Evaluación de la heterocigosidad en *Cebus yuracus* mediante un set de microsatélites

Díaz Antun, Alisson Camila

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Ph.D. Martin Solano Sarah

04 de agosto de 2026

Analysis report
Compilatio Magister+ | ESPE-ECU

TESIS ALI dividri plagio-16-106

ID : fa90a5db7d914a2021efe459e42593f78358837b

<1%
Suspicious texts

File name : TESIS ALI dividri plagio-16-106.txt
Original file size : 1.15 MB
Number of words : 22,105

Submitter : SARAH MARTIN SOLANO
Submission date : July 27, 2026
Upload type : interface
analysis end date : July 27, 2026

Summary (section 1/3)

Location of suspect texts in the document :



Included in the suspicious text score :

Similarities <1%

Passages with similarities to sources found in different collections.



AI detection 15%

Texts with stylistically similar formulations to AI-generated text.
This rate is an indicator, not proof. Check with the author that he/she has mastered the knowledge mentioned in the document.



Unrecognized languages 4%

Passages in which some of the vocabulary used is not part of the language dictionary. This may be an attempt by the author to modify the text to make detection impossible.



Not included in the percentage of suspicious texts :

Texts between quotes <1%

Passages between quotation marks, often revealing a quotation.

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
SARAH MARTIN SOLANO

Ph.D. Martin Solano Sarah

Director/a

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "**Evaluación de la heterocigosidad en *Cebus yuracus* mediante un set de microsatélites**" fue realizado por la señorita **Díaz Antun, Alisson Camila,** el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; habiéndose efectuado una revisión integral de forma y de fondo conforme a los lineamientos y formatos institucionales vigentes. Además, fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 24 de agosto del 2026

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
SARAH MARTIN SOLANO

Ph.D. Martin Solano Sarah

Directora del proyecto de integración curricular

C.C.: 1727221721

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Díaz Antun, Alisson Camila**, con cédula de ciudadanía n° 1721041356, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Evaluación de la heterocigosidad en *Cebus yuracus* mediante un set de microsatélites**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 24 de agosto del 2026

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
ALISSON CAMILA DIAZ ANTUN

Díaz Antun, Alisson Camila

C.C.: 1721041356

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Díaz Antun, Alisson Camila**, con cédula de ciudadanía n° 1721041356, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "**Evaluación de la heterocigosidad en *Cebus yuracus* mediante un set de microsatélites**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 24 de agosto del 2026

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
ALISSON CAMILA DIAZ ANTUN

Díaz Antun, Alisson Camila

C.C.: 1721041356

Dedicatoria

A mis padres, quienes siempre me dejaron soñar y especialmente a esa versión de mí que, con dedicación y resiliencia, logró superar estos años. Que los errores del pasado no definan su presente, sino que le permitan seguir creciendo académicamente y alcanzar muchos sueños en el futuro.

Agradecimiento

A mis padres, gracias por su apoyo a lo largo de estos años. Aunque todavía no comprenden del todo de qué trata mi carrera, siempre se sintieron orgullosos de mí y sin ustedes esto no sería posible. A mis hermanos y, especialmente a mi hermana Tefa, quien me ha visto llorar, rendirme y levantarme. Tu sola presencia me hizo sentirme acompañada durante los días grises. Por la oportunidad de permitirme desarrollar este trabajo, a la PhD. Sarah Martin, gracias por su comprensión, confianza y guía durante este proceso. A la Mgs. Cristina Cholota, por compartir conmigo sus conocimientos durante el desarrollo de este trabajo. A las técnicas Danny, Clau, Fer, Oda que hicieron un poco más ligera la tesis, incluso cuando no siempre sabían cómo ayudarme, gracias por escucharme y ser más que una técnica, unas mentoras.

A los chicos del laboratorio Zahid, Rot, Les, Kevin y Pame, por sacarme una sonrisa en las tardes y porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en cualquier cosa. A mis amigas. Daya, gracias por quedarte y acompañarme durante estos últimos años de la carrera, por tus ocurrencias y la persona genuina que eres. A Majo, a quien tuve la fortuna de conocer mejor este último año de carrera, gracias por tu compañía en los momentos de alegría y también en aquellos de frustración en el laboratorio, los aprecio mucho. Y, por último, a mis gatos cuya presencia durante las noches se convirtió en un pequeño refugio que me devolvía la paz.

Índice de contenidos

Resumen 16

Abstract 17

Capítulo I 18

Introducción 18

Planteamiento del problema 20

Formulación del problema o pregunta de investigación 21

Preguntas de investigación 21

Objetivos 21

Justificación 22

Capítulo II 24

Estado del arte 24

Marco teórico 26

Cebus yuracus: clasificación taxonómica. 28

Características biológicas y ecológicas de *Cebus yuracus* 28

Relación con ambientes intervenidos 30

Estado de conservación 30

Diversidad genética 30

Heterocigosidad como indicador genético 32

Heterocigosidad observada 32

Heterocigosidad esperada 33

Endogamia 34

Microsatélites 35

Amplificación cruzada 37

PCR múltiplex 37
Muestras no invasivas 38
Marco conceptual 38
Capítulo III 40
Metodología 40
Enfoque de investigación 40
Tipo y diseño de investigación 40
Población y muestra 40
Técnica e instrumento 42
Selección de microsatélites 43
Estandarización de PCR dúplex para los microsatélites PEPC40 y PEPC59 44
Optimización de la PCR simplex para los microsatélites D5S111 y AP74 46
Optimización de PCR para el microsatélite D5S111 46
Optimización de PCR para los microsatélites AP74 47
Estandarización de la PCR dúplex para D5S111 y AP74 49
Estandarización de la PCR para el microsatélite CEB07 50
Optimización de la electroforesis en gel de poliacrilamida 52
Estimación del tamaño alélico y genotipado 53
Análisis de heterocigosidad 54
Validación y confiabilidad del instrumento 54
Consideraciones éticas 55
Capítulo IV 56
Análisis y discusión de los resultados 56
Selección del set de primers 56
Optimización de PCR para utilización de microsatélite 58

D5S111 58

Concentración de Magnesio 58

Temperatura de hibridación 60

AP74 62

Concentración de Magnesio 62

Estandarización de la amplificación por PCR dúplex de los microsatélites D5S111 y AP74 63

Evaluación de la concentración de Magnesio 63

Evaluación de la temperatura de hibridación 65

Estandarización de la amplificación por PCR dúplex de los microsatélites PEPC40 y PEPC59 67

Evaluación de la influencia del DMSO 67

Estandarización de la amplificación por PCR del microsatélite CEB07 69

Optimización de la electroforesis en poliacrilamida 70

Evaluación de la amplificación del dúplex AP74 y D5S111 en las muestras de *Cebus yuracus* 72

Evaluación de la amplificación del dúplex PEPC40 y PEPC59 en las muestras de *Cebus yuracus* 74

Selección de las colectas para la genotipificación 75

Genotipificación y caracterización de los alelos 77

PCR dúplex PEPC40 y PEPC59 78

PCR dúplex D5S111 y AP74 80

PCR simplex CEB07 82

Frecuencias alélicas 85

Diversidad genética y heterocigosidad..... 90

Equilibrio de Hardy-Weinberg..... 97

Capítulo V..... 100

Conclusiones..... 100

Recomendaciones..... 101

Índice de tablas

Tabla 1 Muestras y ADN genómico de *Cebus yuracus* de dos localidades de la Amazonía 41

Tabla 2 Parámetros y variaciones de la PCR dúplex para el microsatélite PEPC40 y PEPC59 45

Tabla 3 Concentraciones de reactivos para mastermix de la PCR dúplex PEPC40 y PEPC59 45

Tabla 4 Condiciones de la PCR dúplex para los microsatélites PEPC40 y PEPC59..... 45

Tabla 5 Parámetros y variaciones de la PCR para el microsatélite D5S111..... 46

Tabla 6 Concentraciones de reactivos para mastermix de la PCR del microsatélite D5S111 47

Tabla 7 Condiciones de la PCR para el microsatélite D5S111..... 47

Tabla 8 Parámetros y variaciones de la PCR para el microsatélite AP74..... 48

Tabla 9 Concentraciones de reactivos para mastermix de la PCR del microsatélite AP74..... 48

Tabla 10 Condiciones de la PCR para el microsatélite AP74 48

Tabla 11 Parámetros y variaciones de la PCR dúplex de los microsatélites D5S111 y AP74..... 49

Tabla 12 Concentraciones de reactivos para mastermix de la PCR dúplex de los microsatélites D5S111 y AP74 50

Tabla 13 Condiciones de la PCR dúplex para los microsatélites D5S111 y AP74 50

Tabla 14 Concentraciones de reactivos para mastermix de la PCR del microsatélite CEB07..... 51

Tabla 15 Condiciones de la PCR para el microsatélite CEB07 51

Tabla 16 Concentraciones de reactivos para un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 10 % 53

Tabla 17 Microsatélites seleccionados para la evaluación genética de *Cebus yuracus* 56

Tabla 18 Colectas seleccionadas para la genotipificación de los microsatélites..... 76

Tabla 19 Genotipos estimados a partir de la corrida del sistema dúplex PEPC40 y PEPC59 77

Tabla 20 Genotipos estimados a partir de la corrida del sistema dúplex D5S111 y AP74 81

Tabla 21 Genotipos estimados a partir de la PCR para el microsatélite CEB07..... 83

Tabla 22 Frecuencias alélicas entre poblaciones..... 85

Tabla 23 Parámetros de diversidad genética por locus en los grupos poblacionales.... 91

Tabla 24 Prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (χ^2)..... 99

Índice de figuras

Figura 1 Evaluación de la concentración de $MgCl_2$ para la amplificación del microsatélite D5S111 59

Figura 2 Gradiente de temperatura de hibridación para la amplificación del microsatélite D5S111 61

Figura 3 Evaluación de la concentración de $MgCl_2$ para la amplificación del microsatélite AP74 62

Figura 4 Evaluación de la concentración de $MgCl_2$ para la amplificación del sistema dúplex AP74–D5S111 64

Figura 5 Estandarización de la temperatura de hibridación para la amplificación del dúplex AP74–D5S111 66

Figura 6 Comparación de la amplificación del dúplex PEPC40–PEPC59 con y sin DMSO 68

Figura 7 Verificación de las condiciones de amplificación del microsatélite Ceb07 en *Cebus yuracus* 69

Figura 8 Evaluación de la concentración del gel de poliacrilamida no desnaturalizante 70

Figura 9 Evaluación de la amplificación del dúplex AP74–D5S111 en muestras de *Cebus yuracus* 72

Figura 10 Evaluación de la amplificación del dúplex PEPC40 y PEPC59 en muestras de *Cebus yuracus*. 74

Figura 11 Genotipificación del sistema dúplex PEPC40 y PEPC59 en las muestras seleccionadas 78

Figura 12 Genotipificación del sistema dúplex AP74–D5S111 en las muestras seleccionadas 80

Figura 13 Genotipificación del sistema dúplex AP74–D5S111 en las muestras seleccionadas 81

Figura 14 Selección de muestras y genotipificación del microsatélite Ceb07 en *Cebus yuracus*..... 84

Figura 15 Frecuencias alélicas de los cinco microsatélites en los grupos de Misahuallí y el centro de rescate 86

Figura 16 Mapa de calor de la heterocigosidad observada y esperada por locus en los grupos de muestreo Misahuallí y el centro de rescate 97

Resumen

La diversidad genética constituye un componente relevante para el manejo y conservación de especies. El objetivo de esta investigación fue evaluar la heterocigosidad en *Cebus yuracus* mediante un conjunto de cinco microsatélites. Se analizaron 29 muestras fecales no invasivas correspondientes a 20 individuos: 13 de Misahuallí y 7 de un centro de rescate. Los loci PEPC40, PEPC59, AP74, D5S111 y Ceb07 fueron amplificados mediante PCR y posteriormente se separaron en geles de poliacrilamida no desnaturalizante al 10 % y los tamaños alélicos se estimaron mediante comparación con un marcador molecular. Se establecieron las condiciones de los sistemas dúplex AP74–D5S111 y PEPC40–PEPC59, mientras que Ceb07 se analizó mediante una reacción individual. Los parámetros de diversidad genética fueron calculados en GenAlEx a partir de un genotipo por individuo y locus. Los cinco marcadores fueron polimórficos: PEPC59 presentó siete alelos, PEPC40, AP74 y Ceb07 presentaron cinco, y D5S111 presentó cuatro. Misahuallí mostró una heterocigosidad observada promedio de 0,512 y una esperada de 0,723, mientras que, en el centro de rescate, los valores fueron 0,417 y 0,571, respectivamente. La heterocigosidad observada fue menor a la esperada en la mayoría de los loci, aunque AP74 presentó un exceso de heterocigotos en el centro de rescate. En las pruebas de Hardy-Weinberg, los microsatélites PEPC59 y AP74 de Misahuallí y D5S111 en el centro de rescate demostraron señales nominales de desviación. Sin embargo, el tamaño poblacional, la variación en la amplificación y los posibles errores de genotipificación impiden interpretar estos resultados como evidencia directa de endogamia. El estudio generó una primera caracterización de la heterocigosidad de *C. yuracus,* útil como base para investigaciones con mayor número de individuos, marcadores y técnicas de genotipificación de mayor precisión.

Palabras clave: Cebus yuracus, diversidad genética, heterocigosidad, microsatélites, muestras no invasivas.

Abstract

Genetic diversity is an important component of species management and conservation. The objective of this study was to evaluate heterozygosity in *Cebus yuracus* using a set of five microsatellite markers. A total of 29 non-invasive fecal samples corresponding to 20 individuals were analyzed: 13 from Misahuallí and seven from a wildlife rescue center. The PEPC40, PEPC59, AP74, D5S111, and Ceb07 loci were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and the resulting products were subsequently separated using 10 % non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Allele sizes were estimated by comparison with a molecular size marker. Amplification conditions were established for the AP74–D5S111 and PEPC40–PEPC59 duplex systems, whereas Ceb07 was analyzed through an individual PCR reaction. Genetic diversity parameters were calculated using GenAlEx based on one genotype per individual and locus. All five markers were polymorphic: PEPC59 exhibited seven alleles; PEPC40, AP74, and Ceb07 exhibited five alleles each; and D5S111 exhibited four alleles. Misahuallí showed a mean observed heterozygosity of 0.512 and a mean expected heterozygosity of 0.723, whereas the wildlife rescue center showed values of 0.417 and 0.571, respectively. Observed heterozygosity was lower than expected heterozygosity at most loci, although AP74 showed an excess of heterozygotes in the wildlife rescue center. Hardy–Weinberg equilibrium tests showed nominal signals of deviation for PEPC59 and AP74 in Misahuallí and for D5S111 in the wildlife rescue center. However, the limited sample size, variation in amplification success, and potential genotyping errors prevent these results from being interpreted as direct evidence of inbreeding. This study provides the first characterization of heterozygosity in *C. yuracus* and constitutes a useful baseline for future research involving a larger number of individuals, additional markers, and more accurate genotyping techniques.

Keywords: Cebus yuracus, genetic diversity, heterozygosity, microsatellites, non-invasive samples.

Capítulo I

Introducción

Los primates neotropicales son un grupo de mamíferos clave para el mantenimiento de la dinámica ecológica de los bosques tropicales y dado que participan en procesos como la dispersión de semillas (Chapman, 1989), el control poblacional de invertebrados (Reis et al., 2007), la regeneración vegetal y el mantenimiento de la dinámica propia de los bosques húmedos tropicales (Junker et al., 2020; Wehncke et al., 2003). Sin embargo, un número considerable de especies pertenecientes a este grupo se ve expuesto a amenazas que derivan de la pérdida y la fragmentación de su hábitat natural (Michalski & Peres, 2005), así como la cacería (Chapman & Peres, 2001), el tráfico ilegal (Zapata-Ríos, 2001) y la transformación de los ecosistemas naturales, todos estos factores que ponen en peligro la estabilidad de sus poblaciones a largo plazo (De la Torre, 2012; Tirira, 2013).

En este contexto, *Cebus yuracus* es una especie anteriormente incluida dentro del grupo taxonómico de *Cebus albifrons*, es de particular interés para los esfuerzos de conservación en la Amazonía ecuatoriana. Por esa razón, las revisiones taxonómicas y filogenéticas disponibles han evidenciado que este taxón históricamente reconocido bajo la denominación *C. albifrons* incluye en realidad distintos linajes, entre los cuales se encuentra *C. yuracus*, que está distribuido a lo largo de la región amazónica de Ecuador y norte de Perú (Boubli et al., 2012; Ruiz-García et al., 2018). Como consecuencia de esta trayectoria taxonómica, buena parte de la información existente sobre la especie permanece registrada bajo nombres anteriores, lo cual impide integrar los datos ecológicos, poblacionales y genéticos disponibles para *C. yuracus.*

Para poder estimar qué tan viable es una población a largo plazo, resulta importante analizar la diversidad genética. Esta variable es esencial ya que permite determinar cómo pueden responder los individuos de una población ante desafíos como los que hay frente a enfermedades, cambios en el medio ambiente y procesos de aislamiento (Frankham et al.,

2010; Lynn et al., 2015). Entre los parámetros empleados para su evaluación, la heterocigosidad ocupa un lugar central, dado que permite estimar la proporción de individuos que presentan alelos diferentes en un locus determinado. El contraste entre los valores de heterocigosidad observada y esperada permite identificar posibles señales de endogamia, pérdida de variabilidad genética o desequilibrios a nivel poblacional, aspectos relevantes en especies que enfrentan fragmentación del hábitat o que están en condiciones de cautiverio (Lawler, 2018; Solórzano-García et al., 2021).

Los microsatélites son marcadores moleculares ampliamente utilizados en genética de poblaciones (Alcántara, 2007), y se caracterizan porque presentan un alto polimorfismo, herencia codominante y pueden detectar variación genética a nivel individual (Rivero et al., 2008) y en poblaciones (Azren et al., 2019). En primates neotropicales, se han usado estos marcadores para evaluar diversidad genética (Delval et al., 2024), el parentesco (Hoshino et al., 2012), la estructura poblacional (Yasodha et al., 2018) y los posibles efectos de aislamiento (Vieira et al., 2016), y es por eso que son consideradas herramientas útiles para el estudio de conservación.

Lo que se busca es evaluar la heterocigosidad en *Cebus yuracus* mediante un set de microsatélites, con el objetivo de generar información genética básica que ayude a entender la especie y mejorar las estrategias de conservación y manejo en el futuro. El trabajo se estructura en cinco capítulos: el Capítulo I presenta la introducción, el planteamiento y la formulación del problema, los objetivos y la justificación del estudio; el Capítulo II desarrolla el estado del arte y los fundamentos teóricos relacionados con la diversidad genética, la heterocigosidad y el uso de microsatélites en primates; el Capítulo III describe la metodología empleada para la amplificación, la genotipificación y el análisis de heterocigosidad; el Capítulo IV presenta los resultados obtenidos y su respectiva discusión; y, por último, el Capítulo V presenta las conclusiones y recomendaciones derivadas de la investigación.

Planteamiento del problema

En Ecuador, los primates neotropicales son un grupo particularmente vulnerable, pues se enfrentan a amenazas por la pérdida de hábitat (Marsh et al., 2016), la fragmentación del bosque, la presión humana, la cacería y el tráfico ilegal de fauna silvestre (Tirira et al., 2018). Estas condiciones pueden afectar la conectividad entre poblaciones naturales, reducir el flujo genético y favorecer los procesos de aislamiento. Esto aumenta el riesgo de pérdida de diversidad genética a lo largo del tiempo (Allendorf et al., 2010). Aunque algunas especies de capuchinos muestran plasticidad ecológica y pueden adaptarse a ambientes alterados, esta tolerancia no elimina la necesidad de evaluar su estado genético, especialmente en especies sometidas a presiones sobre sus hábitats (Harris & DeGiorgio, 2016; Rylands et al., 2013).

En el caso de *Cebus yuracus,* el problema se agrava por la limitada información genética disponible. Durante años, esta especie se incluyó en el complejo *Cebus albifrons*, un grupo con una historia taxonómica compleja y con poblaciones diferenciadas en su distribución. Estudios filogenéticos recientes han indicado que es necesario reconocer diferentes linajes dentro de este complejo, incluyendo a *C. yuracus* en la Amazonía ecuatoriana y peruana (Ruiz-García et al., 2018). Como resultado, parte de la información previa se encuentra dispersa bajo nombres taxonómicos anteriores, lo que complica determinar el estado genético específico de esta especie (Solórzano-García et al., 2021).

La ausencia de estimaciones de heterocigosidad representa una limitación para comprender su variabilidad genética, y a su vez dificulta el establecimiento de criterios de manejo basados en evidencia molecular (de Groot et al., 2025). Este vacío es especialmente importante en contextos de conservación, rescate o cría en cautiverio, donde con frecuencia se desconoce el origen geográfico de los individuos y su posible relación genética. Sin esta información, resulta difícil evaluar si los individuos analizados presentan niveles adecuados de variabilidad genética o si hay señales de endogamia, reducción de diversidad o diferenciación entre grupos.

Formulación del problema o pregunta de investigación

La información genética disponible sobre Cebus yuracus todavía es limitada, especialmente en relación con la heterocigosidad de individuos en localidades amazónicas. En Misahuallí, los monos capuchinos mantienen contacto frecuente con personas debido a la actividad turística, sin embargo, no se cuenta con una evaluación preliminar de su heterocigosidad mediante marcadores microsatélite. Por ello, se plantea la siguiente pregunta: ¿Cuál es el nivel de heterocigosidad observada y esperada en individuos de *Cebus yuracus* de Misahuallí y un centro de rescate, evaluados mediante un set de microsatélites como aporte preliminar al conocimiento genético de la especie?

Preguntas de investigación

- ¿Qué loci microsatélite permiten obtener amplificaciones claras y perfiles alélicos útiles en individuos de *Cebus yuracus*?
- ¿Cuáles son los tamaños alélicos aproximados identificados en los individuos analizados para cada marcador microsatélite?
- ¿Cuáles son los valores de heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada obtenidos a partir del set de microsatélites empleado?
- ¿Qué información preliminar sobre diversidad genética puede aportar la evaluación de heterocigosidad en individuos de *Cebus yuracus*?

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar la heterocigosidad en *Cebus yuracus* mediante un set de microsatélites

Objetivos específicos:

- Establecer y estandarizar el protocolo de amplificación de microsatélites de *Cebus yuracus* procedentes de material no invasivo
- Calcular los niveles de heterocigosidad observada y esperada en las poblaciones analizadas de *Cebus yuracus*

Justificación

La falta de información genética disponible para *Cebus yuracus es* una limitación para comprender su diversidad y para apoyar decisiones de manejo en esta especie. En primates, conocer la variabilidad genética permite identificar poblaciones o grupos con diversidad reducida, posibles señales de aislamiento y relaciones de parentesco entre individuos (de Groot et al., 2025; De la Torre, 2012). Esta información es útil tanto en poblaciones silvestres como en individuos mantenidos bajo cuidado humano, ya que muchos animales proceden de rescates, decomisos o tráfico ilegal.

En Ecuador, el tráfico de fauna y la extracción de primates del medio natural constituyen problemas relevantes para la conservación. Los primates son unos de los mamíferos más cazados y utilizados como mascotas, especialmente en la Amazonia (Tirira, 2013), lo que incrementa la presencia de individuos en centros de rescate, zoológicos o reservas, donde el manejo reproductivo puede complicarse si no existe información sobre variabilidad genética (Tirira et al., 2018). Por lo tanto, evaluar la heterocigosidad en *C. yuracus* puede aportar datos útiles que eviten cruces entre individuos emparentados y a su vez reducir riesgos asociados a la pérdida de diversidad genética.

Los marcadores moleculares permiten obtener información que no siempre puede obtenerse mediante observación directa. En primates, los microsatélites han sido utilizados para estudiar diversidad genética (Xu et al., 2018), parentesco (Chistiakov et al., 2006), estructura poblacional (Yasodha et al., 2018) y niveles de endogamia (Putman & Carbone, 2014). Esto es importante porque la conducta social o la procedencia declarada de un individuo no siempre refleja su historia genética. En este sentido, el uso de microsatélites permite completar la información ecológica y de manejo con datos moleculares más objetivos.

El uso de microsatélites se justifica desde el punto de vista metodológico. En especies no modelo, desarrollar marcadores propios puede ser costoso y tomar mucho tiempo. Por esta razón, la amplificación cruzada se ha empleado como alternativa para probar cebadores

diseñados en especies cercanas y evaluar si son útiles en una especie objetivo (Gil Saavedra, 2015). Aunque esta estrategia no siempre tiene éxito en todos los loci, permite avanzar en estudios genéticos cuando existe poca información molecular disponible para la especie de interés.

Por otra parte, el empleo de muestras no invasivas representa una ventaja importante en estudios con primates (Tirira & Aguilar, 2025). La obtención de ADN a partir de heces o pelos reduce la necesidad de capturar o manipular directamente a los animales, esto disminuye el estrés y facilita el trabajo con especies silvestres. Inoue (2015) señala que los métodos genéticos no invasivos pueden complementar los censos tradicionales y aportan información sobre individuos, grupos y flujo génico en paisajes fragmentados.

Capítulo II

Estado del arte

Los estudios sobre primates neotropicales han mostrado que este grupo desempeña un papel importante en los bosques tropicales. Sin embargo, también enfrentan presiones crecientes por actividades humanas. Junker et al. (2020) señalan que la conservación de primates está limitada por la falta de evidencia científica suficiente, especialmente en países tropicales con dificultades de financiamiento, infraestructura e investigación local. En Ecuador, De la Torre (2012) indica que las amenazas sobre los primates no han sido completamente documentadas ni comprendidas. Los estudios se han concentrado principalmente en áreas como Yasuní, Cuyabeno (Tirira & Aguilar, 2025), Bilsay y Los Cedros.

La pérdida del hábitat, la fragmentación del bosque, la cacería y el comercio ilegal son amenazas comunes para los primates en Ecuador y otros países neotropicales. Marsh et al. (2016) analizaron los efectos de la fragmentación sobre *Ateles hybridus, Alouatta seniculus* y *Cebus albifrons*, evidenciaron que las respuestas pueden variar entre especies dependiendo de su dieta, movilidad y capacidad de usar ambientes alterados. Este tipo de estudios demuestra que algunos capuchinos pueden persistir en paisajes modificados, aunque esto no significa dejar de evaluar otros aspectos de su conservación como la diversidad genética.

Ruiz-García et al. (2018) mencionan que *Cebus albifrons* presenta una sistemática intraespecífica confusa, con poblaciones fragmentadas y aisladas a lo largo de su distribución, sobre todo en Colombia y Ecuador. Hershkovitz (1949) reconoció trece subespecies *de Cebus albifrons*, Rylands et al. (2000) propusieron diez, Groves (2005) redujo el número a seis y de Silva (2001) no reconoció subespecies dentro de *Cebus albifrons*

En Ecuador, varios autores han reconocido históricamente dos formas principales dentro del antiguo complejo *Cebus albifrons, a C. a. aequatorialis,* en la región occidental, y *C. a. yuracus*, en la Amazonía ecuatoriana. Investigaciones posteriores han sugerido considerar a

C. aequatorialis y *C. yuracus* como especies válidas, aunque estudios mitocondriales previos no resolvieron completamente la sistemática del grupo en Ecuador (Boubli et al., 2012; Ruiz-García et al., 2007). Los registros sobre biología y distribución de los capuchinos de frente blanca han proporcionado información ecológica importante, pero no siempre separan claramente a *Cebus yuracus* del antiguo concepto de *Cebus albifrons* o no recibe la misma atención de investigación que *C. aequatorialis*. Harris et al. (2008) describen a los capuchinos del género Cebus como primates medianos, sociales, arborícolas y omnívoros capaces de consumir frutos, semillas y pequeños vertebrados. Estos antecedentes ayudan a comprender la flexibilidad ecológica del grupo, aunque no abordan directamente preguntas sobre la variabilidad genética en poblaciones locales.

Los estudios genéticos en primates han ampliado la comprensión de procesos que no siempre se pueden observar de forma directa. Lawler (2018) y Solórzano-García et al. (2021) muestran que la diversidad genética, la heterocigosidad y la estructura poblacional pueden ofrecer información útil sobre la endogamia, el aislamiento y la conservación (Solórzano-García et al., 2021). Hay que destacar que la modificación y fragmentación del hábitat pueden reducir la variación genética, aumentar la estructura poblacional y disminuir el tamaño efectivo de las poblaciones naturales. Los microsatélites son usados por su capacidad para detectar variación entre individuos. Putman y Carbone (2014) indican que estos marcadores, también llamados SSR o STR, son secuencias cortas repetidas en tándem que se distribuyen ampliamente en genomas eucariotas. Sin embargo, los autores también advierten que su interpretación necesita cautela debido a problemas como homoplasia, alelos nulos y errores de genotipado.

En primates neotropicales, varios estudios han probado microsatélites en especies cercanas a *Cebus yuracus.* Escobar-Páramo (2000) por ejemplo caracterizó microsatélites en *Cebus apella* y *Lagothrix lagotricha,* y evaluó su uso en otros primates neotropicales, mostrando el potencial de estos marcadores para estudios de estructura poblacional y parentesco, mientras que Muniz y Vigilant (2008) aislaron microsatélites polimórficos en *Cebus*

capucinus y los probaron en otros primates del Nuevo Mundo. Cortés-Ortiz et al. (2010) evaluaron loci microsatélites en *Alouatta* y otros primates neotropicales mediante amplificación cruzada.

La amplificación cruzada ha sido útil cuando no hay marcadores diseñados específicamente para una especie. Gil Saavedra (2015) evaluó microsatélites desarrollados para *Anadara tuberculosa* en *Anadara similis.* Encontró que cinco de veinticuatro loci amplificaron de forma consistente y fueron polimórficos. Aunque este estudio no se refiere a primates, su aporte metodológico es relevante porque demuestra cómo los marcadores diseñados para una especie cercana pueden probarse inicial y eficazmente en otra especie con poca información genética.

La información específica sobre heterocigosidad en individuos libres de Cebus yuracus sigue siendo nula. Este vacío permite situar la presente investigación como una evaluación preliminar de la heterocigosidad mediante un conjunto de microsatélites. El objetivo es aportar datos moleculares iniciales de una especie amazónica poco estudiada desde este enfoque.

Marco teórico

Los primates neotropicales son aquellos que se encuentran distribuidos en América Tropical y son parte de la rica diversidad biológica de los bosques del continente. Este grupo incluye especies con diversos tamaños, dietas, formas de moverse y estructuras sociales. Su importancia ecológica está ligada a procesos como la dispersión de semillas (Rylands et al., 2013; Tirira et al., 2018), el consumo de frutas, la regulación de invertebrados y la regeneración de plantas en ecosistemas tropicales (Garber & Estrada, 2009). En particular, los capuchinos pueden actuar como dispersores eficaces debido a su comportamiento alimenticio y a su capacidad de transportar semillas lejos del árbol de origen (Wehncke et al., 2003).

La pérdida del bosque, la fragmentación, la cacería, el comercio ilegal y la transmisión de enfermedades son amenazas significativas para varias especies de primates. Estrada et al. (2017) informaron que una parte considerable de los primates neotropicales enfrenta algún

nivel de amenaza, aunque esta región ha recibido menos atención científica que África y Asia. Esta falta de atención muestra la necesidad de crear información precisa sobre especies y subespecies neotropicales, sobre todo en países megadiversos como Ecuador (Cervera et al., 2018).

En Ecuador, los primates son parte de la variada fauna de mamíferos del país y viven principalmente en los bosques tropicales de la Costa, la Amazonía y las laderas andinas, esto incluye áreas como Yasuní y Cuyabeno que han sido estudiadas con mayor frecuencia (Ruiz-García et al., 2021), mientras que otras zonas amazónicas aún carecen de información significativa (Tirira & Aguilar, 2025). Los autores Orellana-Vásquez y Gavilanez (2023) mencionan que el conocimiento sobre la diversidad no es uniforme en todo el Ecuador ya que existen regiones con muchos registros y otras con poco interés científico. Esta falta de información limita la comprensión del estado real de las poblaciones y complica la planificación de estrategias de conservación.

Las amenazas que enfrentan los primates en nuestro país están ligadas a la transformación del paisaje, la expansión agrícola, la colonización, la deforestación y la presión humana que han reducido los hábitats en varias áreas del Ecuador (De la Torre, 2012; Tirira, 2013). La cacería, especialmente en regiones donde los bosques amazónicos son una fuente de alimento para las comunidades locales (Zapata-Ríos, 2001), ha sido reportada en algunas zonas amazónicas. El comercio ilegal de fauna es un problema visible ya que tanto primates como otros animales silvestres se venden, consumen o se mantienen como mascotas (Tirira & Aguilar, 2025).

Algunos primates, como *Ateles belzebuth* y *Lagothrix lagothricha,* dependen en gran medida de bosques primarios lejos de la acción humana. Por lo tanto, suelen ser más sensibles a la pérdida de hábitat y la cacería (Aquino et al., 2012). Otras especies más pequeñas pueden habitar bosques secundarios o áreas intervenidas, pero esto no significa que estén a salvo de

riesgos (Tirira & Aguilar, 2025). Esta diferencia es importante porque la presencia de primates en ambientes alterados no siempre indica estabilidad poblacional.

Cebus yuracus: clasificación taxonómica.

Cebus yuracus es un primate neotropical del Reino Animalia, filo Chordata, clase Mammalia, orden Primates, familia Cebidae y género *Cebus*. En el Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador se registra como una especie monotípica para el país, por lo tanto, no se reconocen subespecies dentro de la población ecuatoriana. Comúnmente se le conoce como capuchino de frente blanca de Humboldt, capuchino blanco del Marañón, machín blanco de Oriente. También se han mencionado bajo los nombres de *Cebus albifrons, Cebus albifrons yuracus, Cebus albifrons cuscinus y Cebus cuscinus* (Álvarez-Solas et al., 2022).

La presencia de estos nombres previos muestra que *C. yuracus* no siempre se consideró una especie independiente y que durante varios años, fue visto como una subespecie o una forma dentro del complejo *Cebus albifrons*. En una de las primeras revisiones sobre este grupo, Hershkovitz (1949) reconoció varias subespecies de *C. albifrons*, incluyendo algunas asociadas a Ecuador. Más tarde, Rylands et al. (2013) propusieron dividir este complejo en varias especies, reconociendo a *Cebus aequatorialis* y *Cebus yuracus* como los taxones presentes en Ecuador. Esta discusión sobre la clasificación no solo se basa en diferencias en la forma o la distribución, sino también en la evidencia genética disponible. Los análisis moleculares han mostrado que el antiguo complejo *C. albifrons* tiene una estructura genética más compleja de lo que las clasificaciones tradicionales sugerían. Ruiz-García et al. (2018) identificaron varios haplogrupos en Ecuador y señalaron que la clasificación basada únicamente en criterios morfológicos o geográficos no explica del todo la variabilidad genética observada en los capuchinos ecuatorianos.

Características biológicas y ecológicas de *Cebus yuracus*

Cebus yuracus pertenece a la familia Cebidae, que incluye a los monos ardilla y a los capuchinos. Dentro de esta familia se ubica en el género *Cebus* que corresponde a los

capuchinos gráciles o sin mechones, se diferencian de los capuchinos robustos del género *Sapajus* por su constitución corporal más delgada y menor robustez craneal (Delval et al., 2024; A. Rylands et al., 2013). Durante varios años fue considerado una subespecie de *Cebus albifrons* bajo el nombre *C. a. yuracus,* pero las revisiones morfológicas y moleculares posteriores mostraron que la diversidad del grupo es más compleja de lo que indicaban las clasificaciones tradicionales (Ruiz-García et al., 2018).

Morfológicamente, es un primate de tamaño mediano, cola larga, pelaje de tonalidades marrones u ocres y una región frontal más clara. Su distribución se relaciona principalmente con los bosques húmedos de la Amazonía ecuatoriana y peruana. También puede ocupar bosques secundarios y áreas con cierto grado de intervención, debido a su capacidad para desplazarse y aprovechar distintos recursos (J. B. C. Harris et al., 2008; A. Rylands et al., 2013).

La especie presenta hábitos diurnos, principalmente arbóreos y sociales. Los individuos forman grupos mixtos con interacciones frecuentes y jerarquías internas. En los capuchinos del género *Cebus* se ha descrito que las hembras suelen permanecer en su grupo natal, mientras que los machos pueden desplazarse hacia otros grupos al alcanzar la madurez (Fragaszy et al., 2004). Este patrón de dispersión puede favorecer el intercambio genético entre grupos siempre que exista conectividad entre las áreas de bosque.

Su alimentación es omnívora e incluye frutos, semillas, insectos, artrópodos y pequeños vertebrados. Además, la destreza de sus manos le permite manipular frutos, ramas, cortezas y cavidades durante la búsqueda de alimento (A. Rylands et al., 2013; Tirira et al., 2018). En conjunto, estas características muestran que *C. yuracus* posee cierta flexibilidad ecológica; aun así, la fragmentación del hábitat puede limitar sus desplazamientos y el contacto entre grupos, con posibles efectos sobre su diversidad genética.

Relación con ambientes intervenidos

Los capuchinos pueden habitar ambientes con cierto grado de intervención humana, siempre que exista la suficiente disponibilidad de recursos y cobertura vegetal. Esta capacidad de adaptación no significa que no enfrenten riesgos, ya que la fragmentación, la cacería y el contacto con asentamientos humanos pueden alterar su comportamiento y afectar los establecimientos de los grupos (Quintana Junco, 2019). En el puerto Misahuallí, los capuchinos de frente blanca se han acostumbrado a la presencia humana y pueden entrar a calles y viviendas, tiendas o vehículos en busca de comida u objetos. Esta situación convierte a Misahuallí en un lugar particular para estudiar individuos libres que tienen contacto frecuente con actividades turísticas (Smith, 2010).

Estado de conservación

El estado de conservación varía según la escala de evaluación. En la Lista Roja de la UICN, la especie se considera casi amenazada, como una tendencia poblacional en declive, esta amenaza está relacionada con una pérdida de bosque y la cacería. En esta evaluación se menciona que la deforestación proyectada dentro de su área de distribución, junto con la presión de caza cerca de asentamientos humanos, podría llevar a la especie a estar en la categoría vulnerable en el futuro (Mittermeier et al., 2022). En contraste, el Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador clasifica a *C. yuracus* como vulnerable para la población nacional (Álvarez-Solas et al., 2022).

Diversidad genética

La diversidad genética se refiere a la variación heredable que encontramos entre individuos, poblaciones o especies. Esta variabilidad se manifiesta en diferentes alelos, genotipos y frecuencias génicas, la cual es fundamental para procesos evolutivos como la selección natural, la deriva genética, la migración y la mutación en el ámbito de la conservación (Putman & Carbone, 2014). Su importancia radica en que permite que las poblaciones se ajusten a cambios ambientales, enfermedades y presiones ecológicas.

Por eso, la genética de la conservación busca medir y entender la diversidad genética en las poblaciones naturales para ayudar en las decisiones de manejo a corto y largo plazo (Berry et al., 2023). La variabilidad genética no siempre muestra efectos visibles de inmediato. Lande (1988) sugirió que los factores demográficos y ambientales pueden tener un impacto mayor en la supervivencia de las poblaciones a corto plazo, mientras que los factores genéticos cobran más importancia en períodos evolutivos más largos. Esta idea ha sido retomada por Frankham (2005) y Lynch et al. (1995) quienes indican que la pérdida de diversidad genética disminuye la capacidad de adaptación de las poblaciones frente a cambios futuros. Aunque una población pueda parecer estable en número de individuos, puede estar acumulando riesgos genéticos si pierde alelos o aumenta su homocigosidad.

En poblaciones silvestres, la diversidad genética puede reducirse por procesos naturales o por actividades humanas, la fragmentación del hábitat (Rylands et al., 2013; Tirira et al., 2018), la disminución del tamaño poblacional y el aislamiento entre grupos limita el flujo génico y favorecen la deriva genética. Este proceso puede alterar aleatoriamente las frecuencias alélicas y causar la pérdida de alelos poco comunes. Además, favorece la fijación de ciertos alelos en grupos pequeños. La modificación y fragmentación del hábitat suele causar aislamiento poblacional (Solórzano-García et al., 2021), reducción de la variación genética, mayor estructura genética y disminución del tamaño efectivo poblacional (Allendorf et al., 2010).

La deriva genética impacta más en poblaciones pequeñas, ya que cuando disminuye el número de individuos reproductivos, sólo una parte de la variación genética se transmite a la siguiente generación. En este contexto, algunos alelos pueden perderse al azar incluso si no son perjudiciales. Garza & Williamson (2001) explican que la reducción del tamaño efectivo intensificó la deriva genética y puede provocar la pérdida de alelos, cambios en las frecuencias alélicas y patrones detectables en los datos genéticos. Ese tipo de análisis se ha usado para

identificar posibles reducciones poblacionales (Frankham et al., 2010) o cuellos de botella a partir de información de marcadores moleculares (Baranski et al., 2010).

Heterocigosidad como indicador genético

En organismos diploides, cada individuo tiene dos copias de un mismo locus. Una copia viene de la madre y la otra del padre, cada variante en ese locus se llama alelo, por lo que si un individuo tiene dos alelos iguales, se considera homocigoto para ese locus, pero si tiene dos alelos distintos, se considera heterocigoto (Gozzer, 2019). La frecuencia alélica muestra qué tan común es un alelo entre los individuos analizados y su estimación ayuda a describir la composición genética de una población y a calcular parámetros como la heterocigosidad.

En estudios con microsatélites, los alelos se diferencian normalmente por el tamaño del fragmento amplificado, expresado en pares de bases. Por eso, un individuo puede ser clasificado como homocigoto si presenta un solo tamaño alélico para un locus, o como heterocigoto si tiene dos tamaños diferentes (Astorga, 2008; Putman & Carbone, 2014). La cantidad de alelos también brinda información sobre diversidad genética, aunque debe interpretarse con precaución. Un locus con muchos alelos puede parecer muy variable, pero su utilidad depende de cómo se distribuyen esos alelos entre los individuos. Un marcador con varios alelos, pero con uno de ellos en alta frecuencia, puede ser menos útil para discriminar que otro marcador con alelos distribuidos de manera más equilibrada (Grativol et al., 2010).

Heterocigosidad observada

La heterocigosidad observada, representada como Ho, es la proporción real de individuos heterocigotos en un locus determinado. Se obtiene directamente de los genotipos observados. Al analizar un marcador microsatélite en varios individuos, se cuenta cuántos tienen dos alelos diferentes y se divide ese número entre el total de individuos genotipados en ese locus (Serrote et al., 2020). La fórmula básica de la heterocigosidad observada es:

$$Ho = \frac{N_{het}}{N}$$

donde

$$N_{het}:$$

representa el número de individuos heterocigotos, y:

$$N$$

representa el número total de individuos analizados para ese locus

En genética poblacional, valores altos de Ho suelen estar relacionados con mayor variabilidad genética. Por otro lado, valores bajos pueden indicar homocigosis elevada (Allendorf et al., 2010), pérdida de diversidad (Leroy et al., 2018) o posible endogamia (Maldonado et al., 2012). Sin embargo, es importante hacer esta interpretación junto con otros parámetros y el tamaño de la muestra disponible (Allendorf et al., 2010; Hamilton, 2009).

Heterocigosidad esperada

La heterocigosidad esperada, representada como He, es la probabilidad de que dos alelos seleccionados al azar de una población sean diferentes. Este valor se calcula a partir de las frecuencias alélicas y se basa en el supuesto de equilibrio Hardy-Weinberg. Por esta razón, He no depende sólo de cuántos individuos heterocigotos se observaron, sino de la distribución de los alelos en el locus analizado (Serrote et al., 2020). La fórmula más utilizada para calcular la heterocigosidad esperada es:

$$He = 1 - \sum_{i=1}^{k} p_i^2$$

donde

$$p_i$$

representa la frecuencia del alelo i, y:

$$\sum_{i=1}^{k} p_i^2$$

representa la suma de las frecuencias alélicas elevadas al cuadrado.

En estudios con varios loci, la heterocigosidad esperada se utiliza como una medida de diversidad genética que permite comparar la variabilidad genética entre loci o grupos analizados (Allendorf et al., 2010).

Endogamia

La endogamia también es un proceso importante en la conservación genética, ocurre cuando individuos emparentados se reproducen entre sí, aumentando la probabilidad de que la descendencia herede copias idénticas de un alelo. La endogamia disminuye la heterocigosidad y aumenta la homocigosidad en la población. Hedrick y Kalinowski (2000) indican que la endogamia recurrente puede aumentar la expresión de alelos recesivos perjudiciales y favorecer la depresión endogámica. Lawler (2018) también señala que los efectos de la endogamia en primates pueden ser complejos, ya que dependen de la historia del grupo, el hábitat del comportamiento social y la estructura demográfica. Un problema de la endogamia es la pérdida de diversidad genética que puede afectar la salud y la viabilidad de las poblaciones. Reed y Frankham (2003) y Spielman et al. (2004) han asociado la reducción de la diversidad genética con una mayor susceptibilidad a las enfermedades infecciosas y carga de parásitos en primates no humanos.

Los impactos humanos se evalúan sólo por la disminución del número de individuos, mientras que los efectos sobre la variabilidad genética pueden no recibir tanta atención. Solórzano-García et al. (2021) destacan que la diversidad genética entre especies ha recibido menos atención en políticas y gestión, a pesar de su importancia para una conservación efectiva. Coates et al. (2018) mencionan que los mecanismos conductuales pueden reducir la probabilidad de endogamia cercana, pero no eliminan el riesgo cuando las poblaciones están aisladas o viven en hábitats marginales. Por ello, la evaluación genética debe combinarse con información ecológica, demográfica y de comportamiento. Spielman et al. (2004) reportaron que las especies amenazadas suelen tener menor heterocigosidad que las no amenazadas. Este

patrón sugiere que la pérdida de diversidad genética puede estar relacionada con procesos de declive poblacional.

Microsatélites

Los microsatélites son regiones cortas del ADN formadas por secuencias de uno a seis nucleótidos repetidas en tándem. También se conocen como SSR o STR. El número de repeticiones puede variar entre individuos, lo que genera alelos de distinta longitud en un mismo locus (Bhargava & Fuentes, 2009; Edwards et al., 1991; Muneer, 2014). Esta variación se origina principalmente por errores durante la replicación del ADN, cuando se ganan o se pierden unidades repetidas (Goldstein et al., 1995; Putman & Carbone, 2014).

Según el tamaño de la unidad repetida, los microsatélites pueden ser mono, di, tri, tetra, penta o hexanucleotídicos. En estudios genéticos se utilizan con frecuencia los microsatélites di, tri y tetranucleotídicos por su variabilidad y facilidad de detección (Muneer, 2014; Putman & Carbone, 2014). Cada locus presenta regiones flanqueantes relativamente conservadas, donde se unen los cebadores utilizados en la PCR. El tamaño del fragmento amplificado depende del número de repeticiones y puede determinarse mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, agarosa de alta resolución o secuenciadores automáticos (Astorga, 2008; Muneer, 2014).

Una ventaja de estos marcadores es su herencia codominante, porque permiten identificar los dos alelos de un individuo diploide. Si ambos fragmentos tienen el mismo tamaño, el individuo se considera homocigoto; si presentan tamaños diferentes, se considera heterocigoto. A partir de estos genotipos se pueden estimar frecuencias alélicas, número de alelos, heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada (Astorga, 2008; Muneer, 2014). Por ello, los microsatélites se han utilizado en estudios de diversidad genética, parentesco, identificación individual y estructura poblacional (Buschiazzo & Gemmell, 2006; Chistiakov et al., 2006; Guichoux et al., 2011; Putman & Carbone, 2014).

A pesar de su utilidad, su interpretación requiere precaución. La alta tasa de mutación puede producir homoplasia, es decir, alelos con el mismo tamaño, pero con diferente secuencia u origen evolutivo (Estoup et al., 2002; Bhargava & Fuentes, 2009; Putman & Carbone, 2014). También pueden presentarse alelos nulos cuando una variación en la región de unión del cebador impide la amplificación de uno de los alelos. En ese caso, un individuo heterocigoto puede ser clasificado erróneamente como homocigoto, lo que disminuye de manera aparente la heterocigosidad observada y puede generar desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (Callen et al., 1993; Reece et al., 2004; Li et al., 2009).

A estas dificultades se suman las bandas inespecíficas, los productos de tartamudeo, la amplificación preferencial de un alelo y los errores en la asignación del tamaño de los fragmentos. Estos problemas son más frecuentes cuando se trabaja con ADN degradado o en baja concentración, como ocurre con muestras no invasivas. Por esta razón, la ausencia de una segunda banda no siempre confirma homocigosis, sino que debe analizarse junto con la calidad de la amplificación y la repetibilidad del resultado (Putman & Carbone, 2014; Kulibaba & Liashenko, 2016).

En especies con poca información genómica se puede aplicar amplificación cruzada, que consiste en utilizar cebadores diseñados para una especie relacionada. Esta estrategia aprovecha la conservación de las regiones flanqueantes y reduce el tiempo y los recursos necesarios para desarrollar marcadores propios (Kijas et al., 1995; González, 2003; López-Vinyallonga et al., 2011). Sin embargo, que un fragmento amplifique no significa que el locus sea útil, ya que puede resultar monomórfico, inespecífico o comportarse de manera diferente en la especie objetivo. Por ello, cada marcador debe evaluarse antes de emplearlo en el cálculo de la heterocigosidad (Takagi et al., 1997; Hedgecock et al., 2004; López-Vinyallonga et al., 2011).

Amplificación cruzada

En especies no modelo, el desarrollo de marcadores propios puede ser costoso y llevar mucho tiempo. Por esta razón, se utiliza la amplificación cruzada como estrategia para probar cebadores diseñados en una especie fuente y aplicarlos en una especie objetivo relacionada. Esta estrategia se basa en la conservación de las regiones flanqueantes del microsatélite, ya que los cebadores necesitan unirse correctamente al ADN para que ocurra la amplificación (Kijas et al., 1995; González, 2003; López-Vinyallonga et al., 2011). La amplificación cruzada puede ser útil cuando hay pocos recursos genómicos disponibles para la especie de interés. Sin embargo, su éxito no es constante. Puede suceder que un locus amplifique claramente, que produzca bandas inespecíficas, que sea monomórfico o que no amplifique. Entre una especie conocida y una especie cercana filogenéticamente puede aumentar la probabilidad de éxito, aunque no garantiza que todos los loci sean informativos (Takagi et al., 1997; Hedgecock et al., 2004; López-Vinyallonga et al., 2011)

PCR múltiplex

Es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa que permite amplificar dos o más regiones de ADN en una sola reacción. A diferencia de una PCR simple, que usa un solo par de cebadores, la PCR múltiplex incorpora varios pares de cebadores dirigidos a diferentes loci. Esta estrategia permite obtener varios productos de amplificación al mismo tiempo, siempre que las condiciones de reacción sean adecuadas para todos los marcadores incluidos (Elnifro et al., 2000; Ali et al., 2014). En estudios con microsatélites, la PCR múltiplex permite amplificar varios loci en una sola reacción. Esto es útil cuando se necesita analizar varios marcadores por individuo, ya que reduce el tiempo de trabajo, el uso de reactivos y la cantidad de ADN necesaria. Esta ventaja es importante cuando se trabaja con muestras no invasivas, ya que generalmente en este tipo de material biológico, el ADN puede estar en baja concentración o presentar cierto grado de degradación (Elnifro et al., 2000; Inoue, 2015).

Muestras no invasivas

Los microsatélites se pueden amplificar mediante PCR a partir de pequeñas cantidades de ADN, característica que es útil cuando se evalúa fauna silvestre, donde a menudo se trabaja con muestras no invasivas como heces, pelos, saliva u orina (Oklander & Soto-Calderón, 2024). En primates esto es importante ya que permite obtener información genética sin capturar ni manipular directamente a los animales. Escobar-Páramo (2000) comentó que los métodos para extraer ADN de heces, restos de alimento y orina ayudaron a superar una de las principales dificultades en estudios moleculares de monos neotropicales. El uso de ADN no invasivo requiere controles cuidadosos, ya que estas muestras pueden contener ADN degradado, inhibidores de PCR o una baja concentración de ADN del hospedero, por esa razón estandarizar las condiciones de PCR y elegir loci con una amplificación clara son pasos necesarios antes de interpretar los genotipos.

Marco conceptual

Microsatélites: son secuencias cortas y repetidas de ADN. También se les conoce como SSR o STR. Estos marcadores se utilizan debido a su alta variabilidad, herencia codominante y capacidad para distinguir alelos por el tamaño de los fragmentos amplificados mediante PCR (Putman & Carbone, 2014).

Locus: es una región específica del ADN donde se localiza una secuencia genética particular. En esta investigación, cada locus corresponde a un marcador microsatélite evaluado en los individuos analizados (Gozzer, 2019).

Alelo: es una variante de un locus. En los microsatélites, los alelos se identifican por el tamaño del fragmento amplificado, medido en pares de bases (Gozzer, 2019).

Genotipo: es la combinación de alelos que un individuo posee en un locus. En organismos diploides, un genotipo puede consistir en dos alelos idénticos o dos alelos diferentes (Gozzer, 2019).

Homocigoto: es un individuo con dos alelos idénticos en un locus específico (Zhang et al., 2005).

Heterocigoto: es un individuo con dos alelos diferentes en un locus específico (Zhang et al., 2005).

Heterocigosidad observada (Ho): es la proporción real de individuos heterocigotos identificados en un locus con base en los genotipos obtenidos (Allendorf et al., 2010).

Heterocigosidad esperada (He): es la probabilidad de que dos alelos seleccionados al azar sean diferentes en una población o grupo de individuos. Esta probabilidad se calcula a partir de las frecuencias alélicas (Allendorf et al., 2010).

Diversidad genética: se refiere a la variación heredable presente entre individuos o grupos (Berry et al., 2023).

PCR múltiplex. Es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa que permite amplificar dos o más regiones específicas de ADN en una sola reacción, usando varios pares de cebadores (Inoue, 2015).

Tamaño del alelo: se refiere a la longitud aproximada del fragmento amplificado de un alelo microsatélite, expresada en pares de bases. Esta medida ayuda a diferenciar los alelos presentes en cada individuo (Putman & Carbone, 2014).

Capítulo III

Metodología

Enfoque de investigación

El enfoque es de tipo cuantitativo, ya que se basa en la recopilación y análisis de datos numéricos obtenidos mediante la amplificación de microsatélites en individuos de *Cebus yuracus*. A través de este enfoque es posible obtener medidas de parámetros genéticos como el número de alelos, sus tamaños y la heterocigosidad observada y esperada, valores que provienen de los resultados obtenidos mediante la electroforesis de las PCR simplex y dúplex. El enfoque cuantitativo ayuda a evaluar la heterocigosidad ya que permite convertir los resultados moleculares en valores medibles y comparables.

Tipo y diseño de investigación

Esta investigación es descriptiva ya que se busca caracterizar la heterocigosidad de individuos de *Cebus yuracus* usando un set de microsatélites, sin establecer relaciones causales entre variables. Se describieron los tamaños alélicos obtenidos, el número de alelos identificados y los valores de heterocigosidad observada y esperada para los microsatélites analizados. Además, es de tipo no experimental, ya que no se manipularon las características genéticas de los individuos ni se intervino en la población estudiada. Los datos se obtuvieron a partir del análisis molecular de muestras no invasivas. Los resultados se interpretaron tal como se presentan en los microsatélites evaluados.

Población y muestra

El estudio tiene dos grupos de muestras de Cebus yuracus, ambos ubicados en la Amazonía ecuatoriana. El primer grupo corresponde a individuos asociados a la localidad de Misahuallí, mientras que el segundo estuvo conformado por individuos mantenidos en un centro de rescate de la ciudad del Puyo “Paseo de los monos”. Las muestras biológicas originales son heces recolectadas antes por el Proyecto Primates Ecuador. Estas heces estaban guardadas

en el Instituto de Investigación en Zoonosis (CIZ) y se conservaron en etanol a -80 °C hasta que se procesaron.

La muestra de trabajo consistió en 22 muestras de individuos de Misahuallí y 7 muestras procedentes del centro de rescate (Tabla 1). Para la mayoría de las muestras, se usó ADN genómico que había sido extraído previamente por Casanova (2024) y Endara (2024) en investigaciones previas. Este ADN se almacenó a -20 °C. Además, en este estudio se extrajo adicionalmente ADN de las muestras MI-010-D y MI-005-D utilizando el kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, para completar el material genético disponible para los análisis moleculares.

Tabla 1

Muestras y ADN genómico de Cebus yuracus de dos localidades de la Amazonía

Numeración	Código	Localidad	Sexo	Edad
1	MI-003-D	Misahuallí	Macho	Subadulto
2	FD-103	Misahuallí	Macho	Adulto
3	MI-006-D	Misahuallí	Macho	Subadulto
4	MI-007-D	Misahuallí	Macho	Joven
5	MI-010-D	Misahuallí	Macho	Adulto
6	MI-010-E	Misahuallí	Macho	Adulto
7	MI-012-D	Misahuallí	Macho	Subadulto
8	MI-014-D	Misahuallí	Macho	Subadulto
9	MI-008-D	Misahuallí	Hembra	Subadulto
10	MI-004-D	Misahuallí	Hembra	Adulto
11	MI-005-D	Misahuallí	Macho	Adulto
12	MI-004-E	Misahuallí	Hembra	Adulto
13	MI-009-D	Misahuallí	Hembra	Subadulto
14	MI-008-E	Misahuallí	Hembra	Joven
15	MI-005-F	Misahuallí	Macho	Joven
16	MI-001-D	Misahuallí	Hembra	Adulto
17	MI-002-E	Misahuallí	Hembra	Adulto
18	MI-009-E	Misahuallí	Hembra	Subadulto
19	MI-007-E	Misahuallí	Macho	Joven

Numeración	Código	Localidad	Sexo	Edad
20	MI-004-F	Misahuallí	Hembra	Adulto
21	MI-001-E	Misahuallí	Hembra	Adulto
22	MI-005-E	Misahuallí	Macho	Joven
23	PM-034-D	Centro de rescate	Macho	Subadulto
24	PM-003-F	Centro de rescate	Macho	Subadulto
25	PM-004-D	Centro de rescate	Macho	Juvenil
26	PM-026-D	Centro de rescate	Macho	Juvenil
27	PM-012-D	Centro de rescate	Hembra	Adulta
28	PM-029-D	Centro de rescate	Hembra	Adulta
29	PM-011-D	Centro de rescate	Hembra	Subadulta

Nota. La tabla muestra el número que se asignó para cada muestra, en los códigos, MI indica Misahuallí y PM indica centro de rescate, el número representa el individuo y las letras D, E o F corresponden a la colecta de la muestra. Para cada individuo se registraron el sexo y la categoría de edad.

Técnica e instrumento

La técnica empleada para la recolección de datos genéticos fue la amplificación de cinco microsatélites (Secuencias de bases repetidas en tándem) mediante reacción en cadena de la polimerasa en modalidades dúplex y simplex. Se usó esta técnica debido a su alta capacidad para detectar variabilidad genética dentro y entre poblaciones, permitiendo evaluar la estructura genética y diversidad de *Cebus yuracus* tanto de Misahuallí como en el centro de rescate de la Amazonía ecuatoriana.

La PCR dúplex permitió amplificar simultáneamente dos microsatélites en una misma reacción. La PCR simplex se utilizó para el locus que fue analizado de manera individual debido a sus condiciones particulares de amplificación. Para ello, se diseñaron dos protocolos base de PCR dúplex, los cuales se plantearon con un volumen final de reacción de 25 µL por muestra. La mezcla de reacción incluyó agua, buffer 1X, primers forward y reverse de cada microsatélite, $MgCl_2$, dNTPs, Taq polimerasa y ADN genómico, mientras que la PCR convencional se planteó con un volumen final de 12,5 µL por muestra con los mismos componentes.

Una vez establecidas las condiciones de amplificación para cada microsatélite, los productos correspondientes a las muestras de *Cebus yuracus* fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Esta técnica permitió obtener una mayor resolución entre fragmentos de tamaños cercanos y facilitó la estimación de los alelos expresados en pares de bases.

Selección de microsatélites

La selección de los microsatélites se hizo a partir del análisis de los mejores resultados obtenidos por Endara (2024) y Casanova (2024) previamente en el Laboratorio de Biotecnología Animal, quienes realizaron en conjunto ocho procesos de estandarización para la misma cantidad de microsatélites mediante PCR convencional. Sin embargo, seis de estos loci no fueron incluidos en el conjunto definitivo, puesto que mostraron un comportamiento de amplificación variable entre las muestras, lo que impedía distinguir los productos con suficiente claridad y, por consiguiente, comprometían la asignación confiable de los alelos. Finalmente, los microsatélites PEPC40 y PEPC59 fueron considerados debido a que ambos demostraron una buena transferibilidad en Cebus yuracus. A partir de estos antecedentes, se planteó su incorporación al set final y adaptación a un sistema de amplificación simultánea mediante PCR dúplex pues tienen temperaturas de hibridación cercanas, así como de las concentraciones de los componentes.

Adicional a estos dos microsatélites, se mandaron a sintetizar en Macrogen Korea cuatro más. Para ello se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando una combinación de términos como *microsatellite*, *PCR*, *Cebus albifrons*, *Cebus yuracus.* La información recopilada fue organizada en una matriz comparativa en la que se registraron el nombre del locus, las secuencias de los cebadores forward y reverse, el motivo repetitivo, y para su elección se tomaron en cuenta aspectos como el número de alelos reportado, el nivel de polimorfismo, la capacidad de amplificación cruzada en especies cercanas a *Cebus yuracus*. Se priorizaron aquellos marcadores que habían mostrado resultados favorables en capuchinos u otros primates neotropicales relacionados, especialmente en *Cebus apella o Cebus albifrons*. De estos cuatro microsatélites se seleccionaron tres, pues mostraron resultados favorables usando PCR convencional.

Estandarización de PCR dúplex para los microsatélites PEPC40 y PEPC59

Debido a que los microsatélites PEPC40 y PEPC59 presentaban condiciones de amplificación similares en PCR simplex (Tabla 2), se mantuvieron constantes las concentraciones de $MgCl_2$, dNTPs, Taq ADN polimerasa, cebadores, ADN molde y el número de ciclos. La temperatura de alineamiento de la reacción dúplex se estableció considerando el locus que requería la temperatura más alta, con el propósito de favorecer una amplificación específica de ambos marcadores.

La optimización evaluó el efecto del DMSO, debido a que uno de los microsatélites requería este aditivo para mejorar su amplificación, mientras que el segundo no. Además, de acuerdo con la bibliografía consultada, la incorporación de DMSO podía modificar la eficiencia de amplificación del locus que no dependía de este reactivo. Por esta razón, se realizaron reacciones de PCR dúplex con y sin DMSO, a fin de determinar si su presencia permitía obtener productos definidos para ambos microsatélites sin afectar la amplificación simultánea.

Tabla 2

Parámetros y variaciones de la PCR dúplex para el microsatélite PEPC40 y PEPC59

Parámetro	Variación
Concentración DMSO	0 %, 3 %

Las concentraciones y condiciones finales de la PCR dúplex para los microsatélites PEPC40 y PEPC59 se muestran en la tabla 3 y la tabla 4.

Tabla 3

Concentraciones de reactivos para mastermix de la PCR dúplex PEPC40 y PEPC59

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (µL) por RX
H2O	µL	N/A		16,55
Buffer	X	10,00	1,00	2,50
PEPC40 F	µM	10,00	0,25	0,63
PEPC40 R	µM	10,00	0,25	0,63
PEPC59 F	µM	10,00	0,25	0,63
PEPC59 R	µM	10,00	0,25	0,63
$MgCl_2$	mM	50,00	1,50	0,75
dNTP	mM	10,00	0,20	0,50
Taq	U/µL	5,00	1,00	0,20
ADN	ng/RX	10,00	25,00	2,00
Total				25,00

Tabla 4

Condiciones de la PCR dúplex para los microsatélites PEPC40 y PEPC59

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	92	2 min	1
Desnaturalización	94	30 s	
Hibridación	57	30 s	40
Extensión	72	30 s	
Extensión Final	72	10 min	1

Optimización de la PCR simplex para los microsatélites D5S111 y AP74

El proceso de normalización y validación de los marcadores microsatélite D5S111 y AP74 requirió la implementación inicial de amplificaciones PCR convencional, esto se justificó en la necesidad de caracterizar de manera independiente la respuesta de cada locus específico, previo a su eventual integración dentro de un protocolo dúplex. Las condiciones iniciales para estos marcadores de amplificación fueron establecidas a partir del protocolo de Ruiz-García et al. (2007) y posteriormente fueron ajustadas para las muestras de ADN de *Cebus yuracus*. No obstante, dado que los cebadores habían sido desarrollados y evaluados previamente en otras especies de primates, fue necesario determinar las condiciones que permitieran obtener una amplificación específica y reproducible en *Cebus yuracus*.

Optimización de PCR para el microsatélite D5S111

La optimización de la PCR simplex para el microsatélite D5S111 se inició con la evaluación de la concentración de $MgCl_2$. Con base en las condiciones descritas en el artículo de Ruiz-García et al. (2007), se ensayaron concentraciones finales de 1,5 y 2 mM. Durante esta etapa se mantuvieron constantes las concentraciones de buffer, cebadores, dNTPs, Taq ADN polimerasa y ADN molde, así como el perfil térmico de la reacción (Tabla 5).

Una vez seleccionada la concentración de 2 mM de $MgCl_2$, se realizó un gradiente de temperatura de alineamiento a 52, 53 y 54 °C. En este ensayo, la concentración de magnesio y los demás componentes de la mezcla permanecieron constantes. Las condiciones finales fueron seleccionadas considerando la obtención de una banda definida y con intensidad suficiente.

Tabla 5

Parámetros y variaciones de la PCR para el microsatélite D5S111

Parámetro	Variación
Concentración de Magnesio	1,5 mM, 2 mM
Temperatura de hibridación	52 °C, 53 °C, 54 °C

Las concentraciones y condiciones finales de la PCR para el microsatélite D5S111 se muestran en la tabla 6 y la tabla 7.

Tabla 6

Concentraciones de reactivos para mastermix de la PCR del microsatélite D5S111

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (µL) por RX
H2O	µL	N/A		16,65
Buffer	X	10,00	1,00	2,50
D5S111 F	µM	10,00	0,50	1,25
D5S111 R	µM	10,00	0,50	1,25
$MgCl_2$	mM	50,00	2,00	0,75
dNTP	mM	10,00	0,2	0,50
Taq	U/µL	5,00	0,5	0,10
ADN	ng/RX	10	25,00	2,00
Total				25,00

Tabla 7

Condiciones de la PCR para el microsatélite D5S111

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95 °C	2 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	
Hibridación	53 °C	30 s	35
Extensión	72 °C	30 s	
Extensión Final	72 °C	5 min	1

Optimización de PCR para los microsatélites AP74

La optimización de la PCR del microsatélite AP74 se hizo a partir de una temperatura de alineamiento de 52 °C, establecida con base en las condiciones descritas en el artículo de Ruiz-García et al. (2007). Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración de $MgCl_2$ sobre la amplificación del locus. Para eso se realizó un ensayo de concentraciones finales de

1,5 mM, 2 mM y 3 mM de $MgCl_2$, mientras que la temperatura de alineamiento y las concentraciones de buffer, cebadores, dNTPs, Taq ADN polimerasa y ADN molde se mantuvieron constantes. Las condiciones finales fueron seleccionadas considerando la obtención de una banda definida y con intensidad suficiente (Tabla 8).

Tabla 8

Parámetros y variaciones de la PCR para el microsatélite AP74

Parámetro	Variación
Concentración de Magnesio	1,5 mM, 2 mM, 3 mM

Las concentraciones y condiciones finales de la PCR para el microsatélite AP74 se muestran en la tabla 9 y la tabla 10.

Tabla 9

Concentraciones de reactivos para mastermix de la PCR del microsatélite AP74

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (µL) por RX
H2O	µL	N/A		15,90
Buffer	X	10,00	1,00	2,50
AP74 F	µM	10,00	0,50	1,25
AP74 R	µM	10,00	0,50	1,25
$MgCl_2$	mM	50,00	3,00	1,50
dNTP	mM	10,00	0,2	0,50
Taq	U/µL	5,00	0,5	0,10
ADN	ng/RX	10	25,00	2,00
Total				25,00

Tabla 10

Condiciones de la PCR para el microsatélite AP74

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95 °C	2 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	

Hibridación	52 °C	30 s	35
Extensión	72 °C	30 s	
Extensión Final	72 °C	5 min	1

Estandarización de la PCR dúplex para D5S111 y AP74

Una vez establecidas las condiciones de amplificación simplex para los microsatélites D5S111 y AP74, se evaluó su amplificación simultánea mediante PCR dúplex. Para ello, se utilizaron como referencia las condiciones determinadas individualmente para cada locus, y ambos pares de cebadores se incorporaron a la misma mezcla de reacción. Inicialmente, se evaluó el efecto de la concentración de $MgCl_2$ utilizando un gradiente de concentraciones de 2, 2,5 y 3 mM. Durante esta evaluación, se mantuvieron constantes la temperatura de hibridación, las concentraciones de tampón, las concentraciones de cebadores, las concentraciones de dNTP, la concentración de polimerasa Taq, la concentración de ADN molde y el número de ciclos de amplificación (Tabla 11).

A la concentración de $MgCl_2$ seleccionada, se observó la amplificación de ambos microsatélites, sin embargo, la intensidad de la banda obtenida en una de las muestras utilizadas para la estandarización fue débil en comparación al control. Para mejorar esto se evaluó la temperatura de hibridación utilizando un gradiente de 52 °C, 53 °C y 54 °C.

Este rango de temperatura se seleccionó en función de las condiciones previamente establecidas para las reacciones simplex, ya que la amplificación de AP74 se observó a 52 °C, mientras que la de D5S111 se observó a 53 °C y también mostró una banda a 54 °C (Tabla 11)

Tabla 11

Parámetros y variaciones de la PCR dúplex de los microsatélites D5S111 y AP74

Parámetro	Variación
Concentración de Magnesio	2 mM, 2,5 mM, 3 mM
Temperatura de hibridación	52 °C, 53 °C, 54 °C

Las concentraciones y condiciones finales de la PCR dúplex para los microsatélites D5S111 y AP74, se muestran en la tabla 12 y la tabla 13.

Tabla 12

Concentraciones de reactivos para mastermix de la PCR dúplex de los microsatélites D5S111 y AP74

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (µL) por RX
H2O	µL	N/A		15,80
Buffer	X	10,00	1,00	2,50
D5S111 F	µM	10,00	0,20	0,63
D5S111 R	µM	10,00	0,20	0,63
AP74 F	µM	10,00	0,20	0,63
AP74 R	µM	10,00	0,20	0,63
$MgCl_2$	mM	50,00	3,00	1,50
dNTP	mM	10,00	0,20	0,50
Taq	U/µL	5,00	1,00	0,20
ADN	ng/RX	10,00	25,00	2,00
Total				25,00

Tabla 13

Condiciones de la PCR dúplex para los microsatélites D5S111 y AP74

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	
Hibridación	54 °C	30 s	35
Extensión	72 °C	30 s	
Extensión Final	72 °C	5 min	1

Estandarización de la PCR para el microsatélite CEB07

Para la amplificación simplex del microsatélite Ceb07 se tomaron como referencia las concentraciones y el perfil térmico descritos por Muniz y Vigilant (2008) para este locus. Debido

a que las condiciones iniciales permitieron obtener un producto de amplificación definido, no fue necesario evaluar variaciones en la concentración de $MgCl_2$, la temperatura de alineamiento ni los demás componentes de la PCR. La reacción se preparó en un volumen final de 12,5 µL, mediante la reducción proporcional de los volúmenes establecidos en la formulación de trabajo de 25 µL utilizada en el laboratorio. En consecuencia, cada componente de la mezcla fue reducido a la mitad, sin modificar sus concentraciones finales. El volumen de ADN molde se estableció en 1 µL por reacción. La composición de la mezcla y el perfil térmico empleados se presentan en las Tablas 14 y 15, respectivamente.

Tabla 14

Concentraciones de reactivos para mastermix de la PCR del microsatélite CEB07

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (µL) por RX
H2O	µL	N/A		8,33
Buffer	X	10,00	1,00	1,25
Ceb07 F	µM	10,00	0,50	0,63
Ceb07 R	µM	10,00	0,50	0,63
$MgCl_2$	mM	50,00	1,50	0,38
dNTP	mM	10,00	0,20	0,25
Taq	U/µL	5,00	0,50	0,05
ADN	ng/RX	10	25,00	1,00
Total				12,50

Tabla 15

Condiciones de la PCR para el microsatélite CEB07

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	2
Hibridación	57 °C	30 s	
Extensión	72 °C	30 s	
Desnaturalización	95 °C	30 s	2
Hibridación	56 °C	30 s	

Extensión	72 °C	30 s	
Desnaturalización	95 °C	30 s	
Hibridación	55 °C	30 s	36
Extensión	72 °C	30 s	
Extensión Final	72 °C	10 min	1

Durante la estandarización de los protocolos para los cinco microsatélites en las modalidades de PCR dúplex y simplex para confirmar la amplificación se usó gel de agarosa al 2,5 %, y se observaron en un fotodocumentador para evaluar los resultados obtenidos con el fin de seleccionar las mejores condiciones y concentraciones de las tres PCR.

Optimización de la electroforesis en gel de poliacrilamida

Una vez establecidas las condiciones de amplificación de los microsatélites, los productos de PCR obtenidos para las muestras de *Cebus yuracus* fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Esta técnica fue seleccionada por su mayor capacidad de resolución frente al gel de agarosa como lo mencionan diferentes artículos como el de Wang et al. (2003) o Kulibaba y Liashenko (2016), lo que permitió diferenciar fragmentos microsatélites con tamaños próximos y realizar la asignación aproximada de los alelos.

Con el propósito de establecer condiciones adecuadas para la separación de los fragmentos microsatélites, se evaluaron geles de poliacrilamida a concentraciones de 8 %, 10 % y 12 %; por lo que también se ajustaron las cantidades de persulfato de amonio (APS) y TEMED utilizadas para iniciar la polimerización. En los ensayos iniciales, las cantidades de APS y TEMED empleadas provocaron una polimerización acelerada de la solución, lo que dificultó la formación adecuada de los pocillos. Por esta razón se hizo un reajuste de los volúmenes de ambos reactivos hasta obtener un tiempo de polimerización que permitiera verter la solución e insertar el peine sin alterar la estructura del gel. La concentración de poliacrilamida fue seleccionada considerando la migración del marcador molecular, el intervalo de tamaño esperado de los productos amplificados, la resolución de los fragmentos y el tiempo

requerido para la corrida. La composición final del gel de poliacrilamida y las condiciones establecidas para la corrida electroforética se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16

Concentraciones de reactivos para un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 10 %

Reactivos	Unidad	Volumen
Agua	mL	3,77
Acrilamida:bisacrilamida 40 % 19:1	mL	1,75
TBE 5x	mL	1,40
APS 10 %	µL	75,00
SYBR Safe 10,000x	µL	0,75
TEMED	µL	5,00
Condiciones de corrida		
Tiempo		2 h 40 min
Voltaje		100 V

La composición seleccionada fue utilizada posteriormente para separar los productos de PCR de las muestras de *Cebus yuracus*. Las mismas condiciones de concentración, voltaje y tiempo fueron aplicadas en distintos geles, en los cuales se obtuvo una migración adecuada del marcador molecular y una separación interpretable de los fragmentos amplificados.

Estimación del tamaño alélico y genotipado

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con un marcador de peso molecular. El tamaño aproximado de los alelos se estimó comparando la migración de las bandas con fragmentos de tamaño conocido presentes en el marcador usando Image Lab de Bio-Rad. Se registraron dos tamaños alélicos expresados en pares de bases para cada individuo y para cada locus microsatélite. En el caso de las muestras con una sola banda distintiva se registraron con el mismo tamaño en ambas columnas de alelos lo que corresponde a un homocigoto, mientras que aquellas con dos bandas distintivas se registraron con dos tamaños diferentes, es decir, un heterocigoto. Los tamaños alélicos se organizaron en una tabla donde las filas corresponden a los individuos

analizados y las columnas a los dos alelos identificados para cada locus, en el caso de las muestras sin amplificación o cuyos perfiles de bandas no permitieron una lectura fiable se registraron como datos faltantes.

Análisis de heterocigosidad

La matriz genotípica se organizó según el formato requerido por el programa GenAlEx versión 6.5, que se ejecuta como un complemento de Microsoft Excel. Para cada locus, se determinó el número de alelos, sus frecuencias alélicas, la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada. Para cada locus, la heterocigosidad observada se obtuvo dividiendo el número de individuos heterocigotos entre el total de individuos cuyo genotipo o banda pudo identificarse con claridad.

Validación y confiabilidad del instrumento

Para asegurar la confiabilidad de los resultados se aplicaron dos protocolos base de PCR dúplex y convencional, el uso de muestras con códigos y la inclusión de controles positivos y negativos, y la verificación inicial de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Posteriormente, las bandas fueron evaluadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %, para separar fragmentos de entre 100 y 300 pb con el fin de obtener una mejor resolución de los fragmentos amplificados y facilitar la interpretación de los alelos.

Los controles positivos fueron ADN de especies relacionadas, como *Cebus apella* y una muestra de *Cebus yuracus*, mientras que el control negativo correspondió a una reacción sin ADN molde. Estos controles permitieron probar una estandarización de la reacción de PCR y descartar contaminación en los reactivos durante la preparación de la mezcla. Para estimar el tamaño aproximado de las bandas se hizo una comparación con un marcador de peso molecular, lo que permitió registrar los fragmentos de forma más clara. En los casos en que se observaron bandas débiles, inespecíficas o de difícil interpretación, los resultados fueron

revisados cuidadosamente y, de ser necesario, se consideró la repetición del ensayo para confirmar la amplificación.

Consideraciones éticas

Este trabajo se llevó a cabo siguiendo los principios éticos para el uso de muestras biológicas de fauna silvestre y recursos genéticos. No se realizó la captura, manipulación directa ni recolección de nuevas muestras de Cebus yuracus, sino que se usó el ADN genómico previamente extraído de muestras fecales recolectadas por el Proyecto Primates Ecuador. Las muestras biológicas fueron obtenidas durante la validez del permiso de investigación MAE-DNB-CM-2017-0073, que se certificó el 06 de febrero de 2018. Este permiso autorizó el uso de recursos genéticos biológicos. Por lo tanto, este trabajo utilizó material biológico previamente aprobado.

Capítulo IV

Análisis y discusión de los resultados

Selección del set de primers

Para la conformación del set de marcadores se seleccionaron cinco microsatélites PEPC40, PEPC59, AP74, D5S111 y Ceb07, considerando como criterios principales los antecedentes de amplificación en especies del género *Cebus,* el polimorfismo previamente reportado y la compatibilidad de sus temperaturas de hibridación y de los intervalos de tamaño para su posible integración en sistemas de PCR dúplex (Tabla 17), de esta manera esta selección permitió priorizar loci con evidencia previa de utilidad en primates neotropicales y reducir la probabilidad de incorporar marcadores con amplificación inconsistente.

Tabla 17

Microsatélites seleccionados para la evaluación genética de Cebus yuracus

Locus	Especie de origen	Secuencia repetida	Tamaño del alelo	Temp. Hibridación	Antecedente de amplificación cruzada	Referencia
PEPC59	*C. apella*	$(GT)_{18}$	302–321	55 °C	Amplificación en primates neotropicales	(Escobar-Páramo, 2000)
PEPC40	*C. apella*	(CA)18(CT)14 (CA)9	280–290	55 °C		
Ceb07	*C. capucinus*	$(AGAT)_{10}$	119–135	55 °C		(Muniz & Vigilant, 2008)
D5S111	Humano	(CA)13C(CA)6T (AC)5	158–165	52 °C	Amplificación en *C. albifrons y otros primates*	(Cortés-Ortiz et al., 2010)
AP74	*A. palliata*	(TG)19	142–156	52 °C		

Los microsatélites PEPC40 y PEPC59 fueron desarrollados originalmente para *Cebus apella* y presentan una temperatura de hibridación reportada de 55 °C. Escobar-Páramo (2000) identificó cuatro alelos para PEPC40 y siete para PEPC59, con intervalos de tamaño de 280–

290 y 302–321 pb, respectivamente. Además del polimorfismo descrito, la coincidencia de sus temperaturas y la separación esperada entre los tamaños de los amplicones permitieron considerarlos inicialmente compatibles para su integración en una misma reacción dúplex.

La elección de PEPC40 y PEPC59 también estuvo respaldada por los ensayos realizados previamente en el laboratorio de Biotecnología Animal. Casanova (2024) y Endara Ibarra (2024) evaluaron ocho microsatélites en muestras de *C. yuracus*. Casanova (2024) estudió PEPC3, PEPC8, Ceb09 y Ceb121, mientras que Endara Ibarra (2024) evaluó PEPC40, PEPC59, Ceb10 y Ceb120. Entre los ocho loci, Ceb09 y Ceb120 no amplificaron ninguna de las muestras analizadas. En el estudio de Endara Ibarra (2024), PEPC40 amplificó 17 de 23 muestras y PEPC59 amplificó 13 de 23, mientras que Ceb10 presentó amplificación en siete muestras. Estos resultados confirmaron la transferibilidad interespecífica de PEPC40 y PEPC59 y proporcionaron condiciones experimentales previamente probadas para ambos marcadores.

Adicionalmente se agregaron los microsatélites D5S111 y AP74. La elección de estos marcadores se fundamentó en el estudio de Ruiz-García et al. (2007), quienes evaluaron diez microsatélites en 14 especies de primates platirrinos, entre ellas *Cebus albifrons*. Para AP74 se registró un elevado polimorfismo, con ocho alelos detectados en siete individuos procedentes del zoológico de Cali y 21 alelos al considerar el conjunto de individuos analizados para la especie. En el mismo grupo de siete individuos, D5S111 presentó tres alelos. Estos antecedentes indicaron que ambos loci eran capaces de detectar variación genética en un taxón estrechamente relacionado con *C. yuracus*. Los dos marcadores poseen orígenes diferentes. AP74 fue desarrollado originalmente para el mono aullador *Alouatta palliata*, mientras que D5S111 corresponde a un microsatélite de origen humano que posteriormente fue utilizado en monos del Nuevo Mundo. La amplificación cruzada de un microsatélite no requiere que la región repetitiva sea idéntica entre las especies, pero sí depende de que las secuencias flanqueantes, sobre las cuales se unen los cebadores, presenten un grado suficiente de

conservación (Clisson et al., 2000). Cuando estas regiones mantienen homología entre especies, los cebadores pueden amplificar el locus correspondiente, y la variación en el número de repeticiones puede utilizarse para diferenciar alelos (Blanquer-Maumont & Crouau-Roy, 1995). Sin embargo, el éxito de la transferibilidad puede variar entre loci y especies, por lo que debe comprobarse experimentalmente en la especie de interés (Coote & Bruford, 1996).

En el caso de D5S111, su utilización previa en primates platirrinos y la detección de polimorfismo en *C. albifrons* proporcionaron evidencia directa para incluirlo en el presente estudio. Con base al artículo de Ruiz-García et al. (2007) tanto AP74 como D5S111 presentaron compatibilidad a una temperatura de hibridación de 52 °C, por lo que se determinó que se podrían integrar dentro de un sistema dúplex.

El quinto marcador seleccionado fue Ceb07, desarrollado específicamente para *Cebus capucinu*s. Muniz y Vigilant (2008) caracterizaron este locus en 187 individuos silvestres e identificaron cuatro alelos, con un intervalo de tamaño de 119–135 pb y valores de heterocigosidad observada y esperada de 0,567. Los autores también evaluaron la amplificación de los marcadores en diferentes especies de monos del Nuevo Mundo, lo que mostró su potencial de aplicación en otros primates neotropicales. Su origen dentro del género Cebus, el polimorfismo previamente registrado y la temperatura de hibridación reportada de 55 °C respaldaron su incorporación al conjunto de marcadores.

Optimización de PCR para utilización de microsatélite

D5S111

Concentración de Magnesio

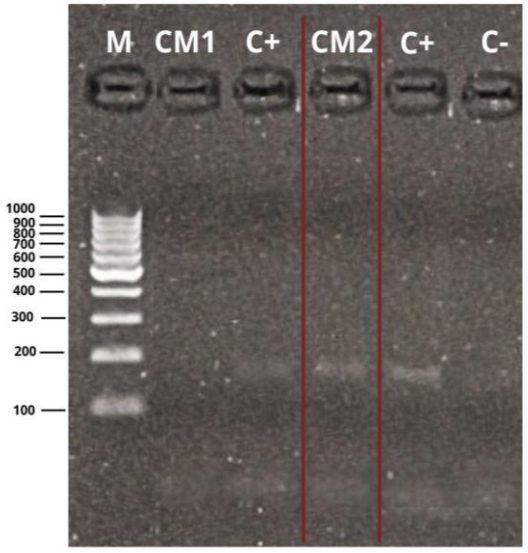
Para optimizar la amplificación del microsatélite D5S111, se evaluaron concentraciones finales de $MgCl_2$ de 1,5 y 2,0 mM. La concentración de 2,0 mM fue seleccionada tomando como referencia el protocolo descrito por Cortés-Ortiz et al. (2010), quienes utilizaron este valor para la amplificación de este locus microsatélite en primates neotropicales. Adicionalmente, se evaluó una concentración de 1,5 mM como el nivel base permitido en ensayos para evaluar el

magnesio, con el propósito de determinar si una menor cantidad de $MgCl_2$ permitía conservar la eficiencia y especificidad de la amplificación. Esta condición también buscó optimizar el uso de los reactivos sin comprometer la obtención del producto esperado. Para cada concentración se utilizó una muestra de ADN de *C. yuracus* y un control positivo *C. apella*, mientras que los demás componentes de la mezcla de reacción y las condiciones del programa de PCR se mantuvieron constantes.

La Figura 1 muestra los productos amplificados para el microsatélite D5S111, donde con 1,5 mM de $MgCl_2$ no se observó ninguna banda definida. En contraste, al emplear 2,0 mM se obtuvo una banda clara en la muestra de *C. yuracus*, ubicada a una altura de migración similar a la observada en el control positivo. El control negativo no presentó productos visibles, por lo que no se detectaron evidencias de contaminación durante la preparación de esta reacción.

Figura 1

Evaluación de la concentración de $MgCl_2$ para la amplificación del microsatélite D5S111



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5 %. M: marcador molecular, CM1 y CM2 corresponden a una muestra de *C. yuracus* amplificada con 1,5 mM y 2,0 mM de $MgCl_2$, respectivamente, C+: control positivo para ambas concentraciones, C−: control negativo.

La diferencia observada entre las dos concentraciones puede relacionarse con la función del Mg como cofactor de la Taq ADN polimerasa. La concentración de este ion influye tanto en la cantidad de producto generado como en la estabilidad de la unión entre los cebadores y el ADN molde. Una concentración insuficiente puede disminuir la actividad de la enzima y reducir el rendimiento de la amplificación, mientras que un exceso puede favorecer uniones inespecíficas y disminuir la especificidad de la reacción (Bickley & Hopkins, 1999). En el presente ensayo, la ausencia de una banda definida con 1,5 mM sugiere que esta concentración no proporcionó suficiente Mg^{2+} disponible bajo la composición utilizada, mientras que el incremento a 2,0 mM permitió obtener un producto visible sin generar bandas inespecíficas evidentes.

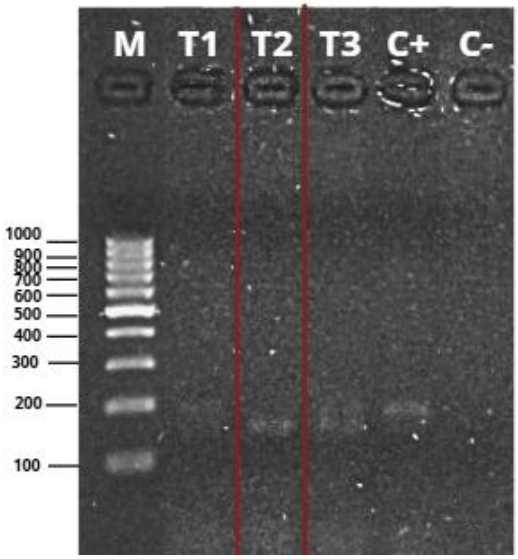
El resultado coincidió con la concentración empleada por Cortés-Ortiz et al. (2010), lo que indica que las condiciones previamente reportadas para D5S111 en otros primates neotropicales constituyeron un punto de partida adecuado para su amplificación en *C. yuracus*. No obstante, esta coincidencia no significa que el marcador funcione de manera óptima en todas las muestras debido a que la concentración óptima de $MgCl_2$ también depende de la calidad del ADN, la concentración de dNTP, los cebadores y los demás componentes de la reacción. Por lo tanto, se seleccionó una concentración final de 2,0 mM de $MgCl_2$ para los ensayos posteriores del microsatélite D5S111, debido a que esta condición produce una señal más definida y reproducible.

Temperatura de hibridación

La amplificación del microsatélite D5S111 fue evaluada a temperaturas de hibridación de 52, 53 y 54 °C. Las tres temperaturas permitieron detectar bandas, aunque esto no fue uniforme ya que se observan diferencias en la intensidad y definición (Figura 2). La condición de 53 °C, correspondiente al carril T2, produjo la banda más intensa y definida en comparación con las obtenidas a 52 °C y 54 °C.

Figura 2

Gradiente de temperatura de hibridación para la amplificación del microsatélite D5S111



Nota. Electroforesis en gel de agarosa de 2,5 %. M: marcador molecular, T1, T2 y T3 corresponden a una muestra de *C. yuracus* amplificada con una temperatura de hibridación de 52 °C, 53 °C y 54 °C, C+: control positivo, C−: control negativo.

La temperatura de hibridación determina la estabilidad de la unión entre los cebadores y sus secuencias complementarias en el ADN molde. Lorenz (2012) menciona que una temperatura demasiado baja puede facilitar la unión de los cebadores a regiones parcialmente complementarias y favorecer productos inespecíficos, mientras que una temperatura excesivamente alta puede dificultar la hibridación y reducir el rendimiento de la reacción. Por esta razón, su selección debe buscar un equilibrio entre intensidad y especificidad de la amplificación (Elnifro et al., 2000).

Aunque la temperatura de 52 °C había sido reportada previamente para D5S111, en la muestra evaluada de *C. yuracus* produjo una señal de menor intensidad que la observada a 53 °C. Este desplazamiento de un grado con respecto a la condición bibliográfica evidencia que los parámetros publicados no siempre se transfieren de manera exacta entre especies. Las diferencias en las secuencias flanqueantes del locus, en la calidad del ADN molde o en la

composición de la mezcla pueden modificar la eficiencia con la que los cebadores se unen a la secuencia objetivo.

AP74

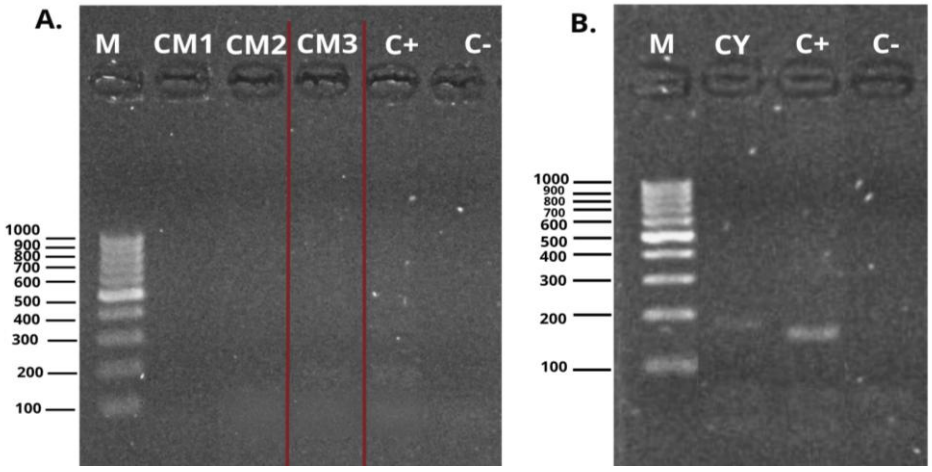
Concentración de Magnesio

En la Figura 3 se observan los resultados obtenidos durante la evaluación de las concentraciones de $MgCl_2$ para el microsatélite AP74. Utilizando las condiciones de 1,5 y 2,0 mM no se distinguieron productos de amplificación mientras que con la condición de 3,0 mM de $MgCl_2$ se observó una banda tenue en el carril CM3 (Figura 3A), localizada en la región correspondiente al producto esperado. Debido a que la señal únicamente fue detectada con la concentración de 3,0 mM, esta condición se repitió para su verificación (Figura 3B), en este segundo ensayo se observó nuevamente una señal, aunque tenue en la muestra de *C. yuracus*.

La aparición del producto únicamente al incrementar la concentración de $MgCl_2$ indica que AP74 presentó un requerimiento de magnesio mayor que D5S111 bajo las condiciones experimentales utilizadas. El Mg interviene como cofactor de la Taq ADN polimerasa y también influye en la estabilidad de la unión entre los cebadores y el ADN molde. Por esta razón, una concentración insuficiente puede disminuir el rendimiento de la reacción, mientras que concentraciones elevadas pueden favorecer la obtención de producto (Elnifro et al., 2000).

Figura 3

Evaluación de la concentración de $MgCl_2$ para la amplificación del microsatélite AP74



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5 %. **A.** Evaluación de la concentración de $MgCl_2$. M: marcador molecular, CM1, CM2 y CM3 corresponden a una muestra de *C. yuracus* amplificada con una concentración de magnesio de 1,5 mM, 2,0 mM y 3,0 mM, C+: control positivo; C−: control negativo. **B.** Verificación de la condición seleccionada: M, marcador molecular; CY, muestra de *C. yuracus* amplificada con 3,0 mM de $MgCl_2$ y una temperatura de hibridación de 52 °C.

La observación de una señal en dos ensayos independientes respaldó la selección de 3,0 mM de $MgCl_2$ y 52 °C como condiciones de amplificación para el microsatélite AP74, debido a que, dentro de los valores evaluados, permitieron detectar el producto tanto en el ensayo inicial como en la reacción de verificación y que a su vez corresponde con los parámetros reportados por Ellsworth y Hoelzer (1998) y Witte y Rogers (1999). Aunque la intensidad de la banda obtenida en *C. yuracus* fue menor que la del control positivo, la repetición de la señal bajo las mismas condiciones respaldó su utilización en los ensayos posteriores.

Estandarización de la amplificación por PCR dúplex de los microsatélites D5S111 y AP74

Evaluación de la concentración de Magnesio

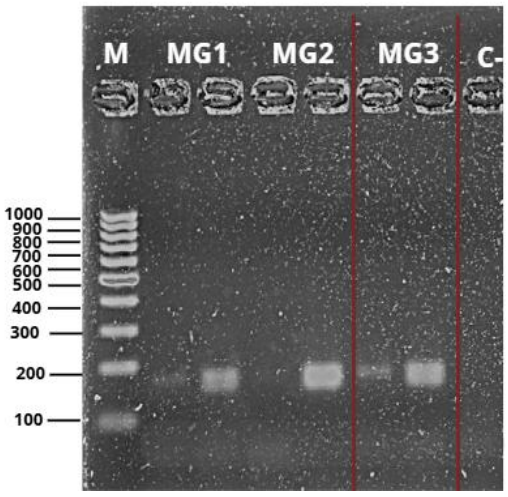
Una vez establecidas las condiciones de amplificación individual de AP74 y D5S111, se evaluó su integración en un sistema de PCR dúplex. En una reacción de este tipo se incorporan simultáneamente dos pares de cebadores para amplificar dos loci dentro de una misma mezcla,

lo que permite reducir el volumen de muestra, el consumo de reactivos y el número de reacciones requeridas (Elnifro et al., 2000). Sin embargo, la presencia de más de un par de cebadores también incrementa la posibilidad de interacciones entre ellos, formación de dímeros y amplificación preferencial de uno de los productos por lo que las condiciones individuales deben comprobarse nuevamente en la reacción conjunta (Bolivar et al., 2014).

La Figura 4 muestra los productos obtenidos durante la evaluación de concentraciones de $MgCl_2$ de 2,0, 2,5 y 3,0 mM para el sistema dúplex AP74–D5S111, utilizando una temperatura de hibridación de 53 °C, debido a que esta condición había producido la banda más definida durante la amplificación individual de D5S111 y se encontraba próxima a los 52 °C utilizados para AP74. Con 2,0 mM de $MgCl_2$ se observó una señal de menor intensidad, mientras que al incrementar la concentración a 2,5 y 3,0 mM se evidenciaron bandas más definidas en la región correspondiente a los productos de amplificación. Dentro de las condiciones evaluadas**,** la concentración de 3,0 mM permitió conservar señales visibles en el sistema dúplex y coincidió con la concentración que había permitido amplificar individualmente el microsatélite AP74.

Figura 4

Evaluación de la concentración de $MgCl_2$ para la amplificación del sistema dúplex AP74–D5S111



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5 %. M: marcador molecular, CM1, CM2 y CM3: muestra de *Cebus yuracus* amplificada con concentraciones finales de $MgCl_2$ de 2,0; 2,5 y 3,0 mM, respectivamente, y una temperatura de hibridación de 53 °C; C+: control positivo; C−: control negativo.

La necesidad de utilizar 3,0 mM en el sistema dúplex también puede relacionarse con la incorporación de cuatro cebadores dentro de la reacción. En comparación con una PCR individual, una PCR múltiple tiene una mayor cantidad de moléculas que son capaces de interactuar con el Mg y competir por otros componentes de la mezcla. Elnifro et al. (2000) señalan que la optimización de una reacción múltiple puede presentar menor sensibilidad o amplificación preferencial de determinados blancos, debido a diferencias en la eficiencia de hibridación y extensión de cada par de cebadores. Por ello, la concentración adecuada no podía definirse únicamente a partir de los 2,0 mM seleccionados para D5S111, sino que debía permitir también la amplificación del locus más exigente, que en este caso fue AP74.

Evaluación de la temperatura de hibridación

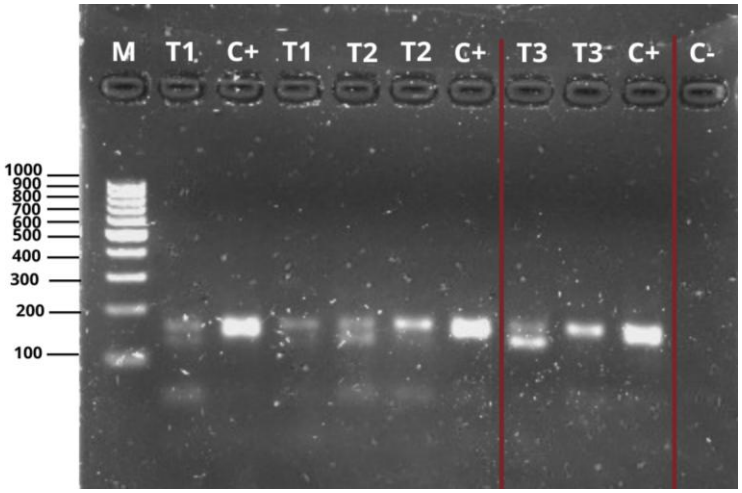
Después de seleccionar 3,0 mM de $MgCl_2$, se evaluaron temperaturas de hibridación de 52 °C, 53 °C y 54 °C para el sistema dúplex AP74–D5S111. La temperatura constituye uno de los parámetros más sensibles de la PCR, debido a que regula la estabilidad de la unión entre cada cebador y su secuencia complementaria (Bolivar et al., 2014). En una reacción dúplex, la condición seleccionada debe permitir que los dos pares de cebadores se unan a sus respectivos blancos con una eficiencia suficiente, sin favorecer de manera marcada la amplificación de un solo locus (Lorenz, 2012).

Como se observa en la Figura 5, a 52 °C y 53 °C se detectó amplificación en las muestras evaluadas, sin embargo, las señales presentaron menor intensidad y definición que las obtenidas a 54 °C. En esta última condición se observaron bandas más intensas y uniformes tanto en las muestras de *Cebus yuracus* como en el control positivo. El control

negativo no presentó productos visibles, por lo que no se detectaron evidencias de contaminación en las reacciones evaluadas.

Figura 5

Estandarización de la temperatura de hibridación para la amplificación del dúplex AP74–D5S111



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5 %. M: marcador molecular; T1, T2 y T3 corresponden a las dos mismas muestras de *C. yuracus* amplificadas a 52 °C, 53 °C y 54 °C, respectivamente, C+: controles positivos correspondientes a cada temperatura; C−: control negativo.

Las temperaturas de 52 y 53 °C se seleccionaron inicialmente a partir de los ensayos individuales. AP74 había amplificado a 52 °C, mientras que D5S111 presentó su señal más definida a 53 °C. No obstante, la incorporación simultánea de ambos pares de cebadores modificó el comportamiento de la reacción. Elnifro et al. (2000) indican que el desempeño de una PCR múltiple depende de que los cebadores presenten eficiencias y temperaturas de hibridación compatibles; cuando estas no son idénticas, la condición final debe establecerse experimentalmente para reducir la amplificación preferencial de uno de los blancos.

En consecuencia, se seleccionó la temperatura de hibridación de 54 °C y 3,0 mM de $MgCl_2$ como condiciones finales para la amplificación del dúplex AP74–D5S111, debido a que

esta combinación produjo el mejor desempeño general dentro de las condiciones evaluadas. Aunque AP74 había presentado amplificación individual a 52 °C, el incremento hasta 54 °C favoreció la intensidad y definición de los productos en la reacción conjunta sin impedir su amplificación.

Estandarización de la amplificación por PCR dúplex de los microsatélites PEPC40 y PEPC59

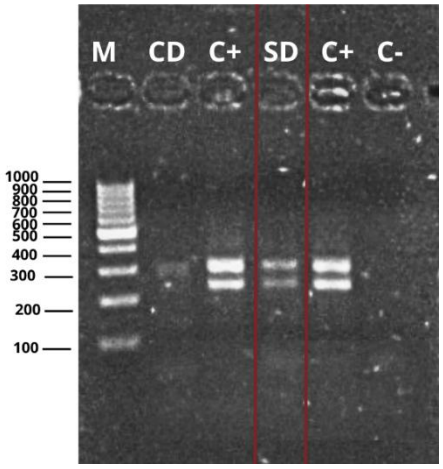
Evaluación de la influencia del DMSO

En la Figura 6 se puede observar la amplificación de la muestra con los microsatélites PEPC40 y PEPC59 en presencia y ausencia de DMSO. En la reacción suplementada con DMSO se observó amplificación, sin embargo, las bandas obtenidas en la muestra de *C. yuracus* presentaron menor intensidad y no permitieron distinguir ambos productos con la misma claridad. En contraste, en la reacción sin DMSO se observaron las bandas más definidas tanto en la muestra de *C. yuracus* como en el control positivo.

Endara Ibarra (2024) probó concentraciones de 3, 4 y 5 % y seleccionó 4 % junto con una temperatura de hibridación de 57 °C. Sin embargo, una condición favorable para una PCR individual no necesariamente mantiene el mismo efecto al incorporar un segundo par de cebadores, debido a que la composición y las interacciones dentro de una PCR múltiple cambian con respecto a una reacción simplex (Elnifro et al., 2000).

Figura 6

Comparación de la amplificación del dúplex PEPC40–PEPC59 con y sin DMSO



Nota. Electroforesis en gel de agarosa de 2,5 %, M: marcador molecular; CD: muestra de *Cebus yuracus* amplificada con 3 % de DMSO, SD: muestra de *C. yuracus* amplificada sin DMSO; C+ repetido bajo las condiciones de las muestras respectivamente.

Por esta razón, la menor definición observada con 3 % de DMSO no contradice los resultados obtenidos previamente para PEPC40, sino que demuestra que la utilidad de un aditivo debe comprobarse nuevamente al conformar un sistema dúplex. En las condiciones del presente estudio, el DMSO no mejoró la amplificación simultánea de PEPC40 y PEPC59 y su retiro favoreció la diferenciación de ambos productos.

En cuanto a la temperatura se hizo bajo las condiciones de PEPC40 quien requería su temperatura de hibridación a 57 °C, pues temperaturas menores presentaban bandas inespecíficas (Endara, 2024). Para PEPC59 no fue necesario realizar ensayos adicionales de optimización y se conservó una temperatura de hibridación de 55 °C. En cambio, PEPC40 presentó productos inespecíficos bajo las condiciones iniciales, por lo que Endara Ibarra (2024) estableció una temperatura de 57 °C y la incorporación de DMSO al 4 %, condiciones que redujeron la formación de estructuras secundarias y bandas inespecíficas, sin embargo como se observa en esta reacción dúplex al retirar el uso del DMSO se logran ver bandas claras en la

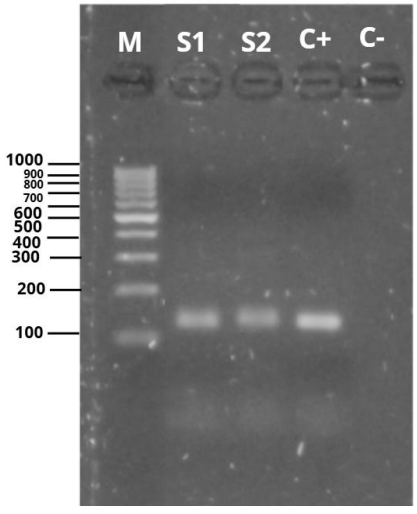
muestra como en el control, el DMSO se utiliza en PCR porque actúa como agente desnaturalizante y disminuye la estabilidad de las estructuras secundarias formadas por el ADN, este efecto puede facilitar la separación de las cadenas y favorecer la amplificación de regiones que presentan estructuras difíciles de desnaturalizar (Lorenz, 2012). No obstante, el DMSO no siempre mejora el rendimiento de la PCR. Concentraciones superiores al 2 % pueden disminuir parcialmente la actividad de la Taq ADN polimerasa y requerir ajustes en la cantidad de enzima utilizada (Lorenz, 2012).

Estandarización de la amplificación por PCR del microsatélite CEB07

La amplificación del microsatélite Ceb07 se obtuvo satisfactoriamente mediante la aplicación directa de las condiciones descritas por Muniz y Vigilant (2008). Como se observa en la Figura 7, las dos muestras de *C. yuracus* y el control positivo presentaron bandas claras y definidas, ubicadas en una región de migración similar. No se observaron productos inespecíficos evidentes ni amplificación en el control negativo. Por lo tanto, no fue necesario realizar gradientes adicionales de temperatura de hibridación, $MgCl_2$ u otros componentes de la mezcla de reacción. Estos resultados evidenciaron la transferibilidad del marcador entre especies del género *Cebus* bajo las condiciones evaluadas.

Figura 7

Verificación de las condiciones de amplificación del microsatélite Ceb07 en Cebus yuracus



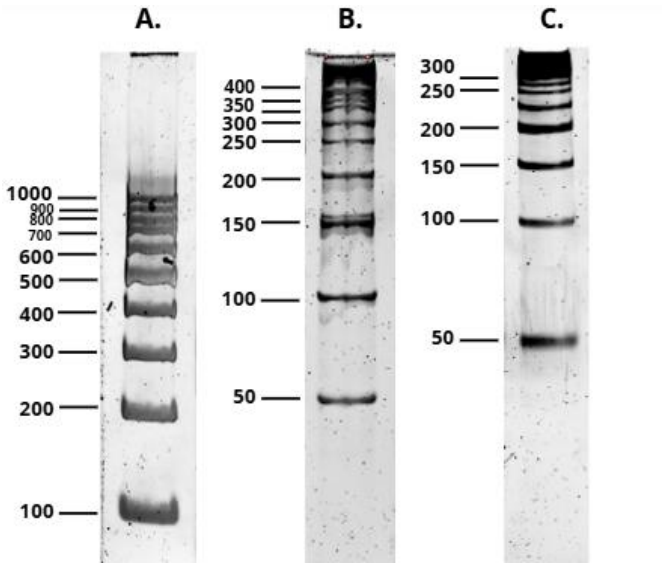
Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5 %. M: marcador molecular; S1 y S2: muestras de *Cebus yuracus*; C+: control positivo; C−: control negativo. Las muestras y el control positivo presentaron bandas claras y definidas, sin productos inespecíficos evidentes, mientras que el control negativo no mostró amplificación.

Optimización de la electroforesis en poliacrilamida

La Figura 8 muestra el patrón de migración de dos marcadores de peso molecular en geles de poliacrilamida no desnaturalizante al 8, 10 y 12 %. Estas concentraciones se evaluaron con el propósito de seleccionar una matriz que permitiera separar los productos de los cinco microsatélites, cuyos tamaños esperados abarcaban aproximadamente desde 110 hasta 321 pb. Dentro de este intervalo, AP74, D5S111 y Ceb07 se encontraban principalmente entre 100 y 200 pb, mientras que PEPC40 y PEPC59 presentaban productos de mayor tamaño.

Figura 8

Evaluación de la concentración del gel de poliacrilamida no desnaturalizante



Nota. Patrón de migración del marcador molecular en geles de poliacrilamida no desnaturalizante preparados a diferentes concentraciones. A. Gel al 8 % con el marcador GeneRuler 1000 pb de Thermo Fisher; B y C corresponden a un gel al 10 % y 12 % respectivamente con el marcador Opti-DNA de 100 pb ABM

La concentración de poliacrilamida determina el tamaño de los poros de la matriz. Al incrementar la proporción de acrilamida se forman poros más pequeños, lo que reduce la velocidad de migración y favorece la separación de fragmentos pequeños; por el contrario, los geles de menor concentración poseen poros más amplios y permiten un desplazamiento más rápido de fragmentos de mayor tamaño (Thermo Fisher Scientific, 2012). En el gel al 8 % se observó una mayor migración de los fragmentos. Sin embargo, bajo las condiciones ensayadas, la distribución del marcador no proporcionó la separación más conveniente en la región comprendida entre 100 y 200 pb, intervalo en el que se encontraban tres de los microsatélites evaluados. Aunque los geles no desnaturalizantes al 8 % pueden separar un intervalo amplio de aproximadamente 60–400 pb, su mayor tamaño de poro puede ofrecer una menor discriminación entre fragmentos pequeños y de tamaños próximos dentro de ese rango (Thermo Fisher Scientific, 2012)

El gel al 12 % presentó una mayor retención de los fragmentos y requirió un tiempo superior de electroforesis para alcanzar una migración comparable. Además, su menor tamaño de poro limitó el desplazamiento de los fragmentos de mayor tamaño dentro del intervalo evaluado. En contraste, el gel al 10 % mostró una distribución más equilibrada del marcador, con una separación visible entre los fragmentos del intervalo de interés y un tiempo de corrida menor que el requerido por el gel al 12 %. En consecuencia, se seleccionó la concentración de poliacrilamida no desnaturalizante al 10 % para la separación posterior de los productos de los microsatélites, debido a que representó el mejor equilibrio entre resolución, intervalo de separación y duración de la electroforesis dentro de las condiciones evaluadas.

La selección de poliacrilamida también fue adecuada para el análisis de microsatélites, debido a que sus alelos pueden diferenciarse por un número reducido de pares de bases. La electroforesis en agarosa puede resultar insuficiente para distinguir fragmentos microsatélites de tamaños próximos, lo que justifica el uso de poliacrilamida como una matriz de mayor resolución (Kulibaba & Liashenko, 2016). Sin embargo, al tratarse de un gel no

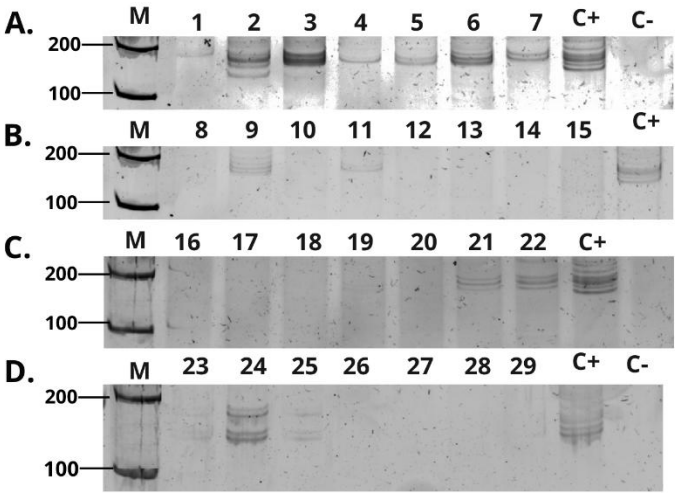
desnaturalizante, la lectura debía realizarse con cautela, ya que los productos de microsatélites pueden formar heterodúplex y otras estructuras secundarias capaces de modificar su movilidad y originar bandas adicionales (Kulibaba & Liashenko, 2016).

Evaluación de la amplificación del dúplex AP74 y D5S111 en las muestras de *Cebus yuracu*s

La Figura 9 muestra los productos obtenidos durante la evaluación del sistema dúplex AP74–D5S111 en 29 muestras no invasivas de *C. yuracus* descritas en la Tabla 1, en la cual se observaron diferencias en la intensidad y definición de las bandas entre las muestras analizadas. Algunas presentaron productos claramente visibles, mientras que en otras no se detectó una señal suficientemente definida para continuar con la genotipificación.

Figura 9

Evaluación de la amplificación del dúplex AP74–D5S111 en muestras de Cebus yuracus



Nota. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %. A. Muestras 1–7; B. muestras 8–15; C. muestras 16–22; D. muestras 23–29. M: marcador molecular; 1–29: numeración correspondiente a las muestras descritas en la Tabla 1; C+: control positivo; C−: control negativo.

La variación observada era posible debido a la naturaleza no invasiva del material biológico, ya que las muestras de heces suelen contener una cantidad reducida de células del organismo y, en consecuencia, una menor proporción de ADN endógeno que las muestras obtenidas a partir de sangre o tejido (Inoue, 2015). Además, la exposición previa a condiciones ambientales, el tiempo transcurrido antes de la conservación y el almacenamiento pueden afectar la integridad del ADN y generar diferencias entre muestras recolectadas bajo un mismo procedimiento (Waits & Paetkau, 2005). En las muestras fecales pueden permanecer compuestos capaces de interferir con la PCR como polisacáridos complejos que pueden inhibir la actividad de la ADN polimerasa y reducir o impedir la formación del producto de amplificación (Monteiro et al., 1997). Por ello, la ausencia de una banda definida en determinadas muestras no demuestra que los loci AP74 o D5S111 estuvieran ausentes en esos individuos, sino que indica que el ADN disponible no produjo una señal interpretable bajo las condiciones aplicadas.

De las 29 muestras evaluadas, 16 presentaron amplificación de las cuales 12 corresponden a individuos de Misahuallí y 4 del centro de rescate, las cuales además fueron seleccionadas para el análisis posterior en geles de poliacrilamida. Las muestras amplificadas correspondieron a los códigos MI-001, MI-002, MI-003, MI-004, MI-005, MI-006, MI-007, MI-008, MI-010, MI-012, MI-014, FD-103, PM-034-D, PM-003-F, PM-012-D y PM-011-D. Este resultado representa una tasa de amplificación del 55,17 % para el sistema dúplex bajo las condiciones evaluadas.

Los controles positivos mostraron productos de amplificación, mientras que los controles negativos no presentaron señales evidentes, lo que permitió descartar contaminación en las reacciones. Las muestras seleccionadas fueron posteriormente analizadas mediante electroforesis en poliacrilamida para obtener una mayor resolución de los fragmentos y realizar la asignación aproximada de los alelos de cada locus.

La amplificación de microsatélites a partir de material no invasivo es viable, pero requiere controles estrictos porque una baja cantidad de ADN puede incrementar el riesgo de

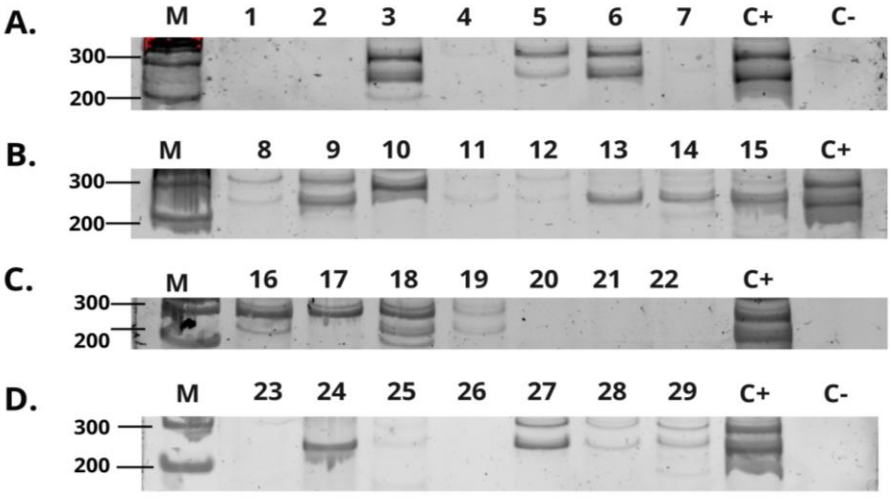
fallos de amplificación y pérdida de uno de los alelos de un individuo heterocigoto (Waits & Paetkau, 2005). En estudios con capuchinos silvestres, Muniz y Vigilant (2008) utilizaron muestras fecales para genotipificar microsatélites, pero acompañaron el procedimiento con métodos controlados de conservación, extracción y cuantificación del ADN, por lo que se puede concluir que las muestras de origen fecal son útiles. Sin embargo, los resultados de amplificación pueden variar debido a las diferencias en los loci, la especie, la calidad de las muestras y los procedimientos de análisis.

Evaluación de la amplificación del dúplex PEPC40 y PEPC59 en las muestras de *Cebus yuracu*s

La Figura 10 muestra los productos obtenidos durante la evaluación del sistema dúplex PEPC40–PEPC59 en 29 colectas fecales no invasivas de *Cebus yuracus*, descritas en la Tabla 1. De este total, 22 colectas procedían de Misahuallí y pertenecían a 13 individuos, debido a que algunos contaban con dos o tres muestras fecales recolectadas en momentos diferentes. Las siete colectas restantes correspondían al centro de rescate y representaban a siete individuos distintos, ya que en este grupo se disponía de una sola muestra por individuo. En conjunto, las 29 colectas analizadas representaron a 20 individuos.

Figura 10

Evaluación de la amplificación del dúplex PEPC40 y PEPC59 en muestras de Cebus yuracus



Nota. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %. A. Muestras 1–7; B. muestras 8–15; C. muestras 16–22; D. muestras 23–29. M: marcador molecular; 1–29: numeración correspondiente a las muestras descritas en la Tabla 1; C+: control positivo; C−: control negativo.

La intensidad y definición de las bandas variaron entre las colectas evaluadas. En algunas se observaron productos de amplificación claramente definidos, mientras que en otras las señales fueron tenues o no permitieron reconocer un patrón suficientemente claro para continuar con la genotipificación. Esta variación también se presentó entre colectas pertenecientes a un mismo individuo. De las 29 colectas analizadas, 20 presentaron una señal compatible con la amplificación del sistema dúplex, lo que corresponde a una tasa de amplificación del 68,97 %. Cabe aclarar que cuando existía más de una colecta amplificada para el mismo individuo, se seleccionó aquella que presentó las bandas de mayor intensidad y definición.

En las muestras fecales, la cantidad de células del hospedador no es uniforme y el ADN puede encontrarse degradado o acompañado de sustancias capaces de interferir con la PCR, entre ellas sales biliares y polisacáridos complejos (Goossens et al., 2000). Esto explica por qué dos colectas pertenecientes al mismo individuo pueden generar bandas con diferente intensidad. Por esa razón, una señal débil o ausente en una colecta no permite concluir que el individuo carezca del locus analizado.

Selección de las colectas para la genotipificación

Debido a que algunos individuos de Misahuallí contaban con más de una colecta fecal, estas muestras no fueron consideradas unidades independientes. Las colectas disponibles para un mismo individuo se compararon con el propósito de seleccionar la que presentara el patrón más adecuado para la genotipificación. Para cada individuo y protocolo de PCR para los cinco microsatélites se seleccionó la colecta que presentó bandas de mayor definición y reproducibilidad, sin productos inespecíficos que pudieran dificultar la interpretación. La

muestra seleccionada fue utilizada en las corridas finales de poliacrilamida para la asignación aproximada de los tamaños alélicos, mientras que las colectas restantes no fueron incluidas.

En el caso del microsatélite Ceb07, la evaluación de la amplificación se realizó directamente en gel de poliacrilamida. Eso quiere decir que la selección de la colecta y la lectura de los alelos se efectuaron a partir de las mismas corridas, siempre que el patrón obtenido permitiera distinguir claramente las bandas correspondientes. Las colectas seleccionadas para cada individuo y sistema se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18

Colectas seleccionadas para la genotipificación de los microsatélites

Numeración	Población	PEPC40–PEPC59	AP74–D5S111	Ceb07
1	Misahuallí	MI-001-E	MI-001-E	MI-001-E
2	Misahuallí	MI-002-E	MI-002-E	MI-002-E
3	Misahuallí	MI-004-D	MI-005-E	MI-003-D
4	Misahuallí	MI-005-F	MI-007-D	MI-005-D
5	Misahuallí	MI-006-D	MI-006-D	MI-006-D
6	Misahuallí	MI-007-D	MI-008-D	MI-007-E
7	Misahuallí	MI-008-D	MI-010-E	MI-008-D
8	Misahuallí	MI-009-D	MI-012-D	MI-010-E
9	Misahuallí	MI-010-E	FD-103	MI-012-D
10	Misahuallí	MI-012-D	MI-003-D	MI-014-D
11	Misahuallí	MI-014-D	MI-014-D	FD-103
12	Misahuallí		MI-004-E	
13	Centro de rescate	PM-003-F	PM-003-F	PM-003-F
14	Centro de rescate	PM-004-D	PM-004-D	PM-004-D
15	Centro de rescate	PM-011-D	PM-011-D	PM-011-D

Numeración	Población	PEPC40–PEPC59	AP74–D5S111	Ceb07
16	Centro de rescate	PM-012-D	PM-034-D	
17	Centro de rescate	PM-029-D	PM-034-D	

Nota. Las letras D, E y F corresponden a colectas fecales diferentes pertenecientes a un mismo individuo.

Genotipificación y caracterización de los alelos

Una vez seleccionada una colecta representativa por individuo, los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 10 %. Los carriles se identificaron mediante códigos numéricos abreviados, cuya correspondencia con el individuo se presenta en la Tabla 19. La asignación de los alelos se realizó mediante la comparación de la posición de las bandas con los fragmentos del marcador molecular. Debido a que la lectura se efectuó visualmente en geles de poliacrilamida no desnaturalizante, los valores obtenidos corresponden a estimaciones aproximadas del tamaño de los alelos y no a una determinación exacta de la longitud de los fragmentos.

Tabla 19

Genotipos estimados a partir de la corrida del sistema dúplex PEPC40 y PEPC59

Individuo	PEPC40 alelo 1	PEPC40 alelo 2	PEPC59 alelo 1	PEPC59 alelo 2
MI-001	223	231	280	300
MI-002	0	0	282	310
MI-004	0	0	280	300
MI-005	231	237	294	294
MI-006	0	0	292	310
MI-007	221	233	282	310
MI-008	223	237	292	292
MI-009	221	233	300	300
MI-010	221	233	284	300

Individuo	PEPC40 alelo 1	PEPC40 alelo 2	PEPC59 alelo 1	PEPC59 alelo 2
MI-012	233	233	292	292
MI-014	233	233	292	292
PM-003-F	221	221	300	300
PM-004-D	223	223	282	282
PM-012-D	221	231	292	310
PM-029-D	223	223	292	310
PM-011-D	221	233	282	310

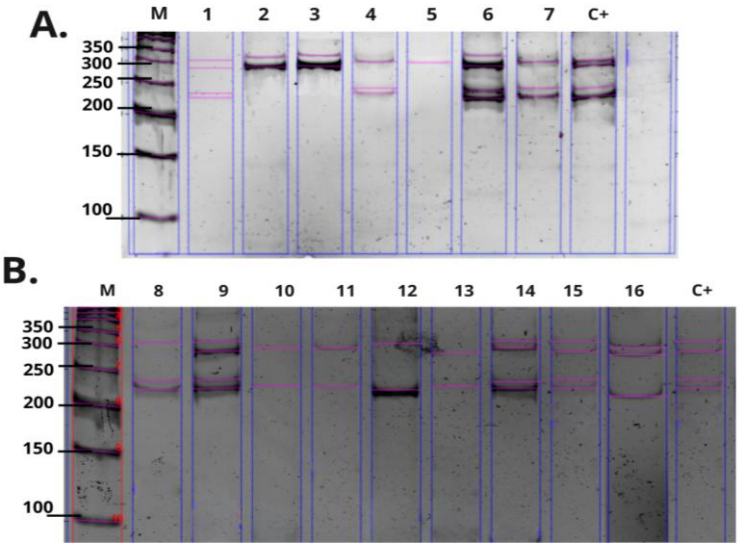
Este criterio fue necesario porque la amplificación de microsatélites puede generar productos adicionales, como bandas stutter, heterodúplex y homodúplex no lineales, que pueden confundirse con alelos verdaderos durante la lectura en geles de poliacrilamida no desnaturalizante (Kulibaba & Liashenko, 2016).

PCR dúplex PEPC40 y PEPC59

La Figura 11 muestra los patrones obtenidos para el sistema dúplex PEPC40–PEPC59 en las colectas seleccionadas. La definición de los productos permitió estimar los tamaños alélicos de ambos loci en la mayoría de los individuos. Sin embargo, el éxito de la genotipificación no fue igual para los dos microsatélites, pese a que se amplificaron dentro de una misma reacción.

Figura 11

Genotipificación del sistema dúplex PEPC40 y PEPC59 en las muestras seleccionadas



Nota. Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 10 %. M: marcador molecular; A. representa las muestras de 1–7 y B. las muestras de la 8–16 seleccionadas para la genotipificación, cuya correspondencia con los códigos de los individuos y las colectas se presenta en la Tabla 18, C+: control positivo.

En los individuos MI-002, MI-004 y MI-006 se obtuvo un patrón interpretable para PEPC59, pero no fue posible confirmar las bandas correspondientes a PEPC40. Estos casos fueron registrados como genotipos incompletos para PEPC40 y excluidos únicamente de los análisis de ese locus. La amplificación de PEPC59 en las mismas reacciones indicó que la ausencia de un genotipo para PEPC40 no corresponde necesariamente a una falla total de la PCR, sino que pudo relacionarse con diferencias en la eficiencia de amplificación entre los dos marcadores.

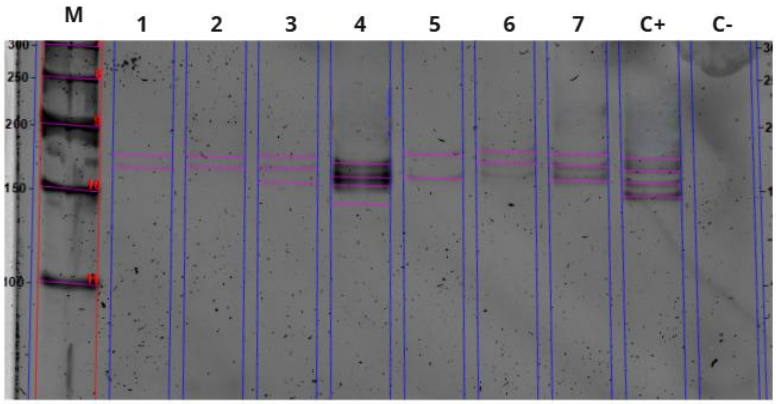
Una de las explicaciones posibles para la falta de amplificación de un locus es la presencia de alelos nulos, los cuales pueden originarse por cambios en las regiones de unión de los cebadores e impedir la amplificación de uno de los alelos (Chapuis & Estoup, 2007), pero también la cantidad limitada de ADN, la pérdida alélica o la amplificación preferencial de PEPC59 dentro del sistema dúplex podrían producir un patrón semejante.

PCR dúplex D5S111 y AP74

Las Figuras 12 y 13 muestran los patrones electroforéticos obtenidos para el sistema dúplex AP74–D5S111 en los 16 individuos seleccionados. La comparación de la posición de las bandas con el marcador molecular permitió estimar los tamaños alélicos y establecer los genotipos presentados en la Tabla 20. El éxito de la genotipificación fue diferente entre los dos microsatélites. Para D5S111 se obtuvieron genotipos interpretables en los 16 individuos analizados. En cambio, para AP74 fue posible asignar genotipos completos en 11 individuos.

Figura 12

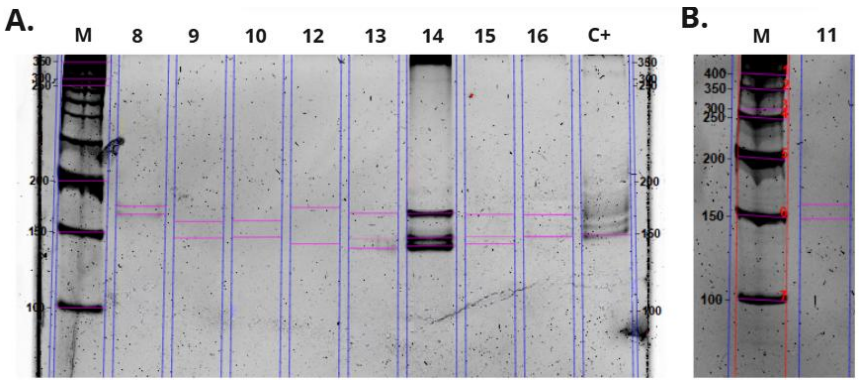
Genotipificación del sistema dúplex AP74–D5S111 en las muestras seleccionadas



Nota. Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 10 %. M: marcador molecular; 1–7: muestras seleccionadas para la genotipificación, cuya correspondencia con los códigos de los individuos y las colectas se presenta en la Tabla 18, C+: control positivo.

Figura 13

Genotipificación del sistema dúplex AP74–D5S111 en las muestras seleccionadas



Nota. Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 10 %. M: marcador molecular; 8–16: muestras seleccionadas para la genotipificación, cuya correspondencia con los códigos de los individuos y las colectas se presenta en la Tabla 18, C+: control positivo.

Tabla 20

Genotipos estimados a partir de la corrida del sistema dúplex D5S111 y AP74

Individuo	D5S111 alelo 1	D5S111 alelo 2	AP74 alelo 1	AP74 alelo 2
MI-001	167	173	0	0
MI-002	167	173	0	0
MI-003	158	158	146	146
MI-004	173	173	142	142
MI-005	167	173	154	154
MI-006	158	167	142	152
MI-007	158	173	0	0
MI-008	167	177	0	0
MI-010	167	177	156	156
MI-012	167	173	0	0
MI-014	173	173	142	142
FD-103	158	158	146	146
PM-034-D	167	167	142	146
PM-003-F	177	177	142	146

Individuo	D5S111 alelo 1	D5S111 alelo 2	AP74 alelo 1	AP74 alelo 2
PM-004-D	167	167	142	146
PM-011-D	167	167	146	146

La menor recuperación de AP74 fue coherente con su comportamiento durante la etapa de estandarización, en la que este microsatélite presentó una amplificación más débil que D5S111. Esta diferencia indica que, aunque ambos loci fueron incluidos en la misma reacción dúplex, no necesariamente presentaron la misma eficiencia de amplificación. En una PCR múltiple puede producirse una amplificación preferencial de uno de los loci cuando existen diferencias en la afinidad de los cebadores, la concentración del ADN molde o la eficiencia de formación de cada producto (Elnifro et al., 2000).

Los resultados no confirmados de AP74 fueron tratados como datos faltantes. Una banda ausente o poco definida puede estar relacionada con una cantidad limitada de ADN, pérdida alélica o menor eficiencia de amplificación del locus. Aunque los alelos nulos también pueden impedir la amplificación cuando existen variaciones en la región de unión de los cebadores (Chapuis & Estoup, 2007), su presencia no puede confirmarse únicamente a partir de la ausencia de bandas en el gel.

PCR simplex CEB07

Debido al volumen final reducido de la reacción de PCR, establecido con un volumen de 12,5 µL, la evaluación de la amplificación del microsatélite Ceb07 se realizó directamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 10 %. Esta concentración permitió conservar el producto disponible y efectuar, dentro de las mismas corridas, tanto la selección de las colectas como la estimación aproximada de los tamaños alélicos (Tabla 21).

Tabla 21

Genotipos estimados a partir de la PCR para el microsatélite CEB07

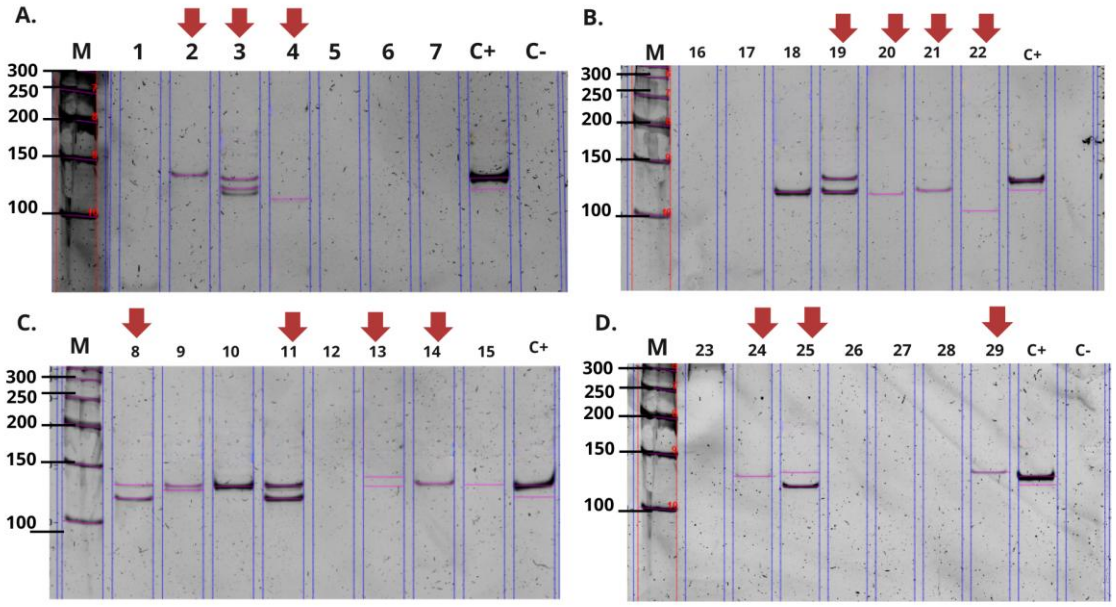
Individuo	CEB07 alelo 1	CEB07 alelo 2
MI-001	130	130
MI-002	118	126
MI-003	110	110
MI-005	118	130
MI-006	118	130
MI-007	130	138
MI-008	130	130
MI-010	118	130
MI-012	118	118
MI-014	118	118
FD-103	110	110
PM-003-F	126	126
PM-004-D	118	130
PM-011-D	130	130

Nota. Los tamaños alélicos se expresan en pares de bases y corresponden a estimaciones aproximadas obtenidas mediante comparación con el marcador molecular.

La Figura 14 muestra los patrones obtenidos en las 29 colectas fecales evaluadas. Las flechas señalan aquellas que presentaron bandas suficientemente definidas para continuar con la asignación de genotipos. Cuando existía más de una colecta del mismo individuo, se conservó la que proporcionó el patrón más claro, sin considerar las colectas restantes como unidades biológicas independientes.

Figura 14

Selección de muestras y genotipificación del microsatélite Ceb07 en Cebus yuracus



Nota. Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 10 %. A. Muestras 1–7, B. muestras 16–22, C. muestras 8–15, D. muestras 23–29. M: marcador molecular. 1–29: numeración correspondiente a las muestras descritas en la Tabla 1, C+: control positivo; C−: control negativo. Las flechas rojas indican las muestras seleccionadas para la genotipificación, debido a que presentaron bandas definidas e interpretables.

A partir de esta evaluación se obtuvieron genotipos interpretables para 14 individuos, correspondientes a 11 ejemplares de Misahuallí y tres del centro de rescate. Este resultado representa una recuperación de genotipos del 70 % respecto de los 20 individuos considerados inicialmente. Ceb07 fue desarrollado originalmente para *Cebus capucinus* y corresponde a un microsatélite tetranucleotídico con una repetición de tipo $(AGAT)_{10}$ (Muniz & Vigilant, 2008). La obtención de genotipos en *C. yuracus* aporta evidencia de que las regiones flanqueantes reconocidas por sus cebadores se encuentran suficientemente conservadas para permitir la amplificación interespecífica. En los individuos analizados se identificaron cinco clases alélicas aproximadas y que concuerdan con el rango establecido por Muniz y Vigilant (2008) quienes

reportaron originalmente cuatro alelos entre 119 y 135 pb para Ceb07 en *C. capucinus*. Aunque algunos de los valores obtenidos en el presente estudio quedaron fuera de ese intervalo, esta diferencia no permite afirmar que se hayan identificado alelos nuevos en *C. yuracus.*

El número de individuos genotipados varió entre microsatélites debido a las diferencias en el éxito de amplificación. Los individuos que no presentaron amplificación en un locus fueron excluidos únicamente del análisis correspondiente a dicho microsatélite. Sin embargo, el individuo PM-026-D que no presentó genotipos interpretables en ninguno de los loci fue excluido de la matriz utilizada para los análisis genéticos.

Frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas obtenidas para cada locus se presentan de manera detallada en la Tabla 22, mientras que la Figura 15 permite comparar visualmente su distribución entre los grupos de Misahuallí y el centro de rescate. En términos generales, el gráfico muestra que las frecuencias no se distribuyeron de manera uniforme entre los alelos ni entre los loci. Misahuallí presentó un mayor número de variantes alélicas observadas, mientras que en el centro de rescate algunos loci estuvieron representados por uno o dos alelos con frecuencias relativamente elevadas. Este patrón fue especialmente evidente en D5S111, donde el alelo de 167 pb alcanzó una frecuencia de 0,750 en el centro de rescate, mientras que para el locus AP74 se observaron los alelos de 142 y 146 pb en este grupo.

Tabla 22

Frecuencias alélicas entre poblaciones

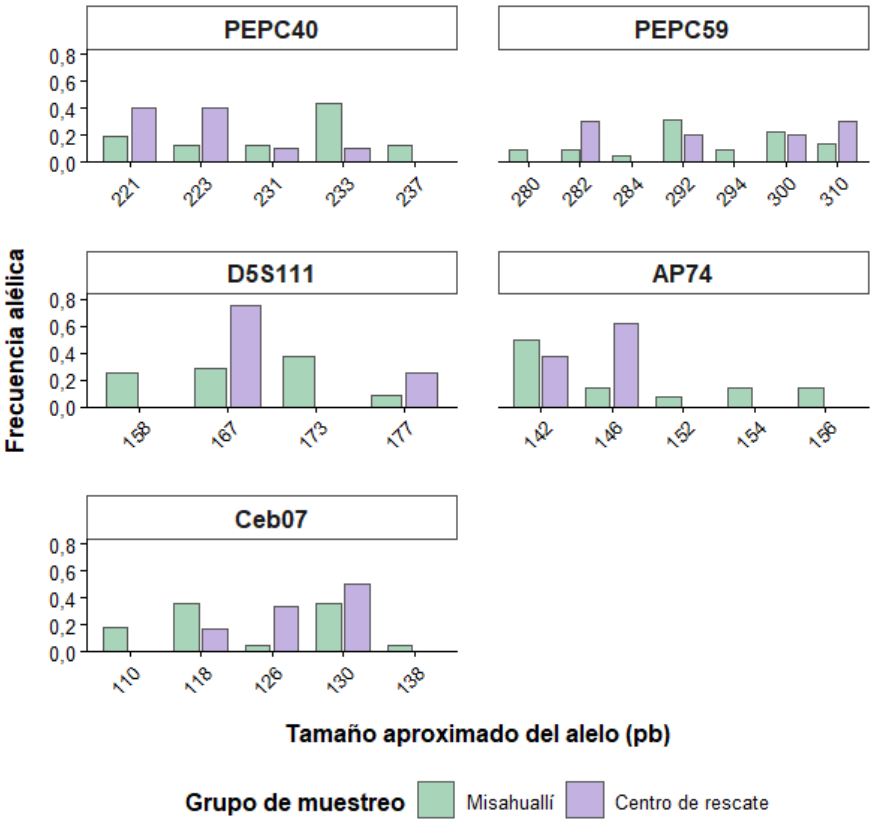
Locus	Alelo (pb)	Misahuallí	Centro de rescate
PEPC40	221	0,188	0,400
	223	0,125	0,400
	231	0,125	0,100
	233	0,438	0,100
	237	0,125	0,000

Locus	Alelo (pb)	Misahuallí	Centro de rescate
PEPC59	280	0,091	0,000
	282	0,091	0,300
	284	0,045	0,000
	292	0,318	0,200
	294	0,091	0,000
	300	0,227	0,200
	310	0,136	0,300
D5S111	158	0,250	0,000
	167	0,292	0,750
	173	0,375	0,000
	177	0,083	0,250
AP74	142	0,500	0,375
	146	0,143	0,625
	152	0,071	0,000
	154	0,143	0,000
	156	0,143	0,000
CEB07	110	0,182	0,000
	118	0,364	0,167
	126	0,045	0,333
	130	0,364	0,500
	138	0,045	0,000

Nota. Las frecuencias se calcularon considerando únicamente los individuos con genotipos interpretables para cada locus. El valor 0,000 indica que el alelo no fue observado en el grupo analizado.

Figura 15

Frecuencias alélicas de los cinco microsatélites en los grupos de Misahuallí y el centro de rescate



Nota. Los tamaños alélicos corresponden a estimaciones aproximadas obtenidas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante. La ausencia de una barra indica que el alelo no fue observado en el grupo correspondiente.

En el caso del microsatélite PEPC59, este presentó el mayor número de alelos, con siete clases alélicas. PEPC40, AP74 y Ceb07 presentaron cinco alelos cada uno, mientras que en D5S111 se registraron cuatro. En PEPC40, el alelo estimado de 233 pb presentó la mayor frecuencia en Misahuallí, con 0,438. En el centro de rescate, los alelos de 221 y 223 pb alcanzaron las frecuencias más elevadas, con 0,400 cada uno. El alelo de 237 pb únicamente fue observado en Misahuallí dentro del conjunto analizado.

El número de variantes encontrado para PEPC40 fue ligeramente superior al registrado originalmente por Escobar-Páramo (2000), quien reportó cuatro alelos para este microsatélite en 30 individuos de *Cebus apella*. Sin embargo, esta diferencia no permite concluir que *C.*

yuracus presente una diversidad genética mayor en este locus, debido a que los estudios evaluaron especies, tamaños muestrales y métodos de estimación alélica diferentes.

El microsatélite PEPC59 fue el que presentó un mayor número de variantes alélicas, en Misahuallí el alelo de 292 pb presentó la frecuencia más elevada, con 0,318, mientras que, en el centro de rescate, los alelos de 282 y 310 pb mostraron las mayores frecuencias, con 0,300 cada uno. Los alelos estimados de 280, 284 y 294 pb fueron observados únicamente en Misahuallí. Escobar-Páramo (2000) también reportó siete alelos para PEPC59 en 71 individuos de *C. apella*. La coincidencia en el número de variantes respalda el carácter polimórfico de este microsatélite en capuchinos. No obstante, esto no significa que en ambos estudios se hayan identificado exactamente los mismos alelos, debido a las diferencias entre las especies analizadas y las técnicas utilizadas para determinar el tamaño de los fragmentos.

En D5S111 se registraron cuatro clases alélicas estimadas. El alelo de 173 pb fue el más frecuente en Misahuallí, con 0,375. En el centro de rescate predominó el alelo de 167 pb, con una frecuencia de 0,750. Esta frecuencia elevada debe interpretarse con cautela, debido a que en este grupo el cálculo se realizó únicamente con cuatro individuos. Por tanto, seis de las ocho copias alélicas correspondieron al alelo de 167 pb. Los alelos de 158 y 173 pb no fueron observados en el centro de rescate, sin embargo, esta ausencia no permite afirmar que dichos alelos no estén presentes en otros individuos de esa procedencia, porque el tamaño reducido de la muestra disminuye la probabilidad de detectar variantes de baja frecuencia.

Para AP74 se identificaron cinco alelos en Misahuallí. El alelo estimado de 142 pb presentó la mayor frecuencia, con 0,500. Los alelos de 146, 154 y 156 pb mostraron una frecuencia de 0,143 cada uno, mientras que el alelo de 152 pb presentó la frecuencia más baja, con 0,071. En el centro de rescate únicamente se observaron los alelos de 142 y 146 pb, dentro de este grupo, el alelo de 146 pb fue el más frecuente, con 0,625, mientras que el alelo de 142 pb presentó una frecuencia de 0,375. Este resultado se obtuvo a partir de cuatro individuos, equivalentes a ocho copias alélicas. La amplificación y la variación observadas para

AP74 respaldan su utilidad como marcador polimórfico en los individuos de *Cebus yuracus* analizados como lo describió Cortés-Ortiz et al. (2010) y Ruiz-García et al. (2007). La amplificación interespecífica de microsatélites depende de que las regiones flanqueantes reconocidas por los cebadores se encuentren suficientemente conservadas entre las especies, aunque su transferibilidad debe comprobarse experimentalmente en cada caso.

En Ceb07 se identificaron cinco clases alélicas, para la población de Misahuallí, los alelos de 118 y 130 pb presentaron las mayores frecuencias con 0,364 cada uno. En el centro de rescate, el alelo de 130 pb alcanzó una frecuencia de 0,500, seguido del alelo de 126 pb, con 0,333. Las frecuencias de Ceb07 en el centro de rescate se calcularon con tres individuos, equivalentes a seis copias alélicas. Por ello, la presencia de una sola copia produjo una frecuencia aproximada de 0,167, lo que demuestra que los valores obtenidos son sensibles a la incorporación o exclusión de pocos individuos. Muniz y Vigilant (2008) reportaron cuatro alelos para Ceb07, con tamaños comprendidos entre 119 y 135 pb, en 187 individuos silvestres de *Cebus capucinus*, mientras que con el uso de electroforesis en gel de poliacrilamida se identificaron cinco clases alélicas para nuestra población muestreada, aproximadas entre 110 y 138 pb. Sin embargo, esta diferencia no puede interpretarse como la identificación de alelos nuevos en *C. yuracus*, porque el estudio original utilizó electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI PRISM 3100. Los tamaños alélicos se estimaron mediante comparación con el estándar interno HD400 marcado con ROX, compuesto por fragmentos de tamaño conocido que permiten determinar la longitud de los alelos en pares de bases.

Al comparar los dos grupos de muestreo se observó que todos los alelos detectados en el centro de rescate también estuvieron presentes en Misahuallí. En cambio, varios alelos de Misahuallí fueron observados únicamente ahí, en el caso del alelo 237 pb en PEPC40, el alelo 280, 284 y 294 pb en PEPC59, el alelo 158 y 173 pb en D5S111, el alelo 152, 154 y 156 pb en AP74 y finalmente los alelos 110 y 138 pb en Ceb07. Este patrón indica que los dos grupos compartieron una parte importante de las variantes detectadas, mientras que Misahuallí

presentó un mayor número de alelos dentro del conjunto analizado. Sin embargo, no permite establecer que los individuos del centro de rescate no procedan de Misahuallí ni confirmar una relación genética directa entre ambos grupos. Para evaluar esta posibilidad sería necesario ampliar el número de individuos y aplicar análisis específicos de diferenciación y estructura genética (Pritchard et al., 2000).

La mayor cantidad de variantes registrada en Misahuallí también puede estar influida por el mayor tamaño muestral. Cuando se analiza un número superior de individuos aumenta la posibilidad de detectar alelos de baja frecuencia que pueden no aparecer en un grupo pequeño. La riqueza alélica mediante rarefacción permite ajustar estas comparaciones a un tamaño muestral común (Solórzano-García et al., 2021). Debido a que este procedimiento no fue aplicado, las diferencias en el número de alelos fueron interpretadas únicamente de manera descriptiva. También debe considerarse que los tamaños alélicos estimados no coincidieron completamente con los intervalos descritos en las especies de origen de los marcadores. Las diferencias entre especies pueden estar relacionadas con variaciones en la región repetitiva y en las secuencias flanqueantes de los microsatélites (Clisson et al., 2000).

Diversidad genética y heterocigosidad

La Tabla 23 presenta los parámetros de diversidad genética obtenidos para los cinco microsatélites en los grupos de Misahuallí y del centro de rescate. La Figura 16 permite visualizar las diferencias entre la heterocigosidad observada y esperada para cada locus. La heterocigosidad observada representa la proporción de individuos heterocigotos identificados en las muestras, mientras que la heterocigosidad esperada expresa la proporción de heterocigotos que se esperaría a partir de las frecuencias alélicas bajo apareamiento aleatorio. Debido al tamaño reducido y variable de los grupos, también se incluyó la heterocigosidad esperada no sesgada, que incorpora una corrección por el número de individuos genotipados (Peakall & Smouse, 2012).

Tabla 23

Parámetros de diversidad genética por locus en los grupos poblacionales

Grupo de muestreo	Locus	N	Ho	He	uHe	FIS	I
Misahuallí	PEPC40	8	0,750	0,727	0,775	-0,032	1,455
Misahuallí	PEPC59	11	0,545	0,802	0,840	0,320	1,767
Misahuallí	D5S111	12	0,667	0,705	0,736	0,054	1,281
Misahuallí	AP74	7	0,143	0,684	0,736	0,791	1,369
Misahuallí	Ceb07	11	0,455	0,698	0,732	0,349	1,327
Misahuallí promedio ± EE	—	—	0,512 ± 0,105	0,723 ± 0,021	0,764 ± 0,021	0,296 ± 0,144	1,440 ± 0,087
Centro de rescate	PEPC40	5	0,400	0,660	0,733	0,394	1,194
Centro de rescate	PEPC59	5	0,600	0,740	0,822	0,189	1,366
Centro de rescate	D5S111	4	0,000	0,375	0,429	1,000	0,562
Centro de rescate	AP74	4	0,750	0,469	0,536	-0,600	0,662
Centro de rescate	Ceb07	3	0,333	0,611	0,733	0,455	1,011
Centro de rescate promedio ± EE	—	—	0,417 ± 0,128	0,571 ± 0,066	0,651 ± 0,073	0,288 ± 0,259	0,959 ± 0,153

Nota. N = número de individuos genotipados, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada, uHe = heterocigosidad esperada no sesgada, corregida por el tamaño muestral; F = índice de fijación intragrupal, equivalente a FIS, donde los valores positivos indican déficit de heterocigotos y los valores negativos indican exceso de heterocigotos; I = índice de información de Shannon; EE = error estándar. Los valores se obtuvieron mediante GenAlEx.

En términos generales, Misahuallí presentó valores promedio superiores a los del centro de rescate. La heterocigosidad observada promedio fue de 0,512 ± 0,105 en Misahuallí y de 0,417 ± 0,128 en el centro de rescate. De manera similar, la heterocigosidad esperada fue de 0,723 ± 0,021 y 0,571 ± 0,066, respectivamente. La heterocigosidad esperada no sesgada mantuvo este patrón, con promedios de 0,764 ± 0,021 en Misahuallí y 0,651 ± 0,073 en el centro de rescate. Estos resultados muestran que los individuos analizados de Misahuallí presentaron, de manera descriptiva, una mayor diversidad genética que la observada en el centro de rescate. Un valor relativamente elevado de He en Misahuallí resulta relevante al considerar que se trata de un grupo que convive de forma permanente con personas dentro de un ambiente urbano. Castro-Loza (2019) documentó que los capuchinos de esta localidad mantienen interacciones frecuentes con los habitantes y que una proporción importante de estas se relaciona con la obtención de alimentos, además es importante mencionar que el déficit de heterocigotos observado en algunos loci de Misahuallí podría estar relacionado con el reducido tamaño del grupo urbano, Castro-Loza (2019) reportó una disminución del número de capuchinos presentes en la localidad y distintas presiones antropogénicas sobre el grupo tales como atropellamiento o ataques de perros. Esta convivencia demuestra que el grupo persiste en un paisaje modificado que puede reducir el movimiento de los individuos entre grupos, restringir el flujo génico y disminuir el tamaño efectivo de las poblaciones (Keyghobadi, 2007). Cuando estas condiciones persisten durante varias generaciones, la deriva genética puede eliminar alelos poco frecuentes y aumentar la diferenciación entre grupos aislados. En primates que habitan en bosques fragmentados se ha señalado que la pérdida de conectividad puede asociarse con reducción de la variabilidad genética, mayor estructuración e incremento del riesgo de apareamientos entre individuos relacionados (Solórzano-García et al., 2021). Sin embargo, el número de individuos genotipados fue menor en el centro de rescate. Por tanto, la diferencia no debe presentarse como estadísticamente significativa ni generalizarse a todos los individuos de ambas procedencias.

En Misahuallí, la heterocigosidad observada fue inferior a la esperada en cuatro de los cinco loci. PEPC40 fue la excepción, con una Ho de 0,750 y una He de 0,727. La proximidad entre ambos valores, junto con un FIS de −0,032, indica que este locus presentó una distribución de heterocigotos cercana a la esperada a partir de sus frecuencias alélicas. D5S111 también mostró una diferencia reducida, con Ho = 0,667, He = 0,705 y FIS = 0,054. Las diferencias fueron más marcadas en PEPC59, Ceb07 y AP74. En PEPC59, la Ho fue de 0,545 frente a una He de 0,802, lo que produjo un FIS de 0,320. En Ceb07 se obtuvo una Ho de 0,455, una He de 0,698 y un FIS de 0,349. El contraste más amplio se observó en AP74, donde la Ho fue de 0,143 y la He alcanzó 0,684, con un FIS de 0,791. Esto significa que, de los siete individuos con genotipo interpretable para AP74 en Misahuallí, solo uno fue registrado como heterocigoto, aunque las frecuencias alélicas permitían esperar una mayor proporción de heterocigotos.

El comportamiento de AP74 debe relacionarse con lo observado durante la estandarización experimental, ya que este locus produjo una señal más débil que D5S111 y necesitó una concentración mayor de $MgCl_2$ para obtener productos visibles. Por ello, el déficit de heterocigotos registrado para AP74 puede contener un componente técnico. Una amplificación insuficiente de uno de los alelos de un individuo heterocigoto puede generar una pérdida alélica y hacer que el individuo sea clasificado incorrectamente como homocigoto (Pompanon et al., 2005).

En el centro de rescate, cuatro loci también presentaron una Ho inferior a He. En PEPC40 se obtuvo una Ho de 0,400 y una He de 0,660, mientras que PEPC59 presentó valores de 0,600 y 0,740, respectivamente. En Ceb07, la Ho fue de 0,333 y la He de 0,611. No obstante, estos resultados se calcularon con cinco individuos para PEPC40 y PEPC59 y únicamente tres para Ceb07, por lo que el genotipo de un solo individuo tuvo una influencia considerable sobre las estimaciones. El caso más marcado se observó en D5S111 en el centro de rescate. Ninguno de los cuatro individuos genotipados fue registrado como heterocigoto, por

lo que Ho fue igual a 0,000 y FIS alcanzó el valor máximo de 1,000. Sin embargo, la He fue de 0,375, lo que demuestra que en el grupo se identificó más de un alelo. El resultado describe la ausencia de heterocigotos dentro de esos cuatro individuos, pero no permite concluir que todo el grupo del centro de rescate carezca de heterocigotos para D5S111.

Para el microsatélite AP74, en la población del centro de rescate se observó una heterocigosidad observada de 0,750, superior a la heterocigosidad esperada de 0,469. La heterocigosidad esperada no sesgada fue de 0,536, mientras que el FIS alcanzó un valor de −0,600. Este resultado indica que tres de los cuatro individuos analizados fueron heterocigotos para este locus, por lo que se observó un exceso de heterocigotos respecto de la proporción estimada a partir de las frecuencias alélicas. Sin embargo, el valor negativo de FIS describe únicamente el patrón encontrado y no constituye evidencia directa de exogamia o apareamiento no aleatorio. La interpretación del centro de rescate necesita tomar en cuenta que los individuos pertenecían a un centro de rescate y no necesariamente conformaban una población reproductiva estable. El origen geográfico, el parentesco y la historia previa de cada animal pueden ser diferentes. Por esta razón, los parámetros obtenidos describen la diversidad de los individuos reunidos en el centro, pero no permiten asumir que representan una población natural sometida a apareamiento aleatorio, además en poblaciones mantenidas bajo cuidado humano, la deriva genética y el apareamiento entre individuos relacionados pueden reducir progresivamente la diversidad cuando el grupo se funda con pocos animales y permanece reproductivamente cerrado durante varias generaciones (Willoughby et al., 2015)

La diferencia entre Ho y He también puede analizarse tomando como referencia el estudio original de Ceb07. Muniz y Vigilant (2008) reportaron para este marcador valores de Ho y He de 0,567 en *Cebus capucinus*, los resultados obtenidos en el laboratorio para Ceb07 mostraron una He de 0,698 en Misahuallí y de 0,611 en el centro de rescate, lo que refleja la presencia de distintas variantes alélicas. Sin embargo, la Ho fue menor en ambos grupos, con valores de 0,455 y 0,333. Para interpretar los resultados hay que tener en cuenta que se

evaluaron especies, tamaños muestrales y métodos de genotipificación diferentes. Muniz y Vigilant trabajaron con una muestra mucho mayor y utilizaron electroforesis automatizada, mientras que en este estudio los genotipos fueron estimados en geles de poliacrilamida no desnaturalizante.

El índice de información de Shannon mostró un promedio de 1,440 ± 0,087 en Misahuallí y de 0,959 ± 0,153 en el centro de rescate. Este parámetro considera tanto el número de alelos como la forma en que se distribuyen sus frecuencias. Por ello, el valor superior de Misahuallí es coherente con la mayor cantidad de variantes alélicas observadas previamente en este grupo. Sin embargo, el índice también puede verse influido por el número de individuos analizados, por lo que debe utilizarse como una medida complementaria y no como evidencia aislada de una diferencia genética entre los grupos. Los valores positivos de FIS observados en la mayoría de los loci indican un déficit de heterocigotos respecto de la proporción esperada. En Misahuallí, el promedio de FIS fue de 0,296 ± 0,144, mientras que en el centro de rescate fue de 0,288 ± 0,259. No obstante, un FIS positivo describe el patrón genotípico encontrado, pero no identifica por sí solo el proceso que lo originó. Los índices de fijación pueden reflejar apareamiento entre individuos relacionados, apareamiento no aleatorio o subdivisión interna, pero también pueden verse afectados por alelos nulos y errores de genotipificación (Putman & Carbone, 2014).

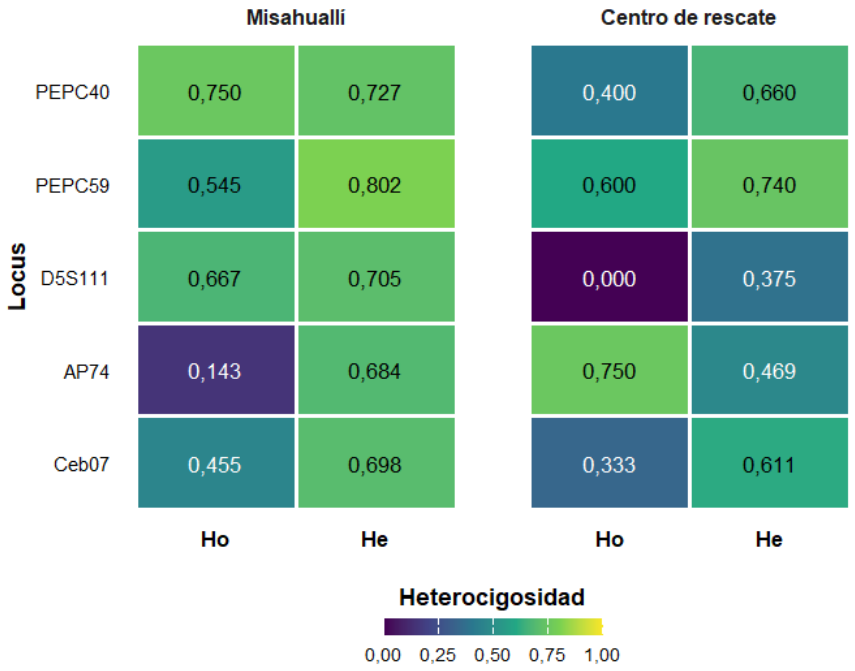
Por esta razón, los valores obtenidos no constituyen evidencia directa de endogamia. En primates, la heterocigosidad estimada con un conjunto limitado de microsatélites no siempre representa con precisión el nivel de endogamia en todo el genoma, especialmente cuando no se dispone de pedigríes o de información de parentesco (Charpentier et al., 2007). En el presente estudio solo se analizaron cinco loci y no se conocía el parentesco entre todos los individuos, de modo que el FIS debe interpretarse como un indicador preliminar de déficit de heterocigotos. Entre las explicaciones técnicas debe considerarse la presencia de alelos nulos. Estos se producen cuando una variación en la región de unión del cebador impide que uno de

los alelos sea amplificado; entonces un individuo heterocigoto puede presentar una sola banda y ser registrado como un falso homocigoto, lo que disminuye Ho e incrementa FIS (Putman & Carbone, 2014).

Sin embargo, el exceso de homocigotos también puede ser producido por pérdida alélica asociada con una baja cantidad de ADN, una amplificación preferencial o errores durante la lectura de las bandas. Esta posibilidad es particularmente relevante porque se trabajó con ADN obtenido de heces. Las muestras no invasivas suelen contener cantidades reducidas y variables de ADN del hospedador, lo que incrementa el riesgo de que uno de los dos alelos no se amplifique durante la PCR (Pompanon et al., 2005). También existen explicaciones biológicas que no pueden descartarse. La presencia de individuos emparentados dentro de un grupo social puede aumentar la similitud genética de la muestra, mientras que la combinación de individuos procedentes de diferentes unidades reproductivas puede producir un déficit aparente de heterocigotos conocido como efecto Wahlund. En un estudio con microsatélites de primates neotropicales, Cortés-Ortiz et al. (2010) encontraron déficit de heterocigotos en determinados loci, pero consideraron que la inclusión de individuos procedentes de varias localidades era una explicación más probable que la presencia generalizada de alelos nulos. Los resultados obtenidos en este caso no proporcionan evidencia suficiente para distinguir entre errores técnicos, parentesco, apareamiento no aleatorio o una posible subdivisión dentro de los grupos, y es una limitación importante para el centro de rescate, porque el origen y las relaciones de parentesco de los individuos no permiten asumir que constituyan una población reproductiva panmíctica.

Figura 16

Mapa de calor de la heterocigosidad observada y esperada por locus en los grupos de muestreo Misahuallí y el centro de rescate



Nota. Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada. La escala de color representa valores de heterocigosidad entre 0 y 1, donde los tonos más oscuros indican valores menores y los tonos más claros o verdosos valores mayores.

Equilibrio de Hardy-Weinberg

Como análisis complementario, la Tabla 24 presenta la evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de chi-cuadrado implementada en GenAlEx. Con un nivel nominal de significancia de 0,05, siete de las diez combinaciones entre locus y grupo de muestreo no presentaron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas. En Misahuallí, PEPC40, D5S111 y Ceb07 presentaron valores de p superiores a 0,05. En cambio, PEPC59 mostró un valor de $\chi^2 = 38,756$ y $p = 0,010$, mientras que AP74 presentó $\chi^2 = 21,143$ y $p = 0,020$. En ambos loci, la heterocigosidad observada fue

inferior a la esperada y los valores de FIS fueron positivos, por lo que los resultados nominales fueron compatibles con un déficit de heterocigotos respecto de las proporciones esperadas.

En el caso del microsatélite AP74 en Misahuallí, la Ho fue de 0,143 frente a una He de 0,684 y el FIS alcanzó 0,791. Estos valores coincidieron con la desviación nominal detectada en la prueba de Hardy-Weinberg. Este patrón podría relacionarse tanto con factores biológicos como con pérdida alélica, alelos nulos o errores durante la asignación de los genotipos. Una desviación del equilibrio no permite distinguir por sí sola entre estas posibles explicaciones (Waples, 2015).

En el centro de rescate los microsatélites PEPC40, PEPC59, AP74 y Ceb07 no presentaron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg. Para AP74 el análisis de HW, $\chi^2 = 1,440$ ($p = 0,230$), mientras que la heterocigosidad observada de 0,750, que supera lo esperado (0,469), y un FIS negativo (−0,600) este patrón corresponde únicamente a los cuatro individuos analizados y no constituye evidencia de un proceso reproductivo general en el grupo.

D5S111 presentó genotipos interpretables en los cuatro individuos analizados y mostró una desviación nominal del equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 4,000$, $p = 0,046$). Ninguno de estos individuos fue registrado como heterocigoto (Ho = 0,000, FIS = 1,000). Sin embargo, debido al reducido tamaño muestral con 7 a 12 individuos en Misahuallí y 3 a 5 en rescate y a las bajas frecuencias genotípicas esperadas, la aproximación del chi-cuadrado puede resultar inestable. Por ello, este resultado debe interpretarse de manera exploratoria y no como evidencia de un proceso reproductivo general en el grupo.

En los microsatélites multialélicos se generan varias clases genotípicas esperadas, pero el número de individuos fue de siete a doce en Misahuallí y de tres a cinco en el centro de rescate. Como consecuencia algunas frecuencias esperadas pueden ser muy pequeñas y la aproximación asintótica del chi-cuadrado puede resultar inestable. Por estas razones, PEPC59 y AP74 en Misahuallí, y D5S111 en el centro de rescate, deben presentarse como loci con

señales preliminares de déficit de heterocigotos, las desviaciones de Hardy-Weinberg pueden relacionarse con apareamiento no aleatorio, parentesco o subdivisión de la muestra, pero también pueden verse influidas por errores de genotipificación, alelos nulos y características particulares de cada locus (Waples, 2015).

Tabla 24

Prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (χ²)

Grupo de muestreo	Locus	N	gl	χ²	p
Misahuallí	PEPC40	8	10	13,469	0,199
Misahuallí	PEPC59	11	21	38,756	0,010
Misahuallí	D5S111	12	6	9,672	0,139
Misahuallí	AP74	7	10	21,143	0,020
Misahuallí	Ceb07	11	10	14,094	0,169
Centro de rescate	PEPC40	5	6	6,250	0,396
Centro de rescate	PEPC59	5	6	10,000	0,125
Centro de rescate	D5S111	4	1	4,000	0,046
Centro de rescate	AP74	4	1	1,440	0,230
Centro de rescate	Ceb07	3	3	3,333	0,343

Nota. N: número de individuos con genotipo interpretable, gl: grados de libertad; χ²: estadístico de chi-cuadrado, p: probabilidad asociada a la prueba. Se consideró evidencia de desviación significativa cuando $p < 0,05$. Los resultados se interpretaron de manera exploratoria debido al tamaño reducido y desigual de los grupos analizados.

Capítulo V

Conclusiones

Se estandarizó la amplificación de cinco microsatélites en muestras fecales no invasivas de *Cebus yuracus*. Para el sistema AP74–D5S111 se seleccionaron 3,0 mM de $MgCl_2$ y una temperatura de hibridación de 54 °C, mientras que PEPC40–PEPC59 presentó mejores resultados a 57 °C y sin DMSO. Finalmente, Ceb07 amplificó bajo las condiciones del artículo original de Muniz y Vigilant (2008).

La electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 10 % permitió separar los productos de los cinco microsatélites y estimar sus tamaños alélicos. No obstante, estos tamaños se consideraron aproximados debido al método visual de lectura.

Los cinco microsatélites fueron polimórficos en los individuos analizados. PEPC59 presentó siete alelos; PEPC40, AP74 y Ceb07 presentaron cinco; y D5S111 presentó cuatro, lo que demuestra la utilidad del conjunto de marcadores para caracterizar la variación genética de *C. yuracus.*

Misahuallí presentó una heterocigosidad observada promedio de 0,512 y una esperada de 0,723, mientras que el centro de rescate presentó valores de 0,417 y 0,571, respectivamente. Aunque Misahuallí mostró una diversidad genética descriptivamente mayor, la comparación estuvo influida por el tamaño muestral desigual y por las diferencias en el origen de los individuos.

La heterocigosidad observada fue inferior a la esperada en la mayoría de los loci; sin embargo, los valores de FIS y las desviaciones nominales del equilibrio de Hardy-Weinberg no constituyeron evidencia directa de endogamia, debido al tamaño muestral reducido y a la posible influencia de parentesco, alelos nulos, pérdida alélica y errores de genotipificación. En consecuencia, los resultados representan una primera caracterización de la heterocigosidad de *C. yuracus* y una base para estudios con mayor número de individuos y técnicas de mayor resolución.

Recomendaciones

Confirmar los tamaños alélicos mediante otras técnicas como electroforesis capilar o algún método de secuenciación de productos representativos de cada locus, especialmente de individuos homocigotos, así como repetir la amplificación de los genotipos homocigotos y de las bandas débiles mediante réplicas independientes de PCR.

Incrementar el número de marcadores analizados para poder tener un set más amplio de microsatélites o usar otro tipo de marcadores como los SNP, que permitirían obtener estimaciones más robustas de diversidad, parentesco, endogamia y estructura genética que las obtenidas a partir de cinco loci.

En la población de Misahuallí, complementar el monitoreo genético de la población con la reproducción, dispersión, conectividad del hábitat y presencia de otros grupos cercanos. Estos datos permitirían evaluar si el déficit de heterocigotos se relaciona con parentesco, aislamiento urbano o reducción del intercambio de individuos.

Referencias

Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología Molecular*, *18*(1), 541–566.

Ali, M. E., Razzak, M. A., & Hamid, S. B. A. (2014). Multiplex PCR in species authentication: Probability and prospects—A review. *Food Analytical Methods*, *7*(10), 1933-1949.

Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A., & Luikart, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, *11*(10), 697–709. https://doi.org/10.1038/nrg2844

Álvarez-Solas, S., Silva, M. A., de la Torre, S., Rodríguez, R., Rivera Román, E., Pozo-Rivera, W. E., & Tirira, D. G. (2022). *Capuchino blanco del Marañón (Cebus yuracus)*. En *Libro rojo de los mamíferos del Ecuador* (3.ª ed., versión 2022.1)

Aquino, R., Cornejo, F. M., Pezo, E., & Heymann, E. W. (2012). Distribution and Abundance of White-Fronted Spider Monkeys, *Ateles belzebuth* (Atelidae), and Threats to Their Survival in Peruvian Amazonia. *Folia Primatologica.* https://doi.org/10.1159/000345549

Astorga, M. P. (2008). Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura*, *277*.

Azren, P. D., Lee, S. Y., Emang, D., & Mohamed, R. (2019). History and perspectives of induction technology for agarwood production from cultivated Aquilaria in Asia: A review. *Journal of Forestry Research*, *30*(1), 1–11.

Baranski, M., Moen, T., & Våge, D. I. (2010). Mapping of quantitative trait loci for flesh colour and growth traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics Selection Evolution*, *42*(1), 17.

Berry, O. F., Holleley, C. E., & Jarman, S. N. (2023). *Applied Environmental Genomics*. CSIRO Publishing.

Bhargava, A., & Fuentes, F. F. (2009). Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology.* https://doi.org/10.1007/s12033-009-9230-4

Bickley, J., & Hopkins, D. (1999). Inhibitors and enhancers of PCR. *Analytical Molecular Biology: quality and validation*, *8*, 81.

Blanquer-Maumont, A., & Crouau-Roy, B. (1995). Polymorphism, monomorphism, and sequences in conserved microsatellites in primate species. *Journal of Molecular Evolution*, *41*(4), 492–497.

Bolivar, A. M., Rojas, A., & Lugo, P. G. (2014). PCR y PCR-Múltiple: Parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en biomedicina*, *3*(1), 25–33.

Boubli, J. P., Rylands, A. B., Farias, I. P., Alfaro, M. E., & Lynch-Alfaro, J. W. (2012). Cebus phylogenetic relationships: A preliminary reassessment of the diversity of the untufted capuchin monkeys. *American Journal of Primatology*, *74*(4), 381–393. https://doi.org/10.1002/ajp.21998

Buschiazzo, E., & Gemmell, N. J. (2006). The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays*, *28*(10), 1040–1050. https://doi.org/10.1002/bies.20470

Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C., & Sutherland, G. R. (1993). Incidence and origin of" null" alleles in the (AC) n microsatellite markers. *American journal of human genetics*, *52*(5), 922.

Casanova, C. (2024). Optimización de un protocolo para el análisis de microsatélites en Cebus albifrons de la Amazonía ecuatoriana a partir de microsatélites utilizados en Lagothrix lagotricha [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Biotecnología.]. https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/38498

Castro-Loza, S. (2019). Ethnoprimatology of Urban Cebus yuracus: An evaluación de las interacciones humanas-no humanas y percepciones locales en Misahualli, Ecuador. Todas las tesis de maestría. https://digitalcommons.cwu.edu/etd/1211

Cervera, L., de la Torre, S., Zapata Ríos, G., Cortés, F. A.-, Álvarez Solas, S., Crowe, O., Cueva, R., de la Torre, A., Duch Latorre, I., Solórzano, M. F., Fuentes, N., Larriva, D., Maila, D., Mantilla, D., Mariscal, A., Mariscal, C., Molina, E., Morales, M., Morelos Juárez, C., … Veloz, O. A. (2018). Working Together Towards One Goal: Results of the First Primate Census in Western Ecuador. http://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/handle/RD_IKIAM/187

Chapman, C. A. (1989). Primate seed dispersal: The fate of dispersed seeds. Biotropica, 148–154.

Chapman, C. A., & Peres, C. A. (2001). Primate conservation in the new millennium: The role of scientists. Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews: Issues, News, and Reviews, 10(1), 16–33.

Chapuis, M.-P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Molecular biology and evolution, 24(3), 621-631.

Charpentier, M. J., Widdig, A., & Alberts, S. C. (2007). Inbreeding depression in non-human primates: A historical review of methods used and empirical data. American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists, 69(12), 1370-1386.

Chistiakov, D. A., Hellemans, B., & Volckaert, F. A. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. Aquaculture, 255(1–4), 1–29.

Clisson, I., Lathuilliere, M., & Crouau-Roy, B. (2000). Conservation and evolution of microsatellite loci in primate taxa. American Journal of Primatology. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2345(200003)50:3%3C205::AID-AJP3%3E3.0.CO;2-Y

Coates, D. J., Byrne, M., & Moritz, C. (2018). Genetic diversity and conservation units: Dealing with the species-population continuum in the age of genomics. Frontiers in Ecology and Evolution, 6, 165.

Coote, T., & Bruford, M. W. (1996). Human microsatellites applicable for analysis of genetic variation in apes and Old World monkeys. Journal of Heredity, 87(5), 406–410.

Cortés-Ortiz, L., Mondragón, E., & Cabotage, J. (2010). Isolation and characterization of microsatellite loci for the study of Mexican howler monkeys, their natural hybrids, and other Neotropical primates. Conservation Genetics Resources, 2, 21–26. https://doi.org/10.1007/s12686-009-9124-6

de Groot, N. G., de Vos-Rouweler, A. J., Heijmans, C. M., Louwerse, A., Massen, J. J., Langermans, J. A., Bontrop, R. E., & Bruijnesteijn, J. (2025). Genetic Conservation and Population Management of Non-Human Primates: Parentage Determination Using Seven Microsatellite-Based Multiplexes. Ecology and Evolution, 15(4), e71216.

De la Torre, S. (2012). Conservation of Neotropical primates: Ecuador–a case study. International Zoo Yearbook, 46(1), 25–35.

de Silva, J. de S. (2001). Especiacao nos macacos-pregos e caiararas, género Cebus Erxleben, 1777 (Primates, Cebidae) [Universidade Federal do Rio de Janeiro]. https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1395770

Delval, I., Araujo, G., & Lynch, J. W. (2024). Capuchins. En Encyclopedia of Sexual Psychology and Behavior (pp. 1–17)

Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., & Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. American Journal of Human Genetics, 49(4), 746.

Ellsworth, J., & Hoelzer, G. (1998). Characterization of microsatellite loci in a New World primate, the mantled howler monkey (Alouatta palliata). Molecular Ecology, 7(5), 657–658.

Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. Clinical Microbiology Reviews, 13(4), 559–570.

Endara, N. S. (2024). Optimización de un protocolo para el análisis de microsatélites en Cebus albifrons de la Amazonía ecuatoriana a partir de microsatélites utilizados en Sapajus sp. [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/38542

Escobar-Páramo, P. (2000). Microsatellite primers for the wild brown capuchin monkey Cebus apella. Molecular Ecology, 9(1), 107–108.

Estoup, A., Jarne, P., & Cornuet, J. (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. Molecular Ecology, 11(9), 1591–1604. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01576.x

Estrada, A., Garber, P. A., Rylands, A. B., Roos, C., Fernandez-Duque, E., Di Fiore, A., Nekaris, K. A.-I., Nijman, V., Heymann, E. W., Lambert, J. E., Rovero, F., Barelli, C., Setchell, J. M., Gillespie, T. R., Mittermeier, R. A., Arregoitia, L. V., de Guinea, M., Gouveia, S., Dobrovolski, R., … Li, B. (2017). Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter. Science Advances, 3(1), e1600946. https://doi.org/10.1126/sciadv.1600946

Fragaszy, D. M., Visalberghi, E., & Fedigan, L. M. (2004). The Complete Capuchin: The Biology of the Genus Cebus. Cambridge University Press.

Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. Biological Conservation, 126(2), 131–140. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002

Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2010). Introduction to conservation genetics (2nd ed.). Cambridge University Press.

Garber, P. A., & Estrada, A. (2009). Advancing the study of South American primates. South American Primates: Comparative Perspectives in the Study of Behavior, Ecology, and Conservation, 3–19.

Garza, J. C., & Williamson, E. G. (2001). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. Molecular Ecology. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01190.x

Gil Saavedra, J. A. (2015). Identificación de microsatélites polimórficos por amplificación cruzada en Anadara similis (Mollusca: Arcidae) [Trabajo de grado, Universidad del Valle]. https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/entities/publication/ce5e2e77-c14e-42bd-b882-617f3ea5e1d8

Goldstein, D. B., Ruiz Linares, A., Cavalli-Sforza, L. L., & Feldman, M. W. (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Genetics, 139(1), 463–471. https://doi.org/10.1093/genetics/139.1.463

González, E. G. (2003). Microsatélites: Sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. Graellsia, 59(2-3), 377-388. https://doi.org/10.3989/graellsia.2003.v59.i2-3.253

Goossens, B., Chikhi, L., Utami, S. S., de Ruiter, J., & Bruford, M. W. (2000). A multi-samples, multi-extracts approach for microsatellite analysis of faecal samples in an arboreal ape. Conservation Genetics, 1(2), 157–162.

Gozzer, R. (2019). Diversidad genética y estructura poblacional del perico (Coryphaena hippurus, Linnaeus 1758) en el Pacífico Peruano.

Grativol, C., da Fonseca Lira-Medeiros, C., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. G. (2010). High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated Jatropha curcas L. accessions. Molecular Biology Reports. https://doi.org/10.1007/s11033-010-0547-7

Groves, C. (2005). The taxonomy of Primates in the Laboratory Context. The Laboratory Primate; Wolfe-Coote, S., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 3-15.

Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., & Petit, R. J. (2011). Current trends in microsatellite

genotyping. Molecular Ecology Resources, 11(4), 591–611. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x

Hamilton, M. (2009). Population genetics Wiley-Blac= well. Publ. The Atrium, Southern Gate, West Sussex, United Kingdom, 34.

Harris, A. M., & DeGiorgio, M. (2016). An Unbiased Estimator of Gene Diversity with Improved Variance for Samples Containing Related and Inbred Individuals of any Ploidy. G3: Genes|Genomes|Genetics, 7(2), 671–691. https://doi.org/10.1534/g3.116.037168

Harris, J. B. C., Álvarez, P. J., Mendoza, V., & Tirira, D. G. (2008). Altitudinal range extension for Cebus albifrons (Primates: Cebidae) in southern Ecuador. Neotropical Primates. https://doi.org/10.1896/044.015.0104

Hedgecock, D., Li, G., Hubert, S., Bucklin, K., & Ribes, V. (2004). Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, Crassostrea gigas. Journal of Shellfish Research, 23(2), 379-386.

Hedrick, P. W., & Kalinowski, S. T. (2000). Inbreeding Depression in Conservation Biology. Annual Review of Ecology and Systematics. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.31.1.139

Hershkovitz, P. (1949). Mammals of Northern Colombia, Preliminary Report No. 4: Monkeys (Primates), with Taxonomic Revisions of Some Forms. Proceedings of the United States National Museum, 98(3232), 323–427, plates 15–17, figures 52–59. https://doi.org/10.5479/si.00963801.98-3232.323

Hoshino, A. A., Bravo, J. P., Nobile, P. M., & Morelli, K. A. (2012). Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. En Genetic diversity in microorganisms. InTechOpen.

Inoue, E. (2015). DNA Analysis Using Noninvasive Samples: Methods of Sample Collection, DNA Extraction, PCR Amplification and Kinship Analysis. Primate Research. https://doi.org/10.2354/psj.31.007

Junker, J., Petrovan, S. O., Arroyo-Rodríguez, V., Boonratana, R., Byler, D., Chapman, C. A., Chetry, D., Cheyne, S. M., Cornejo, F. M., Cortés-Ortiz, L., Cowlishaw, G., Christie, A. P., Crockford, C., de la Torre, S., de Melo, F. R., Fan, P., Grueter, C. C., Guzmán-Caro, D. C., Heymann, E. W., … Kühl, H. S. (2020). A severe lack of evidence limits effective conservation of the world's primates. BioScience, 70(9), 794–803. https://doi.org/10.1093/biosci/biaa082

Keyghobadi, N. (2007). The genetic implications of habitat fragmentation for animals. Canadian Journal of Zoology, 85(10), 1049-1064.

Kijas, J. M. H., Fowler, J. C. S., & Thomas, M. R. (1995). An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. Genome, 38(2), 349-355.

Kulibaba, R., & Liashenko, Y. (2016). Influence of the PCR artifacts on the genotyping efficiency by the microsatellite loci using native polyacrylamide gel electrophoresis. Cytology and Genetics, 50(3), 162–167.

Lande, R. (1988). Genetics and demography in biological conservation. Science, 241(4872), 1455–1460. https://doi.org/10.1126/science.3420403

Lawler, R. R. (2018). Emerging and enduring issues in primate conservation genetics. Annual Review of Anthropology, 47(1), 395–415. https://doi.org/10.1146/annurev-anthro-102317-050006

Leroy, G., Carroll, E. L., Bruford, M. W., DeWoody, J. A., Strand, A., Waits, L., & Wang, J. (2018). Next-generation metrics for monitoring genetic erosion within populations of conservation concern. Evolutionary Applications, 11(7), 1066–1083.

Li, Q., Nie, H., & Kong, L. (2009). Microsatellite–centromere mapping in zhikong scallop (Chlamys farreri) through half-tetrad analysis in D-shaped larvae of gynogenetic diploid families. Aquaculture, 293(1-2), 29-34. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.007

López-Vinyallonga, S. (2011). Amplificación cruzada de microsatélites en el género Centaurea (Compositae). *Collectanea Botanica*, *30*, 17-27. https://doi.org/10.3989/collectbot.2011.v30.002

Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (63), 3998.

Lynch, M., Conery, J., & Burger, R. (1995). Mutation Accumulation and the Extinction of Small Populations. *The American Naturalist.* https://doi.org/10.1086/285812

Lynn, M., Sechi, P., Chikhi, L., & Goossens, B. (2015). Primate conservation genetics at the dawn of conservation genomics. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198703389.003.0005

Maldonado, O., Aveling, C., Cox, D., Nixon, S., Merlo, D., Pintea, L. y Williamson, EA (2012). *Gorilas y chimpancés de Grauer en el este de la República Democrática del Congo (paisaje de Kahuzi-Biega, Maiko, Tayna e Itombwe): Plan de acción para la conservación 2012–2022* . UICN.

Marsh, C., Link, A., King-Bailey, G., & Donati, G. (2016). Effects of fragment and vegetation structure on the population abundance of Ateles hybridus, Alouatta seniculus and *Cebus albifrons* in Magdalena Valley, Colombia. *Folia Primatologica*, *87*(1), 17–30. https://doi.org/10.1159/000443929

Michalski, F., & Peres, C. A. (2005). Anthropogenic determinants of primate and carnivore local extinctions in a fragmented forest landscape of southern Amazonia. *Biological Conservation.* https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.01.045

Mittermeier, R., Rylands, A., & Schwitzer, C. (2022). IUCN SSC Primate Specialist Group: Report 2018–2021. *Report to the International Primatological Society (IPS)*, Quito, Ecuador, 9.

Monteiro, L., Bonnemaison, D., Vekris, A., Petry, K. G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., & Mégraud, F. (1997). Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(4), 995–998.

Muneer, P. M. A. (2014). Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. *Genetics Research International.* https://doi.org/10.1155/2014/691759

Muniz, L., & Vigilant, L. (2008). Isolation and characterization of microsatellite markers in the white-faced capuchin monkey (Cebus capucinus) and cross-species amplification in other New World monkeys. *Molecular Ecology Resources*, *8*(2), 402–405. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01971.x

Oklander, L. I., & Soto-Calderón, I. D. (2024). Applications of primate genetics for conservation and management. *Annual Review of Anthropology*, *53*(1), 371–395.

Orellana-Vásquez, H., & Gavilanez, M. (2023). Taxonomic, functional, and phylogenetic diversity of primate communities in Ecuador. *Therya*, *14*, 269–280. https://doi.org/10.12933/therya-23-1022

Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. *Population genetic software for teaching and research—an update. Bioinformatics*, *28*(19), 2537–2539. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460

Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., & Taberlet, P. (2005). Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, *6*(11), 847–859. https://doi.org/10.1038/nrg1707

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, *155*(2), 945–959. https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945

Putman, A. I., & Carbone, I. (2014). Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecology and Evolution*, *4*(22), 4399–4428. https://doi.org/10.1002/ece3.1305

Quintana Junco, D. J. (2019). Educación ambiental de los turistas que visitan el Puerto Misahuallí, Provincia de Napo. http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/7067

Reece, K. S. (2004). Microsatellite Marker Development and Analysis in the Eastern Oyster (Crassostrea virginica): Confirmation of Null Alleles and Non-Mendelian Segregation Ratios. *Journal of Heredity*, *95*(4), 346-352. https://doi.org/10.1093/jhered/esh058

Reed, D. H., & Frankham, R. (2003). Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology.* https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01236.x

Reis, N. R., Peracchi, A. L., Pedro, W. A., & de Lima, I. P. (2007). *Morcegos do brasil*. Universidade Estadual de Londrina Londrina, Brazil.

Rivero, H. S. A., Aguilar, A. I. C., Ruiz, R. M., Martínez, G. E. R., & Lugo, I. O. B. (2008). Importancia de los marcadores moleculares en el reconocimiento de la diversidad genética forestal. En *Avances De Investigación Forestal Y Desarrollo Sustentable*. 968–839–545–5 ISBN.

Ruiz-García, M., Castillo, M., Álvarez, D., Gardeazabal, J., Borrero, L., Ramírez, D., Carrillo, L., Nassar, F., & Gálvez, H. (2007). Estudio de 14 especies de primates platirrinos (Cebus, Saimiri, Aotus, Saguinus, Lagothrix, Alouatta y Ateles), utilizando 10 loci microsatélites: Análisis de la diversidad génica y de la detección de cuellos de botella con propósitos conservacionistas. *Orinoquia*, *11*(2), 19–37.

Ruiz-García, M., Castillo, M. I., Vásquez, C., Rodriguez, K., Pinedo-Castro, M., Shostell, J., & Leguizamon, N. (2010). Molecular phylogenetics and phylogeography of the white-fronted capuchin (*Cebus albifrons*; Cebidae, Primates) by means of mtCOII gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *57*(3), 1049–1061. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.09.002

Ruiz-García, M., Jaramillo, M., Sánchez-Castillo, S., Castillo, M., Pinto, C., & Shostell, J. (2021). Effects of Sample Size in the Determination of the True Number of Haplogroups or ESUs Within a Species with Phylogeographic and Conservation Purposes: The Case of *Cebus albifrons* in Ecuador, and the Kinkajous and Coatis Throughout Latin America (pp. *101–148).* https://doi.org/10.1007/978-3-030-65606-5_6

Ruiz-García, M., Sánchez-Castillo, S., Castillo, M. I., Luengas, K., Ortega, J. M., Moreno, P., Albuja, L., Pinto, C. M., & Shostell, J. M. (2018). How many species, taxa, or lineages of *Cebus albifrons* (Platyrrhini, Primates) inhabit Ecuador? Insights from mitogenomics. *International Journal of Primatology*, *39*(6), 1068–1104. https://doi.org/10.1007/s10764-018-0062-6

Rylands, A. B., Schneider, H., Langguth, A., Mittermeier, R. A., Groves, C. P., & Rodríguez-Luna, E. (2000). An assessment of the diversity of New World primates. *Neotropical Primates*, *8*(2), 61–93. https://doi.org/10.62015/np.2000.v8.453

Rylands, A., Mittermeier, R., Bezerra, B., Paim, F., & Queiroz, H. (2013). Family Cebidae (squirrel monkeys and capuchins). *Handbook of the Mammals of the World*, *3*, 348–413.

Serrote, C. M. L., Reiniger, L. R. S., Silva, K. B., Rabaiolli, S. M. dos S., & Stefanel, C. M. (2020). Determining the Polymorphism Information Content of a molecular marker. *Gene*, *726*, 144175. https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144175

Smith, R. (2010). Manual de ecoturismo para la Amazonía ecuatoriana. https://digitalrepository.unm.edu/abya_yala/303/

Solórzano-García, B., Zubillaga, D., Piñero, D., & Vázquez-Domínguez, E. (2021). Conservation implications of living in forest remnants: Inbreeding and genetic structure of the northernmost mantled howler monkeys. *Biotropica.* https://doi.org/10.1111/btp.12958

Spielman, D., Brook, B. W., Briscoe, D. A., & Frankham, R. (2004). Does Inbreeding and Loss of Genetic Diversity Decrease Disease Resistance? Conservation Genetics. https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000041030.76598.cd

Takagi, M., Taniguchi, N., Cook, D., & Doyle, R. W. (1997). Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream Pagrus major and detection in closely related species. *Fisheries science*, *63*(2), 199-204.

Thermo Fisher Scientific. (2012). General recommendations for DNA electrophoresis.

Tirira, D. G. (2013). Tráfico de primates nativos en el Ecuador. *Boletín Técnico*, Serie Zoológica, 11(8–9). https://journal.espe.edu.ec/ojs/index.php/revista-serie-zoologica/article/view/1455

Tirira, D. G., & Aguilar, J. M. (2025). Registro de primates en las bajuras amazónicas de la cuenca del río Morona, Morona Santiago, Ecuador. *Revista Peruana de Biología*, *32*(2), e29640. https://doi.org/10.15381/rpb.v32i2.29640

Tirira, D. G., de la Torre, S., & Zapata Ríos, G. (2018). Estado de Conservación de los Primates del Ecuador. *Grupo de Estudio de Primates del Ecuador/Asociación Ecuatoriana de Mastozoología*, Publicación Especial Sobre los Mamíferos del Ecuador, 12.

Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. de F. (2016). Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, *39*, 312–328.

Waits, L. P., & Paetkau, D. (2005). Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: A review of applications and recommendations for accurate data collection. *The Journal of Wildlife Management*, *69*(4), 1419–1433.

Wang, D., Shi, J., Carlson, S., Cregan, P., Ward, R., & Diers, B. (2003). A low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers. *Crop Science*, *43*(5), 1828–1832.

Waples, R. S. (2015). Testing for Hardy–Weinberg Proportions: Have We Lost the Plot? Journal of Heredity, 106(1), 1–19. https://doi.org/10.1093/jhered/esu062

Wehncke, E. V., Hubbell, S. P., Foster, R. B., & Dalling, J. W. (2003). Seed dispersal patterns produced by white-faced monkeys: Implications for the dispersal limitation of neotropical

tree species. *Journal of Ecology*, *91*(4), 677–685. https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00798.x

Willoughby, J. R., Sundaram, M., Wijayawardena, B. K., Kimble, S. J. A., Ji, Y., Fernandez, N. B., Antonides, J. D., Lamb, M. C., Marra, N. J., & DeWoody, J. A. (2015). The reduction of genetic diversity in threatened vertebrates and new recommendations regarding IUCN conservation rankings. *Biological Conservation*, *191*, 495-503. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.07.025

Witte, S. M., & Rogers, J. (1999). Microsatellite polymorphisms in Bolivian squirrel monkeys (Saimiri boliviensis). *American Journal of Primatology.* https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2345(1999)47:1%3C75::AID-AJP9%3E3.0.CO;2-1

Xu, Y., Li, W., Hu, Z., Zeng, T., Shen, Y., Liu, S., Zhang, X., Li, J., & Yue, B. (2018). Genome-wide mining of perfect microsatellites and tetranucleotide orthologous microsatellites estimates in six primate species. *Gene*, *643*, 124–132.

Yasodha, R., Vasudeva, R., Balakrishnan, S., Sakthi, A. R., Abel, N., Binai, N., Rajashekar, B., Bachpai, V. K. W., Pillai, C., & Dev, S. A. (2018). Draft genome of a high value tropical timber tree, Teak (Tectona grandis L. *f): Insights into SSR diversity*, phylogeny and conservation. DNA Research, 25(4), 409–419.

Zapata-Ríos, G. (2001). Sustentabilidad de la cacería de subsistencia: El caso de cuatro comunidades quichuas en la Amazonía nororiental ecuatoriana. *Mastozoología Neotropical*, *8*(1), 59–66.