

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ICTB
MPCAL



ICTB
Instituto de Ciência e
Tecnologia em Biomodelos

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Bárbara Cristina da Silva Meireles

**ESTUDO DA BRACHYURY MANIFESTADA EM UM GRUPO FAMILIAR CATIVO
DE *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780) (*Cercopithecidae*, Primates)**

Rio de Janeiro

2019

Bárbara Cristina da Silva Meireles

**ESTUDO DA *BRACHYURY* MANIFESTADA EM UM GRUPO FAMILIAR CATIVO
DE *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780) (*Cercopithecidae*, Primates)**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – FIOCRUZ

Orientador: Beatriz Goldschmidt

Co-orientador: Cláudia Andréa Araújo Lopes

Rio de Janeiro
2019

da Silva Meireles, Bárbara Cristina.

ESTUDO DA *BRACHYURY* MANIFESTADA EM UM GRUPO FAMILIAR CATIVO DE *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780) (Cercopithecidae, Primates) / Bárbara Cristina da Silva Meireles. - Rio de Janeiro, 2019.
77 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2019.

Orientadora: Beatriz Goldschmidt.

Co-orientadora: Cláudia Andréa Araújo Lopes.

Bibliografia: f. 65-76

1. *Macaca*. 2. *Brachyury*. 3. paternidade. 4. cauda curta. 5. gene *TBXT*. I.
Título.

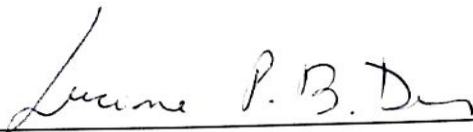
Bárbara Cristina da Silva Meireles

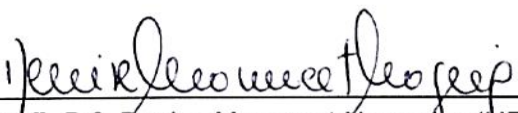
**ESTUDO DA BRACHYURY MANIFESTADA EM UM GRUPO FAMILIAR CATIVO
DE *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780) (*Cercopithecidae*, Primates)**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – FIOCRUZ

Aprovada em 16 de maio de 2019

Banca Examinadora:


Prof^ª. Dr^ª. Luciene Paschoal Braga Dias (FIOCRUZ)
(Presidente da Banca)


Prof^ª. Dr^ª. Denise Monnerat Nogueira (UFRRJ)


Prof^ª. Dr. Tatiana Kugelmeier (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2019

Dedico este trabalho à minha família, à equipe Serviço de Criação de Primatas (Scprim) Não Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) / Fiocruz e aos animais envolvidos no projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo apoio, carinho e caronas matinais até a Fiocruz. A minha irmã Stéphanie pelas brincadeiras que ajudam meu dia a terminar mais leve e pelos conselhos na formatação e diagramação do texto. Ao meu namorado Pedro Messina pela paciência, compreensão e parceria nas gordices, estando ao meu lado em todos os momentos mais desafiadores deste processo.

A Beatriz Goldschmidt por ter sido mais do que uma orientadora durante todo o tempo em que convivemos. Obrigada pelas suas orientações, cobranças e ensinamentos tanto no campo profissional quanto na vida.

Meu sincero agradecimento à equipe da primatologia, incluindo técnicos, médicos veterinários e equipe de coordenação e limpeza pelo suporte e acompanhamento dos animais, além da coleta de material do grupo estudado. A estagiária Aline Bouzon pela ajuda com o projeto e papos divertidos durante o período.

Gostaria de agradecer também ao King (Carlos Soares) que, enquanto funcionário, observou pela primeira vez o caso relatado neste trabalho.

A equipe de anatomia patológica da Coordenação de Pesquisa e Experimentação Animal (CPEA) e do SCPrim pelo apoio na necropsia e montagem do esqueleto do animal citado.

A equipe de coordenação do Ensino que me aturaram todos os dias no final da tarde, em especial a coordenadora do mestrado Inês Dória pela ajuda durante o curso, para retirada de dúvidas ou auxílio com os testes moleculares. A Fátima Fernandes (Fatinha) e a Carol Sousa que nunca negaram uma carona, lanchinhos ou conversas animadas na saída da Fiocruz durante esses dois anos de mestrado.

Aos meus colegas de turma que me apoiaram e compartilharam momentos de desespero com prazos durante os anos de mestrado, mas que com certeza vão concluir essa etapa com excelência.

A Dra. Elba Lemos e doutorando Jonathan Oliveira do Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) que gentilmente cederam seu tempo e estrutura para a parceria deste projeto.

Por fim, não poderia deixar de agradecer aos animais utilizados neste projeto. Sem o apoio de todos os envolvidos nada disso teria sido realizado.

" Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais seguro para o sucesso é sempre tentar apenas uma vez mais."

Thomas Edison

RESUMO

A cauda dos mamíferos exerce importantes funções como no auxílio do equilíbrio, comunicação e interação social entre os indivíduos. Alterações no tamanho da cauda dos animais já foram relatadas em diversas espécies e está associada a uma mutação no gene *TBXT*. Em humanos essa mutação possui relação com o desenvolvimento de tumores. O relato do encurtamento congênito da cauda não havia sido descrito até então em macaco rhesus. O fato de os primatas não humanos serem filogeneticamente próximos aos humanos os torna um biomodelo apropriado para o estudo de mutações gênicas como é o caso da *Brachyury*. O presente trabalho teve o objetivo de contribuir para o conhecimento desta característica, seu modo de herança e possíveis causas. Foi estudada uma família de macaco rhesus com 39 indivíduos, de idade e sexo variados, criados no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fiocruz-RJ, a qual apresentou indivíduos nascendo com diminuição significativa no comprimento total da cauda. O estudo clínico, radiográfico, genealógico e citogenético indicou um padrão de herança autossômico dominante para a característica *Brachyury* em *Macaca mulatta*. A padronização do protocolo de determinação da paternidade por microssatélites de DNA incluiu a definição da temperatura ideal para anelamento de 4 *primers* e gerou bandas com faixas de peso molecular próximas. O encurtamento da cauda não afetou sua função biológica. Os resultados obtidos contribuíram para o conhecimento desta característica nos primatas não humanos e poderão auxiliar no entendimento da relação desta mutação com algumas patologias humanas e animais já descritas.

Palavras-chave: *Macaca*, *Brachyury*, paternidade, cauda curta, gene *TBXT*

ABSTRACT

The mammal's tail support important functions as balance, communication and social interaction between the individuals. Alterations in the animal's tail size have already been reported in several species and is associated with a *TBXT* gene mutation. In humans this mutation is also related to the development of tumors. No report of congenital shortening of the tail was ever described until then in rhesus monkey. The fact that non-human primates are phylogenetically close to humans makes them a suitable biomodel for the study of gene mutations such as *Brachyury*. The present work had the purpose of contributing to the knowledge of this characteristic, its inheritance and etiology. A family of rhesus monkeys with 39 individuals of different age and sex were studied at the Institute of Science and Technology in Biomodels/Fiocruz-RJ, Brazil, who presented individuals with a significant decrease in tail length. A clinical, radiographic, genealogical and cytogenetic study indicated an autosomal dominant inheritance pattern for the *Brachyury* trait in *Macaca mulatta*. The standardization of the paternity determination protocol by DNA microsatellites included the definition of the ideal temperature for annealing of 4 *primers* and generated bands with nearby molecular weight. Tail shortening did not affect the biological function. The results obtained contributed to the knowledge of this trait in nonhuman primates and can help in the understanding of the relation between this mutation and human and animal pathologies already described before.

Keywords: *Macaca*, *Brachyury*, Paternity, Short tail, *TBXT* gene

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ilustração do mapa com distribuição geográfica de *M.mulatta* e área de interseção com *M.fascicularis*. Fonte: HAUS T, 2004.....17
- Figura 2:** Ilustração das vértebras caudais de primatas classificadas em proximais, transicionais e distais. Fonte: Russo GA (2015) adaptado de RUSSO e YOUNG (2011) e KIMURA *et al* (1986)21
- Figura 3:** *Macaca mulatta*. **3-a:** Animais com a cauda em tamanho normal (padrão). **3-b:** animais com a cauda curta (*Brachyury*). Fonte: Arquivo pessoal, 2017.....31-32
- Figura 4:** Recinto dos *M. mulatta*. **A:** visão externa do recinto. Fonte: VIANA, 2010. **B:** visão interna com os animais interagindo com brinquedo e poleiro. Fonte: Arquivo pessoal, 2017.....33
- Figura 5:** *Macaca mulatta*. Animal AM42 após contenção química passando por processo de biometria da cauda. Fonte: Arquivo pessoal, 2018..... 40
- Figura 6:** *Macaca mulatta* animal AM42. **6 a:** em posição decúbito lateral esquerdo e, em **6 b:** em posição de decúbito dorsal para execução da radiografia da cauda. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.....41
- Figura 7:** Quantificação dos indivíduos com a característica em relação número total de *Macaca mulatta* na colônia e na família 12 A. Fonte: Arquivo pessoal,2019.....42
- Figura 8:** Heredograma do grupo familiar 12 A de indivíduos da espécie *Macaca mulatta*. Os animais afetados pela característica *Brachyury* apresentam a marcação preta. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.....44
- Figura 9:** *Macaca mulatta*. Cariótipo do animal AB47, macho, portador da *Brachyury*. Fonte: Arquivo pessoal, 2017.....45
- Figura 10:** Procedimento de bandeamento em gel de agarose a 1,5% mostrando o *primer* D17S791 em um gradiente de temperatura variando em 2°C de 48°C a 56°C da esquerda para direita. As bandas foram visualizadas em todas as temperaturas testadas, mas definimos a temperatura de 56°C como ideal para o *primer* por apresentar boa visualização e poucos rastros. Suposto pai AB47 e filho AN11 apresentaram bandas na mesma altura de pares de base (200 e 600 pb). Fonte: Arquivo pessoal, 2018..... 47
- Figura 11:** Procedimento de bandeamento em gel de agarose a 1,5% mostrando a amplificação dos *primers* D1S207, S17S79, D13S15 e D14S30 nos supostos pais AB47, AC53 e filho AL 66 em **a** - D1S207 com as bandas entre 100-200pb e D17S791 com bandas entre 200-300pb. Apenas o animal AB47 apresenta marcação em 600 pb. **b-** D13S159 com bandas entre 100-200 pb e D14S306 apresentando bandeamento entre 200-300 pb. Fonte: Arquivo pessoal, 2018..... 48

Figura 12: Procedimento de bandeamento em gel de agarose a 1,5% mostrando o *primer* D13S159 replicado em 13 animais. Da esquerda para direita a partir do segundo poço se encontram os supostos pais: AG137; AC5; AD55; mães: U40; U56; AA 44; AA82; AC54; AF136; AG98; filhos: AL71; AL73; AL861 e C- respectivamente. Todos os poços, com exceção do controle negativo, apresentaram marcação entre 100-200 pb. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.....49

Figura 13: *Macaca mulatta* – cauda padrão. Imagem radiográfica do animal **A-** AM52 mostrando a cauda normal. *Macaca mulatta- Brachyury* **B-** animal U28 com 12 vértebras caudais, **C** – AB47 com 7 vértebras caudais, **D-** AC54 com 10 vértebras caudais, **E-** AL66 com 10 vértebras caudais e **F-** AM4 com 10 vértebras caudais. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.....51

Figura 14: Imagem radiográfica dos animais *Macaca mulatta - Brachyury*: **A-** animal AM38 com 10 vértebras caudais, **B-** AM40 com 7 vértebras caudais, **C** – AM42 com 8 vértebras caudais, **D-** AM51 com 7 vértebras caudais, **E-** AN10 com 8 vértebras caudais e **F-** AN11 também com 8 vértebras caudais. Fonte: Arquivo pessoal, 2018..... 52

Figura 15: Imagem radiográfica dos animais *Macaca mulatta - Brachyury*: **A-** AN 12 com apenas 6 vértebras caudais, o menor número do estudo e **B-** AN13 com 8 vértebras caudais. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.....53

Figura 16: *Macaca mulatta*. **a** - Esqueleto montado de exemplar juvenil, não apresentando a característica *Brachyury*. Fonte: Arquivo pessoal, 2018. **B:** mostra as vértebras intermediárias em (1) - 1º pós sacral, (2) - vértebra de transição, (3) - vértebra alongada em exemplar juvenil, não apresentando a característica *Brachyury*. Fonte: adaptação de RUSSO, G.A. 2015.....55

Figura 17: *Macaca mulatta*, macho, portador da *Brachyury*, mostrando display de dominância ao elevar a cauda. Fonte: Arquivo pessoal, 2017.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desenho dos *primers*, peso molecular (pb), repetições e número de alelos.
Fonte: Adaptado de XU *et al*, 2013.....39

Tabela 2: Animais do grupo familiar 12 A *Brachyury* (n = 18); Faixa etária onde: ADULT - animais adultos com mais de cinco anos, JUVEN – Juvenis com idade entre um e cinco anos e FILHO – filhotes com até 1 ano; número de vértebras caudais proximais, de transição e distais; número total de vértebras; medida do comprimento da cauda em cm; média do total de vértebras caudais e da medida da cauda e desvio padrão do total de vértebras caudais e da medida da caudados animais afetados pela *Brachyury* na espécie *M. mulatta*.....54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA – Comissão de Ética no uso de Animais

CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPEA - Coordenação de Pesquisa e Experimentação Animal

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

ICTB - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

NRC - *National Research Council*

PCR -Reação em cadeia da Polimerase

SAR - *Simple Sequence Repeats*

SCPRIM – Serviço de Criação de Primatas Não Humanos

STR - *Short Tandem Repeats*

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca Registrada

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	O MACACO RHESUS (<i>Macaca mulatta</i>)	17
2.2	A COLÔNIA DE <i>Macaca mulatta</i> DO ICTB/FIOCRUZ.....	18
2.3	A CAUDA NO GÊNERO <i>Macaca</i>	18
2.4	GENE <i>TBXT</i> (<i>T-Box Transcription Factor T</i>).....	22
2.5	CITOGENÉTICA DE <i>Macaca mulatta</i>	24
2.6	HEREDOGRAMA.....	25
2.7	MICROSSATÉLITES.....	26
3.	JUSTIFICATIVA	28
4.	OBJETIVOS	29
4.1.	OBJETIVO GERAL.....	29
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5.	HIPÓTESE	30
6.	MATERIAL E MÉTODOS	31
6.1.	ANIMAIS ANALISADOS, LICENÇA E LOCAL DO EXPERIMENTO.....	31
6.2.	SELEÇÃO DOS ANIMAIS E EXAME CLÍNICO.....	34
6.3.	LEVANTAMENTO DO HISTÓRICO E HEREDOGRAMA.....	35
6.4.	ANÁLISE CITOGENÉTICA DOS ANIMAIS AFETADOS.....	35
6.4.1.	OBTENÇÃO DOS CROMOSSOMOS	35
6.4.2.	COLORAÇÃO DOS CROMOSSOMOS	36
6.5.	ANÁLISE DE MICROSSATÉLITE PARA DETERMINAÇÃO DA PATERNIDADE.....	36
6.6.	BIOMETRIA DA CAUDA.....	40
6.7.	RADIOGRAFIA. DA CAUDA.....	40
6.8.	MONTAGEM DO ESQUELETO	41
7.	RESULTADOS	42
7.1	HEREDOGRAMA.....	43

7.2	CITOGENÉTICA.....	45
7.3	PATERNIDADE.....	46
7.4	BIOMETRIA DA CAUDA.....	49
7.5	RADIOGRAFIA DA CAUDA.....	50
7.6	ANÁLISE DO ESQUELETO.....	55
7.7	FUNÇÃO DA CAUDA.....	56
8.	DISCUSSÃO.....	57
9.	CONCLUSÃO.....	63
10.	PERSPECTIVAS.....	64
11.	REFERÊNCIAS.....	65

1- INTRODUÇÃO

A variação no comprimento da cauda é comum, tanto intra como entre espécies. Análises filogenéticas de mamíferos sugerem que o encurtamento ou a perda da cauda pode ter ocorrido várias vezes durante a evolução. A cauda nos vertebrados é usada para uma grande variedade de funções, incluindo equilíbrio, locomoção e comunicação. A maioria dos primatas não humanos possui cauda (BUCKINGHAM, 2013), sendo a função do equilíbrio menor naquelas espécies com a cauda naturalmente encurtada (WAKAMORI E HAMADA, 2019).

Quando um animal nasce com a cauda mais curta que os de sua espécie, esta característica é denominada *Brachyury*. Em ratos, tem sido observada e associada à função de genes T, tendo sido identificada a base molecular para essa característica por Herrmann *et al* (1990). Ratos heterozigotos para mutações nos genes T têm variação de comprimento da cauda. Em camundongos foram descritos oito alelos T diferentes que causam fenótipo de cauda curta (WU *et al.*, 2010). O produto deste gene está envolvido na formação e diferenciação do mesoderma e desenvolvimento axial em todos os vertebrados. O gene T também foi associado com fenótipo de cauda curta em muitas raças de cães (HAWORTH *et al.* 2001; HYTONEN *et al.* 2009). Em gatos, a variação do comprimento da cauda é particularmente comum em duas raças de gato doméstico, Bobtail e o Manx (BUCKINGHAM *et al*, 2013).

Os genes T são importantes reguladores de desenvolvimento em vertebrados com padrões específicos de expressão e papéis precisos durante a embriogênese. Eles codificam fatores que regulam a transcrição gênica, geralmente nos estágios iniciais de desenvolvimento. Mutações nos genes T podem causar distúrbios do desenvolvimento em humanos, principalmente devido à deficiência funcional das proteínas relevantes. Estudos recentes também destacaram o papel de alguns genes T no câncer e na cardiomiopatia, estendendo seu papel nas doenças humanas. (PACKHAM, 2003)

Em espécies de primatas, o comprimento da cauda está sujeito a grande variação. Dentro do gênero *Macaca*, o comprimento da cauda varia bastante entre as várias espécies, sendo explicada pela adaptação a fatores climáticos e/ou filogeográficos (HAMADA *et al.*, 2012). Contudo, não há relatos de *Brachyury* em

primatas. No Instituto de Ciência e Tecnologia (ICTB/Fiocruz) foi observado pela primeira vez, o nascimento de 18 indivíduos com a *Brachyury* em um grupo familiar.

Na criação em cativeiro de primatas não humanos alojados em grupos familiares, o heredograma é estabelecido baseando-se em dados de registros. Entretanto, o macho alfa não é o único capaz de reproduzir ficando suspeita a paternidade real. Portanto, o teste de paternidade por DNA foi aplicado para avaliação do fluxo gênico das características e análise do modo de herança.

O estudo citogenético realizado ofereceu a oportunidade de avaliar a integridade dos cromossomos vinculando ou eliminando a relação de anomalias com a característica observada.

Como esta espécie está filogeneticamente muito próxima dos humanos (HENDRICKX AG E BINKERD PE, 1990), foi estabelecido um paralelo com as alterações do *locus* T-box encontradas na literatura médica e as manifestações desta mutação em *Macaca mulata*.

Nessa perspectiva se insere o presente trabalho, onde buscamos caracterizar pela primeira vez, a *Brachyury* em *Macaca mulatta*, que surgiu espontaneamente no ICTB/Fiocruz, por meio da avaliação clínica, radiológica, citogenética e a padronização do teste de paternidade por microssatélites de DNA para elaboração de heredograma real e estudo do tipo de herança da característica.

Essa dissertação apresenta os resultados do estudo de uma nova característica que surgiu espontaneamente dentro da colônia de macacos rhesus mantidos no ICTB /Fiocruz no Rio de Janeiro, nunca descrita.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - O MACACO RHESUS (*Macaca mulatta*)

A ordem dos primatas pode ser classificada em duas grandes subordens: *Prosimii* e *Anthropoidea*. A subordem *Anthropoidea* divide-se na infraordem dos primatas do Novo Mundo (*Platyrrhini*) e do Velho Mundo (*Catarrhini*) que incluem a superfamília *Cercopithecoidea* (com cauda) e *Hominoidea* (sem cauda). Os *Cercopithecoidea* só possuem uma única família, a *Cercopithecidae*, sendo dividida em 20 gêneros (WOLFENSOHN E HONESS, 2005; PISSINATTI *et al* 2010). O gênero *Macaca* compreende 21 espécies (GROVES 2001), além de outras duas reconhecidas depois, como *M. siberu* (ROOS *et al.* 2003) e *M. munzala* (SINHA *et al.*, 2005).

A distribuição geográfica de *Macaca mulatta* (nome vulgar macaco rhesus) é ampla e atinge desde o Afeganistão e Índia através da Ásia para a Costa chinesa do Oceano Pacífico (Figura 1). Esta espécie é filogeneticamente relacionada aos seres humanos e compartilha um antepassado comum em cerca de 25 milhões de anos atrás (KUMAR e HEDGES, 1998).

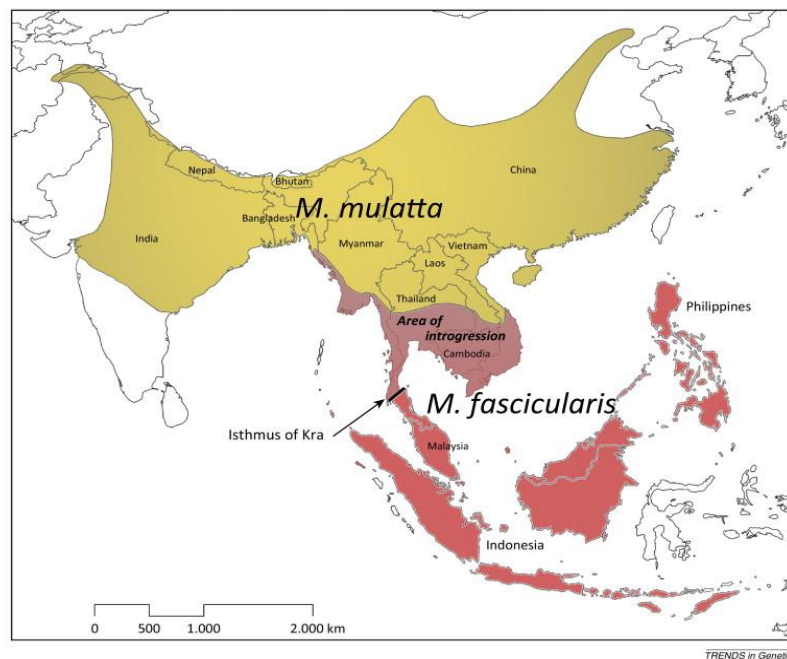


Figura 1 - Ilustração do mapa com distribuição geográfica de *M.mulatta* e área de interseção com *M.fascicularis*. Fonte: HAUS T, 2014.

Devido à similaridade fisiológica e neurobiológica, bem como à susceptibilidade a doenças infecciosas, o macaco rhesus tem sido usado como modelo para o estudo de patologias e características médicas humanas (ROGERS J. *et al*, 2005, GIBS R.A. *et al* 2007), sendo modelos em estudos de fisiologia, endocrinologia, diabetes, obesidade, doença cardiovascular, hipertensão, neurociência, psicobiologia do desenvolvimento, alcoolismo e dependências (HIGLEY J.D, 1993; HAYREH SS, 2000; MOORE TL, 2003 E BARR C.S., 2004.), além do desenvolvimento e avaliação de HIV, AIDS e produção de vacinas (DESROSIERS, R.C., 1990 E LING B., *et al.*, 2002 E MCDERMOTT A.B, 2004).

2.2 - A COLÔNIA DE *Macaca mulatta* DO ICTB/FIOCRUZ

A colônia de macacos *M. mulatta* da Fiocruz teve início em 1932, com Carlos Chagas importando 100 macacos rhesus de origem indiana para estudos com o preparo da vacina antiamarilica. Essa colônia foi estabelecida em um sistema de criação seminatural objetivando pesquisas para viabilizar a imunização da população humana do Brasil, Paraguai, Bolívia, Argentina e Nicarágua e o desenvolvimento de pesquisas relativas a outras doenças tropicais de alta relevância médica e científica. A colônia foi estabelecida na ilha do Pinheiro e, em 1980, transferida para o campus da Fiocruz, onde são mantidos em um sistema de criação em grupos familiares (PISSINATTI A. e ANDRADE MCR, 2010) com cerca de 470 animais. Na Fiocruz, *M. mulatta* tem sido empregado como modelo experimental para desenvolvimento de vacinas recombinantes para Leishmaniose; desenvolvimento de vírus vacinal de febre amarela; teste de neurotropismo e neurovirulência do vírus vacinal da febre amarela; circulação de *Campylobacter*; hepatites virais; Zika; Dengue; Caxumba; Tuberculose; anomalias congênitas e tumores.

2.3 – A CAUDA NO GÊNERO *Macaca*

A cauda exerce funções sociais, comunicação, termorregulação e quando em posição suspensa tem a função de demonstrar dominância (WILSON, 1972; FOODEN E ALBRECHT, 1999; MAESTRIPIERI, 2005; SCHMITT ET AL., 2005). A variação do comprimento da cauda em primatas varia muito entre espécies ou mesmo entre as populações locais (HAMADA *et al.*, 2005; LARSON e STERN, 2006, FOODEN, 2006)

e está envolvida na capacidade de um animal de manter o equilíbrio e se mover em um ambiente arbóreo. (HICKMAN, 1979). Fatores que influenciam a variação do comprimento da cauda entre *Macaca spp.* são o clima e o estilo de vida do animal. Espécies terrestres tendem a ter caudas mais curtas do que espécies arborícolas (RUSSO E SHAPIRO 2011), pois utilizam menos para se locomoverem.

A coluna vertebral de *Macaca mulatta* é formada de 7 vértebras cervicais, 20 vértebras torácicas, 7 vértebras lombares, 3 vértebras sacrais e cerca de 20 vértebras caudais (HARTMAN *et al.*, 1933). O número de vértebras caudais é um dos fatores importantes que determinam o comprimento da cauda. Entretanto, o número de vértebras caudais descrito por Wilson (1972) corresponde a uma média de 18,33 vértebras. Enquanto, Wakamori e Hamada (2019) descreveram um número de 16 vértebras caudais, variando de 14–17, para *M. mulatta* de origem chinesa e 17 vértebras, variando de 15–18, para *M. mulatta* de origem indiana. Nos primatas não humanos as vértebras caudais têm sido classificadas em proximais, transicionais e distais de acordo com sua morfologia (Figura 2). Nas espécies do gênero *Macaca*, as vértebras caudais proximais variaram em número de 4 a 5, transicionais entre 1 a 3 e as vértebras caudais distais entre 8 a 12 (RUSSO 2015; WAKAMORI E HAMADA, 2019). A média de comprimento da cauda para fêmeas de *M. mulatta* foi de 23,09 cm para animais provenientes de Bangladesh, de 21,98 cm para animais do Nepal, 22,09 cm para indianos e 18,86 cm para chineses. No caso de machos a média foi de 25,71 cm para animais oriundos de Bangladesh, 26,33 cm do Nepal, 24,96 cm da Índia e 21,77 cm da China (FEEROZ *et al.*, 2010).

As vértebras caudais apresentam funções variadas. As proximais agem como base para o movimento e as vértebras distais no equilíbrio do peso. A determinação do número de vértebras e o seu tamanho são informações essenciais para o estudo da adaptação e evolução da cauda dos macacos. O número e o tamanho das vértebras caudais podem ter relações filogenéticas e estar relacionada com o comprimento da cauda (WAKAMORI e HAMADA, 2019).

Os corpos das primeiras vértebras caudais proximais são relativamente curtos, com processos transversos bem desenvolvidos e zigapófises craniais e caudais e um arco neural. Nas vértebras de transição e distais, os corpos vertebrais vão aumentando em comprimento, entretanto os processos transversos, e os arcos vão diminuindo em tamanho. As vértebras de transição apresentam apenas zigapófises

craniais e as distais não possuem zigapófises. Naqueles primatas que não possuem cauda preênsil, as últimas vértebras caudais são finas e curtas. (ORGAN 2010, HAMADA *et al* 2012, RUSSO, 2013; RUSSO, 2015, ANKEL-SIMONS, 2007). A vértebra terminal é facilmente identificada por uma extremidade arredondada ou pontiaguda enquanto as vértebras não terminais possuem superfícies articulares planas em ambos os lados. (HAMADA e WAKAMORI, 2019).

Os primatas de cauda curta exibem menor mobilidade da cauda, redução da amplitude de movimento e alavancagem reduzida da musculatura da cauda em comparação com primatas de cauda longa. Nas espécies de primatas não humanos com variação no tamanho da cauda não ocorre diferença no número de vértebras proximais caudais e sim no seu comprimento (WARD, 1993; SHAPIRO e SIMONS, 2002). Nas espécies do gênero *Macaca*, o desenvolvimento da musculatura caudal é mais acentuado nos músculos extensores e abdutores comparados aos flexores (TOJIMA, 2010).

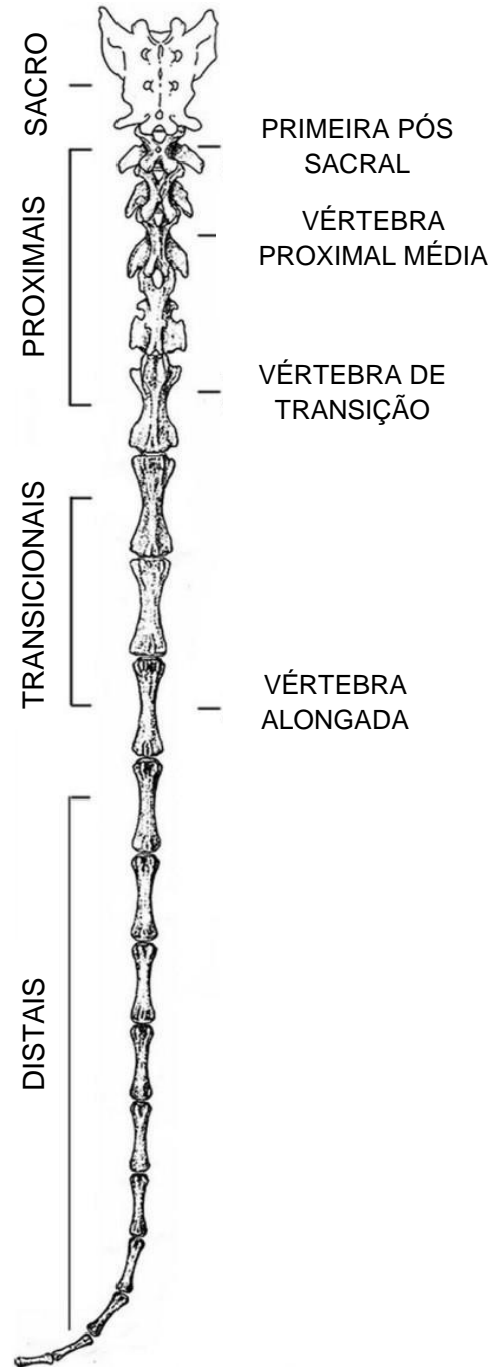


Figura 2- Ilustração das vértebras caudais de primatas classificadas em proximais, transicionais e distais. Fonte: RUSSO, G.A. (2015) adaptado de RUSSO E YOUNG (2011) e KIMURA *et al* (1986).

2.4 – GENE *TBXT* (*T-Box Transcription Factor T*)

O gene *TBXT* (*T-Box Transcription Factor T*), faz parte da família T-box e codifica fatores de transcrição que desempenham papéis essenciais no desenvolvimento embrionário inicial necessário para a especificação, diferenciação, padronização do mesoderma e desenvolvimento axial nos vertebrados (RASHBASS *et al.*, 1991; PALENA *et al.*, 2007). O gene já havia sido descrito na década de 1920 com o nome de gene T (*Brachyury*) quando foi demonstrado que os camundongos heterozigotos para a mutação *Brachyury* (*brachy-ury* significa cauda curta em grego antigo) possuíam cauda curta (DOBROVOLSKAIA, 1927) e depois estudado molecularmente por Herrmann, *et al.* (1990). Foi chamado de gene T até o ano de 2018, quando recebeu a atual nomenclatura gene *TBXT* (genbank).

Brachyury é uma proteína codificada pelo gene T em humanos, que é um fator de transcrição dentro do complexo T-box de genes. Em quatro pacientes humanos de três famílias consanguíneas exibindo agenesia sacral e ossificação anormal dos corpos vertebrais, foi identificada uma região homozigótica comum no cromossomo 6 localização 6q27 (EDWARDS *et al.* 1996) contendo o gene T, homólogo do *Brachyury* do camundongo (POSTMA *et al.*, 2014) e homólogo ao gene T no macaco rhesus que está localizado no cromossomo 4 (genbank). Este fator de transcrição do T-box também foi reconhecido por induzir a transição mesenquimal epitelial em linhagens celulares de carcinoma humano e em linhagens de células tumorais derivadas de carcinomas de pulmão, cólon e próstata (PALENA *et al.* 2007; FERNANDO *et al.* 2010). Nesse sentido, o anulamento deste gene pode efetivamente controlar o câncer e oferecer um novo conceito para o desenvolvimento de tratamentos (PACKHAM e BROOK, 2003, AKIMOTO *et al.*, 2018).

O T-box é altamente conservado entre diferentes espécies (BOLLAG R. J, 1994) e estão dispersos por todo o genoma humano. No camundongo, o gene T *Brachyury* foi localizado no cromossomo 17 (HERRMANN *et al.*, 1990). Mutações diferentes envolvendo o T-box em camundongos resultaram em efeitos no comprimento da cauda, fertilidade e embriogênese (BUCKINGHAM, 2013). Os animais heterozigotos não concluem a formação da cauda sendo esta de tamanho reduzido nos camundongos adultos. Os homozigotos morrem ainda em fase

embrionária com cerca de 10 dias pelo desenvolvimento anormal da membrana alantoide (CHESLEY, 1935).

Várias mutações no T-Box para característica cauda curta foram identificadas em gatos Manx (BUCKINGHAM, 2013) e em outras espécies incluindo Zebrafish (SCHULTE-MERKER *et al.*, 1994), cães (HYTONEN M.K., 2009; HAWORTH *et al.*, 2001) e *Xenopus* (SMITH, 1991). Em gatos Manx sem cauda, o *locus* T está associado a muitas complicações como a incontinência, claudicação e espinha bífida com mielomeningocele. Entretanto, alguns Manx não apresentam tais complicações (BUCKINGHAM *et al.*, 2013; POLLARD *et al.*, 2015). Em uma análise de pedigree, POLLARD *et al.* (2015) sugeriram que gatos Bobtails japoneses, americanos e das ilhas Curilhas com cauda curta não apresentavam mutações no T-Box, e que uma forma gênica adicional, autossômica dominante com expressividade variável no comprimento da cauda existiria nesta espécie que controla a formação da cauda e das vértebras.

Nos cães o comprimento da cauda tem relação com o número de vértebras caudais e varia entre indivíduos. Estudo genético em cães de cauda curta das raças Welsh Corgis Pembroke e cruzamentos de Boxer evidenciou mutação nos *locus* do cromossomo 1 canino homólogo ao gene TBXT de camundongos que é letal quando em homozigose (HAWORTH, 2001). Cães com apenas um alelo mutante (heterozigotos) tem cauda curta ou ausência total da cauda. Como animais homozigotos não foram observados para o alelo mutante descrito acima, foi proposto que, quando em homozigose a mutação é letal (genótipo GG), causando a morte de animais durante a gestação ou logo após o nascimento (HAWORTH *et al.* 2001, INDREBO *et al.* 2008). Em cães da raça Labrador foi identificada a presença da mutação C189G no gene TBXT em heterozigose como causa da redução no tamanho da cauda. Pelo fato de ninhadas entre acasalamentos de animais normais serem maiores, os autores também concluíram que em homozigose esta mutação seria letal (SILVA *et al.*, 2018).

Mutações em genes T-box podem causar distúrbios do desenvolvimento em humanos, principalmente devido à deficiência funcional de proteínas relevantes (WU *et al.*, 2010), incluindo as síndromes de DiGeorge e Holt-Oram. A Síndrome de DiGeorge é um distúrbio congênito que afeta o desenvolvimento do timo, glândulas paratireóideas e arco aórtico e está relacionado com o grupo de genes T-box. Experimentos que utilizaram camundongos com mutações no gene TBXT apresentam

alta incidência de defeitos de arco aórtico, alterações faciais e palatinas (ZHANG *et al* 2006). A síndrome de Holt-Oram é caracterizada pela presença de defeitos morfológicos congênitos nos membros superiores e cardíacos. Manifesta-se de forma autossômica dominante e possui relação com o gene T-Bx5 (CHIN *et al.* 2014).

Biomodelos animais são utilizados para melhor compreensão das síndromes envolvidas com T-box. Jerome e Papaioannou (2001) utilizaram camundongos com mutações no grupo de genes T-box (T-Bx1) para analisar má formações cardíacas, crânio faciais e laringe, na síndrome de Digeorge. Piotrowski *et al* (2003) utilizou zebrafish mutados para complexo de genes T para estudar má formações em faringe, arcos aórticos e timo na mesma síndrome. Bruneau *et al.* (1999) descreveu alterações cardíacas em camundongos mutados para o gene T-Bx5 e comparou com a síndrome de Holt-Oram. Enquanto Packham e Brook (2002) compararam camundongos mutados e humanos com má formações do grupo de genes T-box (T-Bx1, T-Bx3, T-Bx5, T-Bx19 e T-Bx22).

2.5 - CITOGENÉTICA DE *Macaca mulatta*

Enquanto o estudo do genoma do rhesus é estudado por primatologistas, a grande maioria das pesquisas com macacos rhesus é realizada com a intenção aplicar os achados em doenças e nas características humanas pela sua similaridade com o homem. Para isso, é importante entender o cariótipo do macaco rhesus e sua homologia com o cariótipo humano. O cariótipo do macaco rhesus foi extensamente estudado por técnicas de bandeamento cromossômico (STOCK & HSU, 1973; PERTICONE *et al.* 1974; SHARMA & GARG, 1974; DE VRIES *et al.*, 1975; BRUMBACK, 1975; RUBIO GODAY *et al.*, 1976; FINAZ *et at.* 1978; ESTOP *et al.* 1978; DUTRILLAUX *et al.*, 1979; SOARES *et al.*, 1982).

O genoma de *Macaca mulatta* (n=42) é organizado em 20 pares de cromossomos autossomos, sendo 14 metacêntricos, 26 submetacêntricos. O cromossomo X é submetacêntrico e o cromossomo Y é acrocêntrico. A padronização do cariótipo de *M. mulatta* foi baseada na homologia interespecífica com cromossomos humanos (SOARES *et al*, 1982; OWEN *et al*, 2016). Com exceção de 48 pontos de quebra, incluindo três fusões, uma fissão e pontos de interrupção induzida por inversões que são detectáveis através da coloração de cromossomos e por mapeamento comparativo de ligação, existe uma similaridade entre os

cromossomos humanos e *Macaca* (DUTRILLAUX *et al* 1979, ROGERS *et al*, 2006). As sequências de nucleotídeos que apresentam homologia entre o homem e o macaco rhesus corresponde a 93,54% de similaridade (GIBBS RA *et al.*, 2007). Enquanto uma comparação conduzida por Li. *et al* (1987) para pseudogenes da globina revelou que humanos têm 98,3% de identidade de sequências com chimpanzés, 96,9% com orangotangos, 92,7% com macaco rhesus e 88,8% com macaco-da-noite.

2.6 - HEREDOGRAMA

O heredograma é a representação gráfica do pedigree, ou seja, das relações de parentesco entre os membros de uma família. São utilizados símbolos e conexões entre estes com a finalidade de determinar o grau de parentesco dos indivíduos e o fluxo das características. Animais de *pedigree* conhecido são essenciais para a pesquisa genética. Além disso, registros de *pedigree* são importantíssimos para se minimizar a consanguinidade em programas de criação desenvolvidos a longo prazo.

Algumas tentativas iniciais para estabelecer o registro de paternidade em populações de primatas em cativeiro se basearam no pressuposto de que o macho dominante de um grupo é o responsável pela geração de toda a progênie. Entretanto, em muitos casos, a análise com marcadores genéticos revelou que muitos filhotes foram gerados por machos subordinados (WIDDIG *et al.*, 2001). Macacos rhesus fêmeas acasalam com múltiplos machos dentro de 1 ciclo (DIXSON 1998; MANSON 1992) e são reprodutores sazonais. Em algumas situações, o macho dominante gera menos da metade dos filhotes nascidos (DURVALL *et al*, 1976; CURIE-COHEN *et al.*, 1983). A maternidade poderia ser determinada com exatidão em primatas não humanos, porque mãe e filhote mantêm um vínculo estreito. Entretanto, em macaco rhesus, o roubo e a troca permanente de filhotes é muito comum (SMITH, 1986). Desse modo, a maternidade também pode ser erroneamente atribuída.

Dentre os efeitos lesivos da endogamia em populações animais, podemos incluir a redução da fertilidade (AMOS *et al.*, 2001; CHARPENTIER *et al.*, 2005; GALLARDO *et al.*, 2004; SEDDON *et al.*, 2004; SLATE *et al.*, 2000), do crescimento (CHARPENTIER *et al.*, 2006; COLTMAN, BOWEN & WRIGHT, 1998), da sobrevivência de filhotes (COULSON *et al.*, 1999; MANDAL *et al.*, 2004) e o aumento da

suscetibilidade a doenças (ACEVEDO-WHITEHOUSE *et al.*, 2003). A endogamia pode ser evitada se forem mantidos registros exatos de *pedigree* e se um número suficiente de animais estiver disponível para que seja evitado o acasalamento entre parentes (ALTMANN e ALTMANN, 1979).

O estudo das características hereditárias se baseia no tipo de herança, que pode ser determinado pelo estudo do heredograma. O manejo genético de colônias de primatas que inclui a identificação individual para análises genéticas de populações e construção de *pedigree* é crucial para os centros de criação de primatas. A determinação da paternidade baseada em microssatélites de DNA pode ser usada para validar a precisão dos *pedigrees* que são frequentemente baseados nos registros presumidos (XU *et al.*, 2013).

2.7 - MICROSSATÉLITES

Os marcadores moleculares ou marcadores genéticos determinam pontos de referência herdados nos cromossomos e capazes de diferenciar indivíduos (MILACH, 1998). Vários tipos de marcadores moleculares detectam o polimorfismo genético diretamente do DNA. Entre estes, destacam-se os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), ou ainda STR (*Short Tandem Repeats*) (Faleiro, 2007). Os microssatélites são segmentos curtos de DNA com níveis de variação dentro da mesma população ou entre espécies (ELLERGREN, 2004; LITT e LUTY, 1989; WEBER e MAY, 1989) de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, que se repete em *tandem*. Possuem maior capacidade de ganhar alelos que perder podendo ser facilmente amplificados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e analisados por eletroforese (STRACHAN e READ, 2002; MENEZES *et al.*, 2006). Os marcadores microssatélites são úteis no manejo genético para a análise de paternidade, variabilidade e diversidade genética, sexagem de embriões, registro genealógico e detecção de doenças genéticas (MOORE *et al.*, 1998, CURI e LOPES, 2001; GARCIA, 2006).

O uso de microssatélite para testes de paternidade é um procedimento de rotina para as populações de animais de vida livre ou cativo, e têm sido amplamente adotados em animais e seres humanos para teste de parentesco e identificação individual (KAYSER *et al.*, 1996; GODAVARTHI *et al.*, 2010). Muitos estudos têm sido

conduzidos, identificando polimorfismos de microssatélites em macacos rhesus (MORIN *et al.*, 1997; MOORE *et al.*, 2003; ROGERS *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.* 2004; XU *et al.*, 2013 e 2016), indicando que os microssatélites têm grande potencial no manejo genético de colônias de primatas.

Nürnberg, *et al.* (1998) utilizou com sucesso 51 *loci* de microssatélites para determinar a paternidade através de amostras de sangue de um grupo de macacos Rhesus do centro de criação de Cayo Santiago (Porto Rico), composto por 200 machos e cerca de 100 mães e seus conceptos. Outros 13 microssatélites diferentes foram utilizados para determinar a paternidade de 40 indivíduos de *Macaca mulatta* de uma colônia cativa do Wisconsin National Primate Research Center (WNPRC) (ELY, *et al.* 1999). Rogers J., *et al.* (2006) testou 300 microssatélites humanos previamente utilizados em babuínos e 158 já utilizados anteriormente para *M. mulatta* para determinar a paternidade de 865 animais de 5 famílias em 3 gerações de macacos rhesus de 2 centros de criações do EUA, resultando no total de 312 microssatélites viáveis para paternidade em *M. mulatta* e uma taxa de heterozigose da colônia de 0,730. HAYAKAWA (2008) utilizou 8 *primers* de microssatélites humanos e amostras de sêmen, urina, sangue e fezes para analisar a paternidade de 9 filhotes e 25 supostos pais de *Macaca fuscata yakui* selvagens nascidos na ilha de Yakushima (Japão). O estudo revelou que cinco dos nove filhotes analisados eram filhos de machos de fora do grupo social. Recentemente, 10 microssatélites foram utilizados efetivamente para determinar a paternidade por meio de amostras de sangue colhidas de 48 indivíduos *Macaca mulatta* cativos na província de Anhui (China), sendo relatado que seis dos microssatélites já seriam suficientes para confirmar a paternidade (XU *et al.*, 2013).

3 - JUSTIFICATIVA

O Serviço de Criação de Primatas não Humanos (SCPRIM) do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) conta com uma população de cerca de 470 macacos rhesus, divididos em 23 famílias de tamanhos variados. Neste plantel, apenas um grupo familiar apresentou indivíduos com a cauda mais curta que os demais. O gene TBXT já foi relatado como o causador dessa característica em diversas espécies, sendo altamente conservado. Mutações em genes T-box estão associados a doenças congênitas em humanos e são amplificados em um subconjunto de cânceres. Por serem um modelo animal muito próximo ao homem, este grupo familiar da espécie *Macaca mulatta* apresentou espontaneamente esta mutação, poderá representar uma oportunidade de aprimorar o conhecimento dos fatores envolvidos nessa característica acrescentando conhecimentos médicos e evolutivos relacionados a este grupo de genes. O estudo desse grupo familiar é importante, pois até então não há relatos desta característica em primatas não humanos. Conhecer melhor a estrutura genética da população permitirá também a seleção dos animais para programas reprodutivos e para pesquisa biomédica.

4- OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICO

4.1- OBJETIVO GERAL

Investigar a característica *Brachyury* apresentada em um único grupo familiar de macacos rhesus da colônia do ICTB tentando estabelecer sua etiologia e relação com as patologias geradas por mutações no gene TBXT.

4.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir o heredograma do grupo familiar afetado pela *Brachyury*, a partir dos registros nas fichas individuais e análise genética molecular;
- Determinar o modo de herança da característica *Brachyury* e seu fluxo gênico;
- Investigar, por citogenética, a presença de alterações cromossômicas numéricas e estruturais nos animais afetados;
- Descrever o número de vértebras caudais e a biometria da cauda dos macacos rhesus portadores de característica *Brachyury* por meio do exame físico e radiográfico dos animais e de peças anatômicas.

5 - HIPÓTESE

Existem relatos da característica *Brachyury* em diversas espécies e evidências de que seja manifestada por alterações em um conjunto de genes denominados T-box. Nossa hipótese é que a manifestação da característica *Brachyury* no grupo familiar da espécie *Macaca mulatta* é causada por uma mutação no mesmo grupo de genes e, como nas demais espécies, segue o tipo de herança autossômica dominante.

6- MATERIAL E MÉTODOS

6.1. ANIMAIS ANALISADOS, LICENÇA E LOCAL DO EXPERIMENTO

A característica *Brachyury* foi visualizada por um técnico que realizava diariamente o manejo dos *M. mulatta*. A diferença no tamanho da cauda pode ser observada nitidamente comparando os animais com cauda padrão (Figura 3-a) e os afetados (Figura 3- b).





Figura 3- *Macaca mulatta*. **3-a:** Animais com a cauda em tamanho normal (padrão). **3-b:** animais com a cauda curta (*Brachyury*). Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

O ScPrim do ICTB / Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, mantém cerca de 470 macacos rhesus (*Macaca mulatta*). São criados em sistema de acasalamento fechado desde sua fundação em 1932 na ilha do Pinheiro. Em 1980, foram transferidos para o campus da Fiocruz. Anualmente, os animais da colônia são submetidos a um manejo clínico, que consiste em exame físico, biometria, pesagem, coleta de material biológico e tratamento anti-parasitário profilático. Nesta ocasião os animais são sedados com cloridrato de cetamina (10 mg / kg) associada ao midazolam (0,1 mg/kg) via intramuscular (ANDRADE, 2010). Existem na colônia 12 conjuntos de gaiolas compostas por módulos que se dividem em dois recintos distintos, onde são alojados diferentes grupos sociais desses animais. Cada recinto mede 36 m², possuindo uma área interna de 6 m² (refúgio), dando opção de abrigo aos animais nas condições climáticas desfavoráveis. Há um corredor de serviço que é comum a ambos, constituindo acesso para os técnicos realizarem o manejo diário, como alimentação, higienização e contenção animal, quando necessário. A área central da gaiola é

coberta por telha do tipo 'ecológica', que cobre o refúgio e parcialmente a área externa. Os recintos parcialmente cobertos auxiliam na dissipação do calor, ao mesmo tempo em que possibilitam aos animais a exploração de ambientes distintos. As paredes das áreas internas e externas dos recintos são confeccionadas em alvenaria, sobrepostas por grades de ferro tratadas com anticorrosivo. O piso é em concreto, com inclinação que facilita o escoamento de resíduos líquidos. O ambiente é composto por um comedouro de aço inoxidável com tampa, três bebedouros automáticos de aço inoxidável posicionados em três pontos, com uma distância de 2,20 m entre si, a uma altura de 0,70 m do piso, poleiros móveis de madeira, balanços feitos de troncos de árvores e tambores suspensos feitos com plástico rígido que servem de enriquecimento ambiental além de outros itens que são ofertados alternadamente. Cada recinto abriga de 20 a 40 animais em grupos familiares na proporção de um macho para cada dez fêmeas, estando dentro das recomendações do *Guide for the Care and use of Laboratory Animals*, Washington, EUA, 2011 E do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2015). Muitas vezes alguns filhotes permanecem em seus grupos sociais mesmo após atingirem a idade reprodutiva devido à dificuldade de adaptação em outros grupos sociais ou por falta de espaço disponível para formação de uma nova família (Figura 4).



Figura 4 - Recinto dos *M. mulatta*. **A:** visão externa do recinto. Fonte: VIANA, 2010. **B:** visão interna com os animais interagindo com brinquedo e poleiro. Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

Os recintos estão localizados em uma área descoberta, arborizada por espécies frutíferas e ornamentais, que funciona como uma barreira física aos ventos dominantes, reduz o estresse visual entre os grupos e aumenta o conforto térmico, além de proporcionar um ambiente que se aproxima das condições do habitat natural. A higienização dos recintos é realizada diariamente com a varrição, o recolhimento e descarte de resíduos sólidos e lavagem com água sob pressão.

O manejo alimentar compreende a oferta de ração industrializada formulada e balanceada conforme as recomendações do National Research Council - Nutrient requirements of nonhuman primates (NRC, 2003), oferecida nas primeiras horas da manhã, após a higienização dos recintos e no momento de maior atividade dos animais, sendo a base da alimentação dos animais. A dieta é complementada por produtos hortifrutigranjeiros à base de frutas, verduras, ovos, sementes de grãos e castanhas oferecidos no início da tarde após a higienização. Recebem água filtrada e tratada *ad libitum* por meio de bebedouros automáticos de aço inoxidável e são alimentados com ração comercial extrusada (Nuvilab Primatas Velho Mundo®, Quimtia S.A., Brasil) pela manhã, suplementada com itens hortifrutigranjeiros à tarde, previamente imersos em solução de hipoclorito de sódio 2% para controle parasitológico e bacteriológico. Os comedouros são limpos diariamente com água pressurizada; nenhum produto químico é usado. Cada recinto possui poleiros, tambores, troncos de árvores, balanços. Outros itens de enriquecimento ambiental são oferecidos alternadamente (sorvetes de frutas, pipoca, balanço de pneus e piscina em dias quentes).

A criação, produção e manutenção de primatas não humanos no ICTB é destinada à pesquisa biomédica e está devidamente licenciada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Fiocruz) sob o protocolo número LW 5/16. O projeto foi desenvolvido no ScPrim do ICTB/Fiocruz em parceria com o Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

6.2. SELEÇÃO DOS ANIMAIS E EXAME CLÍNICO

Foram selecionados por meio da análise visual e do comprimento da cauda registrado nas fichas individuais, 18 macacos rhesus entre os 39 animais do grupo familiar 12 A, que apresentavam o encurtamento espontâneo da cauda. Após a contenção física com puçá e sedação, os animais com cauda encurtada foram

cl clinicamente examinados para descartar a presença de cicatrizes causadas por lesões que acarretaria alterações no tamanho da cauda. Ainda sob efeito da sedação, foi coletado sangue da veia femoral, para análise citogenética e de paternidade. A cauda dos 18 animais afetados e um normal foi radiografada para análise das vértebras caudais. A biometria da cauda foi realizada nos 18 animais afetados e seus dados comparados com o registro das fichas individuais de 163 animais normais na mesma faixa etária. Um animal com padrão normal de cauda que veio a óbito naturalmente, teve seu esqueleto montado para análise minuciosa das vértebras caudais.

6.3. LEVANTAMENTO DO HISTÓRICO E HEREDOGRAMA

Foi realizada uma análise criteriosa das fichas individuais de todos os animais do grupo familiar com a característica *Brachyury*, sendo levantado o histórico clínico e reprodutivo da família afetada e montado o heredograma para avaliação do grau de parentesco dentro do grupo.

6.4 ANÁLISE CITOGENÉTICA DOS ANIMAIS AFETADOS

6.4.1. OBTENÇÃO DOS CROMOSSOMOS

Após contenção física e química, uma amostra de 1 ml de sangue periférico foi coletada por venopunção femoral com seringas de 3 ml previamente heparinizadas e agulha 21G, identificadas e transportadas até o laboratório em isopor com gelo.

Aproximadamente 10 gotas de sangue total de cada animal foram semeadas em frascos contendo 6 mL de meio de cultura RPMI 1640 com penicilina e estreptomicina, acrescido de 1,5 mL de soro fetal bovino e 0,2 ml de fitohemaglutinina. O material foi incubado em estufa a 37°C por 72 horas. Com 71 horas de incubação foram adicionados 0,2 mL de solução de colchicina a 200 µg/ml e mantido por mais uma hora a 37°C. O material dos frascos foi vertido para tubos de centrifuga e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante desprezado e adicionados 10 ml de solução de KCl 0,075N incubando-se por 15 minutos a 37°C. O material foi novamente centrifugado e ao precipitado adicionado uma solução fixadora de metanol e ácido acético 3:1. Esta fixação foi repetida por mais duas vezes. O material foi diluído em uma pequena quantidade de fixador e gotejado com pipeta Pasteur sobre lâmina

previamente lavada e com uma película de água. As lâminas foram secas ao ar para posterior coloração.

6.4.2. COLORAÇÃO DOS CROMOSSOMOS

Para observação do número e morfologia dos cromossomos, foi aplicada a técnica de coloração com Giemsa a 3% em tampão fosfato por 10 minutos. As melhores metáfases foram fotografadas em câmera digital (modelo Insight 4 SpotImaging/Diagnostic Instruments) transferindo a imagem do microscópio Nikon 50i ao computador para montagem do cariótipo, análise detalhada e documentação.

6.5. ANÁLISE DE MICROSSATÉLITE PARA DETERMINAÇÃO DA PATERNIDADE

A extração do DNA foi realizada a partir do sangue total e de coágulos das amostras de 1 ml de sangue coletado por venopunção femoral com seringas de 3 ml e agulha 21G após contenção física e química dos animais pertencentes a família 12 A. Em seguida foi realizada amplificação de fragmentos de DNA utilizando quatro *primers* para os microssatélites (Tabela 1) e visualização do resultado dos *amplicons* em gel de agarose. A seleção destes *primers* foi feita de acordo com a literatura para o Gênero *Macaca*, sendo escolhidos os marcadores mais utilizados nestes testes (NURNBERG *et al*, 1998; HAYAKAWA, 2008 e XU *et al*, 2013). A análise final foi obtida pelo pareamento similar dos *amplicons* da mãe, do conceito, e o suposto pai, de acordo com o protocolo de Nürnberg *et al* (1998).

Para extração foi utilizado o protocolo de extração da QIAamp® DNA Mini and Blood Mini de acordo com o protocolo pré-estabelecido pelo fabricante (QIAamp®). Após a coleta, os tubos foram reservados por 15 minutos a 37°C para formação e retração do coágulo e então centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm para retirada de 200 µl de soro sanguíneo.

Foram adicionados ao microtubo 20 µl de proteinase K, 4 µl de RNase e 200 µl de tampão AL. Em seguida mixado por 15 s e incubado a 56°C por 10 min. Mixado brevemente e adicionado 200 µl de etanol, mixando por mais 15 segundos. Todo o material foi passado para o microtubo com coluna de centrifugação QIAamp® e centrifugado por 1 min a 8000 rpm. Em seguida a mistura foi para um novo microtubo de 2 ml e centrifugado a 8000 rpm. Foram adicionados 500 µl de Buffer AW1, seguindo-

se nova centrifugação a 8000 rpm por 1 min. O material foi repassado para um novo tubo de 2ml e o filtro descartado. Adicionado 500 µl de Buffer AW2 e centrifugado a 14000 rpm por 3 min. Trocada a coluna de centrifugação por um novo microtubo de 2 ml e centrifugado por mais 1 min. Substituído por um microtubo de 1,5 ml e adicionado 200 µl de tampão AE ou água destilada. Deixado em temperatura ambiente por 1 min e centrifugado 8000 rpm por 1 min. Repousado por 5 min em temperatura ambiente e repetido o procedimento com 200 µl de tampão AE. Após este procedimento a qualidade do DNA extraído foi testada em gel de agarose a 0,8% e guardou-se o material em -20 °C até a realização da amplificação.

A amplificação do DNA foi realizada com 2 *Taq*s polimerases distintas por questão de disponibilidade. A reação constituída *Taq* DNA polimerase Gold (5U/µl Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) utilizou 2,5 µl de Tampão PCR 10X, 0,5 µl de cada primer 10 mM, 4µl MgCl₂ 50 mM, 0,5 µl de desoxinucleotídeos (20mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato), 0,2 µl de *Taq* DNA polimerase Gold e 14,05 µl água livre de nucleases (Promega, Madison, WI, EUA) em um volume final de 25 µl. Em seguida, a reação de amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystem®, Foster City, CA, EUA). As etapas de desnaturação, anelamento e extensão foram adaptadas para cada *primer* com uma temperatura inicial de desnaturação de 95 °C por 10 minutos seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C para concluir a desnaturação, tendo um teste preliminar para determinação da temperatura ideal de 30 segundos com temperatura variando entre 50-56 °C para o anelamento e posterior 45 segundos a 72 °C. Por fim, 10 minutos a 72°C para extensão do material genético. Sendo mantido a 10°C até retirada do material para armazenagem em freezer -20°C. Foi protocolada a melhor temperatura de anelamento para os *primers* foi de 56°C.

A reação constituída de *Taq* DNA polimerase Platinum HotStar (5U/ µl QIAGEN, Frederick, MD, EUA) utilizou 2,5 µl de Tampão PCR 10X, 0,5 µl de cada primer 10 mM, Q-solution 2 µl contendo MgCl₂ em sua composição, 0,5 µl de desoxinucleotídeos (20mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato), 0,2 µl de *Taq* DNA polimerase Platinum e 18,8 µl água livre de nucleases (Promega, Madison, WI, EUA) em um volume final de 25 µl. Durante a amplificação a temperatura inicial de desnaturação foi de 95°C por 15 segundos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C para anelamento por 30 segundos e posterior 72°C por 1 minuto. Finalizando com a extensão a 72°C por 10 minutos. Sendo mantido a 10°C até retirada do material para armazenagem em freezer -20°C.

Para confirmar a amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Para montagem do gel de agarose a 1,5% foram utilizados 100 ml de tampão TBE 0,5% e 1,5 g de agarose. Em seguida, homogeneizado e aquecido no microondas por +- 1 min. Esperado esfriar e colocado nas cubas de eletroforese horizontal Loccus[®] P. Foi adicionado corante com solução de GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA), marcador de peso molecular *100bp DNA ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e os amplicons resultantes do PCR. Adicionando por fim as amostras nos poços do gel e ligada a voltagem de 90 - 110 V para correr o gel. Os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e registrados em sistema digital para documentação de gel (Carestream GelLogic System).

TABELA 1 - Desenho dos *primers*, peso molecular (pb), repetições e número de alelos. Fonte: Adaptado de XU *et al*, 2013.

LOCUS	SEQUÊNCIA DE PRIMER (5' -> 3')	PB	REPETIÇÕES	Nº ALELOS
D1S207	CACTTCTCCTTGAATCG CTT GCAAGTCCTGTTCCAAG TCT	270	(CA) _n	14
D17S791	GTTTTCTCCAGTTATTCC CC AGAGTTCTTCATTCCCTTT CC	171	(CA) _n	16
D14S306	AAAGCTACATCCAAATTA GGTAGG TGACAAAGAACTAAAAT GTCCC	204	(GATA) _n	15
D13S159	GCTGTGACTTTTAGGCC AAA TGTGATGTCTACAACCTC CAGG	145	(CA) _n	12

6.6. BIOMETRIA DA CAUDA

Após contenção física e química dos 18 animais com encurtamento da cauda, o comprimento da cauda foi medido em centímetros utilizando uma fita métrica na porção lateral e ao longo da linha média da primeira vértebra caudal até a ponta da cauda (Figura 5). Os dados foram registrados em uma tabela e comparados com o histórico da biometria da cauda de 163 animais padrões e analisados posteriormente.



Figura 5- *Macaca mulatta*. Animal AM42 após contenção química passando por processo de biometria da cauda. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

6.7. RADIOGRAFIA DA CAUDA

Após sedação prévia dos animais foram realizadas duas incidências radiográficas em aparelho de Raio X de marca Aquilla-320 S em posicionamento latero-lateral (Figura 6 a) e dorso-ventral (Figura 6 b) em um animal com cauda padrão e 18 animais com encurtamento da cauda.



Figura 6- *Macaca mulatta* animal AM42. **6 a:** em posição decúbito lateral esquerdo e, em **6 b:** em posição de decúbito dorsal para execução da radiografia da cauda. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

6.8 MONTAGEM DO ESQUELETO

Um animal juvenil saudável veio a óbito no grupo familiar e seu esqueleto foi utilizado para análise das vértebras caudais. O animal permaneceu congelado até o momento em que passou pela necropsia. A *causa mortis* deste animal foi traumatismo de membros causado por outro indivíduo do mesmo grupo familiar, não ocorrendo comprometimento da coluna vertebral. O processo de limpeza para montagem do esqueleto incluiu limpeza manual, uso de água oxigenada 10 volumes e fervura em água. As peças anatômicas foram montadas seguindo a anatomia do animal com arame e cola de Cianocrilato e fixadas em um bloco de madeira.

7 - RESULTADOS

Foram analisadas as fichas individuais dos 18 animais *Brachyury* para descartar brigas ou amputação da cauda no histórico. Durante o exame clínico realizado em todo grupo familiar essas informações foram confirmadas buscando evidências de cicatrizes que indicassem perdas traumáticas de vértebras caudais. Dos 467 primatas da espécie *M. mulatta* da colônia, 18 apresentam a *Brachyury*, representado grande parte da família 12 A (Figura 7).

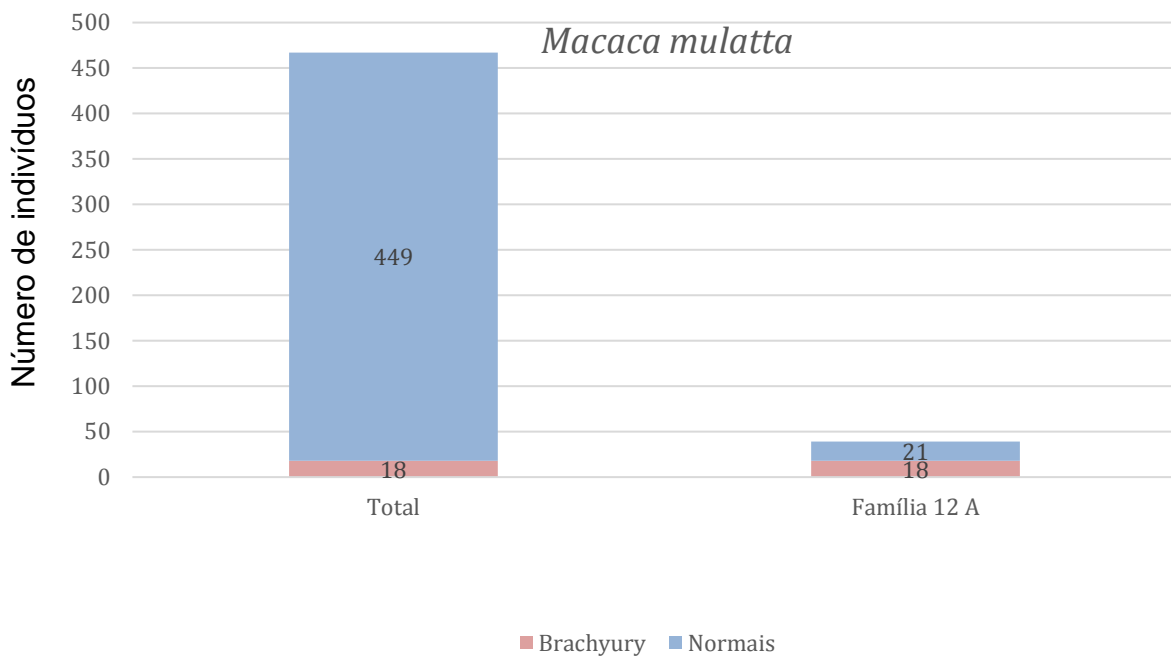


Figura 7- Quantificação dos indivíduos com a característica em relação número total de *Macaca mulatta* na colônia e na família 12 A. Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

7.1 – HEREDOGRAMA

O heredograma montado a partir dos dados retirados das fichas dos animais, embora talvez não represente completamente a realidade de todas as relações de parentesco, mostrou que a *Brachyury* é transmitida de forma autossômica dominante se apresentando em ambos os sexos dos descendentes, na proporção de 10 fêmeas e 8 machos. Foi observado que o primeiro animal no grupo familiar a manifestar a característica que se tem registro foi a fêmea U28. A característica foi disseminada a partir do estabelecimento do macho AB 47 *Brachyury* como reprodutor (Figura 6).

Confrontando o heredograma com a medida das caudas e o número de vértebras ficou evidente a redução progressiva do tamanho da cauda a cada geração. Os filhotes mais jovens, filhos da U56, AF10, U28, AF136, AD106 e AG98 não foram demonstrados no heredograma por não possuírem sexagem e marcação confirmada ainda. Seus prováveis pais são animais juvenis sem a *Brachyury*. Análise visual de suas caudas sugere não possuírem a cauda encurtada.

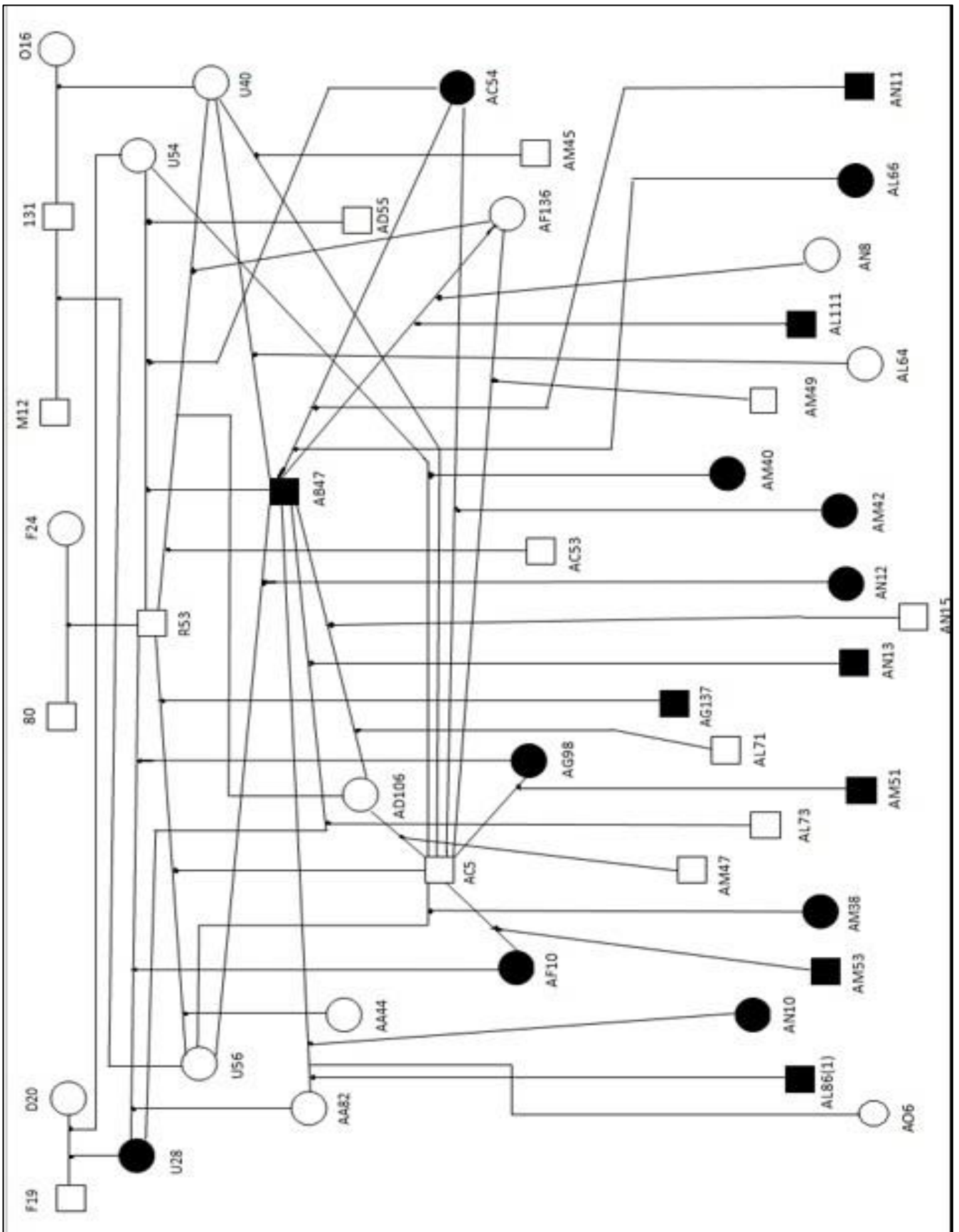


Figura 8- Heredograma do grupo familiar 12 A de indivíduos da espécie *Macaca mulatta*. Os animais afetados pela característica *Brachyury* apresentam a marcação preta. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

7.2 - CITOGENÉTICA

A análise citogenética do sangue dos 18 animais afetados não revelou alteração numérica ou estrutural dos cromossomos pela técnica convencional de coloração (Figura 9).



Figura 9 - *Macaca mulatta*. Cariótipo do animal AB47, macho, portador da *Brachyury*. Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

7.3 PATERNIDADE

A extração do DNA dos animais portadores da *Brachyury* forneceu material de qualidade tanto quando utilizado sangue total como coágulo. O kit de extração da QIAamp® DNA Mini and Blood Mini foi eficiente na obtenção do DNA desses animais.

A partir da amplificação dos primers D1S207; D17S791; D13S159 e D14S306 em cinco gradientes de temperatura diferentes (48° C, 50° C, 52° C, 54° C e 56° C) foi possível determinar a temperatura ideal de anelamento para cada um dos *primers*. O D17S791 foi amplificado nos animais AN11 e o possível pai AB47, onde foi observado em gel de agarose 1,5% que os animais apresentam bandas de peso molecular semelhante (Figura 10). Através da visualização em gel de agarose foi determinado que os *primers* melhor anelavam na temperatura de 56° C. O DNA dos animais AB47, AC53 e AL66 foi amplificado pelos 4 *primers* em géis individuais (Figura 11), contudo, se mostrou insuficiente para determinação da paternidade. Outros 13 animais foram testados em gel de agarose a 1.5%, demonstrando que as bandas são muito próximas nos animais da família (Figura 12).

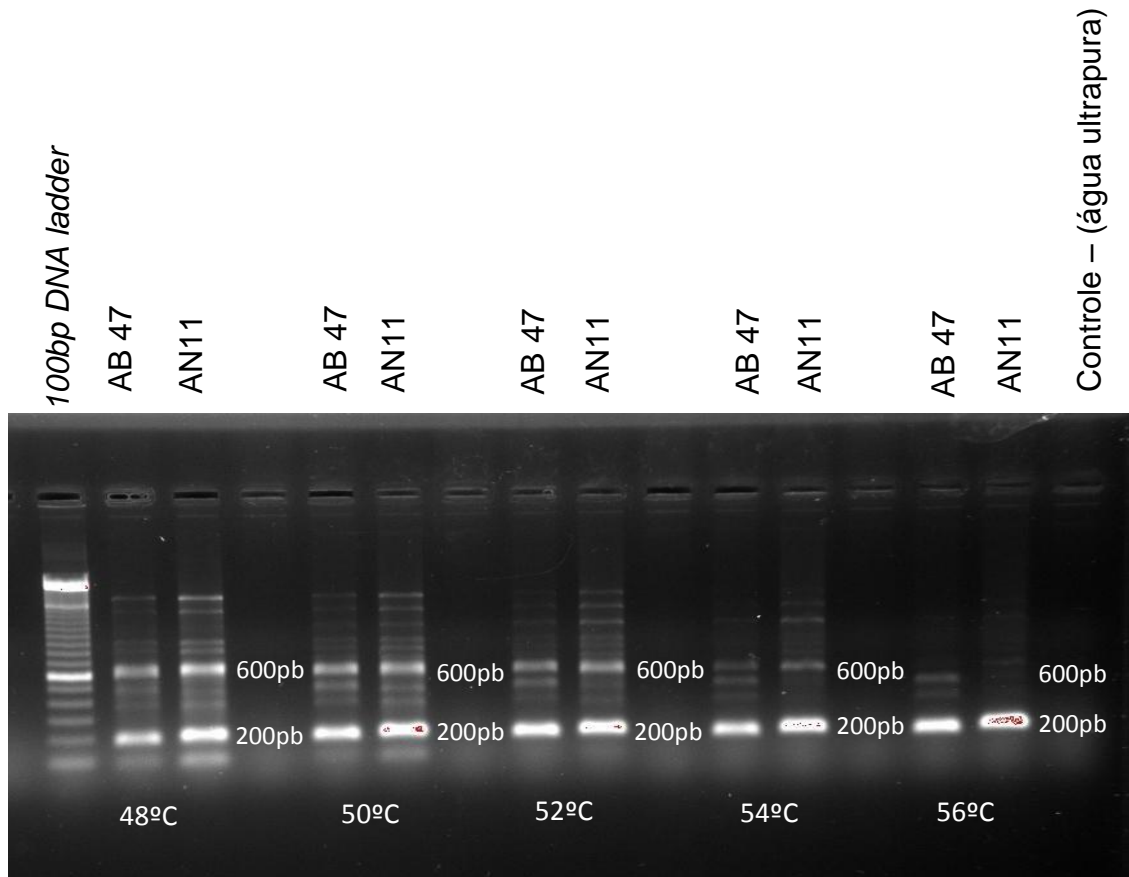


Figura 10- Procedimento de bandejamento em gel de agarose a 1,5% mostrando o *primer* D17S791 em um gradiente de temperatura variando em 2°C de 48°C a 56°C da esquerda para direita. As bandas foram visualizadas em todas as temperaturas testadas, mas definimos a temperatura de 56°C como ideal para o *primer* por apresentar boa visualização e poucos rastros. Suposto pai AB47 e filho AN11 apresentaram bandas na mesma altura de pares de base (200 e 600 pb). Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

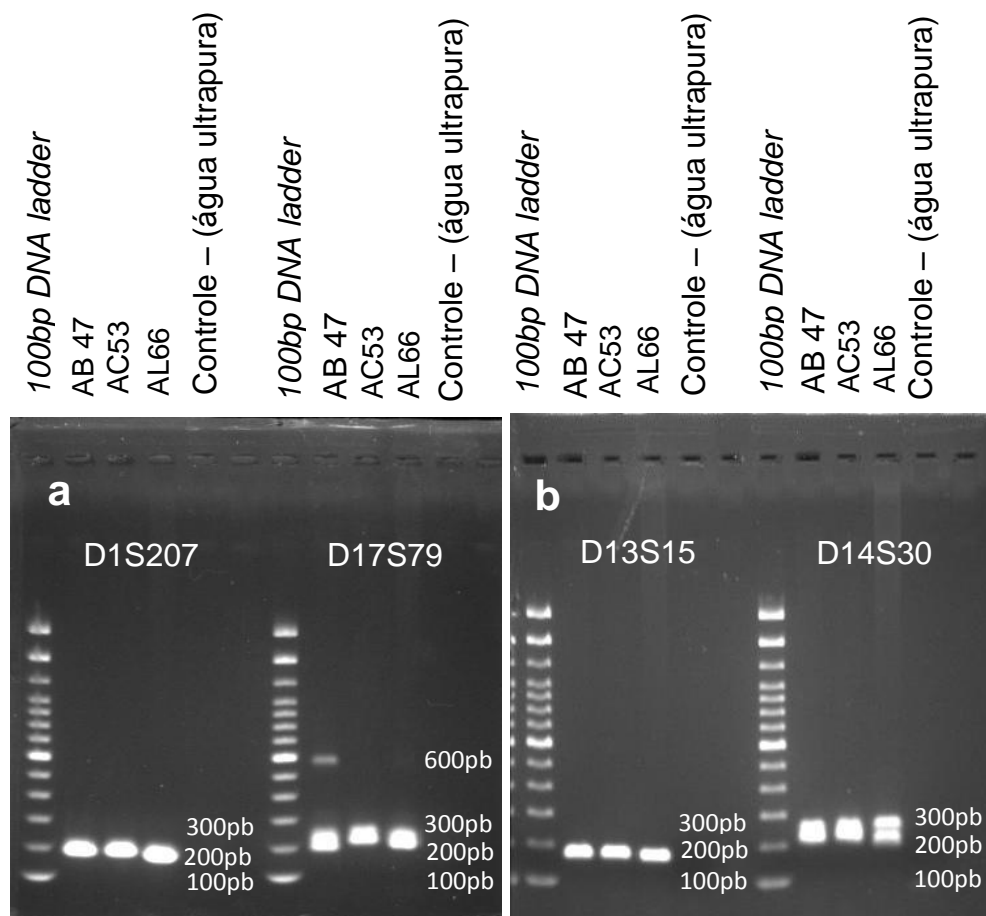


Figura 11- Procedimento de bandeamento em gel de agarose a 1,5% mostrando a amplificação dos *primers* D1S207, S17S79, D13S15 e D14S30 nos supostos pais AB47, AC53 e filho AL 66 em **a** - D1S207 com as bandas entre 100-200pb e D17S791 com bandas entre 200-300pb. Apenas o animal AB47 apresenta marcação em 600 pb. **b-** D13S159 com bandas entre 100-200 pb e D14S306 apresentando bandeamento entre 200-300 pb. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

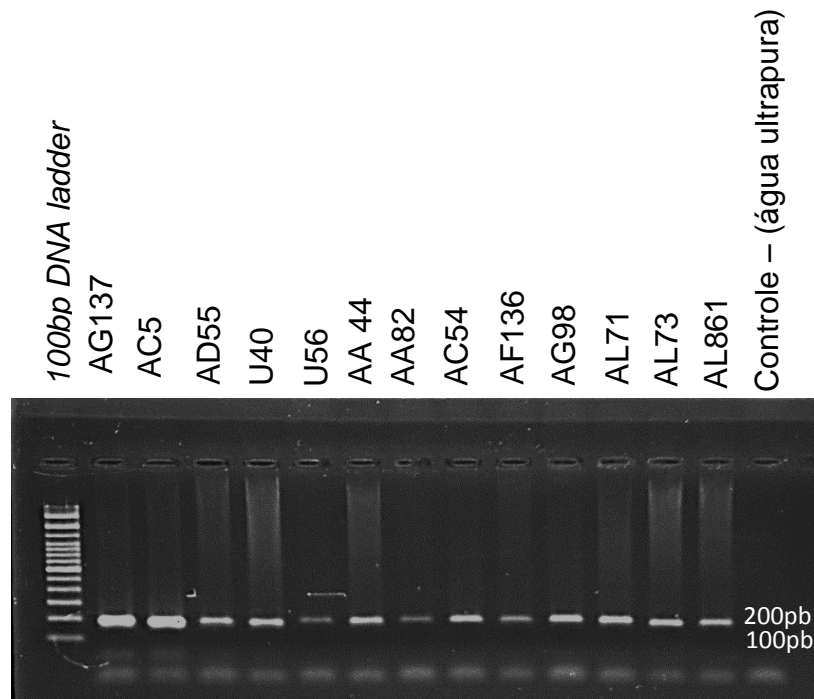


Figura 12- Procedimento de bandeamento em gel de agarose a 1,5% mostrando o *primer* D13S159 replicado em 13 animais. Da esquerda para direita a partir do segundo poço se encontram os supostos pais: AG137; AC5; AD55; mães: U40; U56; AA 44; AA82; AC54; AF136; AG98; filhos: AL71; AL73; AL861 e C- respectivamente. Todos os poços, com exceção do controle negativo, apresentaram marcação entre 100-200 pb. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

7.4 – BIOMETRIA DA CAUDA

Neste grupo familiar, foram selecionados 18 animais que apresentaram caudas de tamanho inferior à média considerada normal para a idade, tendo como referência a medida em cm dos animais dos outros grupos familiares presentes da colônia. Esses dados foram compilados dos registros dos animais da colônia realizados anualmente e arquivados no SCPrim. Os primatas foram radiografados e as caudas medidas com utilização de fita métrica. A medida em cm da cauda dos animais afetados variou de 4 cm a 17,5 cm com média de 11,44 cm (Tabela 2).

No criatório de primatas não humanos do ICTB / FIOCRUZ, é considerada idade adulta e término da fase de crescimento dos macacos rhesus, a partir dos cinco anos de idade. A média do comprimento da cauda dos animais adultos das demais gaiolas foi de 19,5 cm (n = 61), enquanto nos afetados pela característica com a

mesma idade foi de 12,4 cm (n = 6). Os animais mais jovens, com um ano de idade, apresentaram uma média de comprimento de cauda de 15 cm (n =24), enquanto os animais da mesma faixa etária do grupo afetado apresentaram comprimento da cauda com 7,12 cm (n = 4), apresentando um indivíduo (AN12) com apenas 4 cm de cauda. O grupo de animais com idades intermediárias (de um a cinco anos de idade) e cauda padrão apresentou uma média de 19,1 cm (n =78) e os afetados 12,8 cm (n= 8).

7.5 – RADIOGRAFIA DA CAUDA

Um animal com padrão normal de cauda e do mesmo grupo familiar (AM52) foi radiografado e apresentou 18 vértebras caudais (Figura 13 A). Dos 18 animais afetados pela *Brachyury* no grupo familiar 12A, 13 tiveram suas caudas radiografadas (U28, AB47, AC54, AL66, AM4, AM38, AM40, AM42, AM51, AN10, AN11, AN12 e AN13) devido a fatores ambientais que inviabilizaram a captura e sedação dos animais restantes. Obtivemos uma média de 8,5 vértebras caudais (Figura 13 B-F, Figura 14 A-F e Figura 15 A-B). As vértebras caudais proximais variaram de 4 a 5 e as vértebras caudais transicionais de 1 a 3. A redução numérica mais acentuada ocorreu nas vértebras caudais distais, quando comparadas com as proximais e transicionais, onde todos os animais mais jovens apresentavam apenas 1 vértebra caudal distal (Tabela 2).

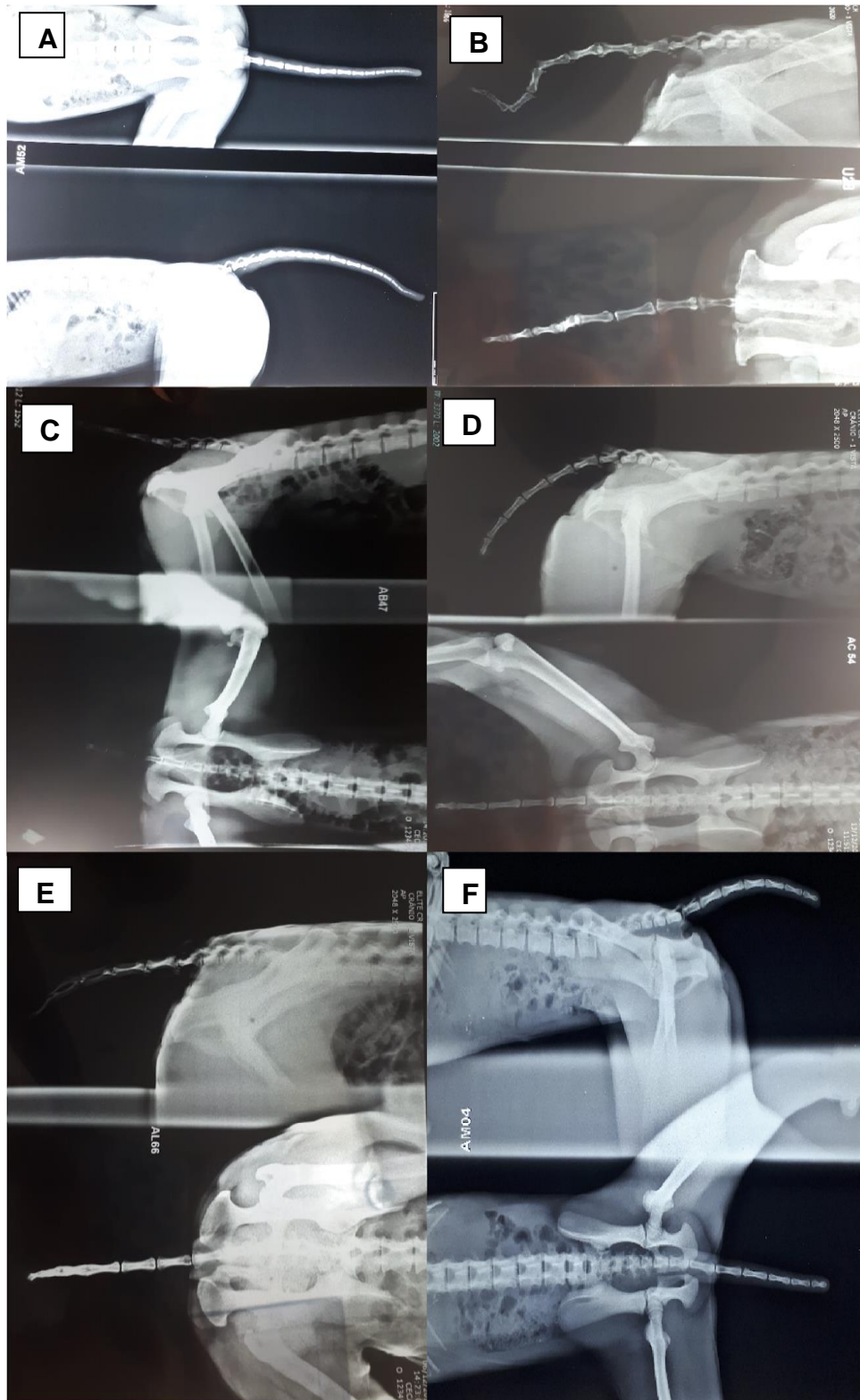


Figura 13- *Macaca mulatta* – cauda padrão. Imagem radiográfica do animal **A-** AM52 mostrando a cauda normal. *Macaca mulatta-Brachyury* **B-** animal U28 com 12 vértebras caudais, **C** – AB47 com 7 vértebras caudais, **D-** AC54 com 10 vértebras caudais, **E-** AL66 com 10 vértebras caudais e **F-** AM4 com 10 vértebras caudais. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

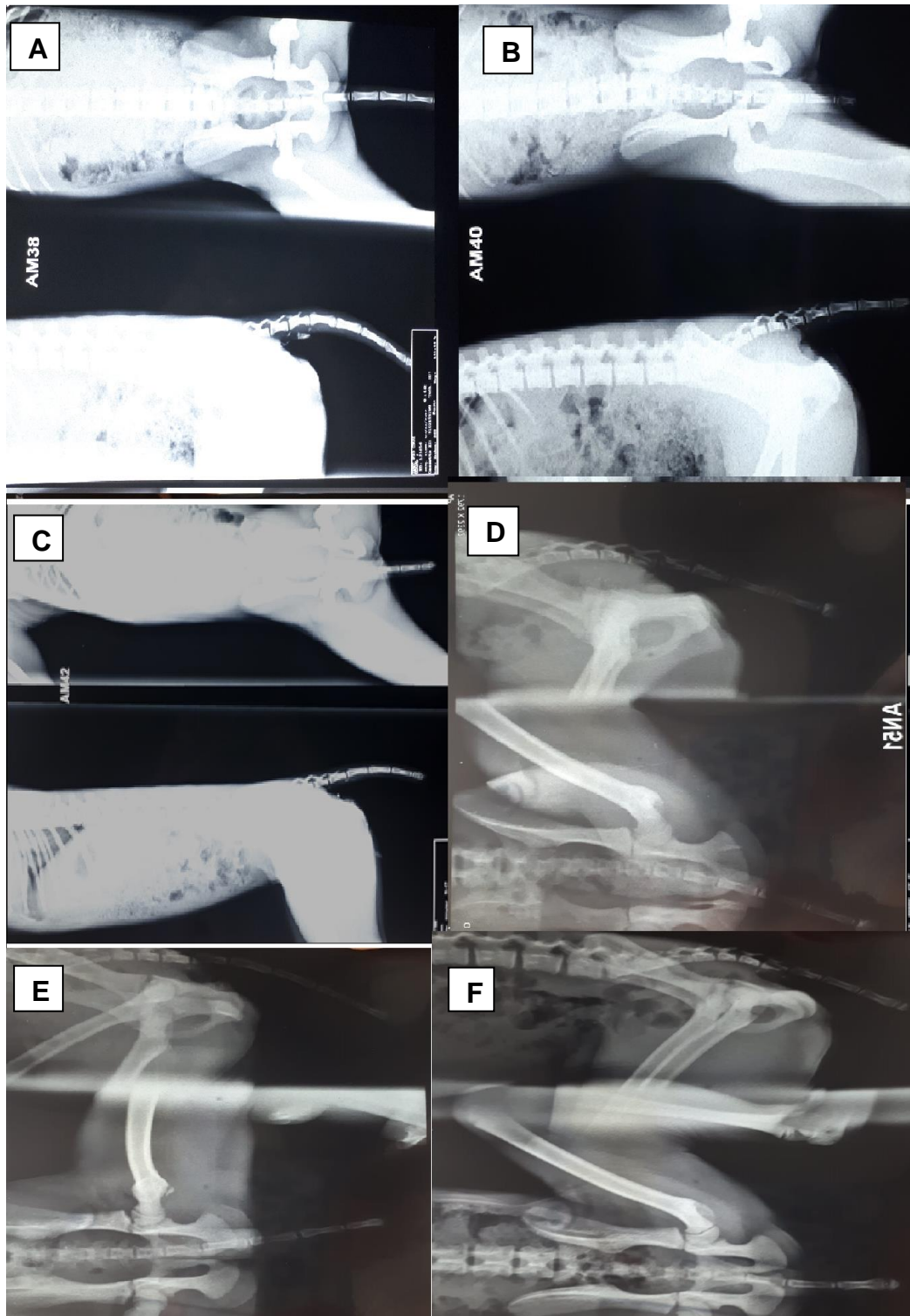


Figura 14- Imagem radiográfica dos animais *Macaca mulatta* - *Brachyury*: **A-** animal AM38 com 10 vértebras caudais, **B-** AM40 com 7 vértebras caudais, **C** – AM42 com 8 vértebras caudais, **D-** AM51 com 7 vértebras caudais, **E-** AN10 com 8 vértebras caudais e **F-** AN11 também com 8 vértebras caudais. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

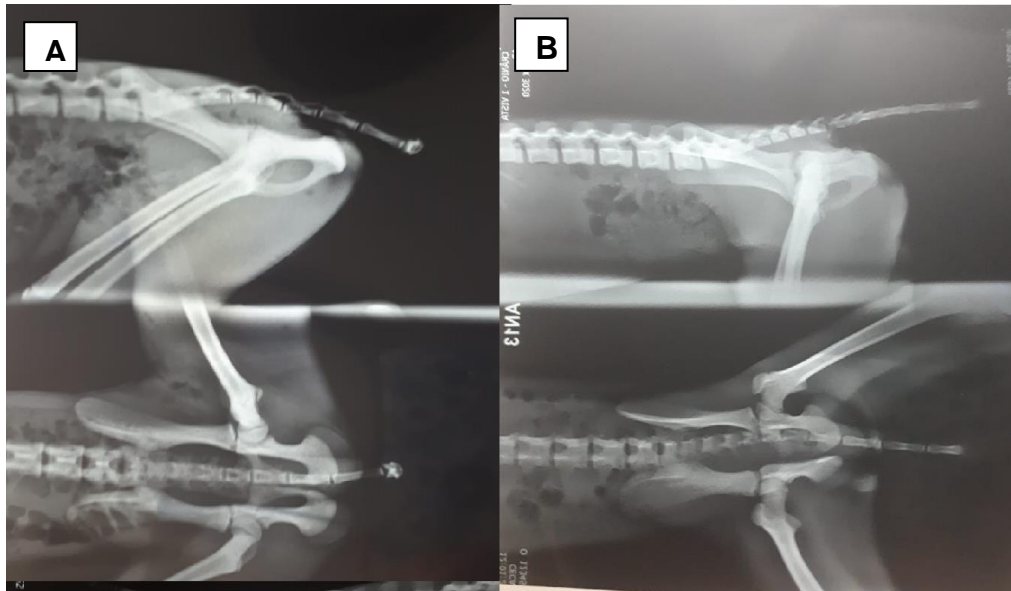


Figura 15- Imagem radiográfica dos animais *Macaca mulatta* - *Brachyury*: **A-** AN 12 com apenas 6 vértebras caudais, o menor número do estudo e **B-** AN13 com 8 vértebras caudais. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Tabela 2- Animais do grupo familiar 12 A *Brachyury* (n = 18); Faixa etária onde: ADULT - animais adultos com mais de cinco anos, JUVEN – Juvenis com idade entre um e cinco anos e FILHO – filhotes com até 1 ano; número de vértebras caudais proximais, de transição e distais; número total de vértebras; medida do comprimento da cauda em cm; média do total de vértebras caudais e da medida da cauda e desvio padrão do total de vértebras caudais e da medida da caudados animais afetados pela *Brachyury* na espécie *M. mulatta*.

ANIMAIS	FAIXA ETÁRIA	VÉRTEBRAS CAUDAIS PROXIMAIS	VÉRTEBRAS CAUDAIS TRANSITÓRIAS	VÉRTEBRAS CAUDAIS DISTAIS	TOTAL VÉRTEBRAS CAUDAIS	MEDIDA CAUDA (cm)
U28	ADULT	5	2	5	12	16,5
AB47	ADULT	4	2	1	7	17,5
AC54	ADULT	5	3	2	10	14,5
AF 10	ADULT	-	-	-	-	17
AG98	ADULT	-	-	-	-	16
AG137	ADULT	-	-	-	-	14
AL66	JUVEN	4	3	3	10	9
AL861	JUVEN	-	-	-	-	12
AM38	JUVEN	5	3	2	10	13
AM 4	JUVEN	4	3	3	10	14,8
AM40	JUVEN	4	2	1	7	8
AM42	JUVEN	4	2	1	8	9,2
AM51	JUVEN	4	2	1	7	8,5
AM53	JUVEN	-	-	-	-	16
AN10	FILHO	5	2	1	8	9
AN11	FILHO	5	2	1	8	7
AN12	FILHO	4	1	1	6	4
AN13	FILHO	5	2	1	8	8,5
MÉDIA	-	-	-	-	8,5	11,9
DESVIO PADRÃO	-	-	-	-	1,6	4,0

7.6- ANÁLISE DO ESQUELETO

A montagem do esqueleto de um macaco rhesus juvenil, não afetado pela *Brachyury* que veio a óbito auxiliou no estudo comparativo com as imagens radiográficas (Figura 16). Foi possível identificar as vértebras intermediárias entre os três tipos de vértebras caudais: 1º pós sacral (que está entre o sacro e as vértebras caudais proximais), vértebra de transição (entre as vértebras proximais e transicionais) e a vértebra alongada (entre as vértebras transicionais e distais), tendo como referência o esquema de Russo GA (2015) (Figura 16 b).

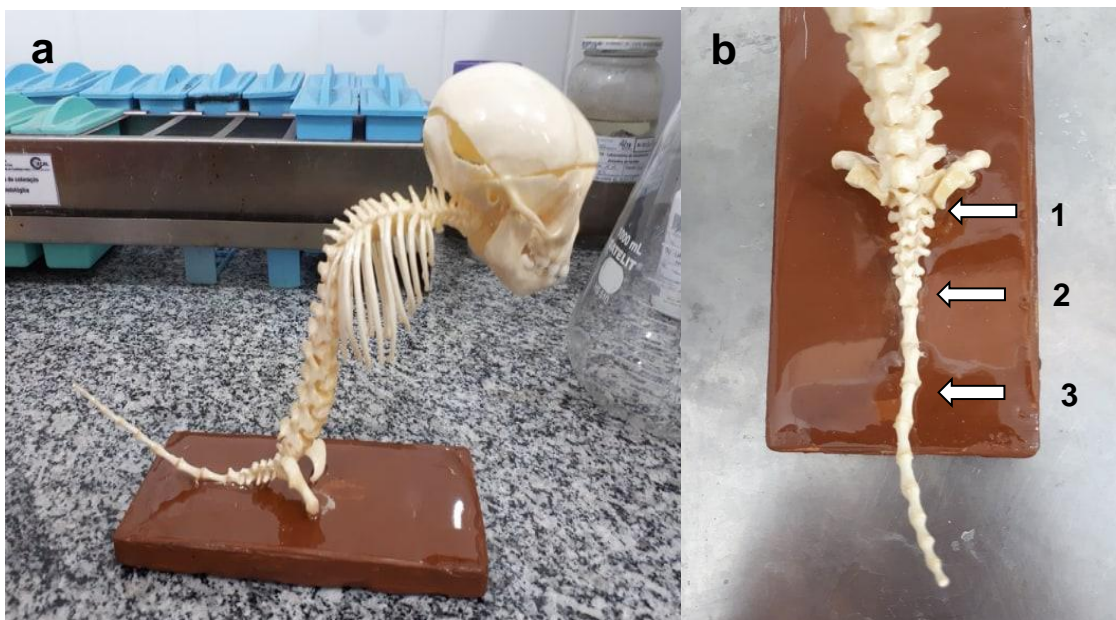


Figura 16- *Macaca mulatta*. **a** - Esqueleto montado de exemplar juvenil, não apresentando a característica *Brachyury*. Fonte: Arquivo pessoal, 2018. **B**: mostra as vértebras intermediárias em (1) - 1º pós sacral, (2) - vértebra de transição, (3) - vértebra alongada em exemplar juvenil, não apresentando a característica *Brachyury*. Fonte: adaptação de RUSSO, G.A. 2015.

7.7 – FUNÇÃO DA CAUDA

Nos *M. mulatta* a *Brachyury* se manifestou apenas no comprimento da cauda e não foi observada alteração no equilíbrio, comunicação, manifestação de dominância ou na eficiência reprodutiva. Os animais foram capazes de elevar a cauda, mesmo de tamanho reduzido, para manifestar dominância (Figura 17). Não foi observado alterações no movimento da cauda de nenhum indivíduo.



Figura 17- *Macaca mulatta*, macho, portador da *Brachyury*, mostrando display de dominância ao elevar a cauda.
Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

8 - DISCUSSÃO

A variação do comprimento da cauda ocorre desde que os macacos asiáticos divergiram há 3,8 milhões de anos atrás (SEHNER 2018). É possível que as caudas tenham sido perdidas várias vezes nos catarrhini não *cercopithecoïdes* (ISHIDA *et al.*, 2004). Contudo, primatas do novo mundo Platyrrhini do gênero *Cacajao* apresentam a cauda naturalmente encurtada. A maioria das mudanças ocorreu em primatas do velho mundo como nas famílias *Hylobatidae* (gibões) e *hominidae* (chimpanzés, gorilas, orangotangos e homem). No Gênero *Macaca* a redução do comprimento da cauda ocorreu em vários grupos de espécies durante a evolução. A variação do número de vértebras caudais em regiões proximais ou distais da cauda também é importante para considerar o processo evolutivo. (FOODEN, 1988; DEINARD e SMITH,2001).

Foi observado que o comprimento da cauda em *M. mulatta* varia ligeiramente com a origem geográfica, sendo o comprimento mais curto da cauda o principal fator que diferencia o rhesus chinês (FOODEN, 2000). Fêmeas de macacos rhesus cativas de origem Tailândesa foram 10-20% menores em tamanho corporal, mas com maior comprimento relativo da cauda do que das fêmeas de origem chinesa ou indiana (HAMADA *et al*, 2005).

Em *M. mulatta* existe descrição de variabilidade numérica de vértebras na coluna vertebral sem referências as vértebras caudais (CERRONI, 2000; OHLSSON *et al*, 2017). Os poucos relatos sobre as vértebras caudais na espécie, tem gerado divergência com relação a sua composição em *M. mulatta*. Uma das razões é que existem poucos estudos de esqueletos com vértebras caudais completas. As brigas entre animais também afetam frequentemente a ponta das caudas resultando na perda das vértebras distais que são as mais numerosas e menores e podem ser facilmente perdidas (TOJIMA, 2014). O histórico e o exame clínico do grupo estudado, permitiu descartar os animais que haviam se envolvido com brigas que pudessem comprometer o comprimento da cauda. A montagem do esqueleto de um animal padrão (Figura 16) permitiu a visualização das vértebras e auxiliou na contagem e identificação nas radiografias.

Sullivan (1933) baseando-se no estudo de apenas dois animais descreveu como cerca de 20 o número de vértebras caudais em *Macaca mulatta*. Entretanto, analisando 92 espécimes, Schultz e Straus (1945) descreveram entre 13 a 20

vértebras caudais para a espécie. Wakamori e Hamada (2019) contabilizaram as vértebras caudais de esqueletos de *Macaca mulatta* preservados em coleções do Instituto de Pesquisa de Primatas da Universidade de Kyoto (Japão) e do Centro de Primatas do Japão. Foram analisados sete espécimes originários do leste asiático com número médio de 16 vértebras caudais e 10 animais do Oeste, com média de 17 vértebras caudais. Os animais mantidos no criatório científico do ICTB/Fiocruz são originários da Índia, portanto da região do oeste asiático. Os animais com tamanho de cauda padrão apresentaram um número médio de 18 vértebras caudais em acordo com a literatura. Entretanto, o grupo de animais que apresentou redução no tamanho da cauda tem, em média, 8,5 vértebras caudais, muito abaixo do número padrão. Segundo Wakamori e Hamada (2019), as vértebras caudais distais possuem maior variação de número e comprimento que as proximais nas diferentes linhagens de macaco rhesus. Nos animais com *Brachyury* do ICTB/FIOCRUZ, observamos através de imagens radiográficas (Figuras 13,14 e 15) que os números de vértebras caudais proximais variam de 4 a 5 não representando divergência com os dados da literatura para os animais com cauda padrão. As vértebras caudais transitórias variaram de 1 a 3, também não representando divergência significativa. Entretanto, o número de vértebras distais apresentou uma redução dramática. Alguns animais apresentaram apenas 1 vértebra caudal distal enquanto outros apresentaram 5 (Tabela 1), diferente do padrão descrito para animais normais com 8 a 12 vértebras caudais distais (RUSSO, 2015; WAKAMORI E HAMADA 2019). Portanto, a redução do tamanho da cauda está estreitamente relacionada a redução do número de vértebras distais nos primatas com *Brachyury*. Os animais mais jovens apresentaram o menor número de vértebras caudais distais e tamanho de cauda em relação a idade, sugerindo que a característica de origem genética estava se manifestando de forma a reduzir a cauda progressivamente a cada geração.

O tamanho da cauda dos animais *Brachyury* variou de acordo com a vértebra que estava ausente. As vértebras proximais apresentam o maior tamanho entre as caudais e, quando todas as vértebras proximais estavam presentes, os animais *Brachyury* apresentavam caudas relativamente mais longas. Embora com apenas quatro vértebras proximais, o macho AB47 apresentou a cauda de maior tamanho em cm entre os *Brachyury*. Essa alteração tem relação com o tamanho de suas vértebras caudais presentes.

A expressividade da característica *Brachyury* se manifestou variada, apresentando diferentes comprimentos da cauda nos animais afetados. A cada geração o encurtamento da cauda foi mais acentuado com a diminuição do seu comprimento total em centímetros. É possível que a penetrância da característica seja completa, com a total manifestação quando em heterozigose.

Ainda que os primatas utilizem da cauda para realizar funções sociais, comunicação, termorregulação, dominância e equilíbrio (WILSON, 1972; HICKMAN, 1979, FOODEN E ALBRECHT, 1999; MAESTRIPIERI, 2005; SCHMITT *et al.*, 2005) a característica *Brachyury* não atrapalhou os macacos rhesus de manifestar características comportamentais uma vez que utilizam ainda outros artifícios como a vocalização e expressões faciais para interagir com o grupo familiar (PARR e HEINTZ, 2009). A movimentação da cauda e sua elevação para nos animais afetados sugere que não houve comprometimento na demonstração de dominância (Figura 17). Por serem espécies de ambiente terrestre (RUSSO e SHAPIRO, 2011) a cauda mais curta não teve influência no equilíbrio.

O estudo de ratos-veadeiro com aumento no comprimento da cauda demonstrou que alguns animais apresentaram aumento no número de vértebras e outros apresentavam alongamento das vértebras caudais (KINGSLEY *et al.*, 2017). O ambiente teria favorecido alelos que afetam *loci* genéticos distintos, isto é, mutações que aumentariam o número de vértebras e mutações que alongariam as vértebras. Apesar dos mecanismos genéticos diferentes, ambas as características contribuíram para o aumento do comprimento da cauda nestes animais. Em *Macaca mulatta* com a cauda curta em nosso estudo, foi possível determinar uma redução drástica das vértebras caudais distais não tendo sido observado o encurtamento das vértebras. Entretanto, o maior aumento da cauda do animal AB47 parece ter relação com o alongamento das vértebras caudais proximais (Tabela 2).

Nos grupos em reprodução a paternidade é presumida pelo macho alfa. Entretanto, os machos jovens alcançam a idade reprodutiva enquanto permanecem no grupo e tem oportunidade se acasalarem. Portanto, para avaliação real do fluxo gênico das características em estudo e para programas reprodutivos, é necessário o teste molecular de paternidade (ANDRADE *et al.*, 2004). O uso de microssatélites para determinar a paternidade e a montagem do heredograma da família são fundamentais para compreender a origem e a distribuição da característica no grupo familiar. Com o objetivo de implantar o teste de paternidade molecular nas colônias do ICTB, foi

desenvolvido um protocolo inicial com utilização de 4 *primers* e padronização da técnica de amplificação.

A extração do DNA foi feita com o sangue total recém coletado da veia femoral dos animais ou de coágulos sanguíneos de amostras previamente coletadas durante o ano de 2018 e armazenados em freezer – 70C^o e processados de acordo com o protocolo estabelecido para extrações com sangue total pela empresa QIAamp[®]. O resultado da extração foi visualizado em gel de agarose a 0,8% e se mostrou eficiente e com bandas nítidas mesmo utilizando apenas coágulos em todos os procedimentos. Dos 4 *primers* selecionados para a paternidade foram determinados de acordo com a literatura recente e que se repetiam em outros trabalhos (NURNBERG, *et al* 1998; HAYAKAWA, 2008 e XU *et al*, 2013). O PCR e a temperatura ideal de anelamento de cada um dos quatro *primers* foi estabelecida com base na literatura e estava de acordo com a faixa 50 a 60 °C determinada por Xu *et al* (2013). O resultado do teste foi visualizado em gel de agarose a 1,5%, como sugerido por Nurnberg *et al* (1998). Contudo, a visualização por gel de agarose se mostrou confusa, com diferenciação entre as bandas bastante sutil pelo fato de os microssatélites apresentarem número de pares de bases próximos (Aproximadamente entre 100 e 200 PB). Os quatro *primers* testados foram escolhidos do trabalho de Xu *et al* (2013) por apresentarem alta taxa de polimorfismo (de 0.5161 a 0.9500). Neste trabalho Xu *et al* (2013) relataram que seis microssatélites seriam suficientes para confirmação da paternidade quando analisados por bioinformática. Os quatro *primers* selecionados estavam entre estes, mas não foram suficientes para confirmar a paternidade pela visualização em gel. Para uma melhor observação dos resultados, seria recomendado o uso de *softwares* (NURNBERG *et al* 1998, ELY *et al* 1999, HAYAKAWA 2008 e XU *et al* 2013).

A construção do heredograma (Figura 8) a partir dos dados de parentesco registrados nas fichas dos animais sugere modo dominante de herança da *Brachyury* uma vez que aparece em todas as gerações e foi primeiramente registrada no animal U28. Até onde se tem registro, a característica foi difundida após o animal AB47 *Brachyury* ser utilizado como reprodutor neste grupo familiar. O fato deste macho ter uma irmã também afetada (AC54 *Brachyury*) indica que a característica foi herdada de um ancestral comum. A partir de cruzamentos com este macho reprodutor muitos de seus descendentes manifestaram a característica. Alguns animais portadores da *Brachyury* são filhos de acasalamentos de animais com cauda padrão, sugerindo

neste caso paternidade duvidosa. A partir do procedimento de vasectomia do macho reprodutor AB47 *Brachyury* com finalidade de evitar a superlotação, os filhotes nascidos não apresentaram mais a característica *Brachyury*. O fato reafirma a hipótese de a característica ter sido herdada deste macho alfa da colônia. Não foram vasectomizados machos jovens *Brachyury*, o que permite que esta característica seja selecionada em estudo futuro para formação de um grupo de animais e seus possíveis conceitos portadores de anomalias no gene TBXT.

A *Brachyury* em camundongos é uma condição dominante que é letal no estado de homozigose e apresenta deformidades nas vértebras caudais quando em heretozigose (DEOL, 1961 e GRUNEBERG 1963). O comprimento da cauda é proporcional ao número de vértebras caudais. Caudas encurtadas em gatos Manx também sugerem um padrão autossômico dominante (HOWELL e SIEGEL 1963; TODD 1964) e as ninhadas do cruzamento entre pais de cauda curta resultam no tamanho da cauda de toda a prole também curta. A homozigose igualmente ao camundongo leva a letalidade embrionária em gatos (DEFOREST e BASRUR, 1979). Da mesma forma, algumas fêmeas do grupo estudado apresentaram histórico de falhas reprodutivas sem nascimento de filhotes, o que pode estar relacionado a mortalidade embrionária. Como nas demais espécies com *Brachyury* não há relato de anomalias cromossômicas. A análise dos cromossomos por método convencional deste grupo familiar portador da *Brachyury* descartou alterações numéricas ou estruturais grosseiras nos cromossomos que poderiam acarretar em alterações na morfologia da cauda (Figura 9).

Wu *et al*, 2010 afirmam que uma mutação de base no gene TBXT leva a um erro importante de *splicing* durante a transcrição do RNAm no camundongo de cauda curta. Ou seja, ocorre um erro durante a formação do RNAm funcional na remoção de *íntrons* (seguimentos sem participação na produção de proteínas) e junção dos *éxons* (seguimentos com informações para produção de proteínas). As evidências encontradas por Silva *et al* (2018), de que uma mutação no gene TBXT do cão da raça labrador é o responsável pelo encurtamento da cauda sugerem que a *Brachyury* nos primatas possa ter a mesma etiologia. Nos *M. mulatta* *Brachyury* do grupo estudado a característica se apresentou isolada, sem envolvimento de outras anormalidades identificadas externamente, um estudo mais detalhado ultrassonográfico ou de necropsia seria necessário para descartar tais alterações internas. Diferentemente no homem, as mutações relacionadas ao gene TBXT

causam distúrbios no desenvolvimento e câncer (WU *et al* 2010). Não foi possível avaliar a mutação no gene TBXT no grupo estudado, porém torna-se indicativo para estudo da etiologia desta característica.

É possível que a homozigose da colônia esteja em um nível alto devido ao longo tempo de cruzamentos consanguíneos. Uma heterozigosidade média de 0,77, baseada em 15 microssatélites, em um grupo de macacos rhesus é considerado um alto nível (SMITH *et al.* 2000). Andrade *et al* (2004) encontrou, uma heterozigosidade média de 0,64 nos macacos rhesus adultos da colônia do ICTB/Fiocruz. Como já se passou mais de uma década do estudo inicial de Andrade e colaboradores é importante que seja repetido no futuro o teste para medir o grau de variabilidade genética. Como a *Brachyury* em homozigose leva a mortalidade embrionária em outras espécies, acredita-se que o mesmo possa ocorrer nos primatas. Uma alta taxa de homozigose levaria este grupo familiar a uma redução populacional drástica.

Existem relatos na literatura de biomodelos animais para o estudo das características que afetam o grupo de T-Box (JEROME E PAPAIOANNOU, 2001; PIOTROWSKI *et al* ,2003; BRUNEAU *et al.*,1999 e PACKHAM E BROOK, 2002), contudo, o uso de um biomodelo primata não humano ainda não foi relatado. O fato destes animais serem filogeneticamente próximos ao homem e as mutações no gene TBXT estarem relacionadas a doenças humanas, a seleção desta característica em *M. mulatta* pode se constituir um valioso biomodelo.

9 CONCLUSÕES:

Com base nos resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

- Pela primeira vez a *Brachyury* é relatada em primatas não humanos;
- No grupo familiar estudado a *Brachyury* teve origem registrada a partir de uma fêmea e um macho reprodutor em dois eventos separados;
- A *Brachyury* se transmite de forma autossômica dominante e em ambos os sexos em *M. mulatta*, evidenciada após análise do heredograma;
- A *Brachyury* não está relacionada com anomalias numéricas ou estruturais dos cromossomos;
- A amplificação e análise de quatro *primers* de microssatélites de DNA (D1S207, D17S791, D13S159 e D14S306) com visualização em gel de agarose 1,5% não é suficiente para determinação da paternidade em *M. mulatta*;
- A expressividade da característica *Brachyury* é variada apresentando diferentes comprimentos da cauda nos animais afetados;
- A cada geração, o encurtamento da cauda se manifesta de forma mais acentuada;
- A característica *Brachyury* descrita para o grupo de *M. mulatta* estudado demonstra o mesmo padrão das outras espécies que apresentaram a redução do tamanho da cauda pela diminuição do número de vértebras;
- Nos *M. mulatta Brachyury* estudados, a redução do tamanho da cauda se dá pela diminuição drástica do número de vértebras caudais distais e se manifestou de forma isolada sem associação com outras alterações;

10 - PERSPECTIVAS

O resultado desta dissertação será publicado para divulgação em uma revista de circulação científica.

Aprimorar a técnica de paternidade para implementação do teste como rotina e avaliação da variabilidade genética da colônia de primatas não humanos do ICTB.

Possivelmente a *Brachyury* seja decorrente de mutação no gene TBXT uma vez que se comporta da mesma forma que em outras espécies com a mutação detectada neste gene e torna-se uma perspectiva futura o desenvolvimento de estudo do T-box de *M. mulatta* portador da *Brachyury* para sequenciamento do gene TBXT em possível doutorado.

Entrar em contato com pesquisadores de doenças humanas interessados em estudar o modelo *M. mulatta Brachyury*.

Manter um grupo formado por indivíduos portadores da característica *Brachyury* e com provável alteração no gene TBXT é uma oportunidade única para estudos em um biomodelo com similaridade próxima ao homem, sendo ideal para aprofundar o conhecimento dos fatores envolvidos com o câncer e síndromes de desenvolvimento que envolvam o grupo de genes T-box no homem.

11-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO-WHITEHOUSE, K; GULLAND, F; GRIEG, D; AMOS, W. Inbreeding: disease susceptibility in California sea lions. **Nature**, Reino Unido, 422:35. 2003.

ALTMANN, S. A. e ALTMANN J. Demographic constraints on behavior and social organization. In: **Primate Ecology and Human Origins**. Bernstein I. e Smith E.O. (eds.), Garland, New York, pp. 47–64, 1979.

AMOS, W.; WORTHINGTON WILMER, J.; FULLARD, K.; BURG, T. M.; CROXALL, J. P. e BLOCH, D. The influence of parental relatedness on reproductive success. Proceedings of the Royal Society of London B. **Biological Sciences**, 268:2021-2027. 2001.

ANDRADE, M C.; PENEDO, M.C.T.; WARD, T.; SILVA, V.F.; BERTOLINI, L.R.; ROBERTS, J.A.; LEITE, J.P.G.; CABELLO, P.H. Determination of genetic status in a closed colony of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Primates**, 45:183–186.2004.

ANDRADE, A.; ANDRADE, M.C.R.; MARINHO, A.D.A.M. e FILHO, J.F. **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica**. Editora Fiocruz, 1 ed, 2010.

ANKEL-SIMONS, F. Postcranial Skeleton. In: **Primate Anatomy An Introduction**. 3 ed, Academic Press,298-300, 2007.

AKIMOTO, N; NAKAMURA, K; HIJIOKA, H; KUME, K; MATSUMURA, Y e SUGIURA, T. Transfection of T-Box Transcription Factor BRACHYURY and SOX2 Synergistically Promote Self-Renewal and Invasive Phenotype in Oral Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**. 2018.

BARR, C.S.; SCHWANDT, M.L.; NEWMAN, T.K.; e HIGLEY, J.D. The use of adolescent nonhuman primates to model human alcohol intake: neurobiological, genetic, and psychological variables. **Annals of the New York Academy of Sciences**,1021: 221– 233. 2004.

BOLLAG, R.J.; SIEGFRIED, Z.; CEBRA-THOMAS, J. A.; GARVEY, N.; DAVISON, E. M.; & SILVER, L. M. An ancient family of embryonically expressed mouse genes sharing a conserved protein motif with the T locus. **Nature Genetics**, 7: 383–389. 1994.

BRUMBACK, R.A. Fluorescent-banded karyotype of a hybrid macaque. **Journal of Human Evolution**. 1975.

BRUNEAU, B.G.; LOGAN, M.; DAVIS, N.; LEVI, T.; TABIN, C.J.; SEIDMAN, J.G. e SEIDMAN, C.E. Chamber-Specific Cardiac Expression of Tbx5 and Heart Defects in Holt–Oram Syndrome. **Developmental Biology**. 1999.

BUCKINGHAM, K.J.; MCMILLIN, M.J.; BRASSIL, M.M.; SHIVELY, K.M.; MAGNAYE, K.M.; CORTES, A.; WEINMANN, A.S.; LYONS, L.A. e BAMSHAD, M.J. Multiple mutant *T* alleles cause haploinsufficiency of Brachyury and short tails in Manx cats. **Mammalian Genome**; 24: 400–408. 2013.

CERRONI, A.M.; TOMLINSON, G.A.; TURNQUIST, J.E.; GRYNPAS, M.D. Bone mineral density, osteopenia, and osteoporosis in the rhesus macaques of Cayo Santiago. **American Journal of Physical Anthropology**, 113: 389–410. 2000.

CHARPENTIER, M.; HOSSAERT-MCKEY, M.; WICKINGS, E.J. e PEIGNOT, P. "Consequences of a one-male harem reproductive system and inbreeding in a captive group of *Cercopithecus solatus*". **International Journal of Primatology**, vol. 26, no. 3, pp. 697-710. 2005.

CHESLEY, P. Development of the short-tailed mutant in the house mouse. **Journal of Experimental Zoology**, 70: 429–459. 1935.

CHIN, J.; SALOMÉ, P.; CAMACHO, A.; PESSOA, B.; BENTO, D.; AMADO, A.; PEREIRA, J. e JESUS, I. Holt-Oram syndrome: A case report. **Revista Portuguesa de cardiologia**, 33(11): 671-752. 2014.

COLTMAN, D.W.; BOWEN, W.D.; WRIGHT, J.M. Birth weight and neonatal survival of harbour seal pups are positively correlated with genetic variation measured by microsatellites. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. 265: 803–809. 1998.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Resolução Normativa nº 28, de 13 de novembro de 2015. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-28-de-13.11.2015-D.O.U.-de-16.11.2015-Secao-I-Pag.-44.pdf> Acessado em: 06 de junho de 2019.

COULSON, T.N.; ALBON, S.D.; SLATE, J.; PEMBERTON, J.M. Microsatellite loci reveal sexdependent responses to inbreeding and outbreeding in red deer calves. **Evolution**, 53: 1951–1960. 1999.

CURIE-COHEN, M.; YOSHIHARA, D; LUTTRELL, L.M.; BENFORADO, K.; MACCLUER, J; STONE, W. The effect of dominance on mating behavior and paternity in a captive troop of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **American Journal Primatology**, 5:127-138. 1983.

CURI, R. A. e LOPES, C. R. Teste de paternidade em bovinos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.21, p.40-45. 2001.

DEINARD, A. e SMITH, D.G. Phylogenetic relationships among the macaques: evidence from the nuclear locus NRAMP1. **Journal of Human Evolution**, 41: 45–59. 2001.

DEFOREST, M.E. e BASRUR, P.K. Malformations and the Manx syndrome in cats. **Canadian Veterinary Journal**, 20: 304–314.1979.

DEOL, M. S. Genetical studies on the skeleton of the mouse. XXVIII. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 155, 78-95. 1961.

DESROSIERS, R.C. The simian immunodeficiency viruses. **Review of Immunology**, 8: 57– 578. 1990.

DE VRLES, G.F., DE FRANCE, H.F. e SCHEVERS, J.A.M. Identical Giemsa banding patterns of two *Macaca* species: *Macaca mulatta* and *M. fascicularis*. A densitometric study. **Cytogenetics and Cell Genetics**.1975.

DIXSON, A.F. Observations on the displays, menstrual cycles and sexual behaviour of the 'black ape' of Celebes (*Macaca nigra*). **Journal of Zoology**,182: 63–84. 1977.

DOBROVOLSKAIA-ZAVADSKAIA, N. Sur la mortification spontané'e de la queue chez la souris nouveau-ne'e et sure l'existence d'un caracte`re heriditaire 'non-viable'. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales**, 97, 114–116. 1927.

DURVALL, S.W.; BERNSTEIN, I.S.; GORDON, T.P. Paternity and Status in a rhesus monkey Group. **Journal of the Society for Reproduction and Fertility**, 47:25-31. 1976.

DUTRILLAUX, B.; BIEMONT, M.C.; VIÉGAS-PEQUIGNOT, E. e LAUREST, C. Comparison of the karyotypes of four *Cercopithecoidea*: *papio papio*, *Papio anubis*, *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*. **Cytogenetic Cell Genetics**, 23:77-83. 1979.

EDWARDS, Y.H.; PUTT, W.; LEKOAPE, K.M.; STOTT, D.; FOX, M.; HOPKINSON, D.A. e SOWDEN, J. The human homolog T of the mouse T(Brachyury) gene; gene structure, cDNA sequence, and assignment to chromosome 6q27. **Genome Research**, 6(3):226-33. 1996.

ELLERGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, 5:435–445. 2004.

ELY, J.J.; AIVALIOTIS, M.J.; KALMIN B.; MANIS G.S.; VANDEBERG J.L. e STONE W.H. Comparison of Biochemical Polymorphisms and short tandem repeat (STR) DNA Markers for Paternity Testing in Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). **Biochemical Genetics**, Vol 37. 1999.

ESTOP, A.; CARVER, J.J.; e PEARSON, P.L. Further studies on the comparative karyology of the African Green and Rhesus monkeys. **Genetica**, 49: 131-138. 1978.

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

FEEROZ, M.M.; SCHILLACI, M.A.; BEGUM, S.; HASAN, M.K.; AZIZ, M.A.; RABIUL ALAM, S.M.; RAHMAN, S.M.; AKHTAR, F.; ENGEL, G.A. e JONES-ENGEL L. Morphometric Assessment of Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*) from Bangladesh. **Primate Conservation**, 25: 119–125. 2010.

FERNANDO, R.I.; LITZINGER, M.; TRONO, P.; HAMILTON, D.H.; SCHLOM, J.; PALENA, C. The T-box transcription factor *Brachyury* promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. **Journal of Clinical Investigation**, 120: 533–544. 2010.

FINAZ, C; COCHET, C. e DE GROUCHY, J. Identité des caryotypes de *Papio papio* et *Macaca mulatta* en bandes R, G, C at Ag-NOR. **Annales de Génétique**, 21, 149-151. 1978.

FOODEN, J. Taxonomy and evolution of the sinica group of macaques: Interspecific comparisons and synthesis. **Fieldiana Zoology**, 45:1–44. 1988.

FOODEN J. e ALBRECHT G.H. Tail-length evolution in fascicularis-group macaques (*Cercopithecidae: Macaca*). **International Journal of Primatology**, 20: 431–440. 1999.

FOODEN, J. Systematic review of the rhesus macaque, *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780). **Fieldiana Zoology**, 96: 1–180. 2000.

FOODEN J. Comparative review of fascicularis-group species of macaques (*Primates: Macaca*). **Fieldiana Zoology**, 107: 1–43. 2006.

GALLARDO, J.A.; GARCIA, X.; LHORENTE, J.P.; NEIRA, R. Inbreeding and inbreeding depression of female reproductive traits in two populations of Coho salmon selected using BLUP predictors of breeding values. **Aquaculture**, 234:111–122. 2004.

GARCIA, J.F. Biotecnologia da reprodução em bovinos. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA**, Londrina, p.195-201, 2006.

GENBANK. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> Acessado em: 08 de fevereiro de 2019.

GIBBS, R.A.; ROGERS, J.; KATZE, M.G.; BUMGARNER, R.; WEINSTOCK, G.M.; MARDIS, E.R.; REMINGTON, K.A.; STRAUSBERG, R.L.; VENTER, J.C.; WILSON, R.K.; BATZER, M.A.; BUSTAMANTE, C.D.; EICHLER, E.E.; HAHN, M.W.; HARDISON, R.C.; MAKOVA, K.D.; MILLER, W.; MILOSAVLJEVIC, A.; PALERMO, R.E.; SIEPEL, A.; SIKELA, J.M.; ATTAWAY, T.; BELL, S.; BERNARD, K.E.; BUHAY, C.J.; CHANDRABOSE, M.N.; DAO, M.; DAVIS, C; DELEHAUNTY, K.D.; DING, Y.; DINH, H.H.; DUGAN-ROCHA, S.; FULTON, L.A.; GABISI, R.A; LI, Z.; LIU, Y.S.; MOORE, S.M.; MUZNY, D.; NAZARETH, L.V.; NGO, D.N; OKWUONU, G.O.; PAI, G.; PARKER, D.; PAUL, H.A.; PFANNKUCH, C.; POHL, C.S.; ROGERS, Y.H.; RUIZ, S.J.; SABO, A.; SANTIBANEZ, J.; SCHNEIDER, B.W.; SMITH, S.M.; SODERGREN, E.; SVATEK, A.F.; UTTERBACK, T.R.; VATTATHIL, S.; WARREN, W.; WHITE, C.S.; CHINWALLA, A.T.; FENG, Y.; HALPERN, A.L; HILLIER, L.W.; HUANG, X.; MINX, P.; NELSON, J.O.; PEPIN, K.H.; QIN,

X.; SUTTON, G.G.; VENTER, E.; WALENZ, B.P.; WALLIS, J.W.; WORLEY, K.C.; YANG, S.P.; JONES, S.M.; MARRA, M.A.; ROCCHI, M.; SCHEIN, J.E.; BAERTSCH, R.; CLARKE, L.; CSÜRÖS, M.; GLASSCOCK, J.; HARRIS, R.A.; HAVLAK, P.; JACKSON, A.R.; JIANG, H.; LIU, Y.; MESSINA, D.N.; SHEN, Y.; SONG, H.X.; WYLIE, T.; ZHANG, L.; BIRNEY, E.; HAN, K.; KONKEL, M.K.; LEE, J.; SMIT, A.F.; ULLMER, B.; WANG, H.; XING, J.; BURHANS, R.; CHENG, Z.; KARRO, J.E.; MA, J.; RANEY, B.; SHE, X.; COX, M.J.; DEMUTH, J.P.; DUMAS, L.J.; HAN, S.G.; HOPKINS, J.; KARIMPOUR-FARD, A.; KIM, Y.H.; POLLACK, J.R.; VINAR, T.; ADDO-QUAYE, C.; DEGENHARDT, J.; DENBY, A.; HUBISZ, M.J.; INDAP, A.; KOSIOL, C.; LAHN, B.T.; LAWSON, H.A.; MARKLEIN, A.; NIELSEN, R.; VALLENDER, E.J.; CLARK, A.G.; FERGUSON, B.; HERNANDEZ, R.D.; HIRANI, K.; KEHRER-SAWATZKI, H.; KOLB, J.; PATIL, S.; PU, L.L.; REN, Y.; SMITH, D.G.; WHEELER, D.A.; SCHENCK, I.; BALL, E.V.; CHEN, R.; COOPER, D.N.; GIARDINE, B.; HSU, F.; KENT, W.J.; LESK, A.; NELSON, D.L.; O'BRIEN, W.E.; PRÜFER, K.; STENSON, P.D.; WALLACE, J.C.; KE, H.; LIU, X.M.; WANG, P.; XIANG, A.P.; YANG, F.; BARBER, G.P.; HAUSSLER, D.; KAROLCHIK, D.; **KERN**, A.D.; KUHN, R.M.; SMITH, K.E. e ZWIEG, A.S. Evolutionary and Biomedical Insights from the Rhesus Macaque Genome. **Science**, 316: 222 - 234. 2007.

GODAVARTHI, S.; JAYARAMAN, A. e GAUR, A. Cross species amplification of human microsatellite markers in pigtailed and stumptailed macaques. **Journal of Genetics**, vol. 90, pp. 1–4. 2010.

GRUNEBERG, H. **The Pathology of Development**. Blackwell: Oxford, 1963.

GROVES, C.P. **Primate Taxonomy**. Smithsonian Institution Press, Washington DC, 2001.

GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. Washington: National Research Council, National Academic Press, 3 ed. 2011.

HAMADA, Y.; WATANABE, T.; CHATANI, K.; HAYAKAWA, S. e IWAMOTO, M. Morphometric comparison between Indian- and Chinese-derived rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Anthropological Science**, 113: 183–188. 2005.

HAMADA, Y.; YAMAMOTO, A.; KUNIMATSU, Y.; TOJIMA, S.; MOURI, T. e KAWAMOTO, Y. Variability of tail length in hybrids of Japanese macaque (*Macaca fuscata*) and the Taiwanese macaque (*Macaca cyclopis*). **Primates**:1–15. 2012.

HARTMAN, C.G.; STRAUS, W.L.; BAST, T.H. **The anatomy of The rhesus Monkey**. ed. Baltimore, Williams e Wilkins. p- 43-59, 1933.

HAUSS, T.; Betsy, F.; Jeffrey, R.; Gaby, D.; Ulrich, C.; Nicola, J.R; Robert, T; Gerhard, F. W e Christian, R. Genome typing of nonhuman primate models: implications for biomedical research. **Trends in Genetics**. 2014.

HAYAKAWA, S. Male-Female Mating Tactics and Paternity of Wild Japanese Macaques (*Macaca fuscata yakui*). **American Journal Primatology**, 70: 986-989. 2008.

HAYREH, S.S. e JONAS, J.B. Appearance of the optic disk and retinal nerve fiber layer in atherosclerosis and arterial hypertension: an experimental study in rhesus monkeys, **American Journal of Ophthalmology**, 130: 91–96. 2000.

HAWORTH, K.; PUTT, W.; CATTANACH, B.; BREEN, M.; BINNS, M.; LINGAAS, F. e EDWARDS, Y.H. Canine homolog of the T-box transcription factor T; failure of the protein to bind to its DNA target leads to a short-tail phenotype. **Mammalian Genome**, 12: 212–218. 2001.

HENDRICKX, A.G. e BINKERD, P.E. Nonhuman primates and teratological research. **Journal of Medical Primatology**, 19(2): 81-108. 1990.

HERRMANN, B.G.; LABEIT, S.; POUSTKA, A.; KING, T. R. e LEHRACH, H. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. **Nature**, 343, 617–622. 1990.

HICKMAN, G. The mammalian tail: a review of functions. **Mammal Review**, 9:143–157. 1979.

HIGLEY, J.D.; THOMPSON, W.W.; CHAMPOUX, M.; GOLDMAN, D.; HASERT, M.F.; KRAEMER, G.W.; SCANLAN, J.M.; SUOMI, S.J. e LINNOILA M. Paternal and maternal genetic and environmental contributions to cerebrospinal fluid monoamine metabolites in rhesus monkeys. **Archives of General Psychiatry**, 50 ,615– 623. 1993.

HOWELL, J.M. e SIEGEL, P.B. Phenotypic variability of taillessness in Manx cats. **Journal of Heredity**, 54:167–169. 1963.

HYTONEN, M.K.; GRALL, A. e HEDAN, B. Ancestral *T-box* mutation is present in many, but not all, short-tailed dog breeds. **Journal of Heredity**, 100: 236–240. 2009.

INDREBO, A.; LANGELAND, M.; JUUL, H. M.; SKOGMO, H.K.; RENGMARK, A.H. e LINGAAS, F. A study of inherited short tail and taillessness in Pembroke Welsh corgi. **Journal of Small Animal Practice**. 2008.

ISHIDA, H.; KUNIMATSU, Y.; TAKANO, T.; NAKANO, Y. e NAKATSUKASA, M. Nacholapithecus skeleton from the middle Miocene of Kenya. **Journal of Human Evolution**, 46, 67–101. 2004.

JEROME, L.A. e PAPAIOANNOU, V.E. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. **Nature genetics**. 2001.

KAYSER, M.; RITTER, H. e BERCOVITCH, F. Identification of highly polymorphic microsatellites in the rhesus macaque *Macaca mulatta* by crossspecies amplification. **Molecular Ecology**, vol. 5, pp. 157–159. 1996.

KIMURA, K.; KONISHI, M.; TAKAHASHI, Y. e IWAMOTO, S. The skeletal system of *Macaca fascicularis*—description and measurement, Part 3: the vertebrae. **Journal National Medical College**, 11:19–34.1986.

KINGSLEY, E.P.; KOZAK, K. M.; PFEIFER, S. P.; YANG, D. S. e HOEKSTRA, H.E. The ultimate and proximate mechanisms driving the evolution of long tails in forest deer mice. **Evolution**, 71, 261–273. 2017.

KUMAR, S e HEDGES, S.B. A molecular timescale for Vertebrate Evolution. **Nature**, 392, 917. 1998.

LARSON, S.G. e STERN, J.T. Jr. Maintenance of abovebranch balance during primate arboreal quadrupedalism: coordinated use of forearm rotators and tail motion. **American Journal of Physical Anthropology**, 129: 71–81. 2006.

LI, W. H.; TANIMURA, M. e SHARP, P. M. An evaluation of the molecular clock hypothesis using mammalian DNA sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 25: 330-342. 1987.

LING, B.; EAZEY, R.S.; LUCKAY, A.; PENEDO, C.; XU, K.; LIFSON, J.D. E MARX, P.A. SIV (mac) pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans. **AIDS**, 16 1489– 1496. 2002.

LITT, M. e LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44:397–401. 1989.

MAESTRIPIERI, D. **Gestural Communication in three species of macaques (*Macaca mulatta*, *M. nemestrina*, *M. arctoides*)**. John Benjamins Publishing Company. University of Chicago, 2005.

MANDAL, A.; PANT, K.P.; ROUT, P.K.; ROY, R. Effects of inbreeding on lamb survival in a flock of Muzaffarnagari sheep. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 17:594–597. 2004.

MANSON, J. H. Measuring female mate choice in Cayo Santiago rhesus macaques. **Animal Behaviour**, 44: 405–416. 1992.

MCDERMOTT, A.B.; MITCHEN, J. ; PIASKOWSKI, S.; SOUZA, I; YANT, L. J.; STEPHANY, J.; FURLOTT, J. e DAVID I.W. Repeated low-dose mucosal simian immunodeficiency virus SIVmac239 challenge results in the same viral and immunological kinetics as high-dose challenge: a model for the evaluation of vaccine efficacy in nonhuman primates. **Journal of Virology**, 78: 3140– 3144. 2004.

MENEZES, M.P.C.; MARTINEZ, A. M.; RIBEIRO, M. N.; PIMENTA FILHO, E. C.; DELGADO BERMEJO, J. V. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.4, p.1336-1341. 2006.

MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA: aplicações no melhoramento de plantas. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, Ano 1, n.5. 1998.

MOORE, C.M.; LELAND, M.M.; BRZYSKI, R.G.; MCKEAND, J.; WITTE, S.M.; ROGERS, J. A baboon (*Papio hamadryas*) with isochromosome for the long arm of the X. **Cytogenetic and Genome Research**, 82:80–82. 1998.

MOORE, T.; KILLIANY, R. e ROSENE, D. Hypertension-induced changes in monoamine receptors in the prefrontal cortex of rhesus monkeys. **Neuroscience**, vol. 120, pp. 177–189. 2003.

MORIN, P.A.; KANTHASWAMY, S. e SMITH, D.G., Simple sequence repeat (SSR) polymorphisms for colony management and population genetics in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **American Journal of Primatology**, vol. 42, pp. 199–213. 1997.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Nonhuman Primates**. 2. ed., Washington: The National Academies Press, 2003.

NÜRNBERG, P.; SAUERMAN, U.; KAYSER, M.; LANFER, C.; MANZ, E.; WWDDIG, A.; BERARD, J.; BERCOVITCH, F.B.; KESSLER, M.; SCHMIDTKE, J. e KRAWCZAK, M. Paternity Assessment in Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*): Multilocus DNA Fingerprinting and PCR Marker Typing. **American Journal of Primatology**, 44:1–18.1998.

OHLSSON, M.; NIETO, J. H.; CHRISTE, K. L.; VILLABLANCA, P.J. e HAVTON L.A. Radiographic and Magnetic Resonance Imaging Identification of Thoracolumbar Spine Variants with Implications for the Positioning of the Conus Medullaris in Rhesus Macaques. **THE ANATOMICAL RECORD**, 300:300–308. 2017.

ORGAN, J. M. Structure and function of platyrrhine caudal vertebrae. **Anatomical record (Hoboken, N.J.: 2007)**, 293, 730–745. 2010.

OWEN, N. M.; LAWCE, H J. e OLSON S. B. A New Rhesus Macaque Karyotype Based on Human-rhesus Synteny. **The Journal of the Association of Genetic Technologists**, 42 (3). 2016.

PACKHAM, E. A. e BROOK, J. D. T-box genes in human disorders. **Human Molecular Genetics**, 12 (Spec No 1), R37–R44. 2003.

PALENA, C.; POLEV, D.E.; TSANG, K.Y.; FERNANDO, R.I.; LITZINGER, M.; KRUKOVSKAYA, L.L.; BARANOVA, A.V.; KOZLOV, A.P. e SCHLOM, J. The human T-box mesodermal transcription factor Brachyury is a candidate target for T-cell-mediated cancer immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, 13(8):2471–2478. 2007.

PARR, L.A. e HEINTZ M. Facial expression recognition in rhesus monkeys, *Macaca mulatta*. **Animal Behaviour**, 77:1507-1513. 2009.

PIOTROWSKI, T.; AHN, D.; SCHILLING, T.F.; NAIR, S.; RUVINSKY, I.; GEISLER, R.; RAUCH, G.; HAFFTER, P.; ZON, L. I.; ZHOU, Y.; FOOTT, H.; DAWID, I. B. e HO, R. K. The zebrafish van gogh mutation disrupts *tbx1*, which is involved in the DiGeorge deletion syndrome in humans. **Development and disease**. 2003.

PERTICONE, P.; RIOVIONI, M.; PALITTI, F. e DI CHIARA P. Banding patterns of the chromosomes of the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Journal of Human Evolution**. 1974.

PISSINATTI, A. e ANDRADE, M.C.R. CAPÍTULO 1: HISTÓRICO. IN: **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica**. Editora Fiocruz, 2010.

PISSINATTI, A.; GOLDSCHMIDT, B. e DE SOUZA I.V. CAPÍTULO 2: TAXONOMIA. IN: **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica**. Editora Fiocruz, 2010.

POLLARD, R.E; KOEHNE, A.L.; PETERSON, C.B. e LYONS, L.A. Japanese Bobtail: vertebral morphology and genetic characterization of an established cat breed. **Journal of Feline Medicine and Surgery** .Vol. 17(8) 719– 726. 2015.

POSTMA, A.V.; ALDERS, M.; SYLVA, M.; BILARDO, I.C.M.; PAJKRT, E.; VAN, R.I.J.N.R.R.; SCHULTE-MERKER, S.; BULK. S.; STEFANOVIC, S.; ILGUN, A.; BARNETT, P.; MANNENS, M.M.A.M.; MOORMAN, A.F.M.; OOSTRA, R.J. e VAN MAARLE, M.C. Mutations in the T (*brachyury*) gene cause a novel syndrome consisting of sacral agenesis, abnormal ossification of the vertebral bodies and a persistent notochordal canal. **Journal of Medical Genetics**, 51:90–97. 2014.

RASHBASS, P.; COOKE, L.A.; HERRMANN, B.G. e BEDDINGTON, R.S. A cell autonomous function of *Brachyury* in T/T embryonic stem cell chimaeras. **Nature**, 353:348–351.1991.

ROOS, C.; ZIEGLER, T.; HODGES, J.K.; ZISCHLER, H.; ABEGG, C. Molecular phylogeny of Mentawai macaques: taxonomic and biogeographic implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 29:139–150. 2003.

ROGERS, J.; GARCIA, R. e SHELLEDY, W. An initial genetic linkage map of the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) genome using human microsatellite loci. **Genomics**, vol. 1 p, pp. 30–38. 2006.

RUBIO-GODAY, A.; CABALLIN, M. R.; CALDES, M. G. e EGOZCUE, J. Comparative study of the banding patterns of the chromosomes of *Cercopithecoidae*. **Folia Primatologica**, 26: 306-309. 1976.

RUSSO, G.A. e SHAPIRO, L.J. Morphological correlates of tail length in the catarrhine sacrum. **Journal of Human Evolution**, 61:223–232. 2011.

RUSSO, G.A. e YOUNG, J.W. Tail Growth Tracks the Ontogeny of Prehensile Tail Use in Capuchin Monkeys (*Cebus albifrons* and *C. apella*). **American journal of physical anthropology**, 146:465–473. 2011.

RUSSO, G.A. **Functional morphology of mammalian sacra and caudal vertebrae: implications for tail loss and positional behaviors in extinct primates**. Dissertação de doutorado em Filosofia. Universidade do Texas, 2013.

RUSSO, G.A. Postsacral vertebral morphology in relation to tail length among primates and other mammals. **The anatomical record: advances in integrative anatomy and evolutionary biology**, 298p. 2015.

- SCHMITT, D.; ROSE, M.; TURNQUIST, J.E.; e LEMELIN, P. Role of the prehensile tail during ateline locomotion: experimental and osteological evidence. **American Journal of Physical Anthropology**, 126: 435–446. 2005.
- SCHULTZ, A.H e STRAUS, W.L. The numbers of vertebrae in primates. **Proceedings of the American Philosophical Society**, 89: 601– 626. 1945.
- SCHULTE-MERKER, S.; VAN EEDEN, F.; HALPERN, M. E.; KIMMEL, C. B. e NÜSSLEIN-VOLHARD, C. No tail (ntl) is the zebrafish homologue of the mouse T (*Brachyury*) gene. **Development**, 120, 1009-1015. 1994.
- SEDDON, N.; AMOS, W.; MULDER, R.A. e TOBIAS, J.A. Male heterozygosity predicts territory size song structure and reproductive success in a cooperatively breeding bird. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences Royal Society**, 271:1823–1829. 2004.
- SEHNER, S.; FICHTEL, C. e KAPPELER, P.M. Primate tails: Ancestral state reconstruction and determinants of interspecific variation in primate tail length. **O American Journal of Physical Anthropology**, 1–10p. 2018.
- SHAPIRO, L.J. e SIMONS, C. Functional aspects of strepsirrhine lumbar vertebral bodies and spinous processes. **Journal of Human Evolution**, 42:753–783. 2002.
- SHARMA, T. e GARG, G.S. Restrictive localization of centromeric heterochromatin (C-bands) in *Presbytis e. entellus* (Dufresne) as compared to *Macaca mulatta* (Zimmerman). **Journal of Human Evolution**. 1974.
- SILVA D.M.; MIGUEL G.G.P.; SOUZA M.L.; CLEVELAND H.P.K. e RAMOS C.A.N. Malformation of the tail in Labrador Retriever dogs caused by mutation C189G in the T gene. **Small Animals Diseases**. 2018.
- SINHA, A.; DATTA, A.; MADHUSUDAN, M. e MISHRA, C. *Macaca munzala*: a new species from Western Arunachal Pradesh, Northeastern India. **International Journal of Primatology**, 26(4): 977–989. 2005.
- SLATE, J.; KRUIK, L.E.B.; MARSHALL, T.C.; PEMBERTON, J.M. e CLUTTON-BROCK, T.H. Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences Royal Society**, 267: 1657–1662. 2000.
- SMITH, S. Infant cross-fostering in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a procedure for the long-term management of captive populations. **American Journal of Primatology**, 11: 229-237. 1986.
- SMITH, J.C.; PRICE, B.M.; GREEN, J.B.; WEIGEL, D. e HERRMANN, B.G. Expression of a *Xenopus* homolog of *Brachyury* (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. **Cell**, 67(1):79-87. 1991.
- SMITH, D.G.; KANTHASWAMY, S.; VIRAY, R. e CODY, L. Additional highly polymorphic microsatellite (STR) loci for estimating kinship in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **American Journal Primatology**, 50:1–7. 2000.

- SOARES, M.B.M.; ARMADA, J.L.A.; SOARES, V.M.F.C. e SEUÁNEZ, H.N. The *Artocarpus integrifolia* (jackfruit) lectin(s): use and applications in chromosome studies of lymphocyte cultures. **Cytobios.** 1982.
- STRACHAN, T. e READ, A.P. **Genética Molecular Humana.** 2ed. Porto Alegre: Artmed, 576p, 2002.
- STOCK, A.D. e HSU, T.C. Evolutionary conservatism of genetic material. A comparative analysis of chromosomes banding between the rhesus macaque ($2n = 42,84$ arms) and the African green monkey ($2n = 60, 120$ arms). **Chromosoma.** 1973.
- SULLIVAN, W.E. Skeleton and Joints. In: **The Anatomy of The Rhesus Monkey (*macaca mulatta*).** Ed. Hafner Publishing Co Ltd, New issue, 1933.
- TODD, N.B. The Manx factor in domestic cats. A possible genetic basis for expressivity of taillessness and other associated anomalies. **Journal of Heredity,** 55:225–230. 1964.
- TOJIMA, S. Comparative anatomy of caudal musculature attachments between Formosan rock macaques (*Macaca cyclopis*) and rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Primate Research,** 26: 107-113. 2010.
- TOJIMA, S. Variation of the number of proximal caudal vertebrae with tail reduction in Old World monkeys. **Primates,** 55: 509–514. 2014.
- XU, Y. R.; LI, J. H.; ZHU, Y. e SUN, B. H. Development of a Microsatellite Set for Paternity Assignment of Captive Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*) from Anhui Province, China. **Russian Journal of Genetics,** Vol. 49, No. 7, pp. 730–736. 2013.
- WAKAMORI, H. e HAMADA, Y. Skeletal determinants of tail length are different between macaque species groups. **Scientific Reports.** 9:1289. 2019.
- WARD, C.V. Torso morphology and locomotion in Proconsul nyanzae. **American Journal of Physical Anthropology,** 92, 291–328. 1993.
- WEBER, J. L. e MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics,** 44: 388 – 396. 1989.
- WIDDIG, A.; NÜRNBERG, P.; KRAWCZAK, M.; JÜRGEN STREICH, W. e BERCOVITCH F.B. Paternal relatedness and age proximity regulate social relationships among adult female rhesus macaques. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA,** 98(24): 13.769-13.773. 2001.
- WILSON, D.R. Tail reduction in *Macaca*. In: **The functional and evolutionary biology of primates.** Tuttle RH, Aldine-Atherton, Chicago, pp 241–261, 1972.
- WOLFENSOHN, S. e HONESS, P. **Handbook of Primate Husbandry and Welfare.** Blackwell Publishing Ltd. 1 ed, 2005.

WU, B.; SHAO, Y.; CHEN, B.; LIU, C.; XUE, Z.; WU, P. e LI, H. Identification of a novel mouse *brachyury* (T) allele causing a short tail mutation in mice. **Cell Biochemistry and Biophysics**, 58:129–135. 2010.

VIANA C. In: ANDRADE A, ANDRADE M C R, MARINHO A DA M e FILHO J F. **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica**. Cap 6: Manutenção em cativeiro. Editora Fiocruz, 1 ed, 2010.

XU, Q.; LIU, T.; BI, W.; WANG, Y.; XU, H.; TANG, L.; SUN, J. e XU, Z. Different effects of *DEP1* on vascular bundle- and panicle-related traits under *indica* and *japonica* genetic backgrounds. **Molecular Breeding**, 35:173. 2015.

Zhang, L.; Zhong, T.; Wang, Y.; Jiang, Q; Song, H. e Gui, Y. *TBX1*, a DiGeorge syndrome candidate gene is inhibited by retinoic acid. **The International Journal of Developmental Biology**, 50: 55-61, 2006.