o gene D-Loop bem como os genes citocromo B (CytB) e citocromo C oxidase (COI, II e III) têm sido as sequências mais utilizadas para identificar e catalogar espécies, discriminar subespécies, estudar evolução em espécies domésticas, silvestres e selvagens. O projeto internacional conhecido como DNA *Barcoding of Life* lançado no ano de 2005 objetivou inicialmente, gerar sequências de aproximadamente 648 pb do gene mitocondrial COI como ferramenta de auxílio em filogenética e catalogação da biodiversidade. Contudo, a melhoria tecnológica proporcionou um aumento de escala nos estudos mitocondriais proporcionando um avanço considerável.

Um dos primeiros trabalhos em primatas empregando os marcadores mitocondriais COII é o de Ashley & Vaughn (1995). Com a finalidade de esclarecer aspectos da história evolutiva no gênero *Aotus* foram obtidas amostras de DNA de 03 possíveis espécies - *A. lemurinus*, *A. nancymae* e *A. azarae*. Após a comparação das sequências obtidas para este gene, os resultados indicaram níveis altos de divergência nesta sequência nucleotídica para as 3 espécies sugerindo assim que os táxons são geneticamente bem distintos e que provavelmente passaram por longos períodos de evolução isolada.

Ruiz-Garcia & Pinedo (2010), propuseram a primeira hipótese de sistemática molecular sobre a origem e evolução do táxon *Lagothrix* com base na análise dos 720pb do gene mitocondrial COII obtidas a partir de amostras de 97 indivíduos. Os autores concluíram que todas as formas atuais de *Lagothrix* sp., provavelmente descenderam do ancestral *L. poeppigii* ou talvez, de forma menos provável, de *L. lugens*. Ruiz-Garcia et al. (2014) sequenciaram os genes COI e COII de 141 espécimes de *Lagothrix* sp. neotropicais e propuseram, a partir dos dados moleculares, uma nova proposta de classificação desse gênero.

O emprego do marcador molecular COII nesta pesquisa visou, principalmente, a confirmação de qual ou quais espécies pertenciam cada um dos indivíduos analisados considerando o gênero *Lagothrix*. Ou seja, a caracterização gênica individual para este gene é uma importante etapa na elaboração de um plano de reintrodução de indivíduos ou de reprodução, evitando principalmente a formação de híbridos. Conforme apresentado no quadro 1, todos os 10 indivíduos analisados pertenciam à espécie *Lagothrix cana*.

Averiguando os resultados descritos nas tabelas 1 e 2, destaca-se a eficácia deste marcador para a identificação de espécies.

6 CONCLUSÕES

Quanto à contenção farmacológica, em todos os animais foi plenamente satisfatória. Não foram observadas reações adversas e os parâmetros vitais avaliados mantiveram-se dentro de padrões compatíveis com o estado de contenção farmacológica e com o retorno à vida normal.

A combinação “ZAD-50” tem volume final de 3,0 ml após o preparo, estando os fármacos tiletamina, zolazepam, atropina e detomidina associados em alta concentração. Esse método simplifica enormemente o trabalho veterinário com mamíferos selvagens, como os primatas do porte da espécie *Lagothrix cana*, possibilitando a captura de cada animal empregando-se um único dardo de pequeno volume. Como exemplo, a contenção farmacológica de um macho adulto pesando 8,8 kg se faz com um volume de 0,54 ml de ZAD-50.

O método de contenção farmacológica mostrou-se seguro e eficiente para procedimentos de captura, transporte, exame físico, marcação por microchip, colheita de amostras de sangue e urina, curativos, tratamento de feridas contaminadas e suturas cutâneas, procedimentos cirúrgicos e odontológicos, incluindo periodontia, exodontia, endodontia e dentística restauradora.

Quanto à análise genética, este trabalho conseguiu padronizar uma sequência de genes no segmento D-Loop, que caracteriza a espécie *Lagothrix cana*, e que deve ser adicionada ao Gen Bank, para fornecer subsídios em eventuais pesquisas subsequentes, relacionadas a assuntos tais quais filogenia, evolução, biodiversidade, reprodução em cativeiro, entre outros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILER, W., MEYERS, E.W., LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 403-410 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

ANDO, M.R.; CIANCA, R.C.; BELETTINI, S.T., VOLTARELLI-PACHALY, E.M., SOUZA, M.V.F.; PACHALY, J.R. Novo método para contenção farmacológica e anestesia de campo em gatos domésticos (*Felis catus*), empregando a fórmula “ZAD-50” (Zoletil/50® + Atropina + Dormiun-V®). *MEDVEP*. V. 13, N. 43, p. 54-61, 2015.

ANDRADE, R.S., MONTEIRO, F.O.B., EL BIZRI, H.R., VICENTE, R.R., GUIMARÃES, D.A., MAYOR, P. Fetal development of the Poeppig's woolly monkey (*Lagothrix poeppigii*)s woolly monkey (*Lagothrix poeppigii*), *Theriogenology*, Volume 110, p. 34-43, 2017.

AQUINO, R. AND ENCARNACIÓN, F. 1994. *Primates of Peru / Los Primates del Perú*. Primate Report 40: 1-127.

ASHLEY, M.V.; VAUGHN, J.L. Owl monkeys (*Aotus*) are highly divergent in mitochondrial Cytochrome c Oxidase (COII) sequences. **International Journal of Primatology**, v.16(5), p. 793-806, 1995.

AUBIN, M.L., MAMA, K. Field anesthetic techniques for use in horses. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 2002; 24(5):411-417.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution** (Second Edition). Sinauer, Sunderland, MA, 684 pp. 2004.

BODMER, R., ROBINSON, J., 2004. Evaluating the sustainability of hunting in the Neotropics. In: SILVIUS, K., BODMER, R., FRAGOSO, J.M.V. (Eds.), *People in Nature. Wildlife conservation in South and Central America*. Columbia University Press, New York, pp. 199–323.

BOUBLI, J.-P., DI FIORE, A., RYLANDS, A.B. & WALLACE, R.B. 2008. *Lagothrix cana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T39925A10288721. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T39925A10288721.en>. Downloaded on 16 November 2015.

BOORE, J.L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.27, n. 8, p.1767-1780, 1999.

BRANSON, K.R. 2003. Anestésicos injetáveis. In: ADAMS H.R. (ed.), **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p.179-223.

BROOKFIELD, J.F.Y. A simple new method for estimating nell allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, v. 5, 453-455, 1996.

BROWN, T.A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 4º Ed. Artmed: Porto Alegre, 2003.

CARNEIRO, M. R. Contenção Farmacológica e Anestesia de Campo em Primatas da Subfamília Cercopithecinae empregando a Fórmula "ZAX-50" (Zoletil 50 + Atropina + Xilazina). Dissertação de Mestrado. Programa de Mestrado em Ciência Animal. Universidade Paranaense - UNIPAR. Umuarama, PR. 2011.

CARTAGENA B.S.M, THIERRY, R.G. CRAVO-MOTA, M. e BEZERRA, B.M.. (2017). Activity budget and social interactions in semi-captive gray woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha cana*) living in an ex situ conservation area in Central Amazonia: Behavior of Gray Woolly Monkeys. *Zoo Biology*. 36. 21-29. 10.1002/zoo.21333.

CHAMBERS J.P., LIVINGSTON A, WATERMAN AE, GOODSHIP A E. Analgesic effects of detomidine in thoroughbred horses with chronic tendon injury. *Research in Veterinary Science* 1993;54(1):52-56.

CIANCA, R. C. ; ANDO, M.R. ; BELETTINI, S.T. ; VOLTARELLI-PACHALY, E.M. ; SOUZA, M.V.F. ; PACHALY, J. R. . Novo método para contenção farmacológica e anestesia de campo em cães domésticos (*Canis familiaris*), empregando a fórmula "ZAD-50" (Zoletil/50® + Atropina + Dormiun-V®). MEDVEP. Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação, v. 12, p. 150-158, 2014.

CLARKE K, TAYLOR P. Detomidine: A new sedative for horses. *Equine Veterinary Journal* 1986;18(5):366-370.

COLLINS, A.C.; DUBACH, J.M. Phylogenetic relationships of spider monkeys (*Ateles*) based on mitochondrial DNA variation. **International Journal of Primatology**, v.21(3), p. 381-420, 2000.

CORTÉS-ORTIZ, L. (2009): Molecular phylogenetics of the Callitrichidae with an emphasis on the marmosets and *Callimico*. In *The smallest anthropoids: the marmoset/callimico radiation*: 3–24. Ford, S. M., Porter, L. & Davis, L. C. (Eds). New York, NY: Springer.

CORTOPASSI, S.R.G. 2004. Técnicas anestésicas utilizadas nos exames ultrasonográficos, p.30-49. In: Carvalho C.F. (ed.), **Ultra-Sonografia em Pequenos Animais**. Roca, São Paulo.

CURI, R.A.; MOTA, L.S.L.S.; AMARANTE, M.R.V.; LOPES, C.R. Bovine carcass sexing by PCR method. **Braz. J. Res. Anim. Sci.**, v.39(3), p. 147-148, 2002.

DI FIORE A., LINK A., CAMPBELL C.J.. The atelines: behavioral and socioecological diversity in a New World radiation. In: Campbell CJ, Fuentes A,

MacKinnon KC, Panger M, Beader SK, editors. Primates in perspective. 2nd edition. Oxford: Oxford University Press. p 155–188. 2010.

DI FIORE A, CHAVES PB, CORNEJO FM, SCHMITT CA, SHANEE S, CORTES-ORTIZ L, FAGUNDES V, ROOS C, PACHECO V. The rise and fall of a genus: Complete mtDNA genomes shed light on the phylogenetic position of yellow-tailed woolly monkeys, *Lagothrix flavicauda*, and on the evolutionary history of the family Atelidae (Primates: Platyrrhini). *Mol Phylogenet Evol* 82: 495-510. 2015.

DINIZ, L.S.M. 1999. Imobilização química em animais selvagens, p.170. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L. & BERNARDI M.M. (ed.). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

DRUMOND, A.J. 2009. Genetics 4.8.5 (www.geneious.com).

EDGAR, R.C. *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. *Nucleic Acids Research*, 1792-1797, 2004.

FANTONI, D.T., FUTEMA, F., CORTOPASSI, S.R.G., SILVA, L.C.L.C.D., VERENGUER, M., MIRANDOLA, R., FERREIRA, M.A. Avaliação comparativa entre acepromazina, detomidina e romifidina em equinos. *Ciência Rural* 1999; 29(1):45-50.

FEITOSA, F.L.F., MARCONDES, M., MASSONE, F. Avaliação farmacológica da detomidina: um novo agente hipno-analgésico para uso em equinos. *Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v. 14, n. 2, p. 167-173, 1990.

FELIPPE, P.A.N.; ADANIA, C.H. Conservação e bem-estar animal. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.S., Catão-Dias, J.L.. *Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária*. 2 ed. São Paulo; Rocca, Cap. 1, p. 2-9. 2014

FITZ GIBBON, C., 1998. The management of subsistence harvesting: behavioural ecology of hunter and their mammalian prey. In: CARO, T. (Ed.), *Behavioural Ecology and Conservation Biology*. Oxford University Press, Oxford, pp. 449–474.

FOODEN, J. 1963. A revision of the woolly monkeys (genus *Lagothrix*). *Journal of Mammalogy* 44: 213–247.

FOWLER, M.E. 1986. Restraint. In: Fowler, M.E (ed.). *Zoo and Wild Animal Medicine*, 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders. p. 38-50.

GROVES, C. P. (2001a): *Primate taxonomy*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.

GROVES, C. P. (2001b): Why taxonomic stability is a bad idea, or why are there so few species of primates (or are there?) *Evolutionary Anthropology* 10: 192–198.

GROVES, C. P. (2004): The what, why and how of primate taxonomy. *International Journal of Primatology* 25: 1105–1126.

GROVES, C. P. (2005): Order Primates. In *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (3rd edn) 1: 111–184. Wilson, D. E. & Reeder, D. M. (Eds). Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.

HOLZ, P.; HOLZ, R.M.; BARNETT, J.E.F. Effects of atropine on medetomidine/ketamine immobilization in the gray wolf (*Canis lupus*). **Journal of zoo and wildlife medicine**, Lawrence, v. 25, n. 2, p. 209-213, jun. 1994.

IWANAGA, S. AND FERRARI, S. F. 2002. Geographic distribution and abundance of woolly (*Lagothrix cana*) and spider (*Ateles chamek*) monkeys in southwestern Brazilian Amazonia. *American Journal of Primatology* 56: 57-64.

JÖCHLE, W. Field trial evaluation of detomidine as a sedative and analgesic in the horses colic. *Equine Veterinary Journal Supplements* 1989;7;117-120.

KOCHER, T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A.; EDWARDS, S.V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F.X.; WILSON, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *PNAS*, v.86(16), p.6196-6200, 1989.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.L. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p.36 – 42, 2005.

LIN, H.C. Dissociative anesthetics. In: THURMON, J.; TRANQUILLI, W.; BENSON, G. **Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996, p. 599-609.

LIN, H.C. *et al.* Ketamine, Telazol, xylazine and detomidine: A comparative anaesthetic drug combinations study in ponies. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.33, p. 241-296. 1992.

MANGINI, P. R.; SILVA, J. C. R. Medicina da conservação: aspectos gerais. In: CUBAS, Z. S. C.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*. São Paulo: Roca, 2006.

MASSONE, F. 1988. **Anestesiologia veterinária – Farmacologia e técnicas**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 235 p.

MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R. dos S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S.R. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, p.153-161, 2001.

MATTHEWS NS, HARTSFIELD SM, CORNICK JL, WILLIAMS JD, BEASLEY A. A comparison of injectable anesthetic combination in horses. *Veterinary Surgery* 1991;20(4):268-273.

MATTHEWS, N.S.; MILLER, S.M.; SLATER, M.R.; HARTSFIELD, S.M.; SHORT, C.E. A comparison of xylazine-ketamine and detomidine-ketamine anaesthesia in horses. **Journal of Veterinary Anaesthesia**, v.20, p. 68-72. 1993.

MAYOR, P., BOWLER, M., LOPEZ-PLANA, C. Anatomicohistological characteristics of the tubular genital organs of the female woolly monkey (*Lagothrix poeppigii*). In American journal of primatology 74 (11), pág. 1006–1016. DOI: 10.1002/ajp.22051. 2012a

MAYOR, P., BOWLER, M. & LÓPEZ PLANA, C.. Ovarian functionality in Poeppig's woolly monkey (*Lagothrix poeppigii*). Animal reproduction science. 136. 10.1016/j.anireprosci.2012.11.006. 2012b.

MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochachka and Mommsen, Biochemistry and molecular biology of fishes, vol.2. Elsevier, 1993.

MOONEY, J.C. & LEE, P.. Reproductive parameters in captive woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*). Zoo Biology. 18. 421 - 427. 10.1002/(SICI)1098-2361(1999)18:5<421::AID-ZOO7>3.0.CO;2-6. 1999.

MUIR, W.W.; HUBBEL, J.A.E. **Handbook of veterinary anesthesia**. 2. ed. St. Louis: Mosby, 1995. 510 p.

MUIR, W.W.; SKARDA, R.T.; MILNE, D.W. Evaluation of xylazine and ketamine hydrochloride for anesthesia in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, p. 195-201. 1977.

NAHUM, L.A. Evolução dos Genomas. In: Matioli, Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos Ed., 2001.

NAGATA, J.; ARAMILEV, V.V.; BELOZOR, A.; SUGIMOTO, T.; McCULLOUGH, D.R. Fecal genetic analysis using PCR-RFLP of cytochrome b to identify sympatric carnivores, the tiger *Panthera tigris* and the Leopard *pardus*, in far eastern Russia. **Conservation Genetics**, v.6(5), p. 863-866, 2005.

NOWAK, R. 1991. Walker's Mammals of the World, Volume 1. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. P. 569.

NUNES, A. V.; ORSINI, V.S.. New records and geographic distribution of Grey Woolly Monkeys, *Lagothrix cana* (É. Geoffroy, 1812) (Primates, Atelidae), in southern Brazilian Amazonia. **Check List**, [S.l.], v. 12, n. 6, p. 2007, dec. 2016. ISSN 1809-127X. Available at: <<https://biotaxa.org/cl/article/view/12.6.2007>>. Date accessed: 16 july 2018. doi:<http://dx.doi.org/10.15560/12.6.2007>.

OLSON, Z. H.; WHITTAKER, D. G.; RHODES JR, O. E. The use of molecular markers in wild sheep research in North America: a review. **Proceeding of the Northern Wild Sheep and Goat Council Biennial Symposium**, v. 16, p.251–269, 2009.

OPAZO, J.C., WILDMAN, D.E., PRYCHITKO, T., JOHNSON, R.M. and GOODMAN, M. 2006. Phylogenetic relationships and divergence times among New World monkeys (Platyrrhini, Primates). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 274–280.

ORSINI, H., BONDAN, E.F. Fisiopatologia do Estresse. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.S., Catão-Dias, J.L.. *Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária*. 2 ed. São Paulo; Rocca, Cap. 5, p. 35-45. 2014

OSILHEIRE Jr., J.A.; PEREIRA, R.L.; HERRERA, D.; PALHARI NETO, C.; BELETTINI, S.T ; PACHALY, J. R. . Novo método para contenção farmacológica e anestesia de campo em onças-pintadas (*Panthera onca*), empregando a fórmula “ZAD” (Zoletil/100® + Atropina + Dormiun-V®) - Relato preliminar. *A Hora Veterinária*, v. 32, p. 54-59, 2012.

PACHALY, J,R.; CARNEIRO, M,R.; ALBERTON, L,R,. BELETTINI, S.T.; AZZOLINI, F, PRAZERES, R.F.; VOLTARELLI-PACHALY, E.M. Contenção farmacológica e anestesia de campo em primatas da Família Cercopithecinae empregando a fórmula “ZAX-50” (Zoletil/50® + atropina + xilazina). *MEDVEP*. V. 9, N. 30, p. 415-459, 2011b.

PACHALY, J. R. Terapêutica por extrapolação alométrica. In: CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca, 2006. p. 1215-1223.

PACHALY, J. R.; DOMINGUES, R.H.; SOUZA, M.V.F.; VOLTARELLI-PACHALY, E.M.; KUNZ, R. O.; CARDEAL, C.. Novo método para contenção farmacológica e anestesia de campo em quatis (*Nasua nasua*), empregando a fórmula ZAD-50 (Zoletil/50 + Atropina + Dormiun-V) - Relato preliminar. *A Hora Veterinária*, v. 33, p. 58-62, 2013.

PACHALY, J.R. ; ALBERTON, L. R. ; VOLTARELLI-PACHALY, E. M. ; BELETTINI, S.T. ; MONTEIRO FILHO, L. P. C. ; CARNEIRO, M. R. . Doses alométricas de cloridrato de detomidina para uso na contenção farmacológica de mamíferos selvagens placentários não xenartros, isoladamente ou em associação a outros fármacos sedativos ou anestésico. *MEDVEP. Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação*, v. 9, p. 462-469, 2011a.

PACHALY, J.R. Alometria. In: KINDLOVITS, A.; KINDLOVITS, L.M. *Clínica e terapêutica em primatas neotropicais*. 2.ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros, 2009, p. 373-384.

PACHALY, J.R. Contenção da cutia, *Dasyprocta azarae* Lichtenstein, 1823 (RODENTIA: MAMMALIA), pela associação de cloridrato de cetamina, cloridrato de xilazina e sulfato de atropina – Definição de protocolos posológicos individuais com base em extrapolação alométrica interespecífica. Tese de Doutorado. Curso de Pós-graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 1998.

PACHALY, J.R. Efeitos farmacológicos do cloridrato de cetamina em medicina veterinária. *Revista do Setor de Ciências Agrárias*, v.13, n.1-2, p. 151-156. 1994.

PACHALY, J.R. et. al. Novo método para contenção farmacológica e anestesia de campo em quatis (*Nasua nasua*), empregando a fórmula "ZAD-50" (Zoletil/50® + Atropina + Dormiun-V®) – Relato preliminar. *A Hora Veterinária*. 2013 ;33(196):58-62.

PACHALY, J.R. Principais drogas empregadas na contenção química de animais selvagens. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar*, v.3, n.1, p. 87-94. 2000.

PACHALY, J.R. Principais drogas empregadas na contenção química de animais selvagens. *Informativo da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens*, v. 3, n. 13, p. 1-3, mai. 1995.

PACHALY, J.R., VOLTARELLI-PACHALY, E.M. Novo método para contenção farmacológica e anestesia de campo em leões (*Panthera leo*), empregando a fórmula "ZAD" (Zoletil 100® + Atropina + Dormiun-V®) – Relato preliminar. *A Hora Veterinária*, n. 181, p.66-72. 2011.

PACHALY, J.R.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A.; WERNER, P.R.; GIOVANELLI, D.F.; De CONTI, J.B.; WOSIAKI, S.R.; BELETTINI, S.T.; VOLTARELLI-PACHALY, E.M. Cetamina, xilazina e atropina, em doses calculadas por extrapolação alométrica interespecífica, para contenção farmacológica da cutia (*Dasypsecta azarae*). *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR (Impresso)*, v. 17, p. 11-26, 2014b.

PACHALY, J.R.; SOUZA, M.V.F.; Montiani-Ferreira, F. et al. Emprego da fórmula "ZAD-50" (ZOLETIL/50® + ATROPINA + DORMIUN-V®) para anestesia dissociativa em procedimento de enucleação com acesso transconjuntival de bulbo ocular proptótico em hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) – Relato de caso. *A hora veterinária*. V. 34, N. 2001, p. 58-62, 2014a.

PERES, C.. (1994). Diet and feeding ecology of gray woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha* cana) in Central Amazonia: Comparisons with other Atelines. *International Journal of Primatology*. 15. 333-372. 10.1007/BF02696098.

PERES, M.B., VERCILLO, U.E.; DIAS, B.F.S. Avaliação do estado de conservação da fauna brasileira e a lista de espécies ameaçadas: o que significa, qual sua importância, como fazer? **Biodiversidade Brasileira**, v.1, n.1, p. 45-48, 2011.

PLUMB, D.C. *Veterinary Drug Handbook - Computer edition*. White Bear Lake: PharmaVet Publishing / Veterinary Software Publishing, 1991.

PUERTAS, P., BODMER, R.E., 2004. Hunting effort as a tool for communitybased wildlife management in Amazonia. In: SILVIUS, K., BODMER, R.E., FRAGOSO, J.M.V. (Eds.), *People in Nature*. Columbia University Press, New York, pp. 123–137. SCHNEIDER, H. 2000. The current status of the New

World monkey phylogeny. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72: 165–172.

ROWE, N. *The Pictorial Guide to the Living Primates*. Pogonias Press, Rhode Island. 1996.

RUIZ-GARCIA M, PINEDO-CASTRO M, O, Molecular Systematics and Phylogeography of the Genus *Lagothrix* (Atelidae, Primates) by Means of the Mitochondrial COII Gene. *Folia Primatologica* 2010;81:109-128.

RUIZ-GARCÍA M., PINEDO-CASTRO M., SHOSTELL J.M. How many genera and species of woolly monkeys (Atelidae, Platyrrhine, Primates) are there? The first molecular analysis of *Lagothrix flavicauda*, an endemic Peruvian primate species. *Mol Phylogenet Evol.* 2014 Oct;79:179-98.

RYLANDS, A. B. & MITTERMEIER, R. A. (2008): The diversity of the New World primates: an annotated taxonomy. In *South American primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation*: 23–54. Garber, P. A., Estrada, A., Bicca-Marques, J. C., Heymann, E. W. & Strier, K. B. (Eds). New York, NY: Springer.

RYLANDS, A. B., COIMBRA-FILHO, A. F. & MITTERMEIER, R.A. (1993): Systematics, distributions, and some notes on the conservation status of the Callitrichidae. In: *Marmosets and tamarins: systematics, behaviour and ecology*: 11–77. Rylands, A. B. (Ed.). Oxford: Oxford University Press.

RYLANDS, A. B., GROVES, C. P., MITTERMEIER, R. A., CORTÉS-ORTIZ, L. & HINES, J. J. (2006): Taxonomy and distributions of Mesoamerican primates. In *New perspectives in the study of Mesoamerican primates: distribution, ecology, behavior and conservation*: 29–79. Estrada, A., Garber, P. A., Pavelka, M. & Luecke, L. (Eds). New York, NY: Springer.

RYLANDS, A.B.; MITTERMEIER, R.A. & SILVA-JÚNIOR, J.S. 2012. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. *International Zoo Yearbook*, 45(1):1748-1090.

SACCONE, C. The evolution of mitochondrial DNA. **Current Opinion in Genetic and Development.**, v.4, p.875-881, 1994.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHNEIDER, H. 2000. The current status of the New World monkey phylogeny. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72: 165–172.

SEDGWICK, C.J.; POKRAS, M.A. Extrapolating rational drug doses and treatment periods by allometric scaling. In: *American Animal Hospitals Association's 55th Annual Meeting*, (1988). *Proceedings...* 1988. p. 156-161.

SELMÍ, A.L. *et al.* O butorfanol na anestesia pela romifidina-tiletamina-zolazepam em gatos. **Ciência Rural**, Santa Maria, 33(6):1067-1073. 2003.

SOMA, L.R. 1971. **Textbook of Veterinary Anesthesia**. Baltimore: Williams and Wilkins. 621p.

SOMA, L.R.; Penney, B.E. 1975. Sedation and general anesthesia, p.527-549. In: Catcott E.J. (Ed), **Feline medicine and Surgery**. 2. ed. Santa Barbara: American Veterinary Publications. 3234 p.

SOUZA, M.V. DE, NASCIMENTO, L.R., HIRANO, L.Q.L., SANTOS, A.L.Q., PACHALY, J.R.. Contenção farmacológica de onças-pintadas *Panthera onca* Linnaeus, 1758 com a associação de tiletamina, zolazepam, detomidina e atropina calculados por extrapolação alométrica interespecífica. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 39, n. 4, p. 1595-1606, 2018.

STEVENSON P, LINK A, DI FIORE A, DE LA TORRE S, BOUBLI JP. 2008. *Lagothrix poeppigii*. In: IUCN, 2010. IUCN Red list of threatened species. Version 2010.4. Available online at: <http://www.iucnredlist.org>. Accessed April 8, 2011. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. Disponível em <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em 23/07/2015, às 23:41 horas.

TABOR, G. M. Defining conservation medicine. In: AGUIRRE. A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARLS, M. C. Conservation medicine: Ecological health in practice. New York: Oxford University, 2002. Cap 2, p. 8-16.

VERONA, C.E., PISSINATTI, A. Primates – Primatas do Novo Mundo (Sagui, macaco-prego, macaco-aranha, bugio e muriqui): CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.S., Catão-Dias, J.L.. Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária. 2 ed. São Paulo; Rocca, Cap. 34 p. 723-743. 2014

VOSS, R.S., FLECK, D.W. Mammalian Diversity and Matses Ethnomammology in Amazonian Peru Part1: Primates. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 2011 351, 1-81

WALLACE, R.B., PAINTER, R.L.E. TABER, A.B. and AYRES, J.M. Notes on a distributional river boundary and southern range extension for two species of Amazonian primates. 1996. *Neotrop. Primates* 4(4): 149-151.

WILDMAN, D.E., JAMESON, N.M., OPAZO J.C., and YI, S.V. 2009. A fully resolved genus level phylogeny of Neotropical primates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 694–702.

8 ANEXOS

8.1 Cópia de artigo publicado durante o período do Doutorado

RELATO DE CASO

Síndrome da persistência dos Ductos de Müller em um cão da raça schnauzer miniatura com sertolioma e sinais clínicos de feminização

Persistent Mullerian duct syndrome in a miniature schnauzer dog with sertoli cell tumor and clinical signs of feminization

Wendy Flávia Martins Caetano - Médica Veterinária (PUC-PR), Pós Graduação em Dermatologia (Equis), médica veterinária no Cevet Centro veterinário.

Juliana Werner - Médica Veterinária, Mestre pela pós-graduação de Ciências Veterinárias da UFPR, Patologista no Laboratório Werner & Werner.

Fábio Mocelim - Médico Veterinário (UFPR), Atualização em ortopedia Veterinária (Equis), cirurgião no Cevet Centro veterinário.

Gabrielle Adad Fornazari - Médica Veterinária (PUC-PR), Mestre em Ciências veterinárias (UFPR), Pós Graduação em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais (Equis).

Marcelo Rocha Carneiro - Médico Veterinário (UFPR), Mestre em Ciência Animal (Universidade Paranaense-UNIPAR), Aluno de doutorado (PPG em Animais Selvagens-UNESP).

Maycon Firmino de Almeida - Médico Veterinário (Faculdade Evangélica do Paraná), Anestesiologista no Cevet Centro Veterinário;

Fabiolla Christine Fagundes Gomes - Acadêmica do curso de Medicina Veterinária (Universidade Tuiuti do Paraná).

Caetano WFM; Werner J; Mocelim F; Fornazari GA; Carneiro MR; Almeida MF; Gomes FCF. Medvop Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária; 5 (14); 51-59.

Resumo

Um Schnauzer Miniatura do sexo masculino de oito anos de idade foi encaminhado ao Cevet Centro veterinário na Cidade de Curitiba-PR com reclamação principal de problemas dermatológicos. Ao exame físico observou-se distensão abdominal, criptorquidia unilateral esquerda, abdome distendido, alopecia não pruriginosa, piodermite superficial e hiperpigmentação. O animal apresentava genitália externa masculina. Além das alterações já descritas, a condição geral do paciente parecia normal. O exame ultrassonográfico revelou a presença de estruturas tubulares de paredes finas, ocupando grande parte da cavidade abdominal, consistente com um corpo e dois cornos uterinos assimétricos, ligados aos testículos adjacentes (um dentro do escroto e outro intracavitário). Foi realizada gonado-histerectomia seguida de encaminhamento para histopatologia das estruturas genitais encontradas. Tanto o procedimento cirúrgico como os resultados do exame histopatológico confirmaram tratar-se de um caso de presença de útero em um indivíduo de sexo masculino, resultando em um diagnóstico final de Síndrome de Ducto de Müller Persistente (SDMP). Adicionalmente, o testículo intra-abdominal apresentava tumor de células de Sertoli. A ultrassonografia mostrou-se uma ferramenta adequada para o diagnóstico de Síndrome da persistência dos ductos de Müller.

Palavras-chave: Schnauzer miniatura, Criptorquidia, Sertolioma, Pseudo-hermafroditismo masculino, Síndrome da persistência dos ductos de Müller.

Abstract

An eight-eight year old male Miniature Schnauzer was referred to Cevet Veterinary Clinic in the city of Curitiba-PR with a chief complaint of dermatological problems. Physical examination detected abdominal distention, left unilateral cryptorchidism, distended abdomen, with a non-pruritic alopecia and hyperpigmentation. The animal had external genitalia consistent of a male individual. Besides the aforementioned clinical signs, the general condition of the patient appeared to be normal. An ultrasonographic examination revealed large thin-walled tubular structures, occupying most of the abdominal

Síndrome da persistência dos Ductos de Müller em um cão da raça schnauzer miniatura com sertolioma e sinais clínicos de feminização

cavity, consistent with a body and two asymmetric uterine horns attached to adjacent testicles (one inside the scrotum and one inside the abdomen). Gonadectomy was performed followed by histopathologic examination of the intracavitary genital structures. Both, the surgical procedure itself and the results of the histopathological analysis confirmed the presence of uterus in a male subject, resulting in a final diagnosis of Persistent Müllerian Duct Syndrome (PMDS). Additionally, the intra-abdominal testis showed evident histologic signs of Sertoli cell tumor. The ultrasound was shown to be a suitable diagnostic tool for the diagnosis of PMDS.

Keywords: Miniature Schnauzer, cryptorchidism, Sertoli cell tumor, Male pseudohermaphroditism, Persistent Müllerian Duct Syndrome.

Introdução

O processo de diferenciação sexual começa quando o indivíduo é ainda um embrião e se estende ao longo de parte do seu desenvolvimento fetal. Neste estágio, que compreende as primeiras semanas de gestação canina, independente dos cromossomos sexuais de cada indivíduo (XX ou XY), os órgãos sexuais internos são sempre bi-potenciais, havendo duas estruturas intra-abdominais: os ductos de Wolff (que dão origem a genitália masculina) e ductos de Müller (que dão origem à genitália feminina) (1). O que significa que todo feto, por um determinado período, tem o potencial de desenvolver ambas as gônadas: masculinas ou femininas. A forma como as gônadas se desenvolvem subsequentemente é influenciada por hormônios que estimulam o desenvolvimento de um dos ductos ou promovem sua involução. Se nenhum problema ocorrer, cada feto ao final da diferenciação terá apenas um dos pares de ductos (2). Contudo, podem ocorrer falhas ao longo do desenvolvimento sexual dos fetos levando a um quadro de hermafroditismo, pseudo-hermafroditismo ou outras formas de inversão sexual (3,4).

Hermafroditismo é o nome dado à condição na qual indivíduos possuem tecidos ovarianos e testiculares ao mesmo tempo, já o pseudo-hermafroditismo, também conhecido como genitália ambígua, trata-se de uma condição na qual o indivíduo apresenta um único sexo cromossômico e gonadal, mas combina as características de ambos os sexos na genitália. O foco do presente relato de caso é no pseudo-hermafroditismo masculino. Sabe-se que há duas formas descritas de pseudo-hermafroditismo masculino: 1) Quando há falha no processo de

masculinização andrógeno-dependente, na qual os animais possuem testículos bilaterais, geralmente criptorquídicos, genitália externa feminina e nenhuma evidência de genitália interna feminina, derivada dos ductos de Müller e 2) Quando há Síndrome da Persistência dos Ductos de Müller, uma forma mais rara de pseudo-hermafroditismo masculino interno (5). Na Síndrome da persistência dos ductos de Müller os indivíduos afetados possuem órgãos reprodutores masculinos normais, entretanto também possuem útero e os ovidutos (trompas de Falópio), que são órgãos reprodutivos femininos. Tanto os ovidutos como o útero são derivados dos ductos de Müller durante o desenvolvimento do feto (1). O ducto de Müller em condições normais involui precocemente durante o desenvolvimento no sexo masculino, mas é mantido nos indivíduos acometidos pela Síndrome da persistência dos ductos de Müller. Os indivíduos afetados têm os cromossomos normais de um macho e genitália masculina normal. A síndrome é causada por uma quantidade insuficiente de uma substância denominada fator inibidor Mülleriano (FIM) produzida pelos testículos ou devido à insensibilidade dos receptores do órgão alvo (ducto de Müller) ao FIM. O período crítico para regressão do ducto de Müller no embrião do sexo masculino canino começa aos 36 dias e termina aos 46 dias de gestação, o que coincide com o início da secreção de FIM, que começa com diferenciação dos testículos e continua a ser secretado ao longo de toda gestação (4,6). Apesar de ser considerada rara, a Síndrome da persistência dos ductos de Müller em cães já foi relatada em vários indivíduos da raça Schnauzer miniatura na América do Norte (5,10,11), América do Sul (12,13), Europa (13) e Ásia (14).

Síndrome da persistência dos Ductos de Müller em um cão da raça schnauzer miniatura com sertolioma e sinais clínicos de feminização

Em animais criptorquidas o risco do desenvolvimento de neoplasias de células de Sertoli é aumentado em 26 vezes (15). Hiperestrogenismo, neoformação abdominal e aumento escrotal ou inguinal são sinais clínicos apresentados em cães com tumor de células de Sertoli (16). Como resultado do hiperestrogenismo, apresentam-se os sinais da síndrome paraneoplásica de feminização, que ocorrem em 70% dos casos de animais com tumores em testículos localizados na cavidade abdominal, 50% em casos com tumores em testículos localizados na região inguinal e 15 % dos animais que apresentam tumores localizados em testículos escrotales (17,18). No entanto, há casos onde os níveis séricos deste hormônio se encontram normais (19,20). A síndrome de feminização no macho está entre as dermatoses sexuais hormonais mais comuns em cães (21). Os sinais dermatológicos, associados ao hiperestrogenismo, mais frequentemente encontrados são: atrofia dos folículos pilosos e glândulas sebáceas, alopecia bilateral ou regional, hiperpigmentação variável nas zonas de alopecia, dermatose linear prepucial e melanose macular (22,23). Os pelos remanescentes se destacam facilmente, e a alopecia bilateral e simétrica, normalmente se inicia na

face caudal das coxas e períneo, espalhando para os flancos, abdômen e tórax, poupando cabeças e extremidades (21,24,25).

O objetivo do presente trabalho é relatar um caso de síndrome da persistência dos ductos de Müller em um cão da raça Schnauzer miniatura com sertolioma, criptorquidia esquerda e sinais clínicos de feminização.

Relato do caso

Exame clínico

Foi atendido no CEVET Centro Veterinário um macho, da raça Schnauzer miniatura, com oito anos de idade. Ao exame físico observou-se que o cão apresentava genitália externa de um indivíduo do sexo masculino, mas com criptorquidismo unilateral esquerdo, abdome distendido e ginecomastia, além de um quadro clínico de dermatose caracterizada pela presença de áreas alopécicas e hiperpigmentação de intensidade variável no aspecto ventral e dorso lombar do paciente (Figura 1). Afora das alterações já descritas, a condição geral do paciente parecia normal.



Figura 1 - Apresentação ventral pré-operatória do cão mostrando testículo direito atrofiado com sinais de feminização, mamas exuberantes e abdome distendido. (Fonte: Wendi Caetano).

Síndrome da persistência dos Ductos de Müller em um cão da raça schnauzer miniatura com sertolioma e sinais clínicos de feminização

Ultrassonografia

Ao exame ultrassonográfico da região abdominal foi constatada a presença de estruturas tubulares de paredes finas com conteúdo anecóico com volume de relativa importância. Detectou-se ainda uma formação heterogênea localizada em pólo caudal de rim esquerdo medindo 4,15 X 4,25 cm. Havia líquido de aspecto anecogênico no escroto (hidrocele). O testículo direito localizado dentro do escroto apresentava dimensões diminuídas (atrofia testicular), com estrutura heterogênea adjacente. A próstata apresentava contornos definidos, superfície regular, dimensões preservadas (2,22 cm) e eco-

textura mantida.

Laparotomia exploratória

Por meio de laparotomia exploratória confirmou-se a presença do testículo esquerdo de localização próxima ao polo caudal do rim esquerdo, semelhantemente a posição anatômica de um ovário. Ligado a esta havia uma estrutura tubular, que sugeria um útero. Foi realizada gonado-histerectomia seguida de encaminhamento para exame histopatológico das estruturas genitais encontradas em laboratório terceirizado, incluindo o testículo direito localizado dentro do escroto. (figuras 2 e 3)

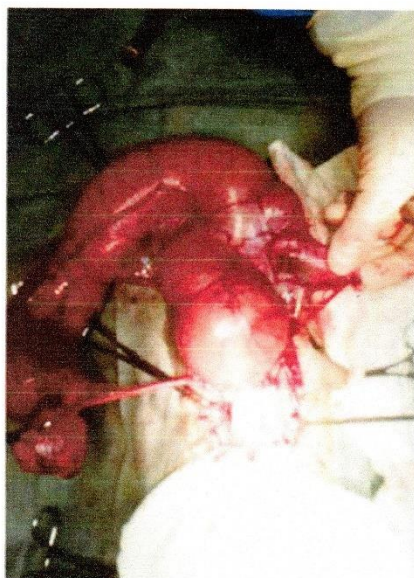


Figura 2 - Imagem fotográfica obtida no período transoperatório: observe a presença intra-abdominal de estrutura tubular que se assemelha anatomicamente a um útero (ducto de Müller). (Fonte Wendi Caetano).

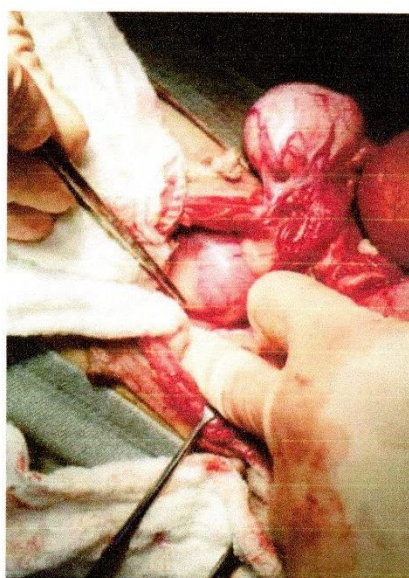


Figura 3 - Imagem fotográfica obtida no período transoperatório: observe a presença do testículo esquerdo (no topo da imagem) localizado próximo ao polo caudal do rim esquerdo, que é uma posição anatômica muito similar a de um ovário. (Fonte Wendi Caetano).

Exame de macroscopia e histopatologia

O resultado do exame histopatológico da massa tubular confirmou a presença de um útero atrofico ou aplásico. A peça cirúrgica media 270 x 46 x

51 mm, sendo composta por uma estrutura tubular medindo 240 x 46 x 51 mm, um nódulo associado a uma das extremidades medindo 40 x 38 x 38 mm, na outra extremidade exibiu uma área tubu-

Síndrome da persistência dos Ductos de Müller em um cão da raça schnauzer miniatura com sertolioma e sinais clínicos de feminização

lar menor de coloração acastanhada medindo 51 x 7 x 7 mm com um nódulo exofítico medindo 5 x 4 x 4 mm. Ao corte, o órgão apresentava-se repleto de material fluido esbranquiçado. Os fragmentos de tecido uterino foram identificados histologicamente e caracterizados por glândulas endometriais escassas e atróficas, algumas delas exibiam dilatação cística; extensas áreas do epitélio exibiam metaplasia escamosa. A camada muscular apresentava intensa vascularização, inclusive com artérias de calibre médio, que lembravam um pedículo. A presença do útero repleto de líquido foi outro aspecto relevante, que provavelmente poderia ter evoluído para um quadro clínico severo. Não foi identificado tecido ovariano macro ou microscopicamente. Concluiu-se que se tratava de um caso de pseudo-hermafroditismo.

O fragmento do testículo criptorquida apresentou proliferação celular neoplásica. A arquitetura

ra tissular do órgão apresentava-se parcialmente obliterada por transformação neoplásica expansiva e bem delimitada, com padrão de crescimento intratubular. As células tumorais eram poliédricas, parte delas alongada no seu eixo longitudinal, apresentando núcleo redondo e citoplasma moderadamente abundante, claro e vacuolar. Os achados anátomo e histopatológicos são compatíveis com tumor das células de Sertoli.

Cortes histológicos do testículo presente na bolsa escrotal mostraram ausência de espermatogênese, orquite e degeneração testicular, sem sinais de transformação ou infiltração neoplásica. O parênquima testicular exibiu área extensa de obliteração de arquitetura tissular por área de reação inflamatória com proliferação de tecido conjuntivo fibroso, hemorragia, edema e infiltrado inflamatório misto muito rico em neutrófilos.

(figuras 4 e 5)

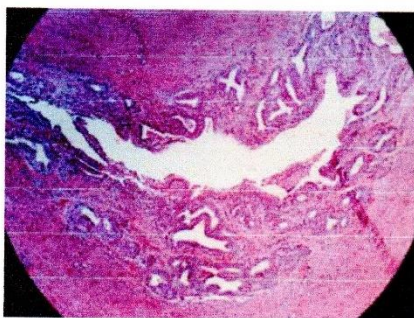


Figura 4 – Fotomicrografia da estrutura tubular morfológica compatível com tecido uterino encontrada durante a laparotomia exploratória. Notar a presença de tecido glandular morfológicamente semelhante a glândulas endometriais atróficas que se apoiam em estroma fibromuscular abundante. (H.E. Aumento de 100x). (Fonte: Juliana Werner).

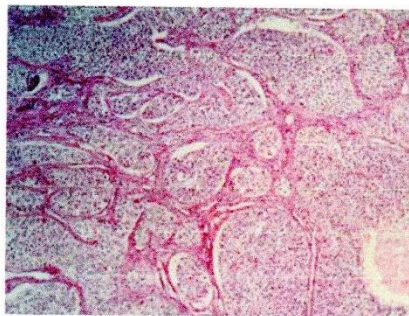


Figura 5 – Fotomicrografia do testículo ectópico. Notar a obliteração da arquitetura tissular por proliferação neoplásica intratubular composta por células poliédricas, alongadas no seu eixo longitudinal e com citoplasma vacuolar (sertolioma). (H.E. Aumento de 100x). (Fonte: Juliana Werner).

Evolução clínica

Cabe esclarecer que poucos meses após o tratamento cirúrgico o animal apresentou-se saudável e com total remissão das características sexuais e comportamentais femininas.

Discussão

A síndrome de persistência do ducto de Müller é mais frequentemente descrita na raça Schnauzer miniatura. Essa síndrome é hereditária nessa raça, tendo um padrão autossômico recessivo (11,31). Os animais com síndrome de persistência do ducto

Müller podem ter infecções do trato urinário, prostatite, hiperplasia cística do endométrio, mucometra e tumores testiculares (11,26,27, 28,29,30,31,32).

Há relato em literatura de um cão com fenótipo masculino que apresentava alopecia simétrica, criptorquidismo bilateral e grave tumor de mama. O animal apresentava sinais clínicos decorrentes de hiperestrogenismo, presença de massa tubular sugerindo útero e cisto ovariano. O resultado do exame histopatológico neste caso confirmou pseudo-hermafroditismo feminino e carcinoma de glândula mamária (33). Outros autores descrevem alguns casos de cães com hermafroditismo e pseudo-hermafroditismo, porém o mecanismo que leva à ocorrência dessas anomalias não foi totalmente documentado ou esclarecido (34,35).

Outra característica clínica observada no caso aqui relatado foi o criptorquidismo, achado relativamente comum também em seres humanos com Síndrome da persistência dos ductos de Müller e que apresentam ovidutos, útero, vagina e são fenotipicamente normais (36). Em seres humanos acometidos com Síndrome da persistência dos ductos de Müller foi sugerido que a criptorquidia decorre como resultado de uma obstrução mecânica provinda da retenção abdominal do útero e ovidutos (37).

É sabido que há aumento do risco de desenvolvimento neoplásico em testículos retidos na cavidade abdominal e, portanto a Síndrome da persistência dos ductos de Müller é também associada com neoplasias testiculares. Os cães com criptorquidia têm 13,6 vezes maiores riscos de apresentarem tumores testiculares do que os normais, sendo que cerca de 20% a 30% de cães com sertolioma apresentam sinais de hiperestrogenismo acompanhados de síndrome de feminização (38,39). Os tumores testiculares em geral podem causar alopecia endócrina dentre outras anomalias cutâneas, como alteração da cor da pelagem, alopecia regional, dermatose linear prepucial e melanose macular (23). A presença de dois tumores já foi relatada em um cão pseudo-hermafrodita. Tal cão apresentava tumor de células de Leydig no testículo direito e outro tumor de células de Sertoli no testículo esquerdo (40). Há ainda outro relato de cão com pseudo-hermafroditismo, presença de tumor de células de Sertoli e ainda seminoma unilateral (6).

No presente caso, a neoplasia testicular foi responsável pela síndrome de feminização, muito

provavelmente em resposta ao hiperestrogenismo e altos níveis de inibina que, embora não investigados no paciente, teriam o potencial de exercer estímulo negativo sobre a hipófise, diminuindo os níveis hormonais de FSH e LH, ocasionando os sinais descritos e causando atrofia testicular contra lateral (41,42,43). Sob o ponto de vista espermatogênico, o testículo criptórquico é normalmente afuncional e os animais criptorquidas bilaterais são estéreis, enquanto os animais com processo unilateral são subférteis (43,44).

A Síndrome da persistência dos ductos de Müller é hereditária de maneira autossômica e recessiva, portanto, quando não estéril recomenda-se a castração de todos os animais afetados (4,7).

Vale ressaltar que para confirmação do diagnóstico clínico, morfológico e histopatológico do presente caso, há a necessidade de se realizar a cariotipagem no intuito de detectar se o paciente apresenta cromossomos normais, do sexo masculino, 78 XY, concluindo-se assim que se tratava realmente de um pseudo-hermafrodita masculino.

Considerações Finais

Tanto o procedimento cirúrgico como os resultados do exame histopatológico confirmaram tratar-se de um caso de presença de útero em um indivíduo criptorquida do sexo masculino da raça Schnauzer Miniatura. Adicionalmente, o testículo intra-abdominal apresentava tumor de células de Sertoli, o que levou aos sinais de feminização. Podemos reconhecer que os problemas dermatológicos e sinais de feminização são provenientes do hiperestrogenismo e estão relacionados com a Síndrome da persistência dos ductos de Müller, Sertolioma e criptorquidismo. A ultrassonografia mostrou-se uma ferramenta adequada para o diagnóstico para Síndrome da persistência dos ductos de Müller. O tratamento cirúrgico é indicado para corrigir tais complicações. Cabe esclarecer que após o tratamento cirúrgico o animal apresenta-se saudável e com total remissão das características sexuais e comportamentais femininas.

Nome: Scott/ Canina/ Schnauzer/ 8 anos/ Macho
Proprietário: Alessandra
Veterinário responsável: Dra. Wendi
Clínica Veterinária Cevet

LAUDO ULTRASSONOGRÁFICO:

Fígado de contornos regulares, dimensões preservadas, com bordos finos, ecotextura preservada, ecogenicidade mantida. Arquitetura vascular com calibre e trajeto preservado. Vesícula biliar repleta, com conteúdo anecogênico homogêneo, paredes finas e ecogênicas.

Estômago não individualizado neste exame. Alças intestinais visibilizada em poucos segmentos, de parede normoespessa (0,24 cm), peristaltismo progressivo, estratificação parietal mantida e lúmen sem evidências sonográficas de alterações.

Pâncreas visibilizado em todos os contornos (corpo, lobo direito e esquerdo), ecogênico, de dimensões preservadas, medindo 0,77 cm em lobo direito. Duodeno de parede normoespessa (0,40 cm) e lúmen sem alterações dignas de nota.

Baço de contornos definidos, superfície regular, dimensões preservadas e ecotextura homogênea.

Rins em topografia habitual, dimensões simétricas, contornos regulares, ecotextura mantida, limites corticomedulares preservados, ecogenicidade mantida.

Bexiga urinária de moderada repleção líquida, paredes preservadas, mucosa regular, com conteúdo anecogênico homogêneo.

Próstata de contornos definidos, superfície regular, dimensões preservadas (2,22 cm) e ecotextura mantida.

Testículo direito de dimensões diminuídas (atrofia testicular), com estrutura heterogênea adjacente (epidídimo neoplásico?). Presença de líquido de aspecto anecogênico em escroto (hidrocele).

Adrenais não individualizadas neste exame.

Linfonodos sem alterações dignas de nota.

Formação heterogênea em pólo caudal de rim esquerdo medindo 4,15 X 4,25 cm (testículo ectópico neoplásico?).

Presença de grande estrutura tubular de paredes finas, ocupando toda cavidade abdominal, medindo 6,52 cm de espessura com conteúdo anecogênico denso a esclarecer.

Caso o clínico considere necessário sugere-se laparotomia exploratória.

Curitiba, 03 de dezembro de 2014.

Verena Jabin
CRMVPR 4972



Figura 6 – Presença de grande estrutura tubular de paredes finas, ocupando toda cavidade abdominal, medindo 6,52 cm de espessura com conteúdo anecogênico denso a esclerificar.

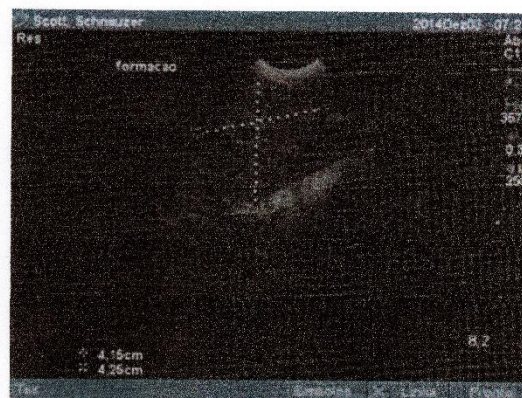


Figura 7 – Formação heterogênea em pólo caudal de rim esquerdo medindo 4,15 X 4,25 cm (testículo ectópico neoplásico?)



Figuras 8 – Testículo direito de dimensões diminuídas (atrofia testicular), com estrutura heterogênea adjacente (epidídimo neoplásico) Presença de líquido de aspecto anecogênico em escroto (hidrocele).



Figuras 9 – Testículo direito de dimensões diminuídas (atrofia testicular), com estrutura heterogênea adjacente (epidídimo neoplásico) Presença de líquido de aspecto anecogênico em escroto (hidrocele).

Referências

1. Yuksel B, Saygun O, Hengimlen S. Persistent müllerian duct syndrome associated with irreducible inguinal hernia, bilateral cryptorchidism and testicular neoplasia: A case report. *Acta Chir Belg*. 2006;106:119-20.
2. Meyers-Wallen VN, Manganaro TF, Kuroda T, Concannon PW, MacLaughlin DT, Donahoe PK. The critical period for müllerian duct regression in the dog embryo. *Biol Reprod*. 1991 Oct;45(4):626-33.
3. NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologia da reprodução dos animais domésticos. 2. ed. Belo Horizonte: Guanabara Koogan, 2003, p. 7-12.
4. LYLE, S. K. Disorders of sexual development in the dog and cat. *The-niogenology*, v. 68, p. 338-343, 2007.
5. Meyers- VN, Donahoe PK, Ueno S, Manganaro TF, Patterson DF. Müllerian inhibiting substance is present in testes of dogs with persistent Müllerian duct syndrome. *Biol Reprod*. 1989;41:881-888.
6. Madureira R, Filho NPR, Santos AR, Dias AL, Headley SA, Brum JS. Pseudo-Hermafroditismo Masculino Em Um Cão Com Seminoma e Sertolioma. 42º Congresso Bras. de Medicina Veterinária e 1º Congresso Sul-Brasileiro da ANCLIVEPA - 31/10 a 02/11 de 2015 - Curitiba - PR; 1421-1425
7. In: Recent Advances in Small Animal Reproduction. P. W. Concannon, G. England, J. Verstegen III and C. Linde Forsberg (Eds.) Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA. Inherited Abnormalities of Sexual Development in Dogs and Cats V. N. Meyers-Wallen (<http://www.ivis.org/advances/Concannon/meyers/reference.asp>)

- Josso N, Picard JY, Imbeaud S, Carre-Eusebe D, Zeller J, Adamsbaum C. 1993: The persistent Müllerian duct syndrome: a rare cause of cryptorchidism. *Eur J Pediatr* 152, S76-S78.
- Gutte AA, Pendharkar PS, Sorte SZ. Transverse testicular ectopia associated with persistent Müllerian duct syndrome – the role of imaging. *Br J Radiol*. 2008;81:E176-8.
- Brown TT, Burek JD, McEntee K. Male pseudohermaphroditism, cryptorchidism and Sertoli cell neoplasia in three miniature schnauzers. *J Am Vet Med Assoc*. 1976;169:821-825.
- Marshall LS, Oehlert ML, Maskins ME, Seiden JR, Patterson DF. Persistent Müllerian duct syndrome in miniature schnauzers. *J Am Vet Med Assoc*. 1982;81:798-801.
- Vannucci FA, Rocha BD, Issa EC, Guedes RMC. Síndrome da persistência dos ductos de Müller em cão – relato de caso. *Vet. Not., Uberlândia*, v. 14, n. 1, p. 71-75, jan./jun. 2008.
- Vegter AR, Kooistra HS, van Sluijs FJ, van Bruggen LWL, Izjer J, et al: Persistent Müllerian Duct Syndrome in a miniature schnauzer dog with signs of feminization and a Sertoli cell tumor. *Reprod Domest Anim*, doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01223.x(2008).
- Matsuura A, Hashizume T, Kanda K, Nagano M, Sugiyama A, et al. A case of persistent Müllerian duct syndrome with Sertoli cell tumor and hydrometra in a dog. *J Vet Med Sci*. 2009;71:379-381.
- Peters, m. A. J; Jong, f. H. Teerds, k. J; Rooij, d. G. De; dieleman, s. J and Van Sluijs, F. J. Ageing, testicular tumours and the pituitary-testis axis in dogs. *Journal of Endocrinology*, 153-161, 2000.
- Corrêa, R. K. R.; Mattos, B. Z.; Noriega, V.T.; Gomes, C.; Oliveira, L.O.; Gianotti, G.C.; Marques, J. V. Ocorrência de neoplasia testicular em cães atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 1-4, 2008.
- Fonseca, Carmen Vanessa De Carvalho Vieira Da. Prevalência e tipos de alterações testiculares em cães. Lisboa, p. 1 – 69, 2009.
- Quartuccio, M.; Marino, G.; Garuffi, G. S. C.; Zanghi, A. Sertoli cell tumors associated with feminizing syndrome and spermatic cord torsion in two cryptorchid dogs, p. 207-209, 2011.
- Meuten DJ. Tumors in domestic animals. 4th edition. Iowa state press; 2002.
- Peters MAJ, Rooij DG, Teerds KJ, Sluijs FJ. Spermatogenesis and testicular tumors in the ageing dogs. *J Repro Fertil* 2000; (120): 443-452.
- Cerundolo, R.; Bensignor, E.; Guaguère. Sex Hormone Dermatoses. In: Guaguère, E; Prélard, P; Craig, M. Eds. A Practical Guide in Canine Dermatology. Meril. Kallantis, 2008:363- 371.
- Sampera, N.; Masot, N.; Janer, M.; Romeo, C.; de Pedro, R. Oestrogen-induced bone marrow aplasia in a dog with a Sertoli cell tumor. *J. Small Anim. Pract.*, v. 43, p. 365 – 369, 2002.
- Scott, DW; Miller, WH; Griffin, DW. Muller & Kirk's. Dermatologia em pequenos animais. 6ª ed. Intermedica Editorial. Buenos Aires, Argentina. 2002:816-905.
- Medleau, Linda. Dermatologia de pequenos animais: atlas colorido e guia terapêutico. São Paulo: Roca, 2003, p. 63-68.
- Paterson, S. (2008). Manual of Skin Diseases of the Dog and Cat (2nd ed.). UK: Blackwell Publishing.
- Hare, W.C.D. (1976). Intersexuality in the dog. *The Canadian Veterinary Journal*, Vol. 17, no. 1.
- Kelly, D.F., Long, S.E., Strohmenger, G.D. (1976). Testicular neoplasia in an intersex dog. *Journal of Small Animal Practice*. 17, 247-253.
28. Chaffaux, S., Mailhac, J.M., Cribiu, E.P., Popescu, C.P., Cotard, J.P. (1985). L'intersexualité chez le chien (*canis familiaris*). A propos de quatre cas. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 156, 179-192.
29. Svendsen, C.K., Thomsen, P.D., Basse, A. (1985). Two cases of male pseudohermaphroditism in the dog. Clinical, macroscopic, karyotypic, and therapeutic features. *Nordisk Veterinærmedicin*. 37, 358-363.
30. Nickel, R.F., Ubbink, G., Van der Gaag, I., Van Sluijs, F.J. (1992). Persistent Müllerian duct syndrome in the Basset Hound. *Tijdschr. Diergeneeskde*. 117 (Suppl. 1), 315;
31. Simpson, G., England, G., Harvey, M. (1998). *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*. Iowa State University Press, Ames. Ed: British Small Animal Veterinary Association.
32. Volpe, P., Izzo, B., Pia Di Meo, G., Perucatti, A., Iannuzzi, L. (2000). Male pseudohermaphroditism in a dog: a clinical case. *The Veterinary Record*. 146, 532- 533.
33. Nemzek, J. A.; Homco, L. D.; Wheaton, L. G.; Gimán, G. L. Clastic ovaries and hyperestrogenism in a canine female pseudohermaphrodite. *Journal of American Animal Hospital Association*, v. 28, p. 402-406, 1992.
34. Inforzato G R, dos Santos W R M, Clemini B S O, Filadelfo A L; Pseudo-Hermaphroditismo em cães, Revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*– ISSN: 1679-7353; Ano VII – Número 12 – Janeiro de 2009.
35. Peter, A.T.; Markwelder, D.; Asem, E.K. Phenotypic feminization in a genetic male dog caused by nonfunctional androgen receptors. *Theorogenology*, v. 40, p. 1093- 1105, 1993.
36. Brook, C.G.D. Persistent Müllerian duct syndrome. In: Josso N (ed.); *The Intersex Child. Pediatric and Adolescent Endocrinology*, vol 8. Basal: S. Karger; 1981: p.100-104.
37. Relf JS, Brodey RS. The relationship between cryptorchidism and canine testicular neoplasia. *J Am Vet Med Assoc*, v.155, p.2005-2010, 1969.
38. Peters, m. A. J; Jong, f. H. Teerds, k. J; Rooij, d. G. De; dieleman, s. J and Van Sluijs, F. J. Ageing, testicular tumours and the pituitary-testis axis in dogs. *Journal of Endocrinology*, 153-161, 2000.
39. Bigliardi, E.; Parma, P.; Peressotti, P.; et al. Clinical, genetic, and pathological features of male pseudohermaphroditism in dog. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 12, n. 9, p. 1-7, 2011.
40. Masserdotti C. Tumori testicolari del cane: diagnostica citologica e correlazioni istopatologiche. *Veterinaria Anno 2000*; 14: 57-63.
41. Felman EC, Nelson RW. Endocrinología y reproducción en perros y gatos. 2a ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana; 2000.
42. Mueller A, Herms L, Robaire M. The effects of aging on the expression of glutathione S-transferases in the testis and epididymis of the Brown Norway rat. *J Androl* 1998; 19: 450-465.
43. Johnston GR, Feeney DA, Rivers B, et al. Diagnostic imaging of the male canine reproductive organs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v.21, p.553-589, 1991.
44. Kawakami E, Tsutsui T, Yamada Y, Yamauchi M. Cryptorchidism in the dog: occurrence of cryptorchidism and semen quality in the cryptorchid dog. *J Vet Sci*, v.46, p.303-308, 1984.

Recebido para publicação em: 17/06/2016.

Enviado para análise em: 18/06/2016.

Aceito para publicação em: 20/06/2016.

8.2 Cópia de artigo aceito para publicação produzido durante o período do Doutorado

Normas para publicação no periódico disponível no endereço eletrônico:
<http://medvep.com.br/normas-para-publicacao/>

CONTENÇÃO FARMACOLÓGICA E ANESTESIA DE CAMPO EM MACACOS-BARRIGUDOS (*Lagothrix cana*, Atelidae) EMPREGANDO A FÓRMULA “ZAD-50” (ZOLETIL/50® + ATROPINA + DORMIUN-V®) E O MÉTODO DE EXTRAPOLAÇÃO ALOMÉTRICA PARA CÁLCULO DE DOSES

Chemical restraint and field anesthesia in woolly monkeys (*Lagothrix cana*, Atelidae) with allometrically scaled doses of the “ZAD-50” formula (Zoletil/50® + Atropine + Dormiun-V®)

Artigo referente a parte de tese de Doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens, junto à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, SP

CARNEIRO, M.R.; CHIESORIN NETO, L.; KLUCZKOVSKI JR., A.; MONTIANI-FERREIRA, F.; MOTA, L.S.L.S.; PACHALY, J.R.

Marcelo Rocha Carneiro

Médico Veterinário, Mestre em Ciência Animal. Aluno do Programa de Pós-graduação em Animais Selvagens da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, SP. E-Mail: mrcarneiro71@gmail.com

Laerzio Chiesorin Neto

Médico Veterinário, Especialista. Professor da Universidade Nilton Lins, Manaus, AM. E-Mail: laerziovet@ibest.com.br

Augusto Kluczkovski Júnior

Médico Veterinário, Mestre, Doutor – Fundação de Vigilância em Saúde – FVS – Manaus, AM. E-mail: augustokjr@hotmail.com

Fabiano Montiani-Ferreira

Médico Veterinário, Mestre, Doutor. Professor Adjunto - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR. E-mail: montiani@ufpr.br

Lígia Souza Lima Silveira da Mota

Zootecnista, Mestre, Doutora. Professora Adjunta no Departamento de Genética do Instituto de Biociências e docente do Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, SP. E-mail: ligia.mota@unesp.br

José Ricardo Pachaly

Autor para correspondência. Médico Veterinário, Mestre, Doutor, Pós-Doutor. Professor Titular do Programa de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Paranaense – UNIPAR. Diretor Científico do Instituto Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária – ESPECIALVET. Rua Lopes Trovão, 250, Zona 4, CEP 87014-080, Maringá, PR, Brasil. E-mail: pachaly@uol.com.br

Carneiro M.R., Chiesorin Neto, L.; Kluczkovski Jr. A.; Montiani-Ferreira, F.; Mota, L.S.L.S., Pachaly J.R.. Contenção farmacológica e anestesia de campo em macacos-barrigudos (*Lagothrix cana*, Atelidae) empregando a fórmula “ZAD-50” (Zoletil/50® + Atropina + Dormiun-V®) e o método de extrapolação alométrica para cálculo de doses. MEDVEP – Rev Cientif Vet Pequenos Anim Esti 2018: X(XX):XXX-XXX.

RESUMO

Relata-se a contenção farmacológica e anestesia dissociativa de campo de 21 primatas adultos da espécie *Lagothrix cana* (macaco-barrigudo), pesando $5,24 \pm 1,66$ kg, sendo 14 fêmeas e sete machos. Foi usada a associação de tiletamina, zolazepam, atropina e detomidina, em doses calculadas por meio de extrapolação alométrica interespecífica. Os fármacos foram combinados numa preparação concentrada que foi denominada “ZAD-50” (Zoletil/50® + Atropina + Dormiun-V®), para a qual se adicionam ao conteúdo de tiletamina e zolazepam desidratados de um frasco do produto Zoletil/50®, os volumes de 0,25 ml de atropina a 1,0%, 0,265 ml de Dormiun-V® e 2,2 ml de água destilada, obtendo-se volume final exato de 3,0 ml de ZAD-50, com a associação de fármacos numa concentração que permite a contenção farmacológica de um mamífero placentário que pese 10,0 Kg com um volume de 0,6 ml, por exemplo. Esse método simplifica enormemente o trabalho veterinário com mamíferos selvagens, e mostrou-se seguro e eficiente para procedimentos de captura, transporte, exame físico, marcação por microchip, colheita de amostras de sangue e urina, curativos, tratamento de feridas contaminadas e suturas cutâneas, procedimentos odontológicos, incluindo periodontia, exodontia, endodontia e dentística restauradora. Os machos foram submetidos a deferentectomia, com o protocolo associado a anestesia local.

Palavras Chave: alometria, anestesia, contenção, animais selvagens, primatas

ABSTRACT

This paper reports the results of a protocol chosen to perform chemical restraint and field anesthesia of 21 woolly-monkeys (*Lagothrix cana*: Atelidae) weighing $5,24 \pm 1,66$ kg, being fourteen females and seven males. A combination of tiletamine, zolazepam, atropine, and detomidine, in allometrically scaled dosages was used. These drugs were combined in a concentrate preparation called “ZAD-50” (Zoletil/50® + Atropine + Dormiun-V®), in which the dehydrated tiletamine + zolazepam content of a Zoletil/50® vial content is diluted with 0.25 ml of 1.0%

atropine, 2.50 ml of 2.0% xylazine, and 2.05 ml of distilled water. With this combination, the final volume of the vial is exactly 3.0 ml of ZAD-50, with the drugs associated in a concentration that allows to produce chemical restraint of a placental mammal weighing 10.0 kg with a 0.6 ml volume, for instance. This method simplifies to a great extent practicing wild mammal medicine, and showed to be safe and efficient for capture, transport, physical examination, microchip application, blood and urine sampling, bandaging, treatment of contaminated wounds and skin sutures, dentistry procedures, including periodontics, exodontics, endodontics, and restorative dentistry. The males were submitted to deferentectomy, with this protocol associated with local anesthesia.

Key Words: allometrics, anesthesia, restraint, wild animals, primates

Introdução

A contenção é o principal fator limitante na medicina de animais selvagens, e muitos fármacos são usados para produzir sedação ou anestesia nesses animais, isoladamente ou em associação (1; 2).

Este artigo relata o uso da associação de Zoletil/50® (tiletamina + zolazepam), atropina a 1,0% e detomidina a 1,0%, em doses calculadas por meio de extrapolação alométrica interespecífica. Os fármacos foram combinados numa preparação concentrada que denominamos “ZAD-50” (Zoletil/50® + Atropine + Dormiun-V®).

O objetivo foi avaliar a eficiência da associação farmacológica, e do método de extrapolação alométrica interespecífica para o cálculo de protocolos posológicos, para primatas da espécie *Lagothrix cana*. Adicionalmente, avaliou-se uma nova forma de diluição e combinação dos fármacos, possibilitando a contenção de um primata de médio porte com uma administração única, em um único dardo de pequeno volume.

O projeto referente a este estudo foi registrado no Instituto de Pesquisa, Estudos e Ambiência Científica da Universidade Paranaense – IPEAC/UNIPAR, e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – CEUA/FMVZ - UNESP, sob número de registro geral 174/2015.

Revisão Da Literatura

Dentre os primatas neotropicais Platyrrhini, os atelídeos (Família Atelidae) englobam as espécies que atingem as maiores massas corporais. Possuem uma cauda preênsil, que funciona como um quinto membro e auxilia o equilíbrio durante sua movimentação. A fórmula dentária dos adultos é 2(I 2/2; C1/1; P 3/3; M 3/3).

Existem quatro gêneros de atelídeos: *Alouatta* (com 10 espécies de bugios), *Ateles* (com sete espécies de macacos-aranha), *Lagothrix* (com quatro espécies de macacos-barrigudos) e *Brachyteles* (duas espécies de muriquis ou monos) (3; 4; 5).

Os macacos-barrigudos (*Lagothrix* spp.) ocupam áreas do território de alguns países amazônicos – Peru, Colômbia, Venezuela, Equador, Bolívia e Brasil (6). Possuem hábitos diurnos (7). Ocupam principalmente áreas de

floresta primária, circulando entre todos os níveis e dificilmente descem ao solo, e bebem a água acumulada em folhas, bromeliáceas e outras estruturas vegetais. Formam grupos de até 40 indivíduos, mas existem relatos ocasionais de indivíduos solitários. Dormem nas copas das árvores, em cima de galhos, mas não necessariamente em um mesmo local, geralmente próximos às fontes de alimento. Geralmente, enquanto a maioria do grupo se alimenta, alguns indivíduos atuam como sentinelas contra eventuais predadores (9). São primariamente frugívoros, e, portanto, excelentes dispersores de sementes. O comportamento alimentar de aproximadamente 40 indivíduos, durante 11 meses, na região de Tefé (Amazonas, Brasil), em 3298 registros de alimentação, constatando-se que a dieta se compõe principalmente por frutos maduros (83%) e sementes (7%). Pode ocorrer variação estacional, e em períodos em que há escassez de frutos a composição da dieta pode variar, incluindo folhas verdes, seiva e flores, sendo que alimentos de origem animal (artrópodes e outras presas) não constituem mais que 0,1% da ingesta (7). Outro estudo, com duração de quatro meses, avaliou o comportamento de 18 indivíduos semicativos, concluindo que o descanso consome 45% do tempo, sendo forrageamento a atividade mais frequente (29%), seguido por deslocamento (23%), interações sociais (3%) e *grooming* (1%) (8). A maturidade sexual ocorre entre cinco e oito anos, a gestação dura aproximadamente 225 dias, e o período de lactação varia entre nove meses e um ano, sendo que a expectativa de vida em cativeiro é de aproximadamente 25 anos (9). Somente as fêmeas carregam os filhotes, primeiramente agarrados ao ventre e, após algum tempo de desenvolvimento, em suas costas (10). Seus principais predadores são os grandes rapinantes, os grandes felídeos e os humanos, por serem muito apreciados como alimento por algumas comunidades indígenas. Na região amazônica, a caça de animais selvagens é uma atividade tradicional, que visa prover as necessidades das populações locais em termos de alimentação de subsistência e outros itens (11), e os *Lagothrix* são os primatas mais frequentemente caçados na região Amazônica (12). Além da caça predatória, a destruição do habitat natural e o tráfico de exemplares para serem utilizados como *pets* contribuem para a diminuição substancial das populações em vida livre. A pressão antrópica é tão devastadora que já existem relatos de indivíduos transpondo os limites de sua distribuição geográfica original, numa tentativa de busca de um ambiente favorável para sua manutenção (13). A ausência de maiores informações a respeito das características reprodutivas da espécie também constitui um fator limitante à execução de atividades de manejo com vistas ao repovoamento das áreas que ainda não foram degradadas (8).

A associação de anestésicos dissociativos a agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 é utilizada em medicina veterinária desde a década de 1960, e continua a ser o protocolo geral mais empregado na contenção farmacológica e anestesia injetável de animais selvagens (14).

Dos anestésicos dissociativos, os mais comuns são a cetamina e a tiletamina, fármacos que promovem sedação e analgesia por interromper a transmissão ascendente das porções cerebrais inconscientes para as conscientes, ao mesmo tempo em que produzem um estado cataléptico (2). O início da ação é rápido, e quando usados em conjunto com agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2, a indução geralmente é tranquila, sendo que os efeitos cardiovasculares dos agonistas são em parte compensados pelo agente dissociativo (15; 16; 17). É comum se observar um padrão respiratório

apnêustico, caracterizado por uma pausa após a inspiração, podendo também ocorrer hipertonia muscular (18; 19).

O cloridrato de tiletamina é um anestésico dissociativo mais potente que o cloridrato de cetamina, porém apresenta maior capacidade de causar convulsões. Por isso, é produzido sempre em associação a um potente benzodiazepínico, o zolazepam, que possui ação anticonvulsivante e miorrelaxante, minimizando as ações cataleptóides da tiletamina (20). A duração de ação da tiletamina é três vezes mais longa que a da cetamina, sendo mais eficaz na indução da anestesia em primatas e gatos que em outras espécies (21).

A utilização de agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 potencializa os efeitos da associação tiletamina-zolazepam, resultando em aumento do plano anestésico (22). Tais fármacos são sedativos e causam depressão dose-dependente pela estimulação de receptores adrenérgicos alfa-2 no sistema nervoso, tanto central quanto periférico (23). Os agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 atuam impedindo a liberação da noradrenalina, e não existindo quantidade suficiente de noradrenalina na fenda sináptica, a transmissão do impulso nervoso fica inibida (24). É importante frisar que se o paciente estiver previamente excitado ou sob situação de estresse, o efeito farmacológico dos agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 fica diminuído, tanto isoladamente quanto em combinação com anestésicos (2).

A detomidina é um dos agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 atualmente mais utilizados na sedação e medicação pré-anestésica em equinos (25), outros autores, indicam-na para intervenções cirúrgicas na posição quadrupedal (26). Também tem sido usada em associação a diversos outros fármacos, aparentemente com pequenas diferenças em relação à xilazina, para sedação pré-anestésica (16; 27; 28; 29; 30). Existe aparentemente um “efeito platô” na sedação, sendo que um aumento da dose de detomidina pode melhorar a analgesia e aumentar a duração de seu efeito, mas não leva a um aumento concomitante na intensidade da sedação (31; 32). Em função do relativo aumento da potência e efeito prolongado de sua ação, pode ocorrer sedação residual (16; 28; 30). Sua utilização, isoladamente ou em associação a outros fármacos sedativos e anestésicos, para contenção farmacológica de diversas espécies de mamíferos selvagens placentários não xenartros (30). A associação denominada “ZAD” já foi utilizada para contenção farmacológica de leões (14), quatis (33) e onças (34; 35), bem como em cães (36) e gatos domésticos (37), além de pequenos roedores, como o hamster-sírio (38).

Em anestesiologia, o sulfato de atropina é empregado para reduzir secreções do trato respiratório e das glândulas salivares, e para inibir os efeitos da estimulação vagal sobre os sistemas respiratório e cardiovascular (39; 40). Age bloqueando o estímulo vagal induzido por respostas reflexas à tração de vísceras, à estimulação laríngea direta e o induzido por diversos agentes anestésicos e pré-anestésicos (40; 41). Tem também ação broncodilatadora, relaxando a musculatura lisa bronquial e traqueal, mas não produz alterações importantes na pressão sanguínea (40). Diminui o peristaltismo e reduz a atividade secretora do trato digestório (42), e em muitas espécies produz midríase (40). Sua utilização evita efeitos adversos dos agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2, como bradicardia, hipotensão e bloqueio atrioventricular (43).

Estando os animais submetidos à anestesia de campo, é fundamental a monitorização dos parâmetros vitais como frequência cardíaca e respiratória, e embora a frequência cardíaca diminua após a administração de agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2, geralmente retorna ao normal após a administração do anestésico dissociativo (14; 19; 34; 33). Empregando a combinação de anestésicos dissociativos a agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2, é comum se observar padrão respiratório apnêustico, caracterizado por uma pausa após a inspiração (18; 44). Entretanto, à medida que a profundidade anestésica se torna menos intensa, a respiração se torna mais regular e laboriosa. Na avaliação da profundidade anestésica, essa mudança no padrão respiratório pode ser bastante útil, sendo que é pouco comum a necessidade de ventilação assistida quando são usadas as combinações de anestésicos dissociativos a agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 (44). Também pode ocorrer hipertonia muscular (19).

Tradicionalmente, doses de fármacos são calculadas e expressas em quantidade por unidade de massa corporal (mg/kg). O emprego desse padrão metodológico, que usa proporcionalidade direta, pode levar a problemas graves relacionados com subdosagens ou dosagens excessivas, devido à grande disparidade de tamanhos e padrões fisiológicos encontrados em algumas espécies (45; 46). O método de extrapolação alométrica, entretanto, calcula e expressa doses como quantidade por unidade de energia consumida por um determinado animal em situação de metabolismo basal (mg/kcal). Uma vez que absorção, distribuição e eliminação de todas as drogas ocorrem em função da taxa metabólica basal, o método alométrico permite, pelo conhecimento das taxas metabólicas basais de dois diferentes vertebrados, extrapolar matematicamente para um deles doses de medicamentos indicadas para outro, para o qual já tenham sido realizados estudos laboratoriais de experimentação farmacocinética e farmacodinâmica (45; 46). O objetivo prático mais evidente, em medicina veterinária, é a extrapolação das doses de drogas entre animais de formas, tamanhos e massas diferentes, possibilitando o uso de dados farmacológicos obtidos em um animal-modelo, para o qual o fármaco foi desenvolvido e estudado, para a farmacoterapia em um animal-alvo, que pode ser qualquer paciente doméstico ou selvagem (45; 46; 47).

No que tange, especificamente à contenção farmacológica de primatas não-humanos, a associação de anestésico dissociativo, benzodiazepínico, atropina e agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 já havia se mostrado efetivamente segura para procedimentos semelhantes aos que foram objeto deste estudo, quando na ocasião, a xilazina, foi a droga utilizada como representante da classe dos agonistas de receptores adrenérgicos alfa-2 (48; 49).

Materiais E Método

Foram utilizados neste trabalho 21 primatas adultos da espécie *Lagothrix cana*, pesando $5,24 \pm 1,66$ kg, sendo 14 fêmeas e sete machos, conforme o Quadro 1. Os animais estavam sob tutela da Fundação Floresta Viva e do CETAS do Refúgio de Vida Selvagem Sauim Castanheiras, em Manaus, capital do estado do Amazonas.

Quadro 1. Identificação de 21 macacos-barrigudos (*Lagothrix cana*) submetidos a contenção farmacológica para realização de diversos procedimentos médicos, empregando a fórmula “ZAD-50” (mistura preparada pela adição de 0,25 mL de sulfato de atropina a 1,0%; 0,265 mL de Dormiun-V® e 2,2 mL de água destilada a um frasco de Zoletil/50®), em doses calculadas por meio de extrapolação alométrica interespecífica.

Paciente	SEXO	Massa corporal ($5,24 \pm 1,66$ Kg)
1	Fêmea	3,50
2	Fêmea	4,25
3	Fêmea	2,50
4	Fêmea	4,25
5	Fêmea	2,50
6	Fêmea	6,10
7	Macho	4,50
8	Fêmea	5,60
9	Fêmea	5,50
10	Fêmea	5,00
11	Fêmea	6,00
12	Macho	6,50
13	Macho	6,50
14	Fêmea	3,90
15	Fêmea	4,80
16	Fêmea	5,00
17	Fêmea	6,90
18	Macho	3,40
19	Macho	6,80
20	Macho	7,90
21	Macho	8,80

As doses a administrar a cada paciente foram calculadas por meio de extrapolação alométrica interespecífica. Para Zoletil® e atropina, o animal-modelo foi o cão doméstico de 10 kg, e as doses-modelo foram 5,0 mg/kg e 0,05 mg/kg, respectivamente. Para detomidina, o animal modelo foi o cavalo de 500,0 Kg, e a dose modelo de foi 0,02 mg/Kg.

Os fármacos foram combinados numa preparação concentrada que foi denominada “ZAD-50” (Zoletil/50®² + Atropina³ + Dormiun-V®⁴), para a qual se adicionam ao conteúdo de tiletamina e zolazepam desidratados de um frasco do produto Zoletil/50®, os volumes de 0,25 ml de sulfato de atropina a 1%, 0,265 ml de Dormiun-V® e 2,2 ml de água destilada. Com essa combinação se obtém um volume final no frasco de exatamente 3,0 ml de “ZAD-50”. Os cálculos alométricos geraram uma tabela de doses de ZAD-50 em ml, com indicação para administrar a primatas da espécie *Lagothrix cana*, pesando entre 2,5 e 8,8 Kg (Quadro 2).

Quadro 2. Volume em ml de “ZAD-50” (mistura preparada pela adição de 0,25 ml de sulfato de atropina a 1,0%; 0,265 ml de Dormiun-V® e 2,2 ml de água destilada a um frasco de Zoletil/50®) calculadas por meio de extrapolação

² Zoletil, Lab. Virbac, São Paulo.

³ Atropina 1% Fagra, Lab. Farmagráfica, Mairiporã, São Paulo.

⁴ Dormiun-V. Laboratório Agener União, Brasília.

alométrica interespecífica, indicadas para administração intramuscular na contenção farmacológica de primatas da espécie *Lagothrix cana*, pesando entre 0,10 e 10,0 kg.

Massa Corporal (Kg)	ZAD-50 (mL)	Massa Corporal (Kg)	ZAD-50 (mL)	Massa Corporal (Kg)	ZAD-50 (mL)	Massa Corporal (Kg)	ZAD-50 (mL)
0,10	0,0190	2,60	0,2186	5,10	0,3622	7,60	0,4886
0,20	0,0319	2,70	0,2248	5,20	0,3676	7,70	0,4934
0,30	0,0433	2,80	0,2310	5,30	0,3728	7,80	0,4982
0,40	0,0537	2,90	0,2372	5,40	0,3781	7,90	0,5030
0,50	0,0635	3,00	0,2433	5,50	0,3834	8,00	0,5077
0,60	0,0728	3,10	0,2494	5,60	0,3886	8,10	0,5125
0,70	0,0817	3,20	0,2554	5,70	0,3938	8,20	0,5172
0,80	0,0903	3,30	0,2613	5,80	0,3989	8,30	0,5220
0,90	0,0986	3,40	0,2673	5,90	0,4041	8,40	0,5267
1,00	0,1067	3,50	0,2731	6,00	0,4092	8,50	0,5314
1,10	0,1146	3,60	0,2790	6,10	0,4143	8,60	0,5360
1,20	0,1224	3,70	0,2848	6,20	0,4194	8,70	0,5407
1,30	0,1300	3,80	0,2905	6,30	0,4245	8,80	0,5454
1,40	0,1374	3,90	0,2962	6,40	0,4295	8,90	0,5500
1,50	0,1447	4,00	0,3019	6,50	0,4345	9,00	0,5546
1,60	0,1519	4,10	0,3075	6,60	0,4395	9,10	0,5593
1,70	0,1589	4,20	0,3132	6,70	0,4445	9,20	0,5639
1,80	0,1659	4,30	0,3187	6,80	0,4495	9,30	0,5684
1,90	0,1727	4,40	0,3243	6,90	0,4544	9,40	0,5730
2,00	0,1795	4,50	0,3298	7,00	0,4594	9,50	0,5776
2,10	0,1862	4,60	0,3353	7,10	0,4643	9,60	0,5821
2,20	0,1928	4,70	0,3407	7,20	0,4692	9,70	0,5867
2,30	0,1994	4,80	0,3461	7,30	0,4740	9,80	0,5912
2,40	0,2058	4,90	0,3515	7,40	0,4789	9,90	0,5957
2,50	0,2122	5,00	0,3569	7,50	0,4837	10,00	0,6002

Todos os animais foram previamente mantidos isolados e confinados nas áreas de cambiamento de seus recintos e submetidos a jejum alimentar prévio mínimo de 24 horas, sem restrição hídrica.

Previamente à captura, a equipe de trabalho avaliava externamente as condições físicas do animal e estimava seu peso corporal. Com base nesse dado era preparado um dardo de confecção artesanal contendo a dose de ZAD-50 indicada pelos cálculos alométricos, que era projetado contra o animal por meio de zarabatana, injetando-se a associação de fármacos por via intramuscular profunda.

Imediatamente após a injeção do ZAD-50 era acionado um cronômetro, e todos os procedimentos subsequentes eram registrados com referência a minutos pós-injeção (MPI). Uma vez induzida a contenção farmacológica, os animais foram submetidos a exame físico e a exame anestesiológico, baseado em método proposto na literatura (50) para animais selvagens, consistindo da avaliação da nocicepção e do miorelaxamento.

Os dados referentes aos exames físico e anestesiológico foram avaliados em intervalos de 10 MPI (minutos pós-injeção), e registrados em fichas durante todo o período do procedimento. Nesses momentos foram avaliados ainda o fluxo salivar e o diâmetro pupilar, e realizada irrigação oftálmica com solução de NaCl a 0,9%, para evitar dessecação corneana. O exame físico consistiu da inspeção visual do tegumento e da cavidade oral, avaliação das frequências

cardíaca e pulmonar por meio de estetoscopia, avaliação da saturação parcial de oxigênio por meio de oximetria de pulso, e avaliação da temperatura corporal por meio de termometria retal.

Foram avaliados intervalo de tempo entre a administração do ZAD-50 e a perda da reação postural de endireitamento (RPE), o tempo compreendido entre a perda da RPE e a primeira tentativa do animal em decúbito levantar a cabeça da superfície e o retorno da RPE.

Uma vez constatada a perda da RPE a equipe adentrava o recinto e iniciava a avaliação clínica do animal. O exame anestesiológico consistiu da avaliação da nocicepção e do miorrelaxamento a cada 10 MPI. A nocicepção foi testada por meio da resposta ao pinçamento da segunda falange de um dígito dos membros torácico e pélvico esquerdos com pinça hemostática sem catraca, que era apertada até que se percebesse compressão intensa do dígito. A analgesia foi considerada excelente quando da ausência de reações de sensibilidade, boa quando ocorreu reação dolorosa moderada, com discreta resistência aos testes, e ruim quando a reação dolorosa foi intensa e caracterizada por situações de evidente desconforto, como flexão total do membro, movimentação da cabeça e vocalização.

Foram também avaliadas as reações de cada paciente às diversas situações a que foram submetidos, incluindo captura, transporte, exame físico, marcação por microchip, colheita de amostras de sangue e urina, curativos, tratamento de feridas contaminadas e suturas cutâneas, procedimentos odontológicos, incluindo periodontia, exodontia, endodontia e dentística restauradora. Os machos foram submetidos a deferentectomia, com o protocolo associado a anestesia local.

O miorrelaxamento foi avaliado pelo grau de rigidez extensora, pela resistência dos membros torácicos e pélvicos à manipulação, e pelo tono muscular. O miorrelaxamento foi considerado excelente quando da perda total do tono muscular, com ausência de tremores e/ ou rigidez, bom quando ocorreu moderada manutenção do tono muscular, e ruim quando o animal apresentou estado de catalepsia ou movimentação intensa. Para a determinação da qualidade da contenção farmacológica foram considerados o estado de imobilidade e o miorrelaxamento, observados a cada 10 MPI ao longo do procedimento. A contenção foi considerada excelente quando o animal apresentou miorrelaxamento excelente e total imobilidade, boa quando o paciente apresentou bom miorrelaxamento e discreta movimentação voluntária, e ruim quando o animal apresentou miorrelaxamento ruim e movimentação voluntária que indicasse a necessidade de meios físicos de contenção.

Após os 60 MPI cada paciente era devolvido ao ser recinto de origem e passava a ser monitorizado à distância. A qualidade da recuperação era considerada excelente quando o animal repousava tranquilamente até despertar, boa quando apresentasse moderada excitação psicomotora, e ruim quando apresentasse agitação, tremores, mioclonia e/ou convulsões generalizadas.

Todos os dados foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial empregando a plataforma JMP (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, North Carolina, EUA). A distribuição normal das variáveis contínuas numéricas (frequência cardíaca e respiratória, temperatura retal e SpO₂) foi analisada e confirmada pelo Teste de Shapiro Wilk. Em seguida foi realizado o teste ANOVA de medidas repetidas, uma vez que os dados eram pareados (mesmos animais em diferentes tempos), seguida de teste *post hoc* de Tukey-

Kramer. Os resultados foram expressos no formato de média e desvio padrão. A análise das variáveis categóricas ordinais de miorelaxamento e resistência dos membros torácicos e pélvicos à manipulação se deu por meio do teste de Qui-quadrado. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos. Após isso, foi realizado o teste de Spearman, para determinar a existência de correlação entre os parâmetros fisiológicos monitorizados em relação ao tempo, ao longo do processo de contenção. Os resultados foram expressos no formato de coeficiente de correlação de postos de Spearman (r_s) e valores de p .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais perderam expressivamente a reação postural de endireitamento (RPE) em $2,52 \pm 0,74$ MPI, e apresentaram início da anestesia aos $3,57 \pm 0,74$ MPI. O retorno de reações conscientes foi observado em $102,0 \pm 66,72$ MPI, com recuperação da reação postural de endireitamento aos $118,0 \pm 62,46$ MPI, e retorno à ambulação normal aos $237,5 \pm 3,53$ MPI.

Os dados referentes aos parâmetros fisiológicos frequência cardíaca, frequência respiratória, saturação parcial de oxigênio (SpO_2) e temperatura retal aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos do período anestésico são apresentados no Quadro 3. A análise global da frequência cardíaca mostrou redução significativa ($p < 0.05$) com relação ao passar do tempo. Com ponto de redução pontual mais crítica entre 10 e 60 MPI ($p = 0,0248$). A frequência respiratória não mostrou diferença significativa em nenhum dos momentos da anestesia. Já no que se diz respeito à temperatura retal, observou-se queda global significativa ($p < 0.05$) a partir de 10 MPI, com a redução pontual mais crítica entre 40 e 50 MPI ($p < 0,05$). Finalmente, a saturação parcial de oxigênio não apresentou diferenças globais significativas durante todo o período anestésico. Houve, no entanto, diferença significativa pontual dos valores obtidos entre 30 e 60 MPI ($p = 0,0334$).

Quadro 3. Frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e saturação parcial de oxigênio (SpO_2) de 21 primatas adultos da espécie *Lagothrix cana* submetidos a contenção farmacológica e anestesia dissociativa de campo pela associação de Zoletil®, Atropina e Detomidina ("ZAD-50"), em doses calculadas por meio de extrapolação alométrica interespecífica (média $\pm$ desvio padrão).

Minutos pós-injeção	Frequência Cardíaca (bpm)	Frequência Respiratória (mpm)	Temperatura retal (°C)	SpO_2 (%)
10	147 ± 29	51 ± 14	$39,0 \pm 0,7$	89 ± 4
20	143 ± 14	50 ± 10	$38,9 \pm 0,8$	88 ± 4
30	141 ± 13	48 ± 10	$38,7 \pm 0,8$	87 ± 4
40	139 ± 15	48 ± 11	$38,3 \pm 1,0$	84 ± 8
50	141 ± 25	51 ± 15	$38,0 \pm 1,0$	84 ± 11
60	131 ± 14	47 ± 12	$37,8 \pm 1,2$	87 ± 10

1. (mpm = movimentos por minuto; bpm = batimentos por minuto)

A frequência cardíaca, na avaliação estatística pelo teste de Spearman, mostrou moderada correlação negativa significativa com o tempo ($r_s = -0,6$; $p = 0,0003$), ou seja, diminuindo conforme passava o tempo. Quanto à frequência respiratória, a análise dos dados pelo teste de Spearman mostrou fraca correlação negativa significativa entre o tempo e a frequência respiratória ($r_s = -0,3$, $p = 0,02$). No que diz respeito à temperatura retal, houve forte correlação negativa com o tempo ($r_s = -0,9$, $p = 0,0001$), diminuindo intensamente conforme passava o tempo. No que tange à saturação parcial de oxigênio, não houve correlação pelo teste de Spearman ($p = 0,38$).

A qualidade da contenção farmacológica, da analgesia e do miorrelaxamento foi considerada excelente, e durante anestesia, os parâmetros fisiológicos apresentaram características compatíveis com o esperado. Não houve variação na frequência respiratória, enquanto a frequência cardíaca se manteve estável na maior parte do tempo anestésico, apresentando uma diminuição dos batimentos entre 10 MPI e 60 MPI, podendo estar relacionada com o estresse prévio à contenção, que favorece o aumento da frequência cardíaca. A temperatura retal caiu progressivamente a partir de 10 MPI e a saturação parcial de oxigênio não apresentou diferenças significativas durante a anestesia. A qualidade da recuperação foi considerada excelente em todos os casos.

Os resultados aqui obtidos corroboram dados referentes a um estudo em que se empregou com sucesso a extrapolação alométrica interespecífica e o mesmo método de concentração e diluição, para a associação denominada “ZAD-50” em leões (14), quatis (33), onças (34; 35), cães domésticos (36), hamster-sírio (38) e gatos domésticos (ANDO et al, 2015).

CONCLUSÃO

A contenção farmacológica de todos os animais foi plenamente satisfatória. Não foram observadas reações adversas e os parâmetros vitais avaliados mantiveram-se dentro de padrões compatíveis com o estado de contenção farmacológica e com o retorno à vida normal.

A combinação “ZAD-50” tem volume final de 3,0 ml após o preparo, estando os fármacos tiletamina, zolazepam, atropina e detomidina associados em alta concentração. Esse método simplifica enormemente o trabalho veterinário com mamíferos selvagens, como os primatas do porte da espécie *Lagothrix cana*, possibilitando a captura de cada animal empregando-se um único dardo de pequeno volume. Como exemplo, a contenção farmacológica de um macho adulto pesando 8,8 kg se faz com um volume de 0,54 ml de ZAD-50.

O método mostrou-se seguro e eficiente para procedimentos de captura, transporte, exame físico, marcação por microchip, colheita de amostras de sangue e urina, curativos, tratamento de feridas contaminadas e suturas cutâneas, procedimentos cirúrgicos e odontológicos, incluindo periodontia, exodontia, endodontia e dentística. A figura 1 mostra diferentes situações referentes à contenção farmacológica de alguns dos animais contidos de acordo com o método apresentado neste artigo.

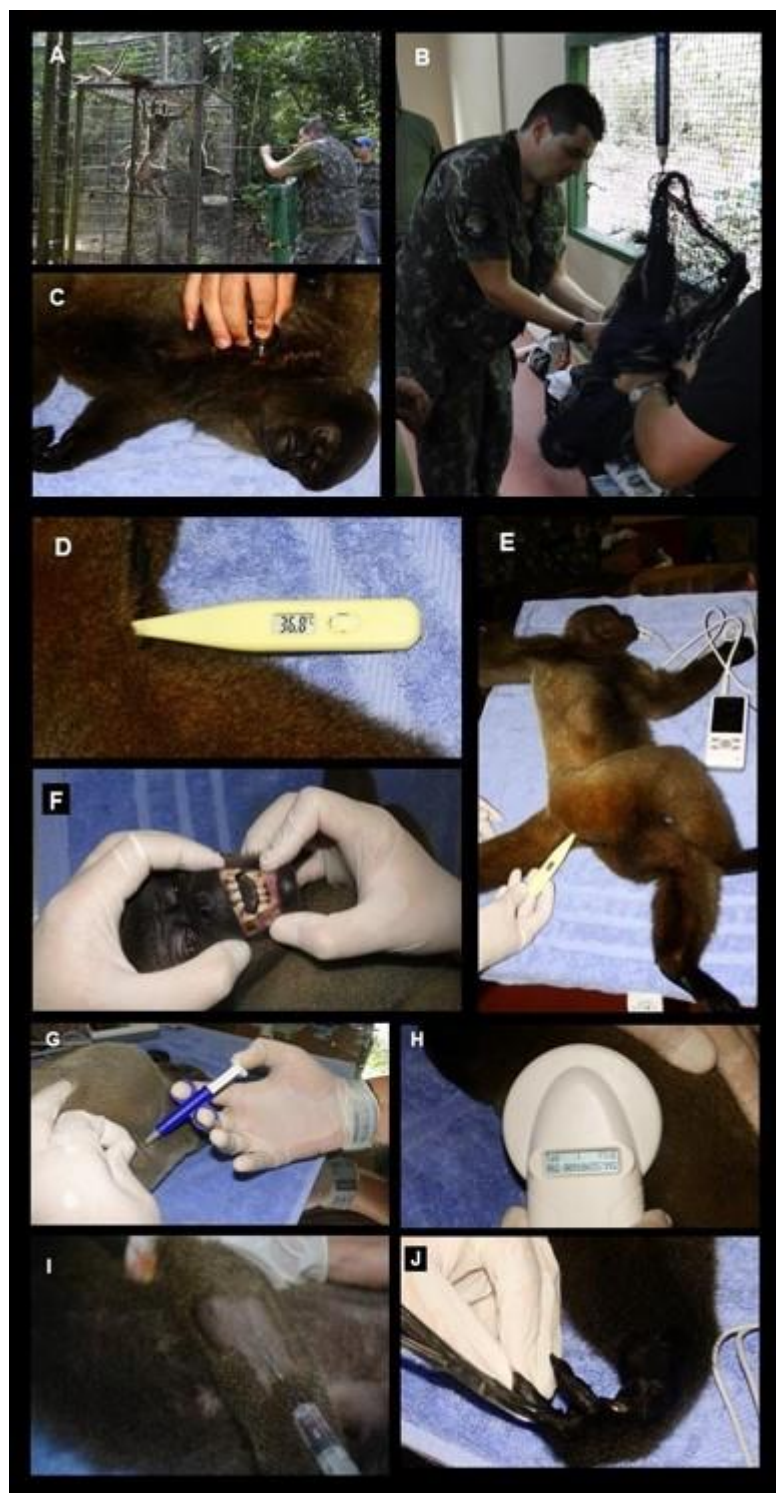


Figura 1. A. Imagem fotográfica do procedimento prévio à contenção de um exemplar adulto de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*). Observa-se a utilização de zarabatana para propulsão de dardo artesanal pressurizado contendo a solução ZAD-50. B. Imagem fotográfica do mesmo animal, já contido farmacologicamente pela associação “ZAD-50” (Zoletil/50® + Atropina + Dormiun-V®), em dose calculada por meio de extrapolação alométrica interespecífica. Observa-se a realização de procedimento de pesagem do animal, com utilização de rede e balança suspensa, C. Imagem fotográfica de um exemplar adulto de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*), contido farmacologicamente pela associação “ZAD-50” (Zoletil/50® + Atropina + Dormiun-V®), em dose calculada por meio de extrapolação alométrica interespecífica, observando-se monitorização da frequência cardíaca por meio de auscultação torácica com estetoscópio, D. Imagem fotográfica de um exemplar adulto de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*),

contido farmacologicamente pela associação “ZAD-50” (Zoletil/50® + Atropina + Dormiun-V®), em dose calculada por meio de extrapolação alométrica interespecífica, observando-se aferição da temperatura por meio de termometria retal. **E.** Imagem fotográfica do mesmo animal, observando-se monitorização de SpO₂ por meio de oxímetro de pulso portátil, **F.** Imagem fotográfica do mesmo animal, observando-se a realização de inspeção da cavidade oral, **G.** Imagem fotográfica do mesmo animal, observando-se realização de marcação por meio de injeção subcutânea de *microchip*, **H.** Imagem fotográfica de um exemplar adulto de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*), contido farmacologicamente pela associação “ZAD-50” (Zoletil/50® + Atropina + Dormiun-V®), em dose calculada por meio de extrapolação alométrica interespecífica, observando-se procedimento de aferição de funcionamento do *microchip* recém-implantado, **I.** Imagem fotográfica do mesmo animal, observando-se realização de procedimento de colheita de sangue por punção da veia braquial esquerda, **J.** Imagem fotográfica do mesmo animal, observando-se procedimento de monitorização da nocicepção por meio de pinçamento da segunda falange do dedo médio do membro torácico esquerdo.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudos, ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – IB/UNESP – *campus* Botucatu, e às equipes veterinárias dos zoológicos do Centro de Triagem de Animais Silvestres do Refúgio de Vida Selvagem Sauim Castanheiras, bem como à toda a equipe de apoio da Fundação Floresta Viva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FOWLER, M.E. 1986. Restraint. In: Fowler, M.E (ed.). **Zoo and Wild Animal Medicine**, 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders. p. 38-50.
2. PACHALY, J.R. Principais drogas empregadas na contenção química de animais selvagens. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.3, n.1, p. 87-94. 2000.
3. SCHNEIDER, H. 2000. The current status of the New World monkey phylogeny. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72: 165–172.
4. OPAZO, J.C., WILDMAN, D.E., PRYCHITKO, T., JOHNSON, R.M. and GOODMAN, M. 2006. Phylogenetic relationships and divergence times among New World monkeys (Platyrrhini, Primates). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 274–280.
5. WILDMAN, D.E., JAMESON, N.M., OPAZO J.C., and YI, S.V. 2009. A fully resolved genus level phylogeny of Neotropical primates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 694–702.
6. FOODEN, J. 1963. A revision of the woolly monkeys (genus *Lagothrix*). *Journal of Mammalogy* 44: 213–247.
7. PERES, C.. (1994). Diet and feeding ecology of gray woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha cana*) in Central Amazonia: Comparisons with other Atelines. *International Journal of Primatology*. 15. 333-372. 10.1007/BF02696098.
8. BODMER, R., ROBINSON, J., 2004. Evaluating the sustainability of hunting in the Neotropics. In: SILVIUS, K., BODMER, R., FRAGOSO, J.M.V. (Eds.), *People in Nature. Wildlife conservation in South and Central America*. Columbia University Press, New York, pp. 199–323.

9. MAYOR, P., BOWLER, M. & LÓPEZ PLANA, C.. (2012). Ovarian functionality in Poeppig's woolly monkey (*Lagothrix poeppigii*). *Animal reproduction science*. 136. 10.1016/j.anireprosci.2012.11.006.
10. VOSS, R.S., FLECK, D.W. Mammalian Diversity and Matses Ethnomammology in Amazonian Peru Part1: Primates. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 2011 351, 1-81
11. FITZ GIBBON, C., 1998. The management of subsistence harvesting: behavioural ecology of hunter and their mammalian prey. In: CARO, T. (Ed.), *Behavioural Ecology and Conservation Biology*. Oxford University Press, Oxford, pp. 449–474.
12. PUERTAS, P., BODMER, R.E., 2004. Hunting effort as a tool for communitybased wildlife management in Amazonia. In: SILVIUS, K., BODMER, R.E., FRAGOSO, J.M.V. (Eds.), *People in Nature*. Columbia University Press, New York, pp. 123–137.
- SCHNEIDER, H. 2000. The current status of the New World monkey phylogeny. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72: 165–172.
13. NUNES, A. V.; ORSINI, V.S.. New records and geographic distribution of Grey Woolly Monkeys, *Lagothrix cana* (É. Geoffroy, 1812) (Primates, Atelidae), in southern Brazilian Amazonia. **Check List**, [S.l.], v. 12, n. 6, p. 2007, dec. 2016. ISSN 1809-127X. Available at: <<https://biotaxa.org/cl/article/view/12.6.2007>>. Date accessed: 16 july 2018. doi:<http://dx.doi.org/10.15560/12.6.2007>.
14. PACHALY, J.R., VOLTARELLI-PACHALY, E.M. Novo método para contenção farmacológica e anestesia de campo em leões (*Panthera leo*), empregando a fórmula "ZAD" (Zoletil 100® + Atropina + Dormiun-V®) – Relato preliminar. *A Hora Veterinária*, n. 181, p.66-72. 2011.
15. MUIR, W.W.; SKARDA, R.T.; MILNE, D.W. Evaluation of xylazine and ketamine hydrochloride for anesthesia in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, p. 195-201. 1977.
16. MATTHEWS, N.S.; MILLER, S.M.; SLATER, M.R.; HARTSFIELD, S.M.; SHORT, C.E. A comparison of xylazine-ketamine and detomidine-ketamine anaesthesia in horses. **Journal of Veterinary Anaesthesia**, v.20, p. 68-72. 1993.
17. PACHALY, J.R. Efeitos farmacológicos do cloridrato de cetamina em medicina veterinária. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v.13, n.1-2, p. 151-156. 1994.
18. LIN, H.C. Dissociative anesthetics. In: THURMON, J.; TRANQUILLI, W.; BENSON, G. **Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996, p. 599-609.
19. LIN, H.C. *et al.* Ketamine, Telazol, xylazine and detomidine: A comparative anaesthetic drug combinations study in ponies. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.33, p. 241-296. 1992.
20. DINIZ, L.S.M. 1999. Imobilização química em animais selvagens, p.170. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L. & BERNARDI M.M. (ed.). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
21. BRANSON, K.R. 2003. Anestésicos injetáveis. In: ADAMS H.R. (ed.), **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p.179-223.

22. SELMI, A.L. *et al.* O butorfanol na anestesia pela romifidina-tiletamina-zolazepam em gatos. **Ciência Rural**, Santa Maria, 33(6):1067-1073. 2003.
23. CORTOPASSI, S.R.G. 2004. Técnicas anestésicas utilizadas nos exames ultra-sonográficos, p.30-49. In: Carvalho C.F. (ed.), **Ultra-Sonografia em Pequenos Animais**. Roca, São Paulo.
24. PACHALY, J.R. Principais drogas empregadas na contenção química de animais selvagens. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar*, v.3, n.1, p. 87-94. 2000.
25. CHAMBERS J.P., LIVINGSTON A, WATERMAN AE, GOODSHIP A E. Analgesic effects of detomidine in thoroughbred horses with chronic tendon injury. *Research in Veterinary Science* 1993;54(1):52-56.
26. FEITOSA F.L.F. *et al.* Avaliação farmacológica da detomidina: um novo agente hipno-analgésico para uso em equinos. *Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo* 1990;14(2): 167-173.
27. CLARKE K, TAYLOR P. Detomidine: A new sedative for horses. *Equine Veterinary Journal* 1986;18(5):366-370.
28. MATTHEWS NS, HARTSFIELD SM, CORNICK JL, WILLIAMS JD, BEASLEY A. A comparison of injectable anesthetic combination in horses. *Veterinary Surgery* 1991;20(4):268-273.
29. FANTONI, D.T., FUTEMA, F., CORTOPASSI, S.R.G., SILVA, L.C.L.C.D., VERENGUER, M., MIRANDOLA, R., FERREIRA, M.A. Avaliação comparativa entre acepromazina, detomidina e romifidina em equinos. *Ciência Rural* 1999; 29(1):45-50.
30. PACHALY, J.R. ; ALBERTON, L. R. ; VOLTARELLI-PACHALY, E. M. ; BELETTINI, S.T. ; MONTEIRO FILHO, L. P. C. ; CARNEIRO, M. R. . Doses alométricas de cloridrato de detomidina para uso na contenção farmacológica de mamíferos selvagens placentários não xenartros, isoladamente ou em associação a outros fármacos sedativos ou anestésico. *MEDVEP. Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação*, v. 9, p. 462-469, 2011.
31. JÖCHLE, W. Field trial evaluation of detomidine as a sedative and analgesic in the horses colic. *Equine Veterinary Journal Supplements* 1989;7:117-120.
32. PACHALY, J.R.; CARNEIRO, M.R.; ALBERTON, L.R., BELETTINI, S.T.; AZZOLINI, F, PRAZERES, R.F.; VOLTARELLI-PACHALY, E.M. Contenção farmacológica e anestesia de campo em primatas da Família Cercopithecinae empregando a fórmula "ZAX-50" (Zoletil/50® + atropina + xilazina). *MEDVEP*. V. 9, N. 30, p. 415-459, 2011.
33. PACHALY, J. R.; DOMINGUES, R.H.; SOUZA, M.V.F.; VOLTARELLI-PACHALY, E.M.; KUNZ, R. O.; CARDEAL, C.. Novo método para contenção farmacológica e anestesia de campo em quatis (*Nasua nasua*), empregando a fórmula ZAD-50 (Zoletil/50 + Atropina + Dormiun-V) - Relato preliminar. *A Hora Veterinária*, v. 33, p. 58-62, 2013.
34. OSILHEIRE Jr., J.A.; PEREIRA, R.L.; HERRERA, D.; PALHARI NETO, C.; BELETTINI, S.T ; PACHALY, J. R. . Novo método para contenção farmacológica e anestesia de campo em onças-pintadas (*Panthera onca*), empregando a fórmula "ZAD" (Zoletil/100® + Atropina + Dormiun-V®) - Relato preliminar. *A Hora Veterinária*, v. 32, p. 54-59, 2012.

35. SOUZA, M.V. DE, NASCIMENTO, L.R., HIRANO, L.Q.L., SANTOS, A.L.Q., PACHALY, J.R.. Contenção farmacológica de onças-pintadas *Panthera onca* (Linnaeus, 1758) com a associação de tiletamina, zolazepam, detomidina e atropina calculados por extrapolação alométrica interespecífica. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 39, n. 4, p. 1595-1606, 2018.
36. CIANCA, R. C. ; ANDO, M.R. ; BELETTINI, S.T. ; VOLTARELLI-PACHALY, E.M. ; SOUZA, M.V.F. ; PACHALY, J. R. . Novo método para contenção farmacológica e anestesia de campo em cães domésticos (*Canis familiaris*), empregando a fórmula “ZAD-50” (Zoletil/50® + Atropina + Dormiun-V®). *MEDVEP. Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação*, v. 12, p. 150-158, 2014.
37. ANDO, M.R.; CIANCA, R.C.; BELETTINI, S.T., VOLTARELLI-PACHALY, E.M., SOUZA, M.V.F.; PACHALY, J.R. Novo método para contenção farmacológica e anestesia de campo em gatos domésticos (*Felis catus*), empregando a fórmula “ZAD-50” (Zoletil/50® + Atropina + Dormiun-V®). *MEDVEP*. V. 13, N. 43, p. 54-61, 2015.
38. PACHALY, J.R.; SOUZA, M.V.F.; Montiani-Ferreira, F. et al. Emprego da fórmula “ZAD-50” (ZOLETIL/50® + ATROPINA + DORMIUN-V®) para anestesia dissociativa em procedimento de enucleação com acesso transconjuntival de bulbo ocular proptótico em hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) – Relato de caso. *A hora veterinária*. V. 34, N. 2001, p. 58-62, 2014.
39. SOMA, L.R. 1971. **Textbook of Veterinary Anesthesia**. Baltimore: Williams and Wilkins. 621p.
40. SOMA, L.R.; PENNEY, B.E. 1975. Sedation and general anesthesia, p.527-549. In: Catcott E.J. (Ed), **Feline medicine and Surgery**. 2. ed. Santa Barbara: American Veterinary Publications. 3234 p.
41. HOLZ, P.; HOLZ, R.M.; BARNETT, J.E.F. Effects of atropine on medetomidine/ketamine immobilization in the gray wolf (*Canis lupus*). **Journal of zoo and wildlife medicine**, Lawrence, v. 25, n. 2, p. 209-213, jun. 1994.
42. MASSONE, F. 1988. **Anestesiologia veterinária – Farmacologia e técnicas**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 235 p.
43. PACHALY, J.R. Principais drogas empregadas na contenção química de animais selvagens. *Informativo da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens*, v. 3, n. 13, p. 1-3, mai. 1995.
44. AUBIN, M. L.; MAMA, K. Field anesthetic techniques for use in horses. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.24, n.5, p. 411-417. 2002.
45. PACHALY, J. R. Terapêutica por extrapolação alométrica. In: CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca, 2006. p. 1215-1223.
46. PACHALY, J.R. Alometria. In: KINDLOVITS, A.; KINDLOVITS, L.M. *Clínica e terapêutica em primatas neotropicais*. 2.ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros, 2009, p. 373-384.
47. SEDGWICK, C.J.; POKRAS, M.A. Extrapolating rational drug doses and treatment periods by allometric scaling. In: American Animal Hospitals Association's 55th Annual Meeting, (1988). *Proceedings...* 1988. p. 156-161.

48. PACHALY, J.R.; CARNEIRO, M.R.; ALBERTON, L.R.; BELETTINI, S.T.; AZZOLINI, F.; PRAZERES, R.F.; VOLTARELLI-PACHALY, E.M. Contenção farmacológica e anestesia de campo em primatas da Família Cercopithecinae empregando a fórmula "ZAX-50" (Zoletil/50® + atropina + xilazina). MEDVEP. V. 9, N. 30, p. 415-459, 2011b.
49. CARNEIRO, M. R. Contenção Farmacológica e Anestesia de Campo em Primatas da Subfamília Cercopithecinae empregando a Fórmula "ZAX-50" (Zoletil 50 + Atropina + Xilazina). Dissertação de Mestrado. Programa de Mestrado em Ciência Animal. Universidade Paranaense - UNIPAR. Umuarama, PR. 2011.
50. PACHALY, J.R.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A.; WERNER, P.R.; GIOVANELLI, D.F.; De CONTI, J.B.; WOSIAKI, S.R.; BELETTINI, S.T.; VOLTARELLI-PACHALY, E.M. Cetamina, xilazina e atropina, em doses calculadas por extrapolação alométrica interespecífica, para contenção farmacológica da cutia (*Dasypsecta azarae*). Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR (Impresso), v. 17, p. 11-26, 2014.

8.3 Cópia da carta de aceite para publicação de artigo produzido durante o período do Doutorado



Curitiba, 10/01/2019.

Marcelo R. Carneiro, Laerzio C. Neto, Augusto K. Júnior, Fabiano Montiani-Ferreira, Lígia S. L. S. da Mota, José R. Pachaly.

Ref.: Aprovação de artigo para publicação

Prezados autores,

Informamos que o artigo **CONTENÇÃO FARMACOLÓGICA E ANESTESIA DE CAMPO EM MACACOS-BARRIGUDOS (*Lagothrix cana*, ATELIDAE) EMPREGANDO A FÓRMULA "ZAD-50"(ZOLETIL/50@+ATROPINA + DORMIUN-V®) E O MÉTODO DE EXTRAPOLAÇÃO ALOMÉTRICA PARA CÁLCULO DE DOSES** encaminhado ao Corpo Científico recebeu parecer favorável para publicação na revista **MEDVEP** e será publicado em espaço e data a serem definidos conforme critérios editoriais.

Agradecemos a deferência pela escolha de nossa Editora para envio de seu trabalho, ressaltando que nos sentiremos honrados em receber outros artigos de sua autoria para futuras publicações.

Atenciosamente,

Marilene C. Bloor

**8.4 Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Biociências –
Brazilian Journal of Biosciences (link para as normas:
<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/public/diretrizes.pdf>)**

**Diversidade genética da região D-Loop do DNA mitocondrial em primatas atelídeos
da espécie *Lagothrix cana***

**Marcelo Rocha Carneiro¹; Talita Roberto Aleixo de Almeida²; José Ricardo
Pachaly³; Lígia Souza Lima Silveira da Mota⁴**

¹Médico Veterinário, Mestre em Ciência Animal. Aluno do Programa de Pós-graduação em Animais Selvagens da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, SP. Avenida Presidente Getúlio Vargas, 2672 – ap. 41., Curitiba, PR. C.E.P.: 80.240-040 – Curitiba (PR).

²Bióloga, Mestre, Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética, da UNESP, Botucatu, SP. Rua Professor Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº - Instituto de Biociências - Botucatu (SP). CEP: 18.618-689.

³Médico Veterinário, Mestre, Doutor, Pós-Doutor. Professor Titular do Programa de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Paranaense (UNIPAR). Diretor Científico do Instituto Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária – ESPECIALVET. Rua Lopes Trovão, 250, Zona 4, CEP 87014-080, Maringá, PR, Brasil.

⁴Autora para correspondência. Zootecnista, Mestre, Doutora. Professora Adjunta no Departamento de Genética do Instituto de Biociências e docente do Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da

UNESP, Botucatu, SP. Rua Professor Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº - Instituto de Biociências, Botucatu (SP). CEP: 18.618-689. E-mail: ligia.mota@unesp.br

Resumo

Este trabalho relata a caracterização de primatas atelídeos *Lagothrix cana* (macacos-barrigudos cinza) por meio da análise e sequenciamento do DNA mitocondrial. Após a extração do DNA pelo método do fenol/clorofórmio, os produtos de amplificação foram sequenciados nos sentidos direto e reverso. Foram amplificados os genes mitocondriais do Citocromo c Oxidase subunidade II (COII) e da região controladora (*D-Loop*) por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Na amplificação do COII empregando os *primers* L6955 e H7766, a reação foi positiva para 10 indivíduos gerando fragmentos de aproximadamente 700pb. Na amplificação do *D-Loop* empregando os *primers* L6955 e H7766, a reação foi positiva para 09 indivíduos, gerando fragmentos de aproximadamente 500pb. Após a comparação do alinhamento das sequências obtidas para o gene COII, observou-se 100% de similaridade com *Lagothrix cana*, determinando-se 8 sítios variáveis entre *L. cana* e *L. lagothricha*, e 9 sítios variáveis, entre *L. cana* e *L. poeppigii*. As mesmas sequências foram comparadas às do macaco-aranha (*Ateles fusciceps*), demonstrando maior número de polimorfismos (58). O emprego do marcador molecular COII visou confirmar a qual espécie pertencia cada indivíduo considerando o gênero *Lagothrix*. Desta forma, conclui-se que todos os indivíduos analisados eram comprovadamente da espécie *Lagothrix cana*. Já, para o gene *D-Loop*, os dados gerados para este marcador serão submetidos ao GenBank pois não foi encontrada nenhuma sequência descrita para esta espécie. Na comparação deste alinhamento entre 09 animais, observou-se 05 polimorfismos em 04 haplótipos, sendo o haplótipo 2 o mais frequente.

Estes resultados devem fomentar e fornecer subsídios para posteriores trabalhos envolvendo filogenia, evolução, biodiversidade e reprodução em primatas.

Palavras Chave: DNA mitocondrial, macacos-barrigudos, filogenia, taxonomia, diversidade genética

Abstract

Genetic diversity in the mitochondrial DNA *D-Loop* region in *Lagothrix cana* atelids primates

This manuscript reports, at first, the genetic characterization of atelid primates *Lagothrix cana* (“gray wooly-monkeys”), by means of DNA sequencing and mitochondrial DNA analysis. After the extraction with the phenol/chloroform method, the products of amplification were sequenced at direct and reverse directions. The COII and D-Loop mitochondrial genes were amplified by the Polimerase Chain Reaction (PCR). For the COII amplification were used L6955 and H7766 primers and the reaction was positive for 10 specimens, creating patches with approximately 700 bp (base pairs). At the D-Loop amplification using the primers L6955 and H7766, the reaction was positive for 09 specimens, creating patches with approximately 500 bp. Comparing the results of the sequences obtained of COII, 100% of similarity was observed to *L. cana*, establishing 8 changeable sites between *L. cana* and *L. lagothricha*, and 9 changeable sites between *L. cana* and *L. poepigii*. This sequence is also compared with the sequences described to spider-monkey (*Ateles fusciceps*), where was founded 58 polymorphic sites. The use of COII molecular marker aims to confirm the specie that each specimen belonged, considering the genus *Lagothrix*, and concludes all specimens belongs to *L. cana* specie. For the D-Loop gene, the data generated for this marker will be submitted to GenBank

because no sequence was found for this species. In the comparison of this alignment between 09 specimens, we observed 05 polymorphic sites in 04 haplotypes, being haplotype 2 the most frequently observed. These results should improve and provide support for further researches involving phylogeny, evolution, biodiversity and reproduction in primates.

Key Words: mitochondrial DNA , woolly-monkeys, phylogeny, taxonomy, genetic diversity.

Introdução

O principal desafio na rotina dos profissionais envolvidos em ações conservacionistas é a escassez de dados científicos confiáveis ou, na maioria dos casos, da ausência destes dados, para balizar o planejamento e desenvolvimento destas ações. Estes profissionais, muitas das vezes, acabam optando por lançar mão dos dados disponíveis para espécies que se encontrem o mais próximo possível, na escala taxonômica, da espécie em questão, e termina por adaptar estes dados, pela ausência de parâmetros específicos para a espécie, com a qual está trabalhando. Muitas das vezes, nem isso é possível. Este panorama não é diferente para a espécie objeto deste estudo, o macaco-barrigudo da espécie *Lagothrix cana*. Os dados específicos existentes na literatura especializada são raros, e sob o ponto de vista da caracterização genotípica específica de seus indivíduos, não constam registros com esta descrição, até a atualidade. Também não há registro de planejamento ou execução de um plano de manejo reprodutivo específico para *Lagothrix cana*. Existem tentativas empíricas de cruzamento entre indivíduos cativos, sem nenhum critério de distinção genética. Na maioria das vezes, estes

trabalhos são apenas pautados, na origem geográfica de indivíduos provenientes de ação de fiscalização do tráfico ilegal, sem nenhum planejamento que previna o aumento da prevalência da consanguinidade dentre os plantéis. Apesar do cativeiro ser, atualmente, um recurso cada vez mais necessário para a conservação de espécies ameaçadas, seja pela manutenção do banco genético, seja na educação ambiental, é sabido que o efeito estressante do cativeiro e a capacidade de adaptação da espécie neste ambiente, ocasiona reações de ordens somática, endocrinológica e comportamental, entre outras e que afetam a higidez dos indivíduos cativos (ORSINI e BORDAN, 2014).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, a partir da década de 80, tornou-se possível a manipulação de ácidos nucleicos, o que levou à análise de diferentes tipos de marcadores moleculares. Tais marcadores podem corresponder a qualquer loco gênico, ou seu próprio produto, que apresente polimorfismos inerentes e que possam ser aplicados em estudos que buscam compreender um problema biológico. De maneira mais ampla, marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de qualquer outro segmento específico de DNA (AVISE, 2004). Com o desenvolvimento da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pelo bioquímico Kary Mullis, em 1985, elevou-se, e muito, a eficiência na detecção de tais polimorfismos. Este progresso se deve a redução do tempo de execução dos experimentos, de custo e de sua complexidade (CURI et al., 2002). A técnica de PCR se baseia na síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, por meio da amplificação em ciclos e na presença da enzima DNA polimerase.

Os marcadores genéticos representam ferramentas poderosas e informativas para ecólogos e geneticistas da conservação definirem, por exemplo, a escala geográfica e a área adequada para realização de monitoramento e manejo das populações (FERAL,

2002). Dentre os marcadores mais utilizados em análises genéticas populacionais, destacam-se a região controle do DNA mitocondrial (mtDNA) e os microssatélites, por serem altamente polimórficos e possuírem altas taxas de mutação (SCHLÖTTERER, 2004).

O genoma mitocondrial em animais é constituído de uma molécula fita dupla de DNA circular, de pequeno tamanho e que codifica aproximadamente 5% de toda a maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria (NAHUM, 2001). Está organizado em 37 genes codificantes, dos quais 22 resultam em RNAs transportadores, 2 são para RNAs ribossomais e 13 são transcritos em RNAs mensageiros e traduzidos, principalmente, nos complexos proteicos responsáveis pela dinâmica da cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa (AVISE, 2000). Dentre os 13 genes, sete codificam subunidades da enzima NADH desidrogenase (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 e 6), três codificam subunidades da enzima citocromo C oxidase (COI, II e III), dois codificam subunidades da ATP sintetase (ATP6 e 8) e, em uma única sequência, o gene que codifica o citocromo B (NAGATA et al., 2005). Nos vertebrados existe uma região não codificadora conhecida como “alça D” (D-loop) que contém o controle da replicação e transcrição desse genoma (BOORE, 1999).

Uma característica importante do mtDNA é a sua alta taxa de evolução, a qual acredita-se ser 10 vezes superior à de um gene nuclear de cópia única. A explicação para este fenômeno se encontra no fato da baixa capacidade de reparo da enzima DNA polimerase e a alta exposição desta molécula aos agentes oxidativos gerados durante o processo de respiração celular (MEYER, 1993).

A taxa de evolução do mtDNA não é homogênea entre os seus diferentes genes. Alguns genes acumulam mais rapidamente essas substituições de bases, dentre os quais encontramos os genes codificadores das subunidades da NADH desidrogenase, citocromo

C oxidase e dos RNAs transportadores. Os genes codificadores para as subunidades ribossômicas e para o citocromo B estão entre os mais conservados entre os organismos (SACCONE, 1994). A região controle D-loop é a que mais acumula mutações podendo elevar sua taxa de evolução de duas a cinco vezes em relação a dos genes que codificam proteínas (MEYER, 1993).

Este trabalho tem por intuito principal, compilar e divulgar o maior volume possível de dados referentes às características fenotípicas e genotípicas da espécie abordada (*Lagothrix cana*), fomentando a retroalimentação científica, com vistas à elaboração de ações de conservação efetivas no âmbito da reprodução e conservação da mesma.

Revisão de Literatura

A Medicina da Conservação constitui uma nova ciência, voltada para enfrentar a ameaça crescente que agentes etiológicos, dos mais diversos tipos, afligem sobre a riqueza biológica do planeta. Possui como pilares básicos, pesquisa e ação e se pauta no conceito da transdisciplinaridade dos profissionais envolvidos nesses dois quesitos. Atuar em medicina da conservação é trabalhar para manter a diversidade biológica e, consequentemente, a qualidade de vida para pessoas, espécies domésticas e selvagens, sobretudo com intenção de manter em um ambiente favorável à plena saúde ecológica (MANGINI & SILVA, 2006). Esta manutenção da diversidade biológica depende intimamente da qualidade dos estudos realizados para a produção de dados e subsequente planejamento e execução dessas ações. A premente necessidade de um banco genético confiável, proveniente de animais puros (não hibridizados), em nível de gênero, espécie ou subespécie é o mais desejável, pois, do contrário, perpetuar-se-á a heterogeneidade gênica, fugindo ao princípio conservacionista, ou melhor, retroagindo no sentido do

objetivo conservacionista. Somente desta forma se conseguirá atingir os objetivos propostos pelo conceito da Medicina da Conservação: Saúde Ambiental (conjunção entre Saúde Humana, Saúde Vegetal e Saúde Animal) e Saúde do Ecossistema (TABOR, 2002).

A classificação taxonômica dos chamados primatas “do novo mundo” (*Platyrrhini*)⁵ é bastante controversa e ainda gera muita discussão a seu respeito, mesmo com a adoção do conceito de espécie filogenética, e com os estudos citogenéticos e moleculares (RYLANDS, MITTERMEIER & SILVA JR., 2011). Historicamente, Simpson (1945) dividia estes primatas em duas grandes famílias: *Callitrichidae* e *Cebidae*. Anos se passaram, e Hershkovitz (1977) incluiu nessa classificação, uma terceira família (*Callimiconidae*) e Groves (2005) alterou significativamente essa divisão, ao sugerir a famílias para os platirrinos: *Aotidae*, *Atelidae*, *Cebidae* e *Pitheciidae*. Nenhum desses sistemas é considerado sob o ponto de vista filogenético, pois contêm um ou mais grupos não-monofiléticos. Rylands *et al.* (2000, 2006, 2009), Groves (2001a, 2005), Rylands & Mittermeier (2008), e Cortés-Ortiz (2009) apresentaram revisões recentes na taxonomia dos primatas platirrinos.

Após o advento da análise e sequenciamento do DNA, e havendo maior suporte para recompilação dos dados, concluiu-se que, atualmente, existem descritas 152 espécies, e 204 espécies e subespécies de Platirrinos. A utilização do conceito de espécie filogenética, considerado mais prático e objetivo que o conceito de espécie biológica (GROVES, 2001a, 2004) tem sido responsável por muito do acréscimo do número de espécies, aliado a outras características, como comportamento, vocalização, etc., não mais limitando a pesquisa a quesitos fenotípicos (morfométricos, por exemplo). O uso da genética molecular estabelece estas diferenças filogenéticas às espécies, solucionando dúvidas, demonstrando a validade de diferenças entre espécies distintas, anteriormente

⁵ Alguns pesquisadores consideram equivocada esta nomenclatura, porém, devido à ocorrência da mesma em muitas referências bibliográficas, foi mantida entre parênteses (Nota do Autor).

classificadas como uma só espécie, e trazendo à tona “espécies críticas”.

Utilizando-se o conceito de espécie filogenética e compilando dados moleculares e de citogenética, os platirrinos foram subdivididos, mais recentemente, em 3 clados: (a) *Atelidae*, (b) *Pitheciidae* e (c) *Cebidae* (absorvendo os *Callimicos*, *Callitriquídeos* e *Aotus* spp.). Na atualidade, a lista da International Union for Conservation of Nature/Species Survival Commission (IUCN/SSC - Primate Specialist Group) totaliza 464 espécies e 676 espécies e subespécies de Primatas.

Atelídeos correspondem às espécies que atingem as maiores massas corporais, dentre os Platirrinos. Possuem uma cauda prênsl, que funciona como um quinto membro, auxiliando no equilíbrio durante sua movimentação. A fórmula dentária dos adultos é representada por $2 \text{ X } I \text{ } 2/2; C1/1; P \text{ } 3/3; M \text{ } 3/3$. A família *Atelidae* é composta por 4 gêneros: *Alouatta* (bugios) compreendendo 10 espécies; *Ateles* (macacos-aranha) compreendendo 7 espécies; *Lagothrix* (macacos-barrigudos) representado por 4 espécies; e *Brachyteles* (muriquis), representado por 2 espécies (SCHNEIDER, 2000; OPAZO *et al.*, 2006; WILDMAN *et al.*, 2009).

Os macacos-barrigudos (*Lagothrix* spp.) são primatas da família *Atelidae*, que ocupam alguns segmentos do território amazônico (Figura 1), abrangendo áreas nos seguintes países: Peru, Colômbia, Venezuela, Equador, Bolívia e Brasil (FOODEN, 1963). *Lagothrix cana* possui ocorrência ao sul do Rio Amazonas-Solimões, no Brasil, entre os Rios Juruá, Tapajós e Juruena, estendendo-se ao oeste para o Rio Guaporé, na fronteira da Bolívia (WALLACE *et al.*, 1996). Iwanaga e Ferrari (2002) definiram os limites do sul para o território de *L. cana* no Estado de Rondônia. Relataram a ausência de *L. cana* em todos os lugares pesquisados no interflúvio dos Rios Mamoré, Madeira e Ji-Paraná. Foram registrados em dois locais ao norte dos Rios Abunã e Madeira, e ao longo da margem direita (norte) do Rio Ji-Paraná e do Rio Pimenta Bueno, bem como ao sul do

Rio São Pedro. O sul de Rondônia consiste de áreas montanhosas e de planícies, savanas e floresta. Os mesmos pesquisadores concluíram, ainda, que *L. cana* pode ser limitado no extremo sul de seu território por florestas de transição com solos predominantemente arenosos. *Lagothrix cana* é evidentemente ausente das selvas de Guaporé e da margem direita do Rio Abunã, na Bolívia. No Peru, ele ocorre entre no interflúvio dos Rios Pachitea e Ucayali e sul do Rio Inuya, para os dois lados do Rio Madre de Dios e na Bacia do Rio Tambopata. Também ocorre na fronteira com a Bolívia, no Rio Inambaria (AQUINO e ENCARNACIÓN, 1994). Peres (1987) relatou que os macacos-barrigudos não ocorrem entre o Alto do Rio Purus e Iaco.

O gênero *Lagothrix* contém espécies classificadas, segunda a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), em “Vulneráveis” (*L. lagotricha* e *L. poeppigii*), “Em Perigo” (*L. cana*) e “Em Perigo Extremo” (*L. lugens*), e como suas populações continuam decaindo, programas de manejo reprodutivo em indivíduos cativos são fundamentais como ferramenta para elaboração e execução de ações de conservação para estes gêneros. Apesar disso, a manutenção e a reprodução em animais cativos destas espécies têm se demonstrado muito difícil (ANGE-VAN HEUGTEN et al., 2008; MOONEY & LEE, 1999), e sua biologia reprodutiva e parâmetros históricos são pouquíssimamente conhecidos (DI FIORE et al., 2010; MOONEY & LEE, 1999). Na realidade, os registros clássicos sobre dados morfológicos remontam ao período entre 1930 e 1950 e, ainda assim, permanecem como fonte principal de citações em produções científicas, mesmo sabendo-se que a maioria está relacionado a Primatas do Velho Mundo, e em condições de cativeiro.

Macacos-barrigudos possuem hábitos diurnos (PERES, 1994). Ocupam principalmente áreas de floresta primária, circulando entre todos os níveis e dificilmente descem ao solo, pois bebem a água acumulada em folhas, bromeliáceas e outras estruturas

vegetais. Formam grupos de até 40 indivíduos, mas existem relatos ocasionais de indivíduos solitários. Dormem nas copas das árvores, em cima de galhos, mas não necessariamente em um mesmo local, quase sempre próximos às fontes de alimento. Geralmente, enquanto a maioria do grupo se alimenta, alguns indivíduos atuam como sentinelas contra eventuais predadores (MAYOR et al., 2017). São primariamente frugívoros, e, portanto excelentes dispersores de sementes. O comportamento alimentar de aproximadamente 40 indivíduos, foi estudado durante 11 meses, na região de Tefé (Amazonas, Brasil), em 3298 registros de alimentação, constatando-se que a dieta se compõe principalmente por frutos maduros (83%) e sementes (7%). Pode ocorrer variação estacional, e em períodos em que há escassez de frutos a composição da dieta pode variar, incluindo folhas verdes, seiva e flores, sendo que alimentos de origem animal (artrópodes e outras presas) não constituem mais que 0,1% da ingesta (PERES, 1994). Bodmer e Robinson (2004), após estudar durante quatro meses o comportamento de 18 indivíduos semicativos, observaram que o descanso consome 45% do tempo, sendo forrageamento a atividade mais frequente (29%), seguido por deslocamento (23%), interações sociais (3%) e *grooming* (1%). A maturidade sexual ocorre entre cinco e oito anos, a gestação dura aproximadamente 225 dias, e o período de lactação varia entre nove meses e um ano, sendo que a expectativa de vida em cativeiro é de aproximadamente 25 anos (MAYOR et al., 2017). Somente as fêmeas carregam os filhotes (Figuras 2 e 3), primeiramente agarrados ao ventre e, após algum tempo de desenvolvimento, em suas costas (VOSS e FLECK, 2011).

Seus principais predadores são os grandes rapinantes, os grandes felídeos e os humanos, por serem muito apreciados como alimento por algumas comunidades indígenas. Na região amazônica, a caça de animais selvagens é uma atividade tradicional, que visa prover as necessidades das populações locais em termos de alimentação de

subsistência e outros itens (FITZ GIBBON, 1998), e os *Lagothrix* são os primatas mais frequentemente caçados na região Amazônica (PUERTAS e BODMER, 2004). Além da caça predatória, a destruição do habitat natural e o tráfico de exemplares para serem utilizados como *pets* contribuem para a diminuição substancial das populações em vida livre. A pressão antrópica é tão devastadora que já existem relatos de indivíduos transpondo os limites de sua distribuição geográfica original, numa tentativa de busca de um ambiente favorável para sua manutenção (NUNES e ORSINI, 2016). A ausência de maiores informações a respeito das características reprodutivas da espécie também constitui um fator limitante à execução de atividades de manejo com vistas ao repovoamento das áreas que ainda não foram degradadas (BODMER e ROBINSON, 2004).

A classificação taxonômica dos macacos-barrigudos, como a dos outros atelídeos, também é bastante controversa. Fooden (1963) propôs a existência de 2 espécies: *L. flavicauda*, para o macaco-barrigudo da cauda amarela (“yellow tailed wooly monkey”) e *L. lagotricha* para todas as demais, baseando-se em características como coloração, morfometria, e diferenças osteológicas que considerou qualitativas. Até hoje, ainda não se tem evidência adicional que prove a existência de 3 espécies como proposto primariamente por Groves (2001, 2005). No mesmo trabalho, Fooden (1963) agregou *L. flavicauda* à família Atelidae, porém, em gênero distinto de *Lagothrix*, como um gênero distinto. Essas variações taxonômicas dificultam a determinação da relação de *L. flavicauda* com outras espécies de *Lagothrix* e de outros Atelídeos. Posteriormente, estudos realizados por meio da análise do sequenciamento de genes mitocondriais (*mtCOI* e *mtCOII*) de 141 indivíduos de variadas espécies de *Lagothrix* (RUIZ-GARCÍA, PINEDO-CASTRO & SHOSTELL, 2014), obtiveram várias conclusões: (1) *L. flavicauda* apresentou diversidade genética igual a zero, enquanto que *L. poeppigii* e *L.*

lugens apresentaram a maior diversidade genética, quando comparados entre si, e *L. lagotricha* e *L. cana* apresentaram um grau mais modesto de diversidade, quando comparadas as suas amostras; (2) A hipótese da ocorrência de duas espécies (*L. lagotricha* e *L. flavicauda*) se comprova a nível molecular, avaliando-se a introgressão genética e a hibridização recente. Neste caso, *L. lagotricha* apresentaria 4 subespécies. Esta conclusão contraria a hipótese de Groves (2001) e corrobora a proposta de Fooden (1963); (3) *L. poeppigii* foi a primeira espécie dentre os indivíduos da espécie do táxon *L. lagotricha* que experimenta diversificação mitocondrial haplótica, enquanto que *L. cana* e *L. lagotricha* apresentam essa diversificação, mais recentemente; (4) *L. poeppigii* e *L. lagotricha* foram os taxa que apresentaram a maior evidência de expansão populacional em diferentes períodos do Pleistoceno, enquanto *L. lugens* apresentou um declínio populacional nos últimos 25.000 anos. Isto demonstra a necessidade premente da realização de ensaios laboratoriais abrangendo o uso da genética molecular com finalidade de obter uma classificação taxonômica mais objetiva e precisa para as espécies em questão, e amplia significativamente os horizontes da pesquisa científica, na atualidade.

Lagothrix cana é classificado atualmente como pertencente ao Reino Animalia, Filo Chordata, Classe Mammalia, Ordem Primates, Subordem Haplorrhini, Infraordem Simiiformes, Parvordem Platyrrhini, Família Atelidae, Subfamília Atelinae, Gênero *Lagothrix*, Espécie *Lagothrix cana* e possui vários nomes populares, entre eles: “macaco-barrigudo”, “macaco-barrigudo cinza”, e em alguns casos, é citado como “Geoffroy’s woolly monkey”.

O macaco-barrigudo dessa espécie possui uma pele grossa e densa, com coloração acinzentada e preta, em seus membros (ROWE, 1996). Apesar de seu grande tamanho e conformação robusta, os macacos-barrigudos são capazes de locomover-se habilmente

sobre as árvores, com a ajuda de sua longa cauda prênsl (Figuras 4 e 5).

A espécie está classificada como “Em perigo (EN)” na lista vermelha da IUCN, e, em geral, os machos são maiores que as fêmeas, podendo alcanças 65 cm, da cabeça à base da cauda e massa corporal de aproximadamente 9,5 Kg, enquanto que as fêmeas não ultrapassam 58 cm e 7,7 Kg, para os mesmos quesitos. Atualmente existem 18 áreas de proteção que abrangem a espécie no Brasil, mas nenhuma ação de preservação contempla a utilização dos animais cativos em plantéis de Zoológicos e criadouros.

Materiais e Métodos

Para este estudo foram capturados 25 indivíduos, supostamente pertencentes à espécie *Lagothrix cana*, provenientes dos plantéis do CETAS Sauim Castanheiras (Prefeitura Municipal de Manaus – AM e da Fundação Floresta Viva (Manaus – AM), para realização de procedimentos de rotina, no próprio local.

O projeto referente a este estudo compõe a solicitação, junto ao SISBIO, de nº 52027, e teve sua concessão renovada em 14/06/2018. O mesmo projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – CEUA/FMVZ - UNESP, sob número de registro geral 174/2015.

Foram realizados os procedimentos de captura, transporte, exame físico, marcação por microchip, eventuais procedimentos clínicos e cirúrgicos, além da colheita de amostras de sangue. Após a punção da veia braquial (Figura 6), as amostras de sangue foram acondicionadas em tubos de ensaio (Figura 7) contendo anticoagulante (EDTA) e congeladas. Posteriormente foram enviadas ao Laboratório de Genética Animal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu.

No laboratório, as amostras foram descongeladas e a extração de DNA total foi realizada por meio da técnica empregando fenol/clorofórmio, segundo protocolo descrito em Sambrook e Russel (2001).

A quantidade e a qualidade do DNA foram avaliadas em espectrofotômetro (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific), por meio de absorbância a 260-280 nm e, em gel de agarose a 1,0%, corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µL/10mL) imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA) e visualizados em digitalizador de imagens, sob luz ultravioleta.

Para a determinação da(s) espécie(s) referente às amostras colhidas, empregou-se uma região do DNA mitocondrial referente ao gene do Citocromo c Oxidase Subunidade II (COII) utilizando os *primers* L6955 (5'-AACCATTTCATAACTTTGTCAA-3') e H7766 (5'-CTCTTAATCTTTAACTT AAAAG-3') (Ashley e Vaughn, 1995; Collins e Dubach, 2000). Para a determinação do número de haplótipos nas amostras certificadas como sendo oriundas da espécie *L. cana* empregou-se um segmento da região controladora do DNA mitocondrial (*D-Loop*) por meio dos *primers* L15400 (5'-TCCACCATTAGCACCCAAAG-3') e H15940 (5'-CCTGAAGTCGGAACCAGATG-3') (Kocher et al., 1989).

As reações de amplificação (PCR) foram feitas em um volume final de 11 µl, contendo 5 µl de água milliQ autoclavada, 4 µl de GoTaq (Promega) (mix pronto 1x contendo 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA Polimerase), 0,5 µl de cada primer (10 µM) e 1 µl de DNA (20-50 ng/µL).

As condições de amplificação para o gene COII foram as seguintes: desnaturação inicial a 95° C, por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95° C, por 30 segundos; 50°C por 30 segundos e 72° C, por 30 segundos, com um passo final de extensão a 72° C, por 5 minutos.

As condições de amplificação para a região controle foram as seguintes: desnaturação inicial a 95° C, por 10 minutos, seguida de 35 ciclos a 94° C, por 35 segundos; 55°C, por 35 segundos e 70° C, por 30 segundos, com um passo final de extensão a 72° C, por 10 minutos.

O rendimento do produto da amplificação foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 1,5% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com Gel RedTM e visualizado em transluminador, sob luz ultravioleta.

Posteriormente, cerca de 5 µl de cada produto de amplificação foi purificado com a adição de 0,5 µl de fosfatase alcalina de camarão (1 U/ µl) (Affymetrix, Inc.) e 0,4 µl de exonuclease I (10 U/ µl) (Affymetrix, Inc.) e incubado por 45 minutos a 37°C. Feito isto, este foi incubado a 80° C, por 15 minutos.

As reações de sequenciamento do produto de PCR foram realizadas pelo sequenciador Applied Biosystems 3500 no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu. Os produtos de amplificação foram sequenciados nos sentidos direto e reverso para garantir uma maior confiabilidade dos resultados.

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Para cada reação, foram utilizados 1,2 µl de solução Big Dye, 1 µl de primer (10 µM) e 5 µl do produto mitocondrial. As reações foram colocadas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C, por 1 minuto; seguida de 25 ciclos a 96°C, por 10 segundos; 50°C, por 30 segundos e 60°C, por 4 minutos; com um passo final de extensão a 72° C, por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 4 µl de água MilliQ autoclavada e 16 µl de etanol 95%. A solução foi misturada em agitador de tubos e mantida por 15 minutos à temperatura ambiente (~25°C). A amostra foi centrifugada por 30 minutos, a 12000 rpm

e o sobrenadante retirado. O precipitado foi lavado com cerca de 200 µl de etanol 70%, e a solução foi misturada em um agitador de tubos e novamente centrifugada por 7 minutos, a 12000 rpm. A amostra foi seca a 90°C, durante 2 minutos e mantida a -20°C.

O produto do sequenciamento foi dissolvido em 1,6 µl de formamida:dextran azul 25 mM EDTA (5:1), ressuspenso e desnaturado por 2 minutos a 90°C, em banho seco. As sequências das duas fitas de DNA de cada amostra foram editadas e alinhadas no programa Sequence Navigator (Applied Biosystems).

A visualização dos eletroferogramas da sequência nucleotídica dos fragmentos de DNA mitocondrial foi realizada por meio do programa computacional Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, 2007), o qual permite a leitura de diversas extensões do sequenciamento. A amplitude e os espaçamentos dos picos foram devidamente observados para atestar a qualidade das sequências e verificar se as mutações eram reais ou se poderiam ser artefatos da técnica do sequenciamento.

Utilizando o programa computacional Geneious 4.8.5 (Drummond et al., 2009), as sequências obtidas no Chromas Lite 2.01 foram editadas e alinhadas e os respectivos eletroferogramas verificados. Cada resultado foi analisado individualmente e comparado ao seu respectivo eletroferograma pelo menos duas vezes. Os alinhamentos foram realizados utilizando a ferramenta (algoritmo) MUSCLE do programa Geneious 4.8.5 (Edgard, 2004). Os alinhamentos foram também verificados manualmente, pelo menos duas vezes, e comparados aos seus eletroferogramas para a certificação da posição de bases nitrogenadas nas sequências obtidas. Para confirmar a identidade das sequências foi utilizado o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1990), através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), o qual relaciona sequências por meio de similaridade entre bases nitrogenadas. Todas as amostras foram alinhadas entre si gerando

um arquivo que foi utilizado na realização dos testes estatísticos posteriores.

Resultados e Discussão

Foi possível a obtenção de DNA das 25 amostras submetidas ao processo de extração. A quantificação da concentração de DNA mostrou variação de 10 a 50 ng/μl e, após a verificação da integridade do material empregando espectrofotometria, foram obtidos valores de 1,25 a 2,0 de absorbância da luz na faixa de 260/280 nm, indicando assim, nos valores entre 1,25 a 1,6, ligeira contaminação por proteína.

Os genes mitocondriais COII e *D-Loop* foram amplificados por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) empregando amostras de DNA obtidas a partir de 19 indivíduos. Na amplificação do gene COII reação foi positiva para 10 indivíduos (003, 006, 089, 098, 110, 629, 699, 873, 922, 992), gerando fragmentos de aproximadamente 700pb (pares de bases). Na amplificação do gene *D-Loop* a reação foi positiva para 09 indivíduos sendo os mesmos elencados para o marcador mitocondrial COII com exceção do indivíduo 922, gerando fragmentos de aproximadamente 500pb.

Os resultados do sequenciamento foram analisados no programa computacional Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, 2007) a fim de verificar a qualidade das leituras das sequências de DNA obtidas. A amplitude e os espaçamentos dos picos foram devidamente observados verificando se as mutações eram reais ou se poderiam ser artefatos da técnica do sequenciamento.

Subsequente a essa análise, as sequências obtidas para os genes COII e *D-Loop* foram alinhadas e as sequências consensos de 567pb e de 429pb respectivamente, foram submetidas a comparações com demais sequências de DNA mitocondriais depositadas no GenBank por meio do método de algoritmo de BLASTn (Altschul *et al.* 1990).

Na comparação realizada entre o alinhamento das sequências obtidas para o fragmento do gene mitocondrial COII dos 10 animais analisados com as sequências depositadas no GenBank para as espécies *Lagothrix cana*, *L. lagothricha* e *L. poeppigii* observou-se 100% de similaridade com *Lagothrix cana* confirmando assim que esses animais são comprovadamente pertencentes a esta espécie (Tabela 1). A comparação dessas sequências nucleotídicas permitiu determinar 8 sítios variáveis entre as espécies *L. cana* e *L. lagothricha* e de 9 sítios variáveis entre *L. cana* e *L. poeppigii* (Tabela 1).

Quando comparadas, as sequências nucleotídica, incluindo-se a espécie *Ateles fusciceps*, (macaco-aranha), evidenciou-se o maior número de polimorfismos (58) quando alinhadas sequências oriundas entre 2 gêneros distintos que, neste caso são *Lagothrix* e *Ateles* (Tabela 2).

Para o gene mitocondrial *D-Loop* não foi encontrada sequência depositada no GenBank para o *Lagothrix cana*. Na comparação do alinhamento das sequências obtidas para este fragmento entre os 09 animais analisados observou-se um total de 05 polimorfismos distribuídos em 04 haplótipos (Quadro 1). Estes resultados são inéditos e serão submetidos ao banco de dados GenBank de forma a disponibilizá-los publicamente para pesquisas futuras. Observa-se que o haplótipo 2 formado pelos animais 089, 6873, 110, 699, 992 foi o mais frequente representando cerca de 55,6% das amostras analisadas.

A região controle do DNA mitocondrial, que inclui o gene *D-Loop* bem como os genes citocromo B (CytB) e citocromo C oxidase (COI, II e III) têm sido as sequências mais utilizadas para identificar e catalogar espécies, discriminar subespécies, estudar evolução em espécies domésticas, silvestres e selvagens. O projeto internacional conhecido como *DNA Barcoding of Life* lançado no ano de 2005 objetivou inicialmente, gerar sequências de aproximadamente 648pb do gene mitocondrial COI como ferramenta

de auxílio em filogenética e catalogação da biodiversidade. Contudo, a melhoria tecnológica proporcionou um aumento de escala nos estudos mitocondriais proporcionando um avanço considerável.

Um dos primeiros trabalhos em primatas empregando os marcadores mitocondriais COII é o de Ashley & Vaughn (1995). Com a finalidade de esclarecer aspectos da história evolutiva no gênero *Aotus* foram obtidas amostras de DNA de 03 possíveis espécies – *A. lemurinus*, *A. nancymae* e *A. azarae*. Após a comparação das sequências obtidas para este gene, os resultados indicaram níveis altos de divergência nesta sequência nucleotídica para as 3 espécies sugerindo assim que os táxons são geneticamente bem distintos e que provavelmente passaram por longos períodos de evolução isolada.

Em 2010, Ruiz-Garcia & Pinedo, propuseram a primeira hipótese de sistemática molecular sobre a origem e evolução do táxon *Lagothrix* com base na análise dos 720pb do gene mitocondrial COII obtidas a partir de amostras de 97 indivíduos. Os autores concluíram que todas as formas atuais de *Lagothrix* sp, provavelmente descenderam do ancestral *L. poeppigii* ou talvez, de forma menos provável, de *L. lugens*. Ruiz-Garcia et al. (2014) sequenciaram os genes COI e COII de 141 espécimes de *Lagothrix* sp. neotropicais e propuseram, a partir dos dados moleculares, uma nova proposta de classificação desse gênero.

O emprego do marcador molecular COII nesta pesquisa visou, principalmente, a confirmação de qual ou quais espécies pertenciam cada um dos indivíduos analisados considerando o gênero *Lagothrix*. Ou seja, a caracterização individual para este gene é uma importante etapa na elaboração de um plano de reintrodução de indivíduos ou de reprodução, evitando principalmente a formação de híbridos. Conforme apresentado no quadro 1, todos os 10 indivíduos analisados pertenciam à espécie *Lagothrix cana*.

Averiguando os resultados descritos nas tabelas 1 e 2, destaca-se a eficácia deste marcador para a identificação de espécies.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudos, ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – IB/UNESP – *campus* Botucatu, e às equipes veterinárias dos zoológicos do Centro de Triagem de Animais Silvestres do Refúgio de Vida Selvagem Sauim Castanheiras, bem como à toda a equipe de apoio da Fundação Floresta Viva.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos para o marcador molecular de DNA mitocondrial COII, pode-se concluir que não está ocorrendo hibridação entre os 2 grupos de animais da espécie *Lagothrix cana* analisados nesta pesquisa. Além disso, empregando outro marcador de DNA mitocondrial, o gene *D-Loop*, pode-se caracterizar 5 polimorfismos levando a descrição de 4 diferentes haplótipos, sendo estes, dados inéditos e que deverão ser submetidos ao GenBank. Isto posto, com a disponibilidade desses dados, será possível fornecer subsídios em pesquisas futuras que tratem de temas tais como filogenia, evolução, biodiversidade, reprodução em cativeiro, entre outros.

Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILER, W., MEYERS, E.W., LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 403-410 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

ANDRADE, R.S., MONTEIRO, F.O.B., EL BIZRI, H.R., VICENTE, R.R., GUIMARÃES, D.A., MAYOR, P. Fetal development of the Poeppig's woolly monkey (*Lagothrix poeppigii*)s woolly monkey (*Lagothrix poeppigii*), *Theriogenology*, Volume 110, p. 34-43, 2017.

AQUINO, R. AND ENCARNACIÓN, F. 1994. *Primates of Peru / Los Primates del Perú*. Primate Report 40: 1-127.

ASHLEY, M.V.; VAUGHN, J.L. Owl monkeys (*Aotus*) are highly divergent in mitochondrial Cytochrome c Oxidase (COII) sequences. **International Journal of Primatology**, v.16(5), p. 793-806, 1995.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution** (Second Edition). Sinauer, Sunderland, MA, 684 pp. 2004.

BODMER, R., ROBINSON, J., 2004. Evaluating the sustainability of hunting in the Neotropics. In: SILVIUS, K., BODMER, R., FRAGOSO, J.M.V. (Eds.), *People in Nature. Wildlife conservation in South and Central America*. Columbia University Press, New York, pp. 199–323.

BOUBLI, J.-P., DI FIORE, A., RYLANDS, A.B. & WALLACE, R.B. 2008. *Lagothrix cana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T39925A10288721. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T39925A10288721.en>. Downloaded on 16 November 2015.

BOORE, J.L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.27, n. 8, p.1767-1780, 1999.

BROOKFIELD, J.F.Y. A simple new method for estimating nell allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, v. 5, 453-455, 1996.

BROWN, T.A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 4º Ed. Artmed: Porto Alegre, 2003.

CARTAGENA B.S.M, THIERRY, R.G. CRAVO-MOTA, M. e BEZERRA, B.M.. (2017). Activity budget and social interactions in semi-captive gray woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha cana*) living in an ex situ conservation area in Central Amazonia: Behavior of Gray Woolly Monkeys. *Zoo Biology*. 36. 21-29. 10.1002/zoo.21333.

COLLINS, A.C.; DUBACH, J.M. Phylogenetic relationships of spider monkeys (*Ateles*) based on mitochondrial DNA variation. **International Journal of Primatology**, v.21(3), p. 381-420, 2000.

CORTÉS-ORTIZ, L. (2009): Molecular phylogenetics of the Callitrichidae with an emphasis on the marmosets and Callimico. In *The smallest anthropoids: the*

marmoset/callimico radiation: 3–24. Ford, S. M., Porter, L. & Davis, L. C. (Eds). New York, NY: Springer.

CURI, R.A.; MOTA, L.S.L.S.; AMARANTE, M.R.V.; LOPES, C.R. Bovine carcass sexing by PCR method. **Braz. J. Res. Anim. Sci.**, v.39(3), p. 147-148, 2002.

DI FIORE A., LINK A., CAMPBELL C.J.. The atelines: behavioral and socioecological diversity in a New World radiation. In: Campbell CJ, Fuentes A, MacKinnon KC, Panger M, Beader SK, editors. *Primates in perspective*. 2nd edition. Oxford: Oxford University Press. p 155–188. 2010.

DI FIORE A, CHAVES PB, CORNEJO FM, SCHMITT CA, SHANEE S, CORTES-ORTIZ L, FAGUNDES V, ROOS C, PACHECO V. The rise and fall of a genus: Complete mtDNA genomes shed light on the phylogenetic position of yellow-tailed woolly monkeys, *Lagothrix flavicauda*, and on the evolutionary history of the family Atelidae (Primates: Platyrrhini). *Mol Phylogenet Evol* 82: 495-510. 2015.

DRUMOND, A.J. 2009. Genetics 4.8.5 (www.geneious.com).

EDGAR, R.C. *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. *Nucleic Acids Research*, 1792-1797, 2004.

FELIPPE, P.A.N.; ADANIA, C.H. Conservação e bem-estar animal. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.S., Catão-Dias, J.L.. *Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária*. 2 ed. São Paulo; Rocca, Cap. 1, p. 2-9. 2014

FITZ GIBBON, C., 1998. The management of subsistence harvesting: behavioural ecology of hunter and their mammalian prey. In: CARO, T. (Ed.), Behavioural Ecology and Conservation Biology. Oxford University Press, Oxford, pp. 449–474.

FOODEN, J. 1963. A revision of the woolly monkeys (genus *Lagothrix*). Journal of Mammalogy 44: 213–247.

GROVES, C. P. (2001a): Primate taxonomy. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.

GROVES, C. P. (2001b): Why taxonomic stability is a bad idea, or why are there so few species of primates (or are there?) Evolutionary Anthropology 10: 192–198.

GROVES, C. P. (2004): The what, why and how of primate taxonomy. International Journal of Primatology 25: 1105–1126.

GROVES, C. P. (2005): Order Primates. In Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference (3rd edn) 1: 111–184. Wilson, D. E. & Reeder, D. M. (Eds). Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.

IWANAGA, S. AND FERRARI, S. F. 2002. Geographic distribution and abundance of woolly (*Lagothrix cana*) and spider (*Ateles chamek*) monkeys in southwestern Brazilian Amazonia. American Journal of Primatology 56: 57–64.

KOCHER, T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A.; EDWARDS, S.V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F.X.; WILSON, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. PNAS, v.86(16), p.6196-6200, 1989.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.L. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p.36 – 42, 2005.

MANGINI, P. R.; SILVA, J. C. R. Medicina da conservação: aspectos gerais. In: CUBAS, Z. S. C.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2006.

MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R. dos S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S.R. Biologia molecular e evolução. Ribeirão Preto: Holos, p.153-161, 2001.

MAYOR, P., BOWLER, M., LOPEZ-PLANA, C. Anatomicohistological characteristics of the tubular genital organs of the female woolly monkey (*Lagothrix poeppigii*). In American journal of primatology 74 (11), pág. 1006–1016. DOI: 10.1002/ajp.22051. 2012

MAYOR, P., BOWLER, M. & LÓPEZ PLANA, C.. (2012). Ovarian functionality in Poeppig's woolly monkey (*Lagothrix poeppigii*). Animal reproduction science. 136. 10.1016/j.anireprosci.2012.11.006.

MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochachka and Mommsen, Biochemistry and molecular biology of fishes, vol.2. Elsevier, 1993.

MOONEY, J.C. & LEE, P. Reproductive parameters in captive woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*). Zoo Biology. 18. 421 - 427. 10.1002/(SICI)1098-2361(1999)18:5<421::AID-ZOO7>3.0.CO;2-6. 1999.

NAHUM, L.A. Evolução dos Genomas. In: Mاتيoli, Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos Ed., 2001.

NAGATA, J.; ARAMILEV, V.V.; BELOZOR, A.; SUGIMOTO, T.; McCULLOUGH, D.R. Fecal genetic analysis using PCR-RFLP of cytochrome b to identify sympatric carnivores, the tiger *Panthera tigris* and the Leopard *pardus*, in far eastern Russia. **Conservation Genetics**, v.6(5), p. 863-866, 2005.

NOWAK, R. 1991. Walker's Mammals of the World, Volume 1. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. P. 569.

NUNES, A. V.; ORSINI, V.S.. New records and geographic distribution of Grey Woolly Monkeys, *Lagothrix cana* (É. Geoffroy, 1812) (Primates, Atelidae), in southern Brazilian Amazonia. **Check List**, [S.l.], v. 12, n. 6, p. 2007, dec. 2016. ISSN 1809-127X. Available at: <<https://biotaxa.org/cl/article/view/12.6.2007>>. Date accessed: 16 july 2018. doi:<http://dx.doi.org/10.15560/12.6.2007>.

OLSON, Z. H.; WHITTAKER, D. G.; RHODES JR, O. E. The use of molecular markers in wild sheep research in North America: a review. **Proceeding of the Northern Wild Sheep and Goat Council Biennial Symposium**, v. 16, p.251–269, 2009.

OPAZO, J.C., WILDMAN, D.E., PRYCHITKO, T., JOHNSON, R.M. and GOODMAN, M. 2006. Phylogenetic relationships and divergence times among New World monkeys (Platyrrhini, Primates). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 274–280.

ORSINI, H., BONDAN, E.F. Fisiopatologia do Estresse. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.S., Catão-Dias, J.L.. *Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária*. 2 ed. São Paulo; Rocca, Cap. 5, p. 35-45. 2014

PERES, C.. (1994). Diet and feeding ecology of gray woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha cana*) in Central Amazonia: Comparisons with other Atelines. *International Journal of Primatology*. 15. 333-372. 10.1007/BF02696098.

PERES, M.B., VERCILLO, U.E.; DIAS, B.F.S. Avaliação do estado de conservação da fauna brasileira e a lista de espécies ameaçadas: o que significa, qual sua importância, como fazer? **Biodiversidade Brasileira**, v.1, n.1, p. 45-48, 2011.

PLUMB, D.C. *Veterinary Drug Handbook - Computer edition*. White Bear Lake: PharmaVet Publishing / Veterinary Software Publishing, 1991.

PUERTAS, P., BODMER, R.E., 2004. Hunting effort as a tool for communitybased wildlife management in Amazonia. In: SILVIUS, K., BODMER, R.E., FRAGOSO, J.M.V. (Eds.), *People in Nature*. Columbia University Press, New York, pp. 123–

137.SCHNEIDER, H. 2000. The current status of the New World monkey phylogeny. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72: 165–172.

ROWE, N. *The Pictorial Guide to the Living Primates*. Pogonias Press, Rhode Island. 1996.

RUIZ-GARCIA M, PINEDO-CASTRO M, O, Molecular Systematics and Phylogeography of the Genus *Lagothrix* (Atelidae, Primates) by Means of the Mitochondrial COII Gene. *Folia Primatologica* 2010;81:109-128.

RUIZ-GARCÍA M., PINEDO-CASTRO M., SHOSTELL J.M. How many genera and species of woolly monkeys (Atelidae, Platyrrhine, Primates) are there? The first molecular analysis of *Lagothrix flavicauda*, an endemic Peruvian primate species. *Mol Phylogenet Evol.* 2014 Oct;79:179-98.

RYLANDS, A. B. & MITTERMEIER, R. A. (2008): The diversity of the New World primates: an annotated taxonomy. In *South American primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation*: 23–54. Garber, P. A., Estrada, A., Bicca-Marques, J. C., Heymann, E. W. & Strier, K. B. (Eds). New York, NY: Springer.

RYLANDS, A. B., COIMBRA-FILHO, A. F. & MITTERMEIER, R.A. (1993): Systematics, distributions, and some notes on the conservation status of the Callitrichidae. In: *Marmosets and tamarins: systematics, behaviour and ecology*: 11–77. Rylands, A. B. (Ed.). Oxford: Oxford University Press.

RYLANDS, A. B., GROVES, C. P., MITTERMEIER, R. A., CORTÉS-ORTIZ, L. & HINES, J. J. (2006): Taxonomy and distributions of Mesoamerican primates. In *New perspectives in the study of Mesoamerican primates: distribution, ecology, behavior and conservation*: 29–79. Estrada, A., Garber, P. A., Pavelka, M. & Luecke, L. (Eds). New York, NY: Springer.

RYLANDS, A.B.; MITTERMEIER, R.A. & SILVA-JÚNIOR, J.S. 2012. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. *International Zoo Yearbook*, 45(1):1748-1090.

SACCONE, C. The evolution of mitochondrial DNA. **Current Opinion in Genetic and Development.**, v.4, p.875-881, 1994.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHNEIDER, H. 2000. The current status of the New World monkey phylogeny. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72: 165–172.

STEVENSON P, LINK A, DI FIORE A, DE LA TORRE S, BOUBLI JP. 2008. *Lagothrix poeppigii*. In: IUCN, 2010. IUCN Red list of threatened species. Version 2010.4. Available online at: <http://www.iucnredlist.org>. Accessed April 8, 2011. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. Disponível em <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em 23/07/2015, às 23:41 horas.

TABOR, G. M. Defining conservation medicine. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARLS, M. C. Conservation medicine: Ecological health in practice. New York: Oxford University, 2002. Cap 2, p. 8-16.

VERONA, C.E., PISSINATTI, A. Primates – Primatas do Novo Mundo (Sagui, macaco-prego, macaco-aranha, bugio e miqui): CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.S., Catão-Dias, J.L.. Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária. 2 ed. São Paulo; Rocca, Cap. 34 p. 723-743. 2014

VOSS, R.S., FLECK, D.W. Mammalian Diversity and Matses Ethnomammology in Amazonian Peru Part1: Primates. Bulletin of the American Museum of Natural History 2011 351, 1-81

WALLACE, R.B., PAINTER, R.L.E. TABER, A.B. and AYRES, J.M. Notes on a distributional river boundary and southern range extension for two species of Amazonian primates. 1996. Neotrop. Primates 4(4): 149-151.

WILDMAN, D.E., JAMESON, N.M., OPAZO J.C., and YI, S.V. 2009. A fully resolved genus level phylogeny of Neotropical primates. Molecular Phylogenetics and Evolution 53: 694–702.

Lista completa de figuras e tabelas

FIGURA 1. Distribuição geográfica dos cinco morfotipos reconhecidos atualmente de macacos-barrigudos. (Adaptado de A. Di Fiore et al. /Molecular Phylogenetics and Evolution)

FIGURAS 2 e 3. Imagens de uma fêmea lactente de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*), com filhote às costas.

FIGURA 4. Imagem de um macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*) infante, utilizando a cauda prênscil como apoio.

FIGURA 5. Imagem de um exemplar adulto de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*) evidenciando a coloração da pelagem dos membros.

FIGURA 6. Venopunção da veia braquial para colheita de sangue em macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*).

FIGURA 7. Tubo de ensaio contendo anticoagulante (EDTA), após colheita de amostra de sangue de exemplar de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*).

TABELA 1. Sítios variáveis em 567 pares de bases do gene COII do DNA mitocondrial em *Lagothrix. cana*, *L. lagothricha* e *L. poeppigii*

TABELA 2. Sítios variáveis em 567 pares de bases do gene COII do DNA mitocondrial em *Lagothrix cana* e *Ateles fusciceps*

TABELA 3. Sítios variáveis em 429 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (D-Loop) em 09 indivíduos da espécie *Lagothrix cana*.

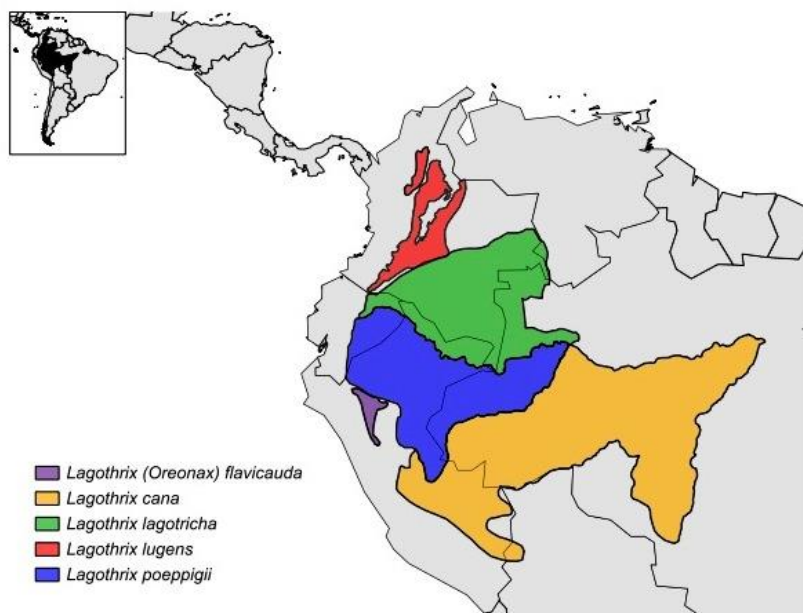
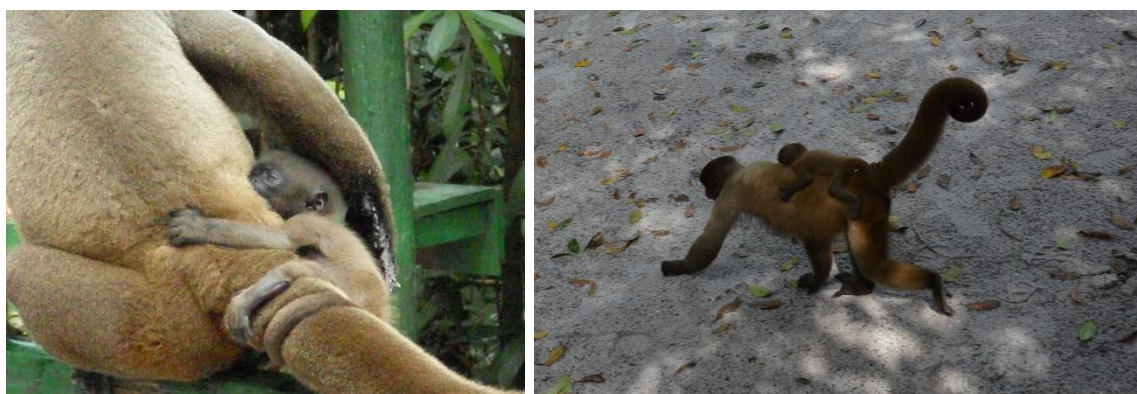


FIGURA 1. Distribuição geográfica dos cinco morfotipos reconhecidos atualmente de macacos-barrigudos. (Adaptado de A. Di Fiore et al. /Molecular Phylogenetics and Evolution)



FIGURAS 2 e 3. Imagens de uma fêmea lactente de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*), com filhote às costas.

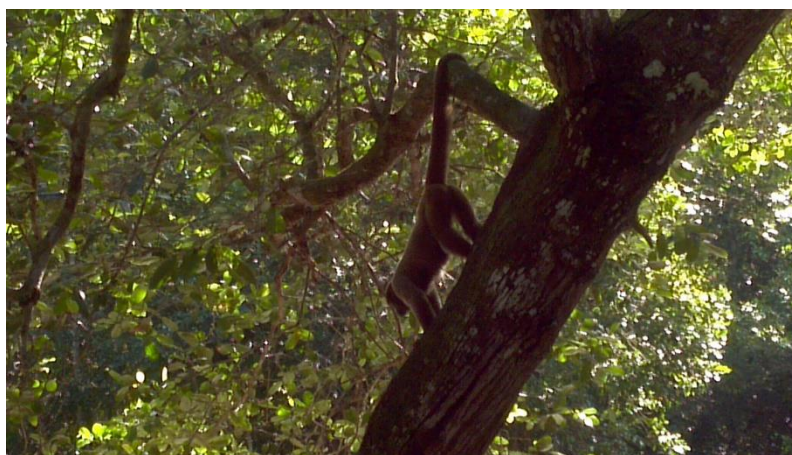


FIGURA 4. Imagem de um macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*) infante, utilizando a

cauda prênsl como apoio.

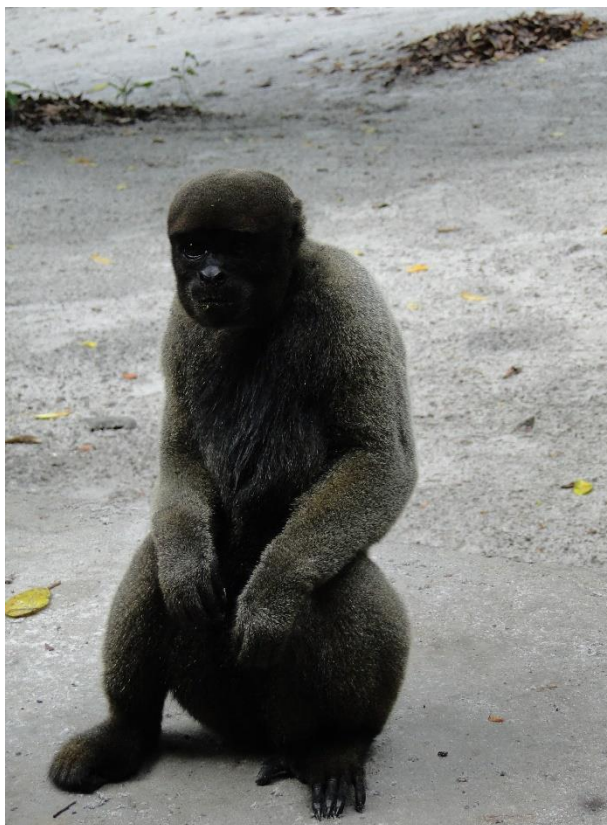


FIGURA 5. Imagem de um exemplar adulto de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*) evidenciando a coloração da pelagem dos membros.



FIGURA 6. Venopunção da veia braquial para colheita de sangue em macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*).



FIGURA 7. Tubo de ensaio contendo anticoagulante (EDTA), após colheita de amostra de sangue de exemplar de macaco-barrigudo (*Lagothrix cana*).

TABELA 1. Sítios variáveis em 567 pares de bases do gene COII do DNA mitocondrial em *Lagothrix cana*, *L. lagothricha* e *L. poeppigii*

Indivíduos	Sequências											
	3	3	6	3	3	4	4	4	4	5	5	
	0	9	9	2	9	1	3	7	7	1	3	
				1	9	5	2	1	7	9	4	
<i>L. cana</i>	T	T	A	T	T	T	T	C	C	A	C	
003	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
699	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
873	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
922	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
629	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
110	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
006	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
089	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
098	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
992	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>L. lagothricha</i>	C	.	G	C	C	C	C	.	T	.	T	
<i>L. poeppigii</i>	.	C	G	C	C	C	C	T	T	G	.	

TABELA 2. Sítios variáveis em 567 pares de bases do gene COII do DNA mitocondrial em *Lagothrix. Cana* e *Ateles fusciceps*

		Sequências																	
		3	1	3	3	6	6	7	8	9	9	1	1	1	1	1	1	1	1
			8	0	9	2	9	5	5	3	9	1	2	2	3	3	5	5	6
												1	0	7	5	8	6	9	2
																			5
Indivíduos																			
<i>L. cana</i>		T	C	T	T	C	A	A	T	C	T	T	T	G	C	C	A	T	G
<i>A. fusciceps</i>		C	T	.	.	A	.	T	C	T	C	C	C	A	T	T	T	C	A
		Sequências																	
		1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
		7	8	8	8	8	9	9	1	1	2	2	2	3	6	7	8	9	0
		8	0	6	7	9	2	5	3	6	0	5	8	7	7	9	2	1	7
																			5
Indivíduos																			
<i>L. cana</i>		T	G	C	C	G	C	G	A	C	T	A	T	T	T	A	C	C	C
<i>A. fusciceps</i>		C	A	T	T	A	T	A	G	T	C	C	C	C	C	G	T	T	T
		Sequências																	
		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4
		2	2	3	5	5	6	6	9	9	9	0	1	1	3	4	5	5	6
		1	7	6	4	7	6	9	0	3	9	5	1	5	2	7	1	2	5
																			1
Indivíduos																			
<i>L. cana</i>		T	A	T	C	T	T	T	T	G	T	C	T	T	T	C	A	C	C
<i>A. fusciceps</i>		.	T	C	T	C	C	A	C	A	C	A	C	.	.	T	G	T	A

Sequências	
	4 4 4 4 5 5 5 5 5 5
	7 8 8 9 0 1 1 3 4 6
	7 3 7 8 4 6 9 4 6 1
Indivíduos	
<i>L. cana</i>	C C T A T T A C C C
<i>A. fusciceps</i>	. T C G A C . T T T

TABELA 3. Sítios variáveis em 429 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (D-Loop) em 09 indivíduos da espécie *Lagothrix cana*

	8	1	1	2	3
	2	1	1	5	0
Indivíduos		4	5	6	0
003	C	G	G	C	A
098	.	.	.	.	.
089	T	A	.	T	G
873	T	A	.	T	G
110	T	A	.	T	G
699	T	A	.	T	G
992	T	A	.	T	G
006	.	A	A	T	G
629	T	A	A	.	.