

CAMILA MOURA NOVAES

**ANÁLISE CARIOTÍPICA DE SAGUIS HÍBRIDOS DO GÊNERO *CALLITHRIX*
NO SUDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

N935a
2014 Novaes, Camila Moura, 1984-
Análise cariotípica de saguis híbridos do gênero
Callithrix no sudeste brasileiro / Camila Moura Novaes.
- Viçosa, MG, 2014.
xiii, 47f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Ita de Oliveira e Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Saguis. 2. Citogenética. 3. Hibridação.
4. *Callithrix*. 8. Brasil, Sudeste. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa
de Pós-graduação em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 572.8

CAMILA MOURA NOVAES

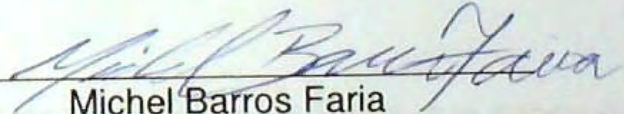
**ANÁLISE CARIOTÍPICA DE SAGUIS HÍBRIDOS DO GÊNERO *CALLITHRIX*
NO SUDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

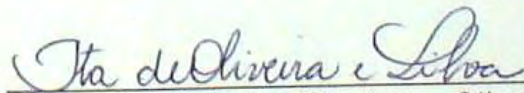
APROVADA: 15 de agosto de 2014.



Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Coorientador)



Michel Barros Faria



Ita de Oliveira e Silva
(Orientadora)

*"Não são as espécies mais fortes que sobrevivem
nem as mais inteligentes, e sim as mais suscetíveis
a mudanças"*

Charles Darwin

*"Crescer custa, demora, esfolta, mas compensa.
É uma vitória secreta, sem testemunhas.
O adversário somos nós mesmos"*

Martha Medeiros

***Dedico este trabalho a todos que sonharam
comigo e que de alguma forma se fizeram
presente nessa etapa!***

Agradecimentos

À professora Ita, por ter me aceitado como sua aluna, por ter confiado em meu trabalho. Por toda sua dedicação e seu investimento em mim.

Ao professor Jorge por ter aceitado me co-orientar e por abrir as portas do Beagle pra mim. Suas contribuições foram além da citogenética e da biologia molecular. Aprendi com seus ensinamentos acadêmicos a ter um brilho no olhar por aquilo que fazemos.

Ao professor e amigo Michel Barros Faria, por aceitar participar da banca e por ser fundamental na aprendizagem acadêmica e pessoal.

Ao professor Ruiz-Miranda por ceder o material biológico para realizações dos experimentos. À Adriana Grativol por nos ajudar com um frasco de colchicina, no momento em que ela faltou e ainda tínhamos muitos animais para serem processados.

Aos pesquisadores da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Pr. Dr. Leonardo Serafim e Dr. Giane Kristosch pelo suporte, logística e coleta das amostras. À equipe de captura Mayara Amescua (UENF), Rafaela Ribeiro Screnci (UENF), Roberta Silva Santos (UENF) e Natalia Lima (UENF) pela captura de animais e coleta de amostras.

Ao Camilo (Xaracito) por ter se disponibilizado a ir pra Campos dos Goytacazes para processar todo o material biológico.

Aos marujos do Beagle, que sempre se disponibilizaram a ajudar e a ensinar. Em especial à Marininha, que foi meu primeiro contato e que me recebeu com todo carinho e disposição em me acompanhar. A Nicole por toda ajuda e pela amizade e a Nathalia Travenzoli por toda ajuda nos experimentos e por todo incentivo!

Aos colegas do Projeto Saguis de Viçosa pela ajuda em campo, por momentos compartilhados juntos e pelos conhecimentos trocados. Aos colegas do mestrado Fernandinha, Drica, Milene, Clarice e Renata pelas trocas de conhecimento.

À Isabel Tostes, por toda sua ajuda em campo e em laboratório. É sem dúvida a melhor estagiária. Obrigada pelo apoio e carinho!

Ao Ighor Zappes que se disponibilizou em fazer várias PCRs comigo, mesmo quando as suas reações não davam certo. Foram intermináveis testes que ele esteve ao meu lado, sempre com uma palavra encorajadora: calma, vai dar certo!

Ao veterinário Vinicius, por sua disponibilidade em fazer todos os procedimentos nas capturas.

À Claudinha, amiga e veterinária que também contribuiu nos procedimentos com alguns animais. Além disso, sua amizade sempre foi importante pra mim. Longas conversas e desabafos fizeram a diferença nesse período.

À Jaque, professora de inglês e amiga. Todo o seu incentivo no ensino da língua e todo o seu apoio e sua amizade foram importantes na decisão de seguir esse caminho.

À Fernanda, professora de inglês, pelas correções e ensinamentos.

À Lúcia, secretária da Biologia Animal que sempre esteve de prontidão para atender nossos pedidos e sempre nos ajudou em tudo. Ao Adinilson que sempre socorreu no sistema. Obrigada por ajudar na parte burocrática.

À Albinha, minha amiga! Obrigada pelas correções e por toda ajuda nesse processo! Todo o seu apoio antes e durante esse período tornou meus dias mais coloridos. Me fez ver que Deus nos manda anjos para tornarem nossa caminhada melhor. Sua amizade é muito importante pra mim.

À Mariane, amiga que me acompanha desde a graduação. Seus incentivos e esforços para que eu não desistisse desse sonho foram fundamentais nessa conquista!

À República Ternurinha, que sem dúvida foi a maior fonte de aprendizado e crescimento nesse período! A Aninha, Viktinho e Verônica, que dividiram seu espaço comigo e foram peças fundamentais desse crescimento!

À Nena, com seus conselhos e sua terapia que me ajudaram a chegar até aqui sem carregar fardos pesados.

À Talithinha, por todo apoio e amizade. À Angela, por todas as orações antes e durante o mestrado. Ao amigo Abóbora, por seguir comigo todos os caminhos. Por ser companheiro na escolha pela real felicidade. Aos meus amigos, que mesmo longe se fazem presente e são parte de mim. Essa vitória também é deles.

Ao Clodoaldo, pelas ajudas em campo, pelas correções na escrita, por me incentivar, por participar de tudo com tanto carinho e amor. Sua presença tornou meus dias mais felizes e fez surgir em mim os sorrisos mais belos.

Aos meus pais, Neuza e “15”, por me incentivarem a seguir meu sonho. Obrigada por serem meu porto seguro, minha razão de viver. Vocês são incentivo pra eu ser melhor a cada dia. Ao meu irmão Gui, que é a criaturinha mais especial em minha vida. Ser exemplo para você é o que me move. Obrigada por serem luz em minha vida! Amo vocês!

Enfim, agradeço a Deus, que me levou a realizar esse sonho e me sustentou em todos os momentos, me trazendo pessoas em cada momento em que eu me encontrava. Em cada encontro na capela da UFRV, em cada gesto simples, Ele me fez perceber a cada dia sua presença real em mim e à minha volta!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVO GERAL	14
2.1. Objetivos específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Área de estudo	15
3.2. Coleta de dados.....	15
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
5. ARTIGO I - Características cariotípicas de saguis híbridos do gênero <i>Callithrix</i> (Erxleben, 1777) sugerem a participação de três espécies parentais.....	17
5.1. Resultados.....	18
5.2. Discussão.....	23
5.3 Referências Bibliográficas.....	26
6. ARTIGO II - Mapeamento cromossômico utilizando sondas de sequências repetitivas em saguis híbridos do gênero <i>Callithrix</i> (Erxleben).....	31
6.1. Resultados e Discussão	32
6.2. Referências Bibliográficas.....	35
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
8. ANEXOS	41
8.1. Preparações citogenéticas	41
8.2. Protocolo de coloração convencional por Giemsa	42
8.3. Protocolo de Ag-NOR	43
8.4. Protocolo de Bandeamento C	44
8.5. Protocolo de Hibridação Fluorescente in situ segundo Cioffi para sondas de DNA repetitivo	45

LISTA DE FIGURAS

Introdução geral

- Figura 1.** As seis espécies que formam o gênero *Callithrix* (Rylands *et al.*, 2009)..... 5
- Figura 2.** Mapa da distribuição original das espécies do gênero *Callithrix* (Rylands *et al.*, 2009)..... 6
- Figura 3.** Indivíduos híbridos do gênero *Callithrix*, retirados da Ilha D'Água, na Baía de Guanabara e mantidos no Sercas (Setor de Etologia, Reprodução e Conservação de Animais Silvestres) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)..... 6

Artigo I

- Figura 1.** Cariótipo dos indivíduos analisados em coloração Giemsa. (a) Cariótipo de um indivíduo do sexo feminino com uma fórmula cariótica: $10m+18sm+2st+14t$ de cromossomos autossomos e $NF=78$ (b) Cariótipo de um indivíduo do sexo masculino com a mesma fórmula cariótica para os cromossomos autossomos e $NF=77$ 19
- Figure 2.** Coloração convencional dos cromossomos por impregnação de nitrato de prata (Ag-NOR). (a) Quatro cromossomos marcados e (b) seis cromossomos corados 20
- Figure 3.** Padrões de heterocromatina encontrados em indivíduos híbridos. (a, b e c). Marcando as regiões centroméricas dos cromossomos 21
- Figure 4.** Hibridização fluorescente *in situ* (FISH), a sonda $GA_{(15)}$ de DNA repetitivo. Marcação dos pares de cromossomos telocêntricos 16, 17, 20 e 21 e um membro da pares de cromossomos 8 e 15, o que sugere a natureza híbrida desses pares de homólogos. 22

Artigo II

- Figura 1.** Microsatélite CAT(10) com sinais mais fortes na região telomérica dos braços longos do primeiro par de cromossomos metacêntricos e no par 9 de cromossomos submetacêntricos. O quarto par de cromossomos metacêntricos com sinais em seus dois braços, e o par cinco com sinais em apenas um braço. Apenas um homólogo dos pares 6, 11 e 15 apresentaram sinais na região telomérica de seus braços longos. Os pares 2 e 12 apresentaram sinais ao longo

do cromossomo. O par 16 de cromossomos telocêntricos com sinais nos centrômeros	33
Figura 2. Microssatélite CGG ₍₁₀₎ com sinais no centrômero de quatro pares de cromossomos telocêntricos, sendo eles, pares 16, 19, 20 e 2	33
Figura 3. (a) Microssatélite CA ₍₁₅₎ com sinais nos centrômeros de dois pares de cromossomos telocêntricos e no braço longo de um par de cromossomos submetlocêntricos, sendo que o sinal de um dos homólogos, aparece mais forte. (b) Microssatélite GAG ₍₁₀₎ com sinais no par 19 de cromossomos telocêntricos.....	34
Figura 4. Marcação DAPI com sinais nos braços curtos e longo do primeiro par de cromossomos metacêntricos. Os pares 2 e 3 com marcações apenas no braço curto. Os pares 7 e 8 com marcações em todo braço longo. O par 10 com dois blocos de marcações no braço longo e o par 15 no braço longo. O par 18 apresentou três blocos de marcações, com zonas intersticiais entre eles. Os pares 16, 17, 19, 20, 21 e 22 apresentaram dois blocos de marcações, também com zonas intersticiais entre elas.....	34

RESUMO

NOVAES, Camila Moura, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2014. **Análise cariotípica de saguis híbridos do gênero *Callithrix* no sudeste brasileiro.** Orientadora: Ita de Oliveira e Silva. Coorientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

O gênero *Callithrix* possui seis espécies distribuídas no bioma Mata Atlântica, desde o nordeste brasileiro até o norte do estado de São Paulo, e em regiões dos biomas Cerrado e Caatinga. Indivíduos híbridos já foram registrados em condições de cativeiro e em zonas de contato naturais entre algumas das espécies do gênero. Estudos com citogenética convencional foram realizados com as espécies do gênero *Callithrix*, porém, não há na literatura, trabalhos com citogenética molecular através da técnica de FISH (hibridização fluorescente *in situ*) que utilizam sondas de DNA repetitivo. Esta técnica pode fornecer uma ferramenta rápida, precisa e econômica para definir a estrutura e revelar a organização e evolução do genoma das espécies. O objetivo deste trabalho foi analisar citogeneticamente animais ($N = 7$, sendo quatro machos e três fêmeas), a partir de preparos da medula óssea, provenientes da Ilha D'Água no estado do Rio de Janeiro, considerados híbridos das espécies introduzidas *C. jacchus* e *C. penicillata*, usando técnicas de coloração convencional, Ag-NOR e Bandeamento C e coloração com sondas de fluorocromos de DNA repetitivo. Os espécimes apresentaram $2n=46$, e fórmula cromossômica $10m+18sm+2st+14t$ de cromossomos autossomos com $NF=77$ para machos e $NF=78$ para fêmeas. Embora o número diplóide seja consistente com o padrão descrito para o gênero, é proposta uma fórmula cromossômica e um número fundamental que não são indicados na literatura. A forma do cromossomo Y foi semelhante à esperada em *C. aurita*, a qual é nativa na região. A coloração Ag-NOR marcou a constrição secundária do braço curto de dois pares de cromossomos, semelhante ao padrão já descrito para as outras espécies exceto em *C. jacchus*, que apresenta também marcações de NOR no cromossomo Y. O bandeamento C marcou a região centromérica dos cromossomos, corroborando a homogeneidade observada nas espécies puras. O microssatélite $GA_{(15)}$ marcou regiões nos cromossomos telocêntricos, pares 16, 17, 20 e 21, além de apenas um membro dos pares

cromossômicos 8 e 15, sugerindo a natureza híbrida destes pares de homólogos. O microssatélite $CA_{(15)}$ apresentou sinais nos centrômeros de dois pares de cromossomos telocêntricos e no braço longo de um par de cromossomos subtlocêntricos, sendo o sinal de um dos homólogos, aparece mais forte. O microssatélite $CAT_{(10)}$ apresentou sinais mais fortes, preferencialmente nas regiões teloméricas dos braços longos de cromossomos metacêntricos e subtlocêntricos. O par 4 de cromossomos metacêntricos apresentou sinais em seus quatro braços. O microssatélite $CGG_{(10)}$ apresentou sinais no centrômero de quatro pares de cromossomos telocêntricos, e o $GAG_{(10)}$ apresentou sinais em um par de cromossomos telocêntricos. Os microssatélites $A_{(30)}$, $C_{(30)}$, $GC_{(15)}$, $TA_{(15)}$ e $TAT_{(10)}$, $CAA_{(10)}$, e $CAG_{(10)}$ não apresentaram sinais em nenhum cromossomo. A marcação de DAPI apresentou sinais como blocos grandes nos cromossomos autossomos e não coincidiram com regiões heterocromáticas. Os caracteres cariotípicos sugerem que os híbridos apresentam mais de duas espécies parentais. E este é o primeiro trabalho de mapeamento cromossômico utilizando sondas de sequências repetidas de DNA em saguis.

ABSTRACT

NOVAES, Camila Moura, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2014. **Análise cariotípica de saguis híbridos do gênero *Callithrix* no sudeste brasileiro.** Adviser: Ita de Oliveira Silva. Co-Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

The *Callithrix* genus has six species distributed in the Atlantic Forest biome, from northeastern Brazil to the north of the state of São Paulo, and in regions of Cerrado and Caatinga. Hybrid individuals have been recorded in captive conditions and in areas of natural contact among some species of the genus. Conventional cytogenetic studies were performed with the genus *Callithrix*, however, there are no works in the literature about molecular cytogenetic technique of FISH (fluorescence in situ hybridization) using repetitive DNA probes. This technique can provide rapid, accurate and economical tool for defining the structure and revealing the organization and evolution of the genome of the species. The aim of this study was to analyze cytogenetically animals (N = 7, four males and three females) from bone marrow preparations, from the IlhaD'Água in the state of Rio de Janeiro, considered hybrids of the introduced species *C. jacchus* and *C. penicillata*, using conventional staining, Ag-NOR and C banding techniques and staining with fluorochromes of repetitive DNA probes. The specimens presented $2n = 46$ and chromosomal formula $10m+18sm+2st+14t$ of autosomal chromosomes with $NF = 77$ for males and $NF=78$ for females. Although a chromosomal formula and a key number that are not indicated in the literature, the diploid number is consistent with the pattern described for the genus proposed. The form of the Y chromosome was similar to that expected in *C.aurita*, which is native to the region. The Ag-NOR staining marked the secondary constriction of the short arm of two pairs of chromosomes, similar to the pattern already described for other species except *C. jacchus*, which also features markings NOR on chromosome Y. The C-banding marks the centromeric region chromosome, confirming the homogeneity observed in the pure species. The $GA_{(15)}$ in microsatellite regions marked telocentric pairs 16, 17, 20 and 21 chromosomes, and only one member of the chromosome pairs 8 and 15 as suggesting the hybrid nature of these pairs of homologous. The $CA_{(15)}$ microsatellite showed signs in the centromeres of two

pairs of telocentric chromosomes and the long arm of a pair of subtelocentric chromosomes, being the sign of one of the homologues, appears stronger. The $CAT_{(10)}$ microsatellite showed stronger signals, preferably in the telomeric regions of the long arms of metacentric and subtelocentric chromosomes. The fourth pair of metacentric chromosomes showed signs in his four arms. The $CGG_{(10)}$ microsatellite showed signs at the centromere of four pairs of telocentric chromosomes, and the $GAG_{(10)}$ showed signals on one pair of telocentric chromosomes. The microsatellites $A_{(30)}$, $C_{(30)}$, $GC_{(15)}$, $TA_{(15)}$ e $TAT_{(10)}$, $CAA_{(10)}$, e $CAG_{(10)}$ did not show any signs chromosome. Marking DAPI showed signs as large blocks in chromosomes and autosomes did not coincide with heterochromatic regions. The karyotypic characters suggest that hybrids have more than two parental species. And this is the first work using chromosomal mapping of repeated sequences of DNA probes in marmosets.

1.Introdução Geral

O Brasil possui 77% das espécies de primatas do Novo Mundo, sendo assim o país com a maior diversidade de animais dessa ordem (Rylands *et al.*, 1997). A família Callithrichidae é formada pelos gêneros *Callithrix*, *Cebuella*, *Callibella*, *Mico*, *Saguinus*, *Leontopithecus* e *Callimico* (Rylands & Mittermeier, 2009) sendo composta pelos menores primatas do mundo, os quais o peso corporal não ultrapassa um quilograma. Possuem o hábito alimentar onívoro e são, também, adaptados à dieta de exploração de exsudatos vegetais (Coimbra-Filho & Mittermeier, 1976). Vivem em grupos de 4 a 15 indivíduos (Stevenson & Rylands, 1988), ocupando uma grande variedade de habitats neotropicais.

O gênero de estudo, *Callithrix* (Erxleben, 1777), possui seis espécies distintas morfológicamente (Figura 1), originalmente distribuídas pelo território brasileiro, ocupando áreas de Cerrado, Caatinga e regiões litorâneas desde o Maranhão até o estado de São Paulo (Figura 2) (Rylands *et al.*, 2009). Entretanto, a distribuição atual das espécies do gênero *Callithrix* vem sendo motivo de discussões, devido a fatores como fragmentação das florestas e introdução em locais fora de sua origem natural, que têm alterado essa distribuição original, aumentando a ocupação espacial de algumas espécies. Devido à ampla distribuição da espécie *C. penicillata* (Rylands *et al.*, 2009) e à introdução da espécie *C. jacchus* vítimas do tráfico de animais silvestres, essas duas espécies são as que mais participam dos processos de hibridização com as outras espécies do gênero.

A introdução de espécies é a segunda maior causa da desintegração ecológica, perdendo apenas para a fragmentação de habitats, onde estima-se que futuramente será a maior causa da perda de biodiversidade no planeta (Rocha & Anjos, 2007; Chapin *et al.*, 2000). Alguns estados brasileiros têm registrado a presença de espécies exóticas em todos os seus Municípios (Bruno & Bard, 2012) e, em alguns casos, essa introdução de espécies tem representado ameaças às espécies nativas (Ruiz-Miranda *et al.*, 2011; Ruiz-Miranda *et al.*, 2010; Ruiz-Miranda *et al.*, 2006).

Uma das consequências mais graves da introdução de espécies exóticas sobre a biota autóctone é o fenômeno conhecido como hibridação (Bruno & Bard, 2012). Esse fenômeno se dá pela ruptura dos limites entre as espécies que pode resultar na perda de espécies puras (Arnold & Meyer, 2006; Mallet, 2005). Como conceito de espécies mais utilizado tem-se os seguintes:

“O critério para o status de espécie, no caso do conceito morfológico (tipológico) de espécies, é o grau de diferença fenotípica. De acordo com esse conceito, uma espécie é reconhecível pela diferença intrínseca refletida em sua morfologia, e é isso o que torna uma espécie claramente diferente de toda e qualquer outra”. (Linnaeu, 1758).

“Grupos de populações naturais capazes de entrecruzamento que são reprodutivamente (geneticamente) isolados de outros grupos similares. A ênfase dessa definição não está mais no grau de diferença morfológica, mas sim na relação genética”. (Mayr, 1942).

“Uma espécie é um grupo de indivíduos completamente férteis entre si, mas isolados reprodutivamente de outros grupos semelhantes por suas propriedades fisiológicas (produzindo qualquer incompatibilidade de pais, ou esterilidade dos híbridos, ou ambos)”. (Dobzhansky, 1935).

Entre os primatas, esse fenômeno de hibridização já foi descrito para o Velho Mundo (Gotoh *et al.*, 2001; Detwiler *et al.*, 2005; Sugawara, 1988; Jolly *et al.*, 1997), com os primeiros casos sendo registrados para o gênero *Macaca* (Bernstein, 1966) e *Cercopithecus* (Aldrick-Blake, 1968). Esse fenômeno também ocorre no Novo Mundo (Aguiar *et al.*, 2008; Cortés-Ortiz *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 1992; Mendes, 1997) com a ocorrência de hibridização natural entre primatas dos gêneros *Alouatta* (Cortés-Ortiz *et al.*, 2007), *Saimiri* (Silva *et al.*, 1992) e *Callithrix* (Mendes, 1997; Passamani *et al.*, 1997). Experimentos realizados em cativeiro, também registraram indivíduos híbridos para os

gêneros *Leontopithecus* (Coimbra-Filho & Mittermeier, 1976) e *Callithrix* (Coimbra-Filho, 1970; Coimbra-Filho & Maia, 1976; Coimbra-Filho, 1993).

Tem-se registrado híbridos férteis na família *Callitrichidae* nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (Alonso *et al.*, 1987; Mendes, 1989; Mendes, 1991; Pereira *et al.*, 1994; Passamani *et al.*, 1997; Mendes, 1997; Melo, 1999). Os indivíduos, geralmente, apresentam caracteres morfológicos intermediários aos apresentados pelas espécies puras, como por exemplo, o tufo pré-auricular branco, presença marcante da espécie *C. jacchus* e mancha branca na face, característica da espécie *C. penicillata*.

Em primatas, os estudos citogenéticos podem elucidar problemas de identificação de espécies para fins taxonômicos, reprodutivos ou para uso em pesquisas biomédicas, quando essas apresentam grande polimorfismo na pelagem que dificultam a distinção entre elas (Nieves *et al.*, 2008). Podem, também, revelar alterações desconhecidas no nível de população como, por exemplo, a alteração numérica encontrada em populações de saguis (*C. jacchus*) de cativeiro, devido à exposição dos animais a produtos de químicos desinfetantes (Delimitreva *et al.*, 2013).

Além disso, a citogenética é uma ferramenta importante uma vez que os cromossomos são os elementos estruturais controladores das principais características da hereditariedade em todos os sistemas biológicos (Guerra, 1988) e através de comparações cariotípicas, relações filogenéticas puderam ser investigadas (Iughetti, 2008). Os cromossomos podem variar morfológica e numericamente entre as espécies e existem, também, as diferenças cariotípicas intraespecíficas, que sugerem a existência de espécies crípticas (Pieczarka & Nagamachi, 2004). Alterações cromossômicas são potencialmente importantes para o rumo evolutivo das espécies (Viña Bertolotto, 2006), e estudos com comparações cariotípicas associados a estudos taxonômicos e moleculares fornecem uma ferramenta útil para estudar evolução, filogenia e entender os mecanismos de especiação (Artoni *et al.*, 2000).

Dentro da citogenética, as técnicas de bandeamento são úteis no pareamento correto dos cromossomos e também na visualização das possíveis variações estruturais (Guerra, 2008). Espécies relacionadas, semelhantes em número e morfologia de seus cromossomos, podem apresentar diferenças nos

padrões de bandeamento em seus cariótipos, como encontrado nas sub-espécies *Saguinus midas midas* e *Saguinus midas niger* (Nagamachi *et al.*, 1990).

Grande parte dos estudos citogenéticos do gênero *Callithrix* foram realizados com espécies consideradas “puras”, sendo que a Família *Callithrichidae* é amplamente estudada quanto ao número de cromossomos, coloração Ag-NOR e bandeamento C e G (Nagamachi & Ferrari, 1984; Barros *et al.*, 1990; Slavutsky & Vinuesa, 1990; Nagamachi *et al.*, 1992; Canavez *et al.*, 1996; Nagamachi *et al.*, 1997 a e b;) e algumas espécies em estudos de citogenética molecular empregando a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (Sherlock *et al.*, 1996; Sineo *et al.*, 2007; Neusser *et al.*, 2005). Existem poucos estudos citogenéticos e moleculares realizados em indivíduos híbridos de primatas. Para o gênero *Callithrix*, tem-se registro de apenas um trabalho com citogenética convencional, realizado com 3 indivíduos machos de cativeiro no estado do Rio de Janeiro, onde foram empregadas as técnicas de coloração convencional e Ag-NOR (Nogueira *et al.*, 2011).

A técnica de FISH (hibridização fluorescente *in situ*) pode fornecer uma ferramenta precisa, rápida e econômica de construção de mapas citogenéticos de homologies entre várias espécies (Wienberg & Stanyon, 1997), permitindo ainda, localizar diferentes tipos de sequências de DNA (Andrade & Lopes, 2011) e também podem demonstrar alterações cromossômicas ocorridas ao longo da evolução (Wienberg, 2005). Os microssatélites são marcadores genéticos promissores para estudos da história filogenética de populações, através da construção desses mapas comparativos e, assim, relações filogenéticas podem ser construídas através dessa técnica (Oliveira *et al.*, 2002, 2005).

Atualmente, os registros de indivíduos híbridos entre as espécies do gênero *Callithrix* vem aumentando. Na Baía de Guanabara, no estado do Rio de Janeiro, as espécies *C. penicillata* e *C. jacchus* foram introduzidas e a reprodução entre elas tem gerado filhotes que apresentam padrões morfológicos intermediários (Figura 3). Dessa forma, devido à importância dos estudos citogenéticos, e com a crescente introdução de espécies do gênero *Callithrix* fora de sua área de ocorrência, tendo como consequência a hibridização dessas espécies, tornam-se necessários trabalhos que

investiguem as possíveis alterações cromossômicas de animais híbridos e o processo de especiação dentro do gênero.

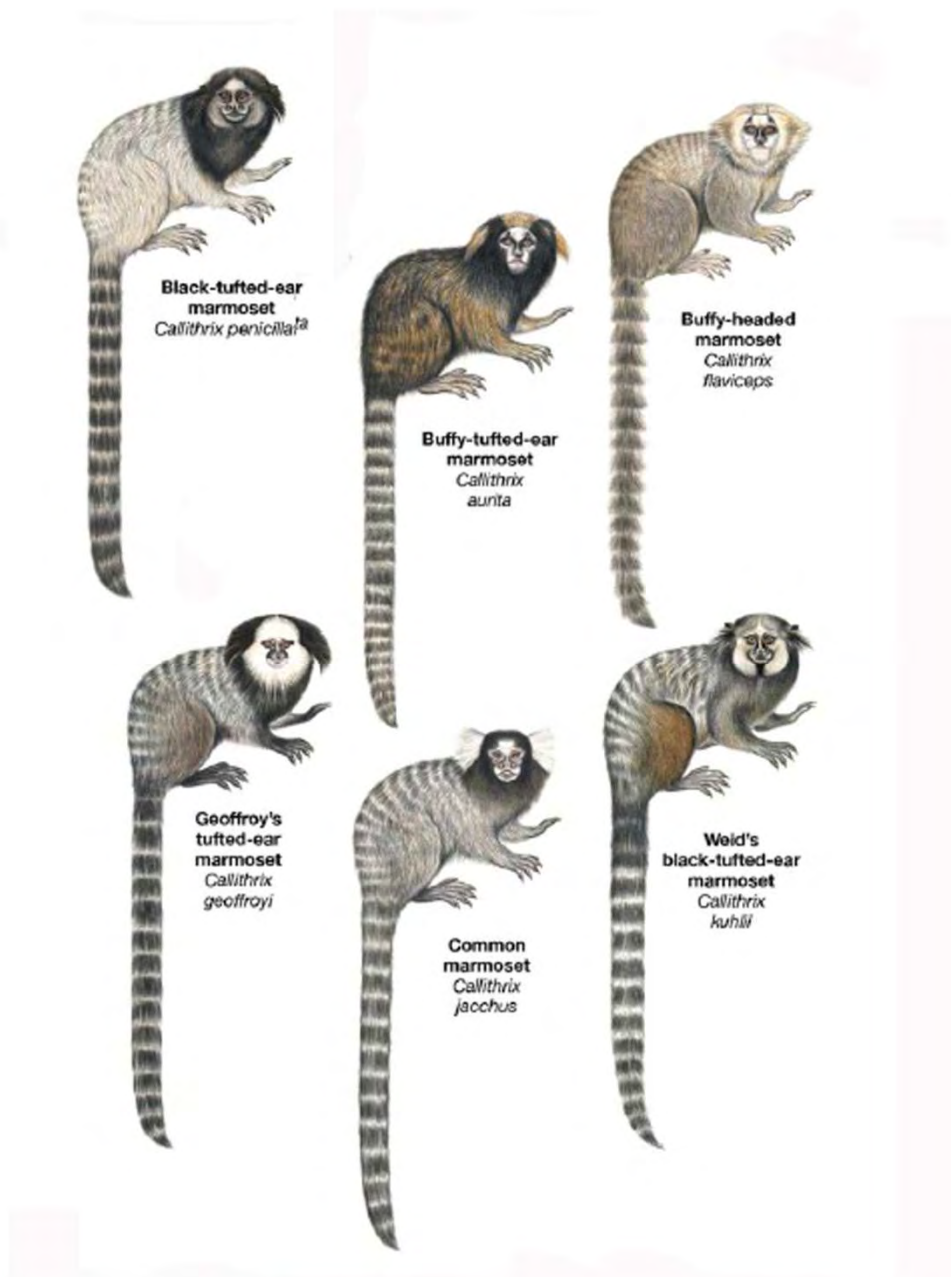


Figura 1: As seis espécies que formam o gênero *Callithrix* (Rylands *et al.*, 2009).



Figura 2: Mapa da distribuição original das espécies do gênero *Callithrix* (Rylands *et al.*, 2009).

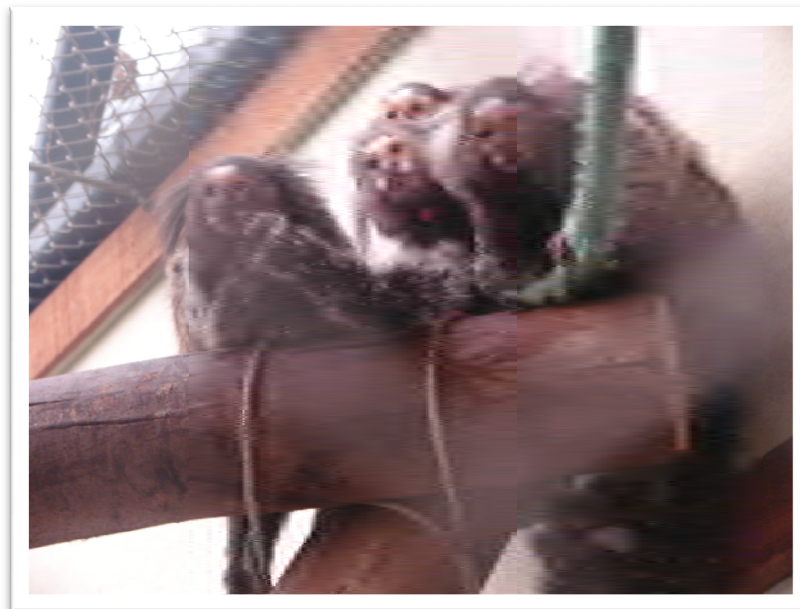


Figura 3: Indivíduos híbridos do gênero *Callithrix*, retirados da Ilha D'Água, na Baía de Guanabara e mantidos no Sercas (Setor de Etologia, Reprodução e Conservação de Animais Silvestres) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Foto: Camila Novaes.

2.Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi analisar cariotipicamente indivíduos híbridos do gênero *Callithrix* introduzidos na Ilha D'Água, na Baía de Guanabara, no estado do Rio de Janeiro, por meio de protocolos de coloração convencional Giemsa, Ag-Nor, bandeamento C e FISH (*fluorescence in situ hybridization*).

2.1.Objetivos específicos

- Analisar se há possíveis alterações no número de cromossomos dos indivíduos;
- Analisar se o padrão de Ag-NOR e Bandeamento C dos indivíduos híbridos apresentam diferenças do padrão descrito para as espécies consideradas puras;
- Descrever o mapeamento cromossômico de repetições de microssatélites usando a técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*).

3. Materiais e Métodos

3.1. Área de estudo

Os sete sagüis, sendo quatro machos e três fêmeas (*Callithrix jacchus*, *Callithrix penicillata* e híbridos) foram obtidos de programas de remoção autorizados conforme licença nº 33965-1 emitida pelo SISBIO-ICMBio-MMA, da Ilha d'Água, na Baía de Guanabara – RJ, região onde as espécies não ocorrem naturalmente. A Ilha d'Água pertence à TRANSPETRO e localiza-se no interior da baía de Guanabara, na cidade e estado do Rio de Janeiro. Os sagüis foram considerados um problema de segurança do trabalho neste local e iniciou-se um projeto conjunto entre TRANSPETRO e a Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) para remoção desses animais do local, sendo destinados todos ao Setor de Etologia, Reprodução e Conservação de Animais Silvestres (SERCAS) da UENF para avaliação sanitária e pesquisa.

3.2. Coleta de dados

As metáfases foram obtidas a partir de preparos da medula óssea (Ford e Harmeton, 1956). Foi injetada subcutaneamente em cada animal uma solução aquosa de colchicina a 0.05% na proporção de 1 ml/100g de peso corporal, por um período de uma hora. O material foi retirado do fêmur usando uma seringa com solução hipotônica de cloreto de potássio (KCL) 0,075M e incubado durante 30 minutos a uma temperatura de 37º C. Após esse período, a suspensão celular foi fixada em solução de metanol e ácido acético (3:1) e posteriormente levada a uma centrífuga de 1000rpm (Anexo 1). Para cada indivíduo foram analisadas as metáfases em coloração convencional Giemsa (5%) para determinar o número diplóide e a estrutura do cariótipo e posteriormente as lâminas foram descoradas com metanol e ácido acético (3:1). Os cromossomos foram corados com coloração convencional Giemsa (Anexo 2), as imagens das metáfases foram obtidas em software CellSens Dimensions e medidas em software Image Pro Plus®, e classificados conforme

a razão de braços (RB), dividindo o comprimento do braço maior pelo comprimento do braço menor, em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtlocêntrico (st) e telocêntricos (t) (Levan *et al.*, 1964). As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) foram identificadas por impregnação com nitrato de prata (Howell & Black, 1980) (Anexo 3). As regiões de heterocromatina constitutiva foram visualizadas a partir da técnica de Banda-C (Summer, 1972) (Anexo 4). Os experimentos de hibridização fluorescente *in situ* foram realizados como protocolo específico (Pinkel *et al.*, 1986) com modificações (Anexo 5). Foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos rotulados como sondas: A₍₃₀₎, C₍₃₀₎, CA₍₁₅₎, GA₍₁₅₎, GC₍₁₅₎, TA₍₁₅₎, CAA₍₁₀₎, CAG₍₁₀₎, CAT₍₁₀₎, GAG₍₁₀₎, CGG₍₁₀₎, e TAT₍₁₀₎. Estas sequências foram marcadas diretamente com Cy3 de 5' terminais durante a síntese por Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os cromossomos foram contrastados com Fluoroshield com DAPI (Sigma), e analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX53 (Olympus Corporation, Tokio, Japan).

4.Referências Bibliográficas

AGUIAR, L. M.; PIE, M. R.; PASSOS, F. C. 2008. Wild mixed groups of howler species (*Alouatta caraya* and *Alouatta clamitans*) and new evidence for their hybridization. *Primates*, 49: 149–152.

ALDRICH-BLAKE, F. P. G. 1968. A fertile hybrid between two *Cercopithecus* species in the Budongo Forest, Uganda. *Folia Primatologica*, 9: 15-21.

ALONSO, C.; FARIA, D. S.; LANGGUTH, A.; SANTEE, D. F. 1987. Variação da pelagem na área de intergradação entre *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*. *Revista Brasileira de Biologia*, 47: 465-470.

ARNOLD, M. L.; MEYER, A. 2006. Natural hybridization in primates: One evolutionary mechanism. *Zoology*, 109: 261–276.

ARTONI, R. F.; VICARI, M. F.; BERTOLLO, L. A. C. 2000. Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. *Biological and Health Sciences*, 6: 43-60.

BARROS, R. M. S.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C. 1990. Chromosomal evolution in *Callithrix emiliae*. *Chromosoma*, 99: 440-447.

BERNSTEIN, I. S. 1996. Occurring primate hybrid. *Science*, 3756: 1559-1560.

BRUNO, S. F.; BARD, V. T. 2012. Exóticos invasores – bioinvasores selvagens introduzidos no estado do Rio de Janeiro e suas implicações. Editora UFF.

CANAVEZ, F.; ALVEZ, S.; FANNING, T.G.; SEUÁNEZ, H. N. 1996. Comparative karyology and evolution of the Amazonian *Callithrix* (Platyrrhini, Primates). *Chromosoma*, 104: 348-357.

CHAPIN, F. S.; ZAVALETA, E. S.; EVINER, V. T.; NAYLOR, R. L.; VITOUSEK, P. M.; REYNOLDS, H. L.; HOOPER, D. U.; LAVOREL, S.; SALA, O. E.;

HOBBIE, S. E.; MACK, M. C.; DÍAZ, S. 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature*, 405: 234-242.

COIMBRA-FILHO, A. F. 1970. Acerca de um caso de hibridismo entre *Callithrix jacchus* (L.1758) x *C. geoffroyi* (Humboldt, 1812) (Callithricidae, Primates). *Revista Brasileira de Biologia*, 30: 507-517.

COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. 1976. Exsudate eating and tree-gouging in marmosets. *Nature*, 262: 630.

COIMBRA-FILHO, A.; MAIA, A. A. 1976. Hibridismo de macho de *Callithrix geoffroyi* (Humboldt, 1812) x fêmea de *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758), e criação artificial de filhote híbrido (Callithricidae, Primates). *Revista Brasileira de Biologia*, 36: 665-673.

COIMBRA-FILHO, A. F.; PISSINATTI, A.; RYLANDS, A. B. 1993. Experimental multiple hibridismo and natural hybrids among *Callithrix* species from eastern Brazil. *Marmosets and tamarins. Systematic, behavior and ecology*, 95-129.

CORTÉS-ORTIZ, L.; JUNIOR, T. F. D.; CANALES-ESPINOSA, D.; GARCÍA-ORDUÑA, F.; RODRÍGUEZ-LUNA, E.; BERMINGHAM, E. 2007. Hybridization in Large-Bodied New World Primates. *Genetics*, 176: 2421-2425.

DELIMITREVA, S.; WEDI, E.; BAKKER, J.; TKACHENKO, O. Y.; NIKOLOVA, V.; NAYUDU, P. L. 2013. Numerical chromosome disorders in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) – comparison between two captive colonies. *Journal of Medical Primatology*, 1-9.

DETWILER, K. M.; BURRELL, A. S.; JOLLY, C. J. 2005. Conservation Implications of Hybridization in African Cercopithecine Monkeys. *International Journal of Primatology*, 26: 661-684.

FORD, C. and HAMERTON, J., 1956. A colchicines hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome. *Stain Technology*, 31: 247:251.

GOTOH, S; TAKENAKA, O; WATANABE, K; HAMADA, Y; KAWAMOTO, Y; WATANABE, T; SURYOBROTO, B; SAJUTHI, D. 2001. Hematological values and parasite fauna in free-ranging *Macaca hecki* and the *M. hecki*/*M. tonkeana* hybrid group of Sulawesi Island, Indonesia. *Primates*, 42: 27-34.

GUERRA, M. S. 1988. Introdução à citogenética geral. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

HOWELL, W.M. and BLACK, D.A., 1980. Controlled silver - staining of nucleolus Organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.

IUGHETTI, C. G. 2008. Evolução cromossômica: estudo da variabilidade cariotípica em Platyrrhini e das homeologias e sintonias com cromossomos humanos. Tese. Universidade de São Paulo.

JOLLY, C. J.; WOOLLEY-BARKER, T.; BEYENE, S.; DISOTELL, T. R.; PHILLIPS-CONROY, J. E. 1997. Intergeneric Hybrid Baboons. *International Journal of Primatology*, 18: 597-627.

MALLET, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.*, 20(5): 229–237.

MELO, F. R. 1999. Caracterização molecular de *C. aurita*, *C. flaviceps*, *C. geoffroyi* e seus possíveis híbridos (Primates, Callitrichinae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa – UFV, 62 p.

MENDES, S. L. 1989. Sintropia e hibridização entre dois táxons de *Callithrix* do grupo *jacchus*. In resumos do XVI CBZ, Paraíba: 110.

MENDES, S.L. 1997. Hybridization in free-ranging *Callithrix flaviceps* and the taxonomy of the Atlantic Forest marmosets. *Neotropical Primates*, 5: 6-8.

NAGAMACHI, C. Y.; FERRARI, I. 1984. Cytogenetic studies of *Callithrix jacchus* (*Callitrichidae*, Platyrrhini) from two different sites in Brazil. I.

morphologic variability of chromosome Y. *Revista Brasileira de Genética*, 3: 497-507.

NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; BARROS, R. M. S. 1990. Cytogenetic study of *Saguinus midas midas* (Callitrichidae, Primata) from Jari, Brazilian Amazon Region, comparison with the karyotype of *Saguinus midas niger*. *Revista Brasileira de Genética*, 13: 89-96.

NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; BARROS, R. M. S. 1992. Karyotypic comparison among *Cebuella pygmaea*, *Callithrix jacchus* and *C. emiliae* (Callitrichidae, Primates) and its taxonomic implications. *Genética*, 85: 249-257.

NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; SCHWARZ, M.; BARROS, R. M. S.; MATTEVI, M. S. 1997a. Comparative chromosomal study of five taxa of genus *Callithrix*, group *Jacchus* (Platyrrhine, Primates). *American Journal of Primatology*, 41: 53-60.

NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; SCHWARZ, M.; BARROS, R. M. S.; MATTEVI, M. S.; 1997b. Chromosomal similarities and differences between tamarins, *Leontopithecus* and *Saguinus* (Platyrrhini, Primates). *American Journal of Primatology*, 43: 265-276.

NEUSSER, M.; MÜNCH, M.; ANZENBERGER, G.; MÜLLER, S. 2005. Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* x *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and comparative genomic hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*, 108: 191-196.

NIEVES, M.; MENDEZ, G.; ORTIZ, A.; MÜHLMANN, M.; MUDRY, M. D. 2008. Karyological diagnosis of *Cebus* (Primates, Platyrrhini) in captivity: Detection of hybrids and management program applications. *Animal. Reproduction. Science*: 108, 66–78.

NOGUEIRA, D. M.; FERREIRA, A. M. R.; GOLDSCHMIDT, B.; PISSINATTI, A.; CARELLI, J. B.; VERONA, C. E. 2011. Cytogenetic study in natural hybrids of

Callithrix (Callitrichidae: Primates) in the Atlantic forest of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia*, 101: 156-160.

PASSAMANI, M.; AGUIAR, L. M. S.; MACHADO, R. B.; FIGUEIREDO, E. 1997. Hybridization between *Callithrix geoffroyi* e *Callithrix penicillata* in southeastern in Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Primates*, 5: 9-10.

PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y. 2004. Pintura cromossômica como instrument para estudos filogenéticos em primatas. *Sociedade brasileira de genética*, 115-132.

ROCHA, C. F. D.; ANJOS, L. A. 2007. Feeding ecology of a nocturnal invasive alien lizard species, *Hemidactylus mabouia* Moreau de Jonnés, 1818 (Gekkonidae), living in an outcrop rocky area in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 3: 486-491.

RUIZ-MIRANDA, C. R.; AFFONSO, A. G.; DE MORAIS, M. M.; VERONA, C. E.; MARTINS, A.; BECK, B. B. 2006. Behavioral and Ecological Interactions between Reintroduced Golden Lion Tamarins (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1766) and Introduced Marmosets (*Callithrix spp*, Linnaeus, 1758) in Brazil's Atlantic Coast Forest Fragments Brazilian. *Archives of Biology and Technology*, 49: 99-109.

RUIZ-MIRANDA, C. R.; BECK, B. B.; KLEIMAN, D. G.; MARTINS, A.; DIETZ, J. M.; RAMBALDI, D. M.; KIERULFF, M. C.; OLIVEIRA, P. P.; BAKER, A. J. 2010. Re-introduction and translocation of golden lion tamarins, Atlantic Coastal Forest, Brazil: the creation of a metapopulation. In *Global re-introduction perspectives. Additional case-studies from around the globe: 225–230*. Soorae, P. S. (Ed.). Abu Dhabi, UAE: IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group (RSG).

RUIZ-MIRANDA, C. R.; DE MORAIS JÚNIOR, M. M.; DE PAULA, V. R.; GRATIVOL, A. D.; RAMBALDI, D. M. 2011. Vítimas e vilões: o problema dos saguis introduzidos no Rio de Janeiro. *Ciência Hoje*, 48: 44-49.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; RODRIGUEZ-LUNA, E. 1997. Conservation of Neotropical Primates: Threatened species and an analysis of primate diversity by country and region. *Folia Primatologica*, 68: 134-160.

RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A. C.; MITTERMEIER, R. A. 2009. The systematics and distributions of the marmosets (*Callithrix*, *Callibella*, *Cebuella* and *Mico*) and *Callimico* (Callithichidae, Primates). *The Smallest Anthropoids*, 25-61.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. 2009. The Diversity of the New World Primates (Platyrrhini): An Annotated Taxonomy. *In*: GARBER, P. A.; ESTRADA, A.; BICCA-MARQUES, J. C.; HEYMANN, E. W.; STRIER, K. B. *South American Primates: Comparative, perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation*. Springer, 23-54.

SHERLOCK, J. K.; GRIFFIN, D. K.; DELHANTY, J. D. A.; PARRINGTON, J. M. 1996. Homologies between human and marmoset (*Callithrix jacchus*) chromosomes revealed by comparative chromosome painting. *Genomics*, 33: 214-219.

SILVA, B. T. F.; SAMPAIO, M. I. C.; SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M. P. C.; MONTOYA, E.; ENCARNACION, F.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; SALZANO, F. M. 1992. Natural hybridization between *Saimiri* taxa in the Peruvian Amazonia. *Primates* 33, 107-113.

SINEO, L.; DUMAS, F.; VITTURI, R.; PICONE, B.; PRIVITERA, O.; STANYON, R. 2007. Williams-Beuren mapping in *Callithrix argentata*, *Callicebus cupreus* and *Alouatta caraya* indicates different patterns of chromosomal rearrangements in neotropical primates. *Journal of Zoological Systematics Evolutionary Research*, 45: 366-371.

SLAVUTSKY, M. D. M. I.; VINUESA, M. L. 1990. Chromosome Comparison Among Five Species of Platyrrhini (*Alouatta caraya*, *Aotus azarae*, *Callithrix jacchus*, *Cebus apella*, and *Saimiri sciureus*). *Primates*, 31: 415-420.

STEVENSON, M. F.; RYLANDS, A. B. 1998. The marmosets, Genus *Callithrix*. In: MITTERMEIER, R. A. *et al.* (Eds.) *Ecology and behavior of Neotropical Primates*. Washington, 2: 131-222.

SUGAWARA, K. 1988. Ethological study of the social behavior of hybrid baboons between *Papio anubis* and *P. hamadryas* in free-ranging groups. *Primates*, 29: 429-448.

VIÑA BERTOLOTTI, C. E. 2006. *Enyalius* (Leiosauridae: Squamata): o que os dados moleculares e cromossômicos revelam sobre esse gênero de lagartos endêmico do Brasil. São Paulo: USP. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 129p.

5. Artigo I

CARACTERÍSTICAS CARIOTÍPICAS DE SAGUIS HÍBRIDOS DO GÊNERO *CALLITHRIX* (ERXELEBEN, 1777) SUGEREM A PARTICIPAÇÃO DE TRÊS ESPÉCIES PARENTAIS

Camila Moura Novaes^I, Isabel Tostes Ribeiro^I, Jorge Abdala Dergam^I, Adriana Daudt Grativol^{II}, Carlos Ramon Ruiz-Miranda^{II}, Tania Ribeiro Junqueira Borges^{III}, Ita de Oliveira e Silva^I

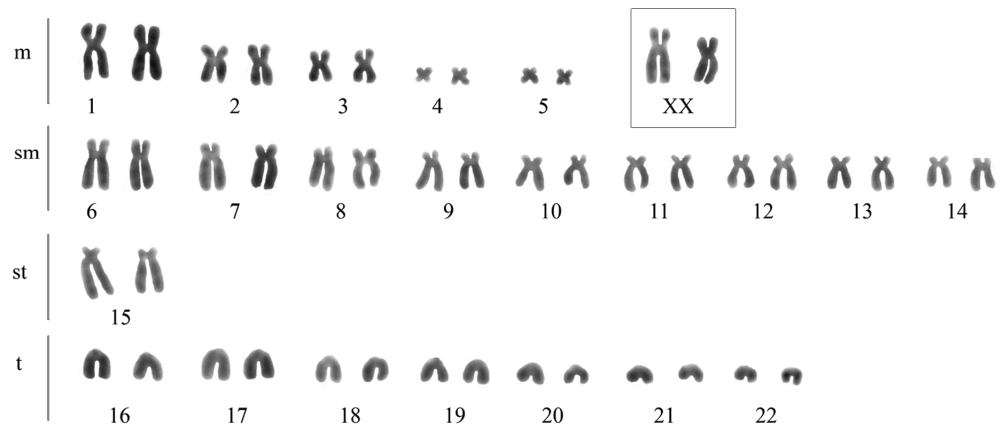
I - Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário. Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 36.570-000.

II – Laboratório de Ciências Ambientais. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Avenida Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. 28.013.602.

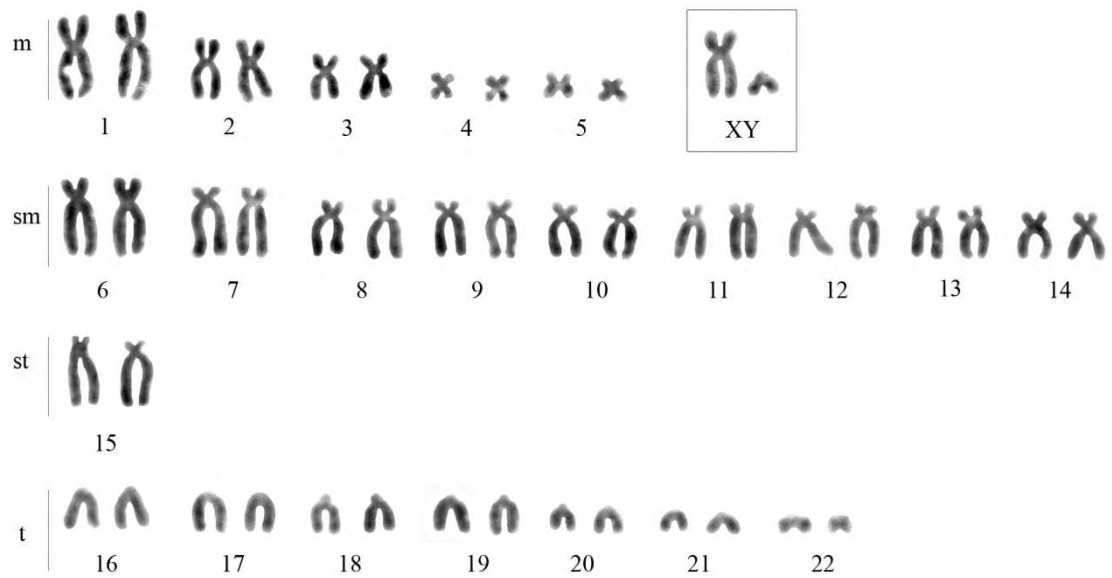
III – PETROBRAS Transporte SA-TRANSPETRO – Rua 16, casa 06 – Metropolitana. Brasília, Distrito Federal, Brasil. 71731-160.

5.1. Resultados

Os cariótipos dos indivíduos analisados apresentaram $2n=46$ cromossomos, com 14 cromossomos de um braço e 30 cromossomos de dois braços, com fórmula cariotípica $10m+18sm+2st+14te$ de cromossomos autossomos e NF (número fundamental)=77 para indivíduos machos e NF=78 para indivíduos fêmeas. Os cromossomos sexuais apresentaram morfologia metacêntrica para cromossomo X e telocêntrico para o cromossomo Y (Figura 01). A coloração Ag-NOR marcou a constrição secundária do braço curto variando de 2 a 3 pares de cromossomos (Figura 2a e b). A heterocromatina ocorreu como pequenas bandas na região centromérica de todos os cromossomos (Figura 3). A sonda fluorescente de DNA repetitivo acumulou em apenas um dos cromossomas de um par homólogo 8 (Figura 4). O mesmo padrão foi observado em par de cromossomos 15. Marcações fluorescentes também estavam presentes nos pares de cromossomos telocêntricos 16, 17, 20 e 21.



(a)



(b)

Figura 1: Cariótipo dos indivíduos analisados em coloração Giemsa. (a) Cariótipo de um indivíduo do sexo feminino com uma fórmula cariótica: $10m+18sm+2st+14t$ de cromossomos autossomos e $NF=78$ (b) Cariótipo de um indivíduo do sexo masculino com a mesma fórmula cariótica para os cromossomos autossomos e $NF=77$.

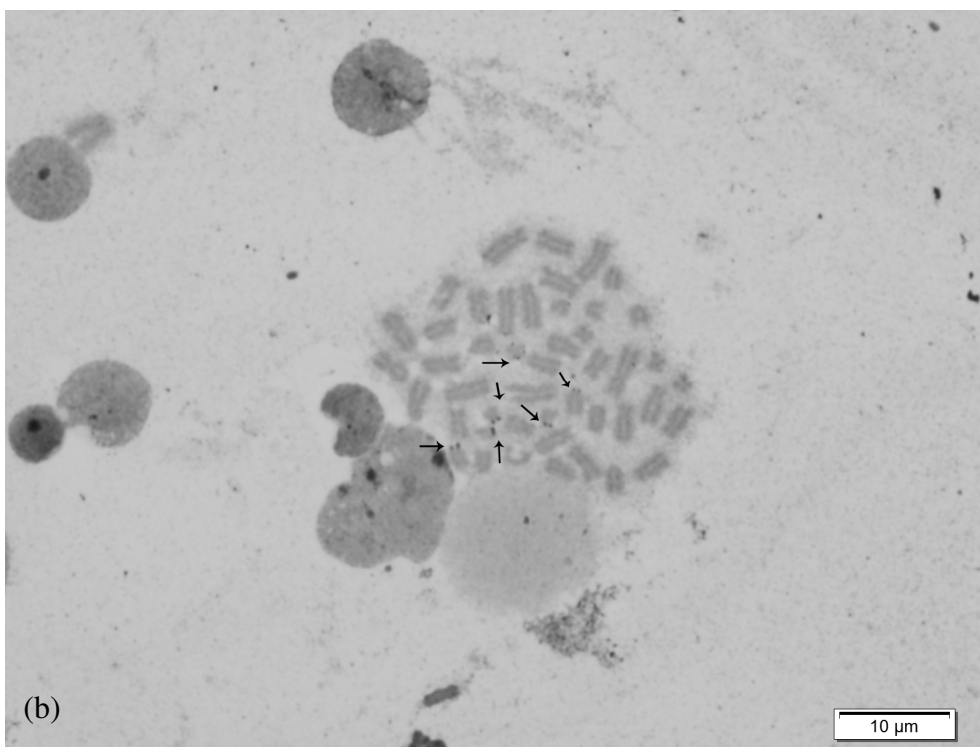
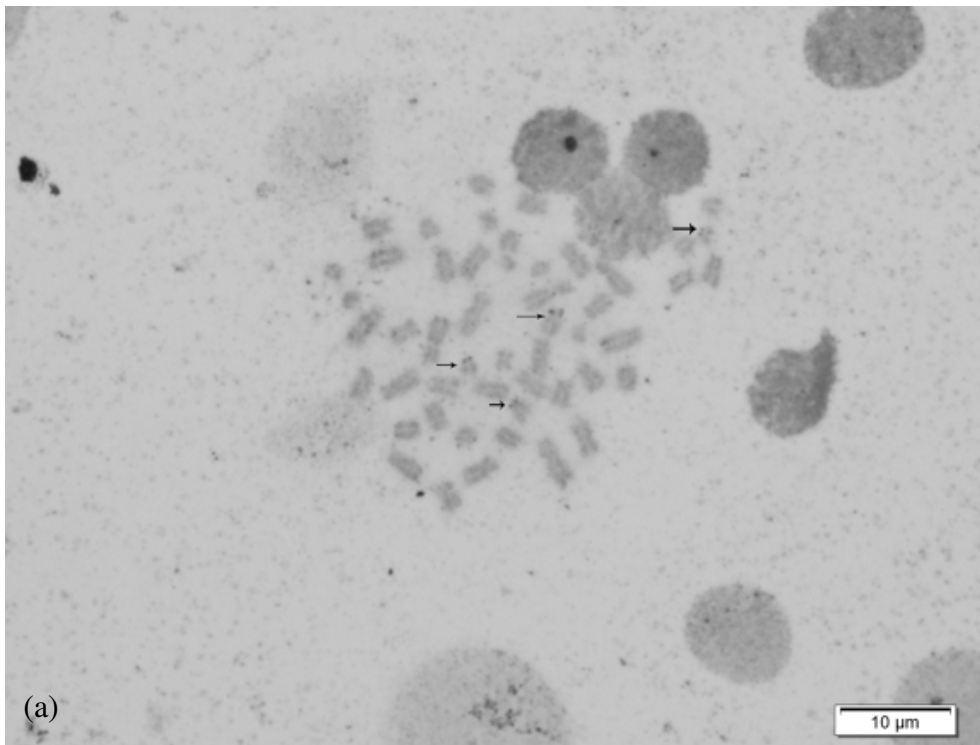
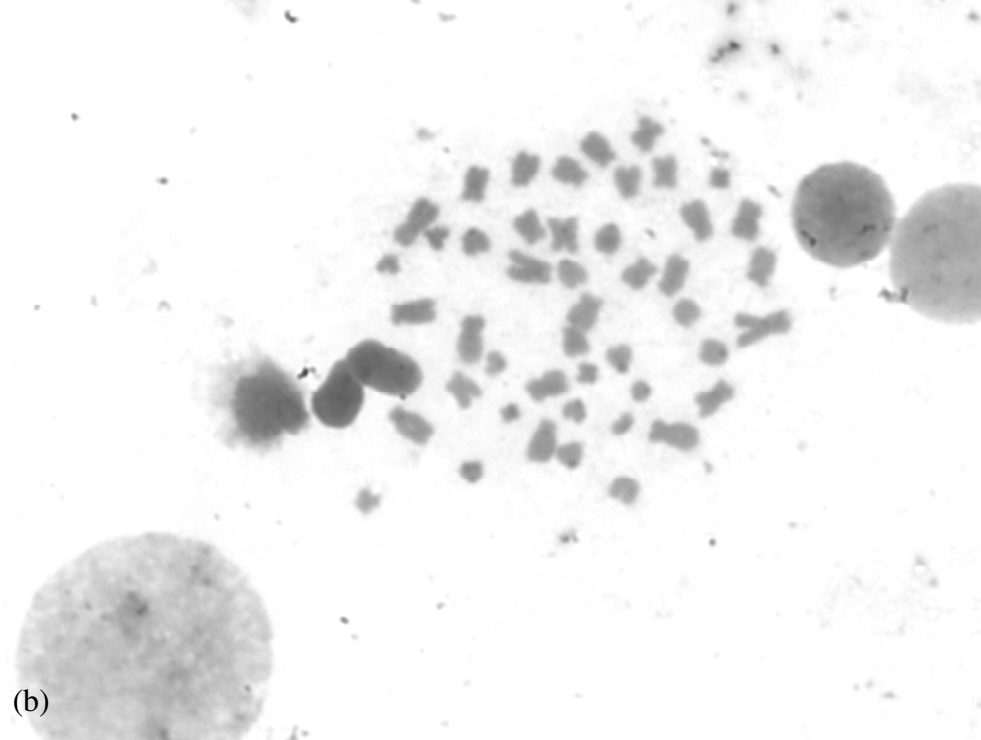
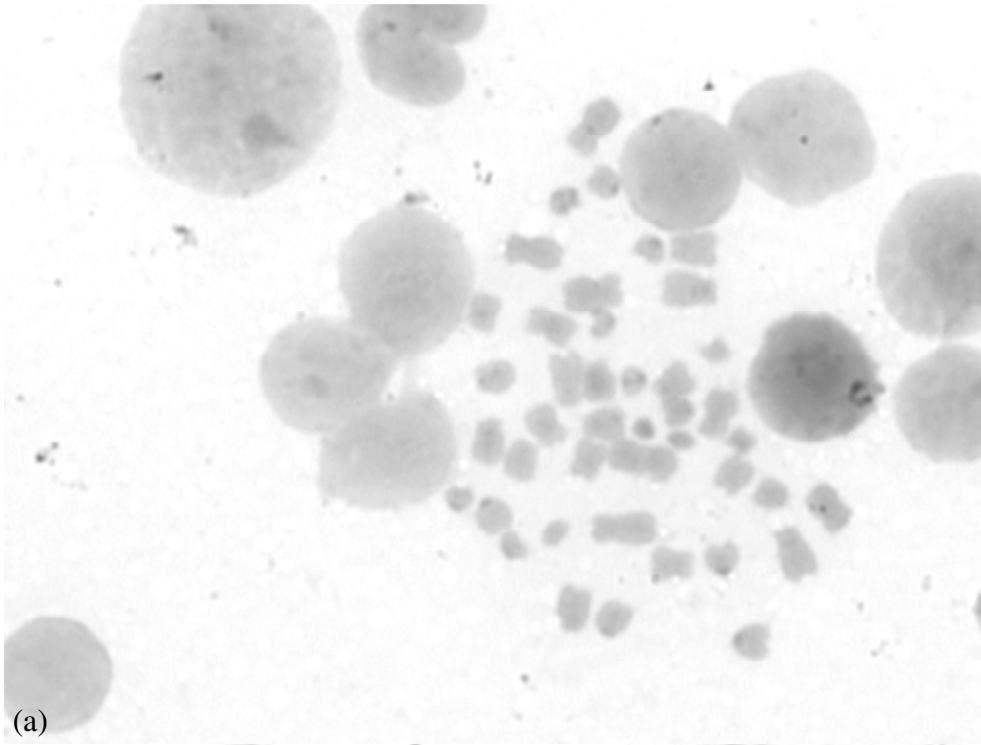


Figura 2: Coloração convencional dos cromossomos por impregnação de nitrato de prata (Ag-NOR). (a) Quatro cromossomos marcados e (b) seis cromossomos corados.



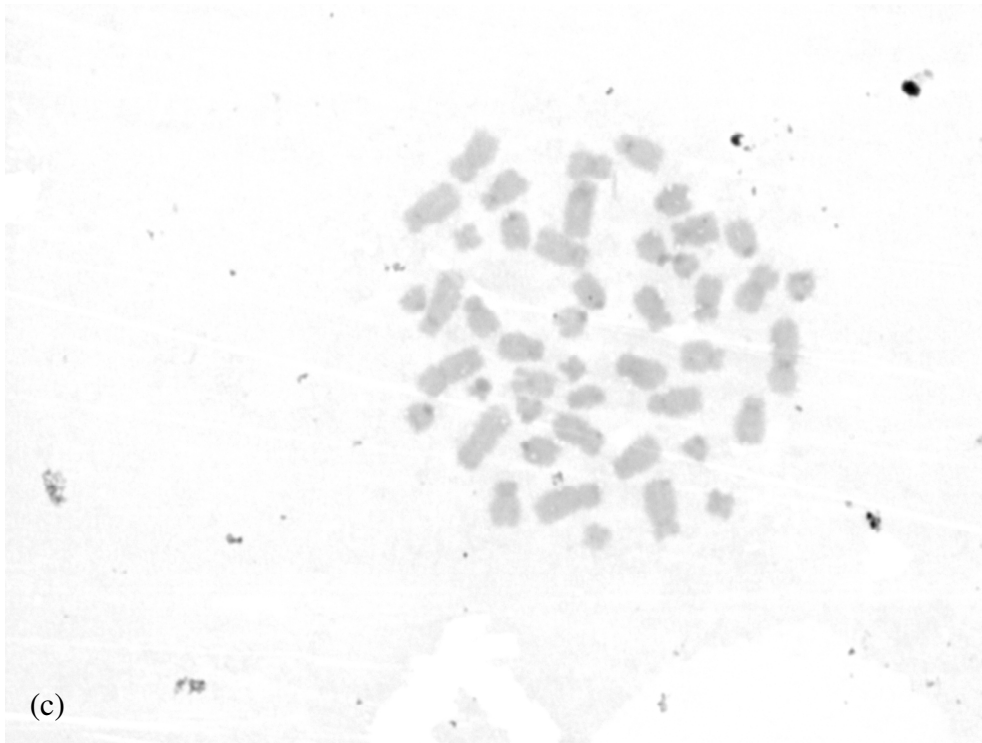


Figura 3: Padrões de heterocromatina encontrados em indivíduos híbridos. (a, b e c). Marcando as regiões centroméricas dos cromossomos.

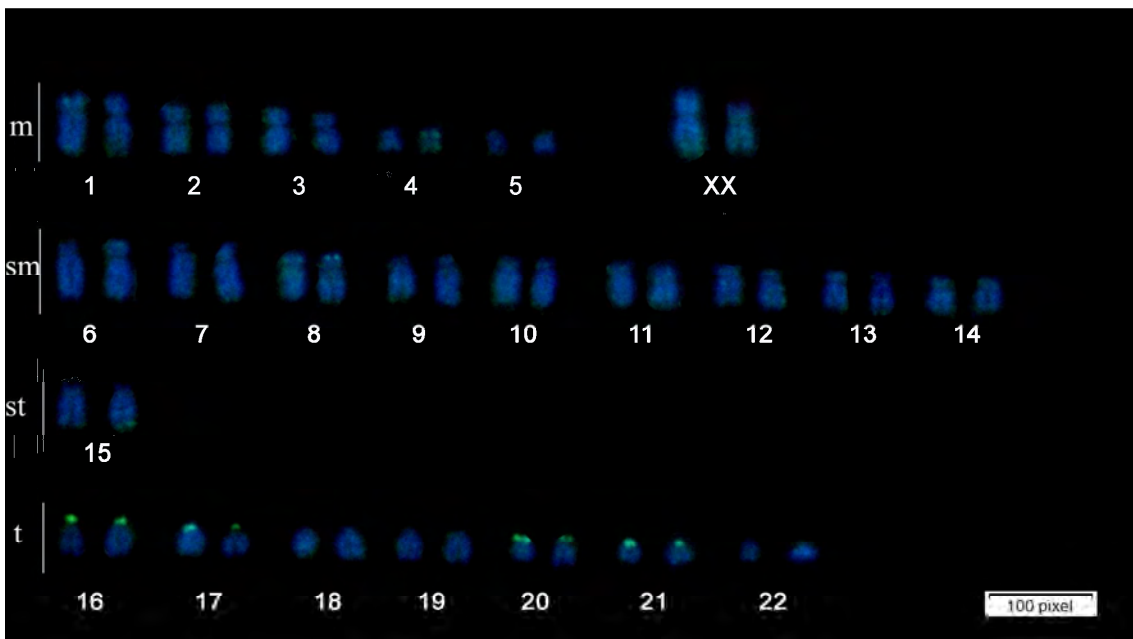


Figura 4: Hibridização fluorescente *in situ* (FISH), a sonda $GA_{(15)}$ de DNA repetitivo. Marcação dos pares de cromossomos telocêntricos 16, 17, 20 e 21 e um membro da pares de cromossomos 8 e 15, o que sugere a natureza híbrida desses pares de homólogos.

5.2. Discussion

O número de cromossomos dos animais considerados híbridos foi $2n=46$ cromossomos, com 14 cromossomos de um braço e 30 cromossomos de dois braços, sendo este número consistente com o número descrito para as espécies do gênero (Nagamachi & Ferrari, 1984; Nagamachi *et al.*, 1997a; Nogueira *et al.*, 2011). Os dados obtidos neste estudo indicam que a fórmula cariótica é de $10m+18sm+2st+14t$ (cromossomos autossomos) e $NF=77$ para indivíduos machos e $NF=78$ para indivíduos fêmeas, sendo que, estudos anteriores, realizados com as espécies puras e também com indivíduos híbridos, não especificam uma fórmula cromossômica e não apresentam o número fundamental (NF) (Nagamachi *et al.*, 1997a; Nogueira *et al.*, 2011). Estes resultados também diferem da primeira descrição de cariótipos realizada com a espécie *C. jacchus* (Nagamachi & Ferrari, 1984), que foi a referência dos estudos posteriores. A estrutura e número de cromossomos são importantes porque limitam os grupos de ligação, afetando a recombinação média e rearranjos (Eberle, 1975). Rearranjos cariotípicos foram detectados em *C. jacchus* como um possível efeito de agentes mutagênicos ambientais (Delimitreva *et al.*, 2013). As diferenças no número de cromossomos entre espécies estreitamente relacionadas são, principalmente, devido a translocações Robertsonianas, como observado em *C. emiliae* (Thomas, 1920) ($2n = 44$) e *C. jacchus* ($2n = 46$), envolvendo a translocação dos pares de cromossomos 16 e 22 (Barros *et al.*, 1990).

Nesse contexto, é relevante indicar que o gênero *Callithrix* é um clado homogêneo e a diferença encontrada nos cariótipos das espécies é a morfologia do cromossomo Y, onde *C. jacchus* apresenta as formas metacêntrica, submetacêntrica e telocêntrica (Nagamachi & Ferrari, 1984; Nagamachi *et al.*, 1997a) e para *C. penicillata* é esperada a morfologia metacêntrica e submetacêntrica (Nagamachi *et al.*, 1997a). Nos espécimes analisados, os indivíduos machos apresentaram morfologia telocêntrica para o cromossomo Y. Essa morfologia é semelhante à encontrada em *C. jacchus*, que é um dos possíveis parentais. Porém, a coloração Ag-NOR, marcada no cromossomo Y, conforme descrita apenas em *C. jacchus* (Nagamachi *et al.*, 1997a), não esteve presente nos cromossomos dos indivíduos analisados. A

espécie *C. aurita* apresenta apenas a morfologia telocêntrica para o cromossomo Y (Nagamachi *et al.*, 1992), e essa espécie é considerada como originária da região de estudo (Rylands *et al.*, 2009). Dessa forma inferimos que, embora os indivíduos analisados apresentem padrões morfológicos corpóreos apenas das espécies *C. jacchus* e *C. penicillata*, ambas introduzidas na região, a espécie *C. aurita* também pode ser um dos possíveis parentais baseados nos caracteres morfológicos do cromossomo Y.

A técnica de coloração por nitrato de prata, Ag-NOR, apresentou variação de dois a três pares cromossômicos. A presença de quatro cromossomos marcados é semelhante à indicada para a espécie *C. geoffroyi* (Nagamachi *et al.*, 1997a), enquanto que a marcação de seis cromossomos foi semelhante à encontrada em cromossomos de indivíduos considerados híbridos (Nogueira *et al.*, 2011). Dessa forma, os resultados obtidos não apresentaram diferenças em relação aos padrões encontrados nas espécies puras e também em indivíduos híbridos.

O padrão de distribuição de heterocromatina é característico de cada espécie, ou de grupos de espécies, mesmo essas sendo taxonomicamente relacionadas (Eberle, 1975; Nagamachi *et al.*, 1992). O padrão de bandeamento C restrito às regiões centroméricas dos cromossomos é semelhante ao das espécies do gênero, que diferencia este grupo do grupo de sagüis “*argentata*”, da Amazônia, que apresenta grande região de heterocromatina (Canavez *et al.*, 1996). A acumulação de heterocromatina constitutiva em calitriquídeos ocorreu após a separação dos gêneros *Mico* e *Callithrix*, caracterizando um fenômeno recente (Canavez *et al.*, 1996). A espécie *C. jacchus* apresenta um padrão mais próximo do antepassado, pois apresenta pequena quantidade de heterocromatina (Nagamachi *et al.*, 1992). A homogeneidade interespecífica da distribuição de heterocromatina também é encontrada para outros gêneros da família Callithrichidae, como para o gênero *Leontopithecus*, onde as espécies não apresentam diferenças no padrão de bandeamento em seus cariótipos (Nagamachi *et al.*, 1997 b). Dessa forma, o bandeamento C não mostrou diferenças para os indivíduos híbridos, o que era esperado, uma vez que as espécies puras apresentam uma homogeneidade nesse padrão de coloração dos cromossomos.

A técnica de FISH é potencialmente informativa, na medida em que pode evidenciar regiões cromossômicas homólogas características de cada espécie, em nível de DNA (Sherlock *et al.*, 1996). Não existem estudos prévios de padrões de sondas GA₍₁₅₎ em callitriquídeos, sendo este trabalho a primeira descrição para o gênero. A marcação apenas de um cromossomo do par 8 e do par 15, sem a marcação de seus homólogos, pode indicar que esses cromossomos eram de espécies distintas e que essas possuíam padrões diferentes de distribuição da sonda específica GA de DNA repetitivo. Nesse sentido, estudos futuros com as espécies consideradas “puras” usando sondas específicas e variadas de DNA repetitivo, poderão ser uma ferramenta para determinar o hibridismo entre callitriquídeos. Em comparações de regiões cromossômicas homólogas entre humanos e saguis da espécie *C. jacchus* usando outro tipo de sonda, a HSA, para marcações de regiões específicas de cromossomos humanos, revelaram uma similaridade de 15 regiões marcadas nos cromossomos de saguis das 24 regiões totais encontradas em humanos, mostrando uma alta similaridade, apesar da distância filogenética quando comparado por exemplo com o chimpanzé e orangotangos (23 pinturas) e gorilas (21 pinturas) (Stanyon & Chiarelli, 1983; Sherlock *et al.*, 1996). Porém, em gibões, que são mais próximos dos humanos, as similaridades apareceram em apenas oito cromossomos, suportando a hipótese de uma taxa evolucionária extremamente alta nas alterações cromossômicas (Jauchet *et al.*, 1992).

A sonda GA₍₁₅₎ não marcou nenhuma região centromérica dos cromossomos sendo este resultado semelhante ao padrão encontrado para hibridização *in situ* realizada com o gênero Mico, utilizando sondas CarB, que não marcou as regiões centroméricas, marcando apenas regiões que coincidiram com os blocos de heterocromatina constitutiva (Canavez *et al.*, 1996).

Os callitriquídeos representam um grupo cariotipicamente conservado, onde as homologias encontradas em seus cromossomos estão presentes em um ancestral comum, antes da divergência entre *Cebidae* e *Callithrichidae* (Canavez *et al.*, 1996). Embora a produção de indivíduos férteis entre as espécies do gênero *Callithrix*, pode ser derivada do alto grau de homogeneidade em seus cariótipos, nossos resultados indicam que

marcadores citológicos podem ser obtidos de caracterizações cariotípicas mais precisas e com o uso de técnicas de citogenética molecular.

Agradecimentos - Agradecemos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), aos pesquisadores da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Pr. Dr. Leonardo Serafim e Dr. Giane Kristosch para apoio logístico e de coleta de amostras, à equipe de captura Mayara Amescua (UENF), Rafaela Ribeiro Screnci (UENF), Roberta Silva Santos (UENF) e Natalia Lima (UENF) para a captura de animais e coleta de amostras e Camilo Gonzales Arias para ajudar com o processamento de material biológico.

5.3. Referencias Bibliográficas

BARROS, R. M. S., NAGAMACHI, C. Y. and PIECZARKA, J. C., 1990. Chromosomal evolution in *Callithrixemiliae*. *Chromosoma*, 99:440-447.

CANAVEZ, F., ALVEZ, S., FANNING, T. G. and SEUÁNEZ, H. N., 1996. Comparative karyology and evolution of the Amazonian *Callithrix* (Platyrrhini, Primates). *Chromosoma* 104:348-357.

COIMBRA-FILHO, A. F., 1970. Acerca de um caso de hibridismo entre *Callithrixjacchus* (L.1758) x *C. geoffroyi* (Humboldt, 1812) (Callithricidae, Primates). *Revista Brasileira de Biologia*, 30: 507-517.

COIMBRA-FILHO, A. F. and MITTERMEIER, R. A., 1976. Hybridization in the genus *Leontopithecus*, *L.r. rosalia* (Linnaeus, 1766) x *L.r. chrysomelas* (Kuhl, 1820) (Callitrichidae, Primates). *Revista Brasileira de Biologia*, 36:129-137.

COIMBRA-FILHO, A. and MAIA, A. A., 1976. Hibridismo de macho de *Callithrix geoffroyi* (Humboldt, 1812) x fêmea de *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758), e criação artificial de filhote híbrido (Callithricidae, Primates). *Revista Brasileira de Biologia*, 36: 665-673.

COIMBRA-FILHO, A. F., PISSINATTI, A. and RYLANDS, A. B., 1993. Experimental multiple hibridismo and natural hybrids among *Callithrix* species

from eastern Brazil. Marmosets and tamarins: Systematic, behavior and ecology, pp 95-129.

DELIMITREVA, S., WEDI, E., BAKKER, J., TKACHENKO, O. Y., NIKOLOVA, V. and NAYUDU, P. L., 2013. Numerical chromosome disorders in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) – comparison between two captive colonies. *Journal of medical primatology*, 1-9.

EBERLE, P., 1975. Chromosome finds in primates and cytogenetical aspects in the evolution of man. *Journal of Human Evolution*, 4:435-439.

FORD, C. and HAMERTON, J., 1956. A colchicines hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome. *Stain Technology*, 31: 247:251.

HERSHKOVITZ, P., 1977. Living New World monkeys (Platyrrhini) with an introduction to primates. Chicago University Press, Chicago, vol. 1.

HOWELL, W.M. and BLACK, D.A., 1980. Controlled silver - staining of nucleolus Organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.

JAUCH, A., WIENBERG, J., STANYON, R., ARNOLD, N., TOFANELLI, S., ISHIDA, T. and CREMER, T., 1992. Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 8611-8615.

KIERULFF, M. C. M., RUIZ-MIRANDA, C. R., OLIVEIRA, P. P., BECK, B. B., MARTINS, A., DIETZ, J. M., RAMBALDI, D. M. and BAKER, A. J., 2012. The Golden lion tamarin *Leontopithecus rosalia*: a conservation success story. *International Zoo Yearbook*, 46:36–45.

LEVAN, A., FREDGA K. and SANDBERG, A.A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 1: 201-220.

MENDES, S. L., 1997. Hybridization in free-ranging *Callithrix flaviceps* and the taxonomy of the Atlantic Forest marmosets. *Neotropical Primates*, 5:6-8.

NAGAMACHI, C. Y. and FERRARI, I., 1984. Cytogenetic studies of *Callithrix jacchus* (*Callitrichidae*, Platyrrhini) from two different sites in Brazil. I. morphologic variability of chromosome Y. *Revista Brasileira de Genética*, 3: 497-507.

NAGAMACHI, C. Y., PIECZARKA, J. C. and BARROS, R. M. S., 1992. Karyotypic comparison among *Cebuella pygmaea*, *Callithrix jacchus* and *C. emiliae* (*Callitrichidae* Primates) and its taxonomic implications. *Genética*, 85:249-257.

NAGAMACHI, C. Y., PIECZARKA, J. C., SCHWARZ, M., BARROS, R. M. S. and MATTEVI, M. S., 1997. Comparative chromosomal study of five taxa of genus *Callithrix*, group *Jacchus* (Platyrrhine, Primates). *American Journal of Primatology*, 41:53-60.

NAGAMACHI, C. Y., PIECZARKA, J. C., SCHWARZ, M., BARROS, R. M. S., and MATTEVI, M. S., 1997. Chromosomal similarities and differences between tamarins, *Leontopithecus* and *Saguinus* (Platyrrhini, Primates). *American Journal of Primatology*, 43: 265-276.

NEUSSER, M., MÜNCH, M., ANZENBERGER, G. and MÜLLER, S., 2005. Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* x *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and comparative genomic hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*, 108:191-196.

NOGUEIRA, D. M., FERREIRA, A. M. R., GOLDSCHMIDT, B., PISSINATTI, A., CARELLI, J. B. and VERONA, C. E. 2011. Cytogenetic study in natural hybrids of *Callithrix* (*Callitrichidae*: Primates) in the Atlantic forest of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia*, 101: 156-160.

PASSAMANI, M., AGUIAR, L. M. S., MACHADO, R. B. and FIGUEIREDO, E., 1997. Hybridization between *Callithrix geoffroyi* e *Callithrix penicillata* in southeastern in Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Primates*, 5:9-10.

PINKEL, D., STRAUME, T. AND GRAY, J. W., 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83:2934-2938.

RUIZ-MIRANDA, C. R., AFFONSO, A. G., DE MORAIS, M. M., VERONA, C. E., MARTINS, A. and BECK, B. B., 2006. Behavioral and Ecological Interactions between Reintroduced Golden Lion Tamarins (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1766) and Introduced Marmosets (*Callithrix* spp, Linnaeus, 1758) in Brazil's Atlantic Coast Forest Fragments Brazilian. *Archives of Biology and Technology*, 49: 99-109.

RUIZ-MIRANDA, C. R., BECK, B. B., KLEIMAN, D. G., MARTINS, A., DIETZ, J. M., RAMBALDI, D. M., KIERULFF, M. C., OLIVEIRA, P. P. and BAKER, A. J., 2010. Re-introduction and translocation of golden lion tamarins, Atlantic Coastal Forest, Brazil: the creation of a metapopulation. In Global re-introduction perspectives. Additional case-studies from around the globe: 225–230. Soorae, P. S. (Ed.). Abu Dhabi, UAE: IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group (RSG).

RUIZ-MIRANDA, C. R., DE MORAIS JÚNIOR, M. M., DE PAULA, V. R., GRATIVOL, A. D. and RAMBALDI, D. M., 2011. Vítimas e vilões: o problema dos sagüis introduzidos no Rio de Janeiro. *Ciencia Hoje*, 48: 44-49.

RYLANDS, A. B., COIMBRA-FILHO, A. C. and MITTERMIER, R. A., 2009. The systematics and distributions of the marmosets (*Callithrix*, *Callibella*, *Cebuella* and *Mico*) and *Callimico* (Callithichidae, Primates). *The Smallest Anthropoids*, 25-61.

SHERLOCK, J. K., GRIFFIN, D. K., DELHANTY, J. D. A. and PARRONGTON, J. M., 1996. Homologies between human and marmoset (*Callithrix jacchus*)

chromosomes revealed by comparative chromosome painting. *Genomics*, 33: 214-219.

STANYON, R. and CHIARELLI, B., 1983. Mode and tempo in primate chromosome evolution: implications for Hylobatid phylogeny. *Journal of human evolution*, 12: 305-315.

SUNMER, A. T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.

6. Artigo II

MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO UTILIZANDO SONDAS DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS EM SAGUIS HÍBRIDOS DO GÊNERO *CALLITHRIX* (Erxleben, 1777)

Camila Moura Novaes^I, Ita de Oliveira e Silva^I, Carlos Ramon Ruiz-Miranda^{II}, Tania Ribeiro Junqueira Borges^{III}, Jorge Abdala Dergam^I

I - Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário. Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 36.570-000.

II – Laboratório de Ciências Ambientais. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Avenida Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. 28.013.602.

III – PETROBRAS Transporte SA – TRANSPETRO – Rua 16, casa 06 – Metropolitana. Brasília, Distrito Federal, Brasil. 71731-160.

6.1. Resultados e Discussão

O número diplóide dos indivíduos híbridos foi $2n=46$. Os resultados obtidos através da análise convencional quanto ao número diplóide e fundamental, morfologia e sistema sexual dos indivíduos analisados foram semelhantes aos encontrados para indivíduos híbridos já descritos (Novaes *et al.*, 2014, dados submetidos).

Em geral, o mesmo padrão de distribuição foi encontrado entre machos e fêmeas no mapeamento de sondas específicas de microssatélites nos cromossomos autossomos. Um padrão de sinais discretos foi observado para alguns microssatélites, enquanto outros foram mais amplamente dispersos nos cromossomos. O microssatélite $CAT_{(10)}$ apresentou sinais mais fortes, na região telomérica dos braços longos do primeiro par de cromossomos metacêntricos e submetacêntrico par 9. O quarto par de cromossomos metacêntricos apresentou sinais em seus dois braços, enquanto que o par 5 apresentou sinais em apenas um braço. Apenas um homólogo dos pares 6, 11 e 15 apresentou sinais na região telomérica de seus braços longos. Os pares 2 e 12 apresentaram sinais ao longo dos cromossomos (Figura 1). O microssatélite $CGG_{(10)}$ apresentou sinais nos centrômeros de 4 pares de cromossomos telocêntricos, sendo eles, pares 16, 19, 20 e 22 (Figura 2). O microssatélite $CA_{(15)}$ apresentou sinais nos centrômeros de dois pares de cromossomos telocêntricos e no braço longo de um par de cromossomos subtelo-cêntricos, sendo que o sinal de um dos homólogos, aparece mais forte (Figura 3a). O $GAG_{(10)}$ apresentou sinais no par 19 de cromossomos telocêntricos (Figura 3b). Os microssatélites $A_{(30)}$, $C_{(30)}$, $GC_{(15)}$, $TA_{(15)}$ e $TAT_{(10)}$, $CAA_{(10)}$, e $CAG_{(10)}$ não apresentaram sinais em nenhum cromossomo. A marcação de DAPI apresentou sinais como blocos grandes nos cromossomos autossomos e não coincidiram com regiões heterocromáticas. O primeiro par de cromossomos metacêntricos apresentou marcações nos braços curto e longo. Os pares 2 e 3 apresentam marcações apenas no braço curto. Os pares 7 e 8 apresentaram marcações em todo braço longo. O par 10 apresentou dois blocos de marcações no braço longo e o par 15 no braço longo. O par 18 apresentou três blocos de marcações, com zonas intersticiais entre os blocos de marcações.

Os pares 16, 17, 19, 20, 21 e 22 apresentaram dois blocos de marcações, também com zonas intersticiais entre elas (Figura 4).

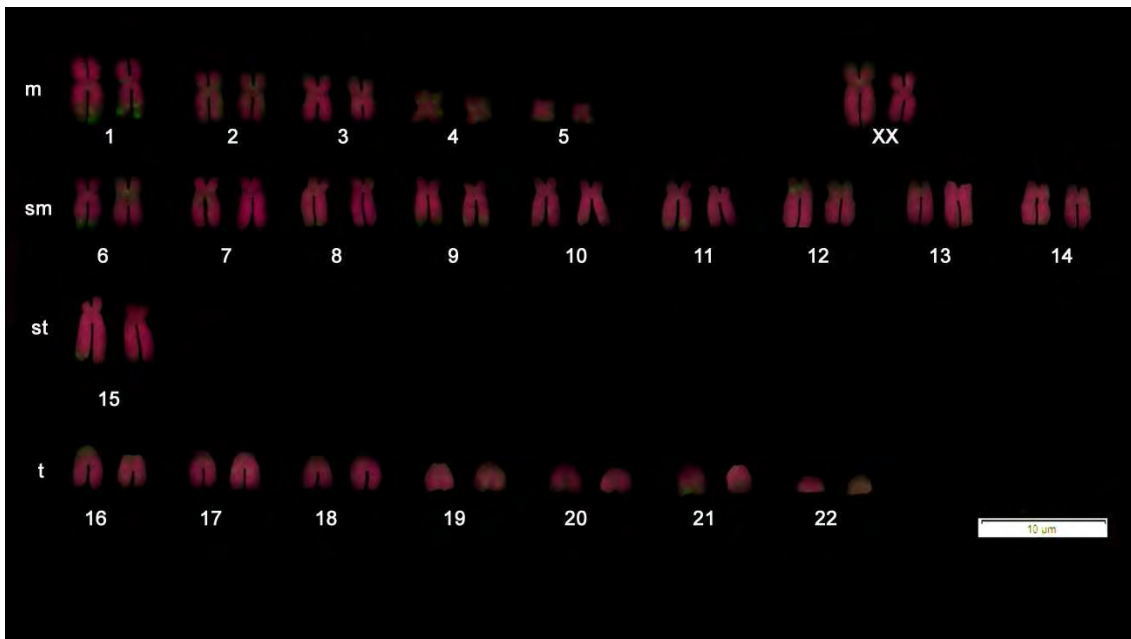


Figura 1: Microssatélite $CAT_{(10)}$ com sinais mais fortes na região telomérica dos braços longos do primeiro par de cromossomos metacêntricos e no par 9 de cromossomos submetacêntricos. O quarto par de cromossomos metacêntricos com sinais em seus dois braços, e o par cinco com sinais em apenas um braço. Apenas um homólogo dos pares 6, 11 e 15 apresentaram sinais na região telomérica de seus braços longos. Os pares 2 e 12 apresentaram sinais ao longo do cromossomo. O par 16 de cromossomos telocêntricos com sinais nos centrômeros.

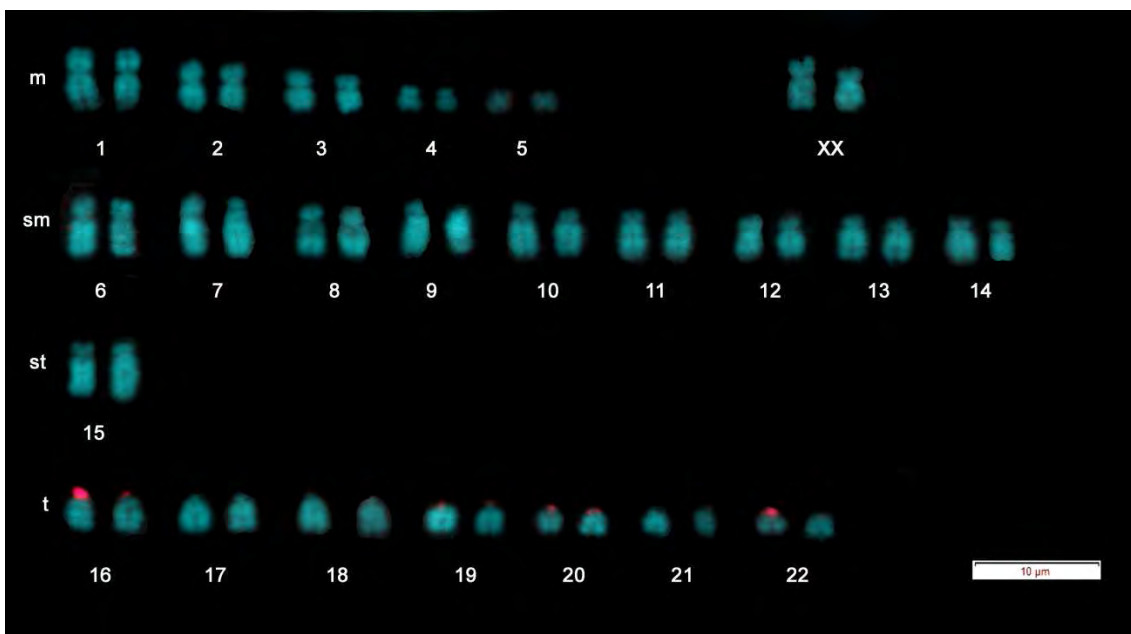


Figura 2: Microssatélite $CGG_{(10)}$ com sinais no centrômero de quatro pares de cromossomos telocêntricos, sendo eles, pares 16, 19, 20 e 22.

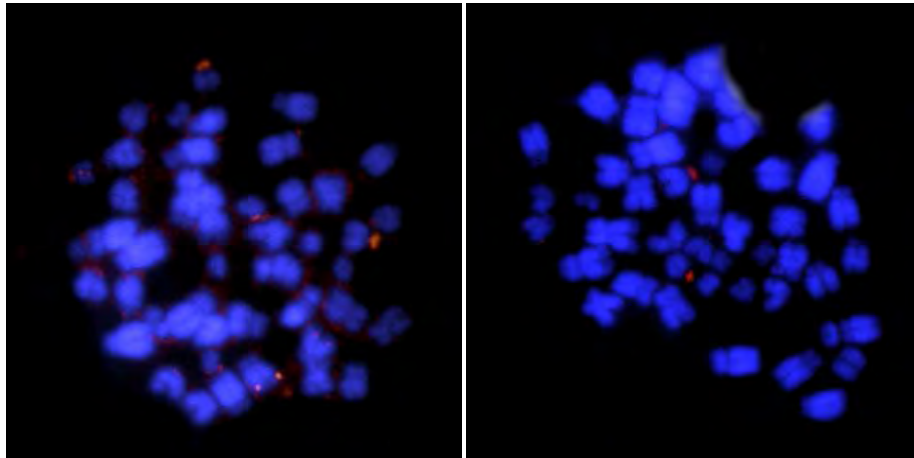


Figura 3: (a) Microssatélite $CA_{(15)}$ com sinais nos centrômeros de dois pares de cromossomos telocêntricos e no braço longo de um par de cromossomos subtelo-cêntricos, sendo que o sinal de um dos homólogos, aparece mais forte. (b) Microssatélite $GAG_{(10)}$ com sinais no par 19 de cromossomos telocêntricos.

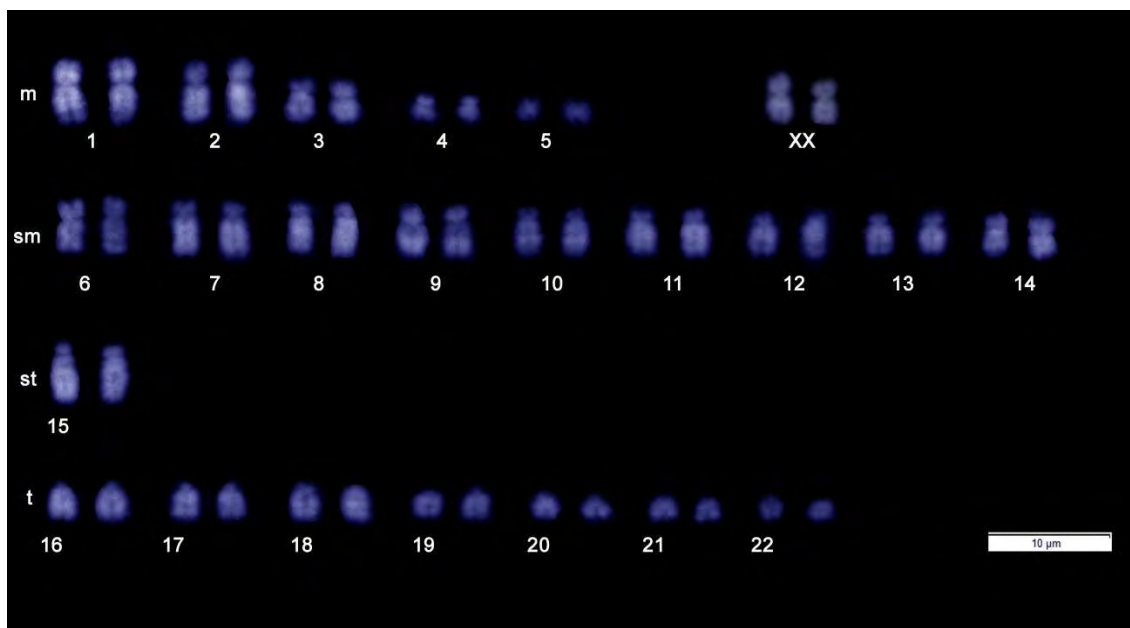


Figura 4: Marcação DAPI com sinais nos braços curtos e longo do primeiro par de cromossomos metacêntricos. Os pares 2 e 3 com marcações apenas no braço curto. Os pares 7 e 8 com marcações em todo braço longo. O par 10 com dois blocos de marcações no braço longo e o par 15 no braço longo. O par 18 apresentou três blocos de marcações, com zonas intersticiais entre eles. Os pares 16, 17, 19, 20, 21 e 22 apresentaram dois blocos de marcações, também com zonas intersticiais entre elas.

Os sinais apresentados pelas sondas $GAG_{(10)}$ e $CGG_{(10)}$ em dois e quatro pares de cromossomos respectivamente, coincidiram com regiões de

heterocromatina, que se encontram na região centromérica, (Nagamachi *et al.*, 1997), porém as sondas utilizadas não apresentaram sinais em nenhum cromossomo sexual. Em outros vertebrados como lagartos e peixes as regiões de heterocromatina também podem ser ricas em DNA repetitivo, e esses últimos, por sua vez, serem importantes na diferenciação dos cromossomos sexuais (Pokorná *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2013). Já a marcação DAPI apresentou blocos grandes nos cromossomos autossomos e sexuais e não coincidiram com regiões heterocromáticas, mostrando que a constituição dessas regiões heterocromáticas não são de bases AT.

Nos organismos eucariotos, cerca de 30 a 40% do DNA é composto de sequências repetidas (Hardman, 1986) que participam da organização da cromatina, replicação e recombinação do DNA e regulação da atividade gênica (Li *et al.*, 2002) e estudos citogenéticos-moleculares têm demonstrado que as sequências repetidas de DNA podem ser muito úteis como ferramenta para definir a estrutura e revelar a organização e evolução do genoma das espécies (Mazzuchelli, 2008). Em saguis do gênero *Callithrix* essas regiões cromossômicas ainda não foram mapeadas, sendo este, o primeiro estudo de mapeamento físico dos sítios de DNA repetitivo no gênero *Callithrix*. Tendo em vista a falta de informações nessa área, novos estudos precisam ser desenvolvidos no mapeamento dos sítios de DNA repetitivo em outros primatas do gênero para um melhor entendimento da organização cromossômica estrutural e dos possíveis mecanismos evolutivos do grupo.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro.

6.2.Referências Bibliográficas

AMARAL, P. J. S.; FINOTELO, L. F. M.; OLIVEIRA, E. H. C.; PISSINATTI, A.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C. 2008. Phylogenetic studies of the genus *Cebus* (Cebidae-Primates) using chromosome painting and G-banding. *BioMed Central Evolutionary Biology*, 8: 169.

ANDRADE, I. S.; LOPES, M. J. S. 2011. Mapeamento cromossômico de genes ribossomais 45S, 5S e sequência telomérica nos morcegos *Artibeus literatus* e *Artibeus planirostris* (Chiroptera-Phyllostomodae). Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica, III Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação e VII Jornada de Iniciação Científica da Fundação Joaquim Nabuco, Universidade Federal de Pernambuco.

BARROS, R. M. S.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; RODRIGUES, L. R. R.; NEUSSER, M.; OLIVEIRA, E. H.; WIENBERG, J.; MUNIZ, J. A. P. C.; RISSINO, J. D.; MULLER, S. 2003. Chromosomal studies in *Callicebus donacophilus pallescens*, with classic and molecular cytogenetic approaches: Multicolour FISH using human and *Saguinus oedipus* painting probes. Chromosome Research, 11: 327-334.

CANAVEZ, F.; ALVEZ, S.; FANNING, T. G.; SEUÁNEZ, H. N. 1996. Comparative karyology and evolution of the Amazonian *Callithrix* (Platyrrhini, Primates). Chromosoma, 104: 348-357.

CONSIGLIERE, S.; STANYON, R.; KOEHLER, U., N.; ARNOLD, N.; WIENBERG, J. 1998. In Situ Hybridization (FISH) Maps Chromosomal Homologies Between *Alouatta belzebul* (Platyrrhini, Cebidae) and Other Primates and Reveals Extensive Interchromosomal Rearrangements Between Howler Monkey Genomes. American Journal of Primatology, 46: 119–133.

DURFY, S. J.; WILLARD, H. F. 1990. Concerted Evolution of Primate Alpha Satellite DNA Evidence for an Ancestral Sequence Shared by Gorilla and Human X Chromosome Alpha Satellite. Journal Molecular Biology, 216: 555-566.

GROSS, M.; STARKE, H.; TRIFONOV, V.; CLAUSSEN, U.; LIEHR, T.; WEISE, A. 2006. A molecular cytogenetic study of chromosome evolution in chimpanzee. Cytogenetics Genome Research, 112: 67–75.

HARDMAN, N. 1986. Structure and function of repetitive DNA in eukaryotes. *Biochemical Journal*, 234: 1-11.

YANO, C. F.; POLTRONIERI, J.; BERTOLLO, L. A. C.; ROBERTO FERREIRA ARTONI, R. F.; THOMAS LIEHR, T.; CIOFFI, M. B. 2014. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. *Plos One*, 9: 1-7.

JAUCH, A.; WIENBERG, J.; STANYON, R.; ARNOLD, N.; TOFANELLI, S.; ISHIDA, T.; CREMER, T. 1992. Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 8611-8615.

Li Y.C.; Kord A.B.; Fahima T.; Berles A.; Nero E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.

MARZELLA, R.; VIGGIANO, L.; MIOLLA, V.; STORLAZZI, C. T.; RICCO, A.; GENTILE, E.; ROBERTO, R.; SURACE, C. FRATELLO, A. MANCINI, M. ARCHIDIACONO, N.; MARIANO ROCCHI. 2000. Molecular Cytogenetic Resources for Chromosome 4 and Comparative Analysis of Phylogenetic Chromosome IV in Great Apes. *Genomics*, 63: 307–313.

MAZZUCHELLI, J. 2008. Identificação e caracterização de sequências repetidas de DNA no genoma do ciclídeo *Astronotus ocellatus*. Dissertação. 67p.

MÜLLER, S.; O'BRIEN, P. C. M.; FERGUSON-SMITH, M. A.; WIENBERG, J. 1997. A novel source of highly specific chromosome painting probes for human karyotype analysis derived from primate homologues. *Human Genetics*, 101: 149–153.

MULLER, S.; HOLLATZ, M.; WIENBERG, J. 2003. Chromosomal phylogeny and evolution of gibbons (hylobatidae). *Human Genetics*, 113: 493–501.

NAGAMACHI, C. Y.; FERRARI, I. 1984. Cytogenetic studies of *Callithrix jacchus* (*Callitrichidae*, Platyrrhini) from two different sites in Brazil. I. morphologic variability of chromosome Y. *Revista Brasileira de Genética*, 3: 497-507.

NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; SCHWARZ, M.; BARROS, R. M. S.; MATTEVI, M. S. 1997a. Comparative chromosomal study of five taxa of genus *Callithrix*, group *Jacchus* (Platyrrhine, Primates). *American Journal of Primatology*, 41: 53-60.

NICKERSON, E.; NELSON, D. L. 1998. Molecular Definition of Pericentric Inversion Breakpoints Occurring during the Evolution of Humans and Chimpanzees. *Genomics* 50: 368–372.

NOGUEIRA, D. M.; FERREIRA, A. M. R.; GOLDSCHMIDT, B.; PISSINATTI, A.; CARELLI, J. B.; VERONA, C. E. 2011. Cytogenetic study in natural hybrids of *Callithrix* (*Callitrichidae*: Primates) in the Atlantic forest of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia*, 101: 156-160.

OLIVEIRA, E. H. C.; NEUSSER, M.; FIGUEIREDO, W. B.; NAGAMACHI, C.; PIECZARKA, J. C.; SBALQUEIRO, I. J.; WIENBERG, J.; MULLER, S. 2002. The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): Reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. *Chromosome Research*, 10: 669-683.

OLIVEIRA, E. H. C.; NEUSSER, M.; PIECZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C.; SBALQUEIRO, I. J.; MÜLLER, S. 2005. Phylogenetic inferences of Atelinae (Platyrrhini) based on multi-directional chromosome painting in *Brachyteles arachnoides*, *Ateles paniscus paniscus* and *Ateles b. marginatus*. *Cytogenetics Genome Research*, 108: 183–190.

PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y. 2004. Pintura cromossômica como instrumento para estudos filogenéticos em primatas. In: GUERRA, M. FISH: conceitos e aplicações na citogenética. 115-132.

POKORNÁ, M.; KRATOCHVÍL, L.; KEJNOVSKÝ, E. 2011. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). BioMed Central Genetics, 12:90.

RIED, T.; ARNOLD, N.; WARD, D. C.; WIENBERG, J. 1993. Comparative high-resolution mapping of human and primate chromosomes by fluorescence in situ hybridization. Genomics, 18: 381-386.

TSEND-AYUSH, E.; GRUTZNER, F.; YUE, Y.; GROSSMANN, B.; HANSEL, U.; SUDBRAK, R.; HAAF, T. 2004. Plasticity of human chromosome 3 during primate evolution. Genomics, 83, 193–202.

WIENBERG, J.; STANYON, S. 1997. Comparative painting of mammalian chromosomes. Genomes and evolution, 784-791.

WIENBERG, J. 2005. Fluorescence in situ hybridization to chromosomes as a tool to understand human and primate genome evolution. Cytogenetics Genome Research, 108:139–160.

XU, D.; LOU, B.; BERTOLLO, L. A. C.; CIOFFI, M. B. 2010. Chromosomal mapping of microsatellite repeats in the rock bream fish *Oplegnathus fasciatus*, with emphasis of their distribution in the neo-Y chromosome. Molecular Cytogenetics, 6:12.

7. Considerações Finais

O estudo citogenético em saguis pode revelar aspectos relevantes sobre a evolução cromossômica dentro do grupo.

Neste estudo, pôde-se ressaltar que as técnicas convencionais de citogenética, como coloração por Giemsa, Ag-Nor e Bandeamento C, não foram apropriadas para determinação de hibridismo entre as espécies. Porém a técnica de FISH representou uma potencial ferramenta nessa determinação da natureza híbrida dos animais.

A morfologia do cromossomo Y encontrada nos animais analisados, sugere que a espécie *Callithrix aurita*, que é originária da região, pode também ser um possível parental, além das espécies *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*.

8.Anexos

8.1.Preparações citogenéticas (Protocolo modificado de Ford & Hamerton, 1956)

- Injetar subcutaneamente no animal uma solução aquosa de colchicina a 0.05% no animal ainda vivo, na proporção de 1 ml/100g de peso corporal, para estimular a divisão celular e aguardado um período de uma hora;
- Posteriormente os animais são anestesiados com uma associação de cloridrato de quetamina (10mg/Kg de peso) e xilazina (1mg/Kg de peso),e sacrificados com uma droga de 2mL de cloreto de potássio via intra-cardíaca;
- O material foi retirado do fêmur usando uma seringa com solução hipotônica de cloreto de potássio (KCL) 0,075M e incubado durante 30 minutos a uma temperatura de 37° C;
- Após esse período, a suspensão celular foi fixada em solução de metanol e ácido acético (3:1) e posteriormente levada a uma centrífuga de 1000rpm;
- Após centrifugar por três vezes o material, foi adicionado fixador e guardado em tubo de *Eppendorf* no freezer até a preparação das lâminas.

8.2. Protocolo de coloração convencional por Giemsa

- Lavar as lâminas com algodão e detergente;
- Ferver as lâminas em béquer com água destilada até a temperatura de 70°C;
- Pingar a solução a uma altura aproximada de 1 metro;
- Secar as lâminas em temperatura ambiente ou na estufa a 36°C;
- Corar com coloração convencional Giemsa 5% (10 ml de tampão fosfato + 0,5 ml de solução mãe Giemsa) por 3 minutos;
- Secar a temperatura ambiente ou em estufa a 36° C;
- Procurar as metáfases em microscópio e marcar em lâmina branca;
- Fotografar.

8.3.Ag-NOR (Protocolo modificado de Howell & Black, 1980)

- Preparo da solução reveladora a base de gelatina: dissolver 1g de gelatina branca sem sabor em 50 mL de água destilada morna e adicionar 0,5 ml de ácido fórmico;
- Preparo da solução de nitrato de prata P.A. (AgNO_3) 50%: pesar 0,5g de nitrato de prata e dissolver em 1mL de água destilada (observação: o eppendorf deve ser protegido da luz com papel alumínio para evitar oxidação da prata);

Procedimento:

- Descorar as lâminas com fixador 3 metanol: 1 ácido acético, lavar em água corrente e deixar secar ao ar;
- Adicionar 4 gotas de nitrato de prata, 2 gotas de solução reveladora a base de gelatina e 2 gotas de água destilada, cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida em estufa 60°C;
- Observar a coloração da lâmina até que a mesma adquira cor marrom-dourada, lavar em água corrente e deixar secar ao ar.

8.4. Bandeamento C (Protocolo modificado de Sumner, 1972)

- Preparo da solução de hidróxido de bário 5%: pesar 5 gramas de hidróxido de bário P.A. ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) e dissolver em 100 mL de água destilada. Deixar homogeneizar por uma hora. Em seguida, filtrar a solução em papel de filtro e colocar em jarra de coplin em banho maria 42 °C;
- Descorar as lâminas com fixador 3 metanol:1 ácido acético, lavar em água corrente e deixar secar ao ar;
- Preparo do ácido clorídrico 0,2%: Misturar ácido clorídrico comercial com água destilada na proporção de 1 HCl: 4 H_2O ; colocar em jarra de coplin em banho maria 42 °C;
- Preparo da solução salina 2xSSC pH 7,0: Dissolver 8,765g de NaCl e 4,41g de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em 500 mL de água destilada; colocar em jarra de coplin em banho maria 60 °C;
- Deixar as lâminas por 5 minutos na solução de HCL;
- Lavar em água destilada 10 vezes;
- Secar ao ar livre;
- Colocar no $\text{Ba}(\text{OH})_2$ por 45 segundos;
- Lavar 10 vezes na solução de HCL;
- Lavar em água destilada por 10 vezes;
- Colocar as lâminas, sem secar, no 2XSSC por 1 hora;
- Secar as lâminas e corar por 2 minutos em solução Giemsa 5%;
- Fotografar.

8.5.FISH para sondas de DNA repetitivo (Protocolo modificado de Pinkel *et al.*, 1986)

1° Dia

- Preparar as lâminas (podem ser corridas previamente e descoradas);
- Limpar lamínulas com álcool comercial;
- Desidratar em série alcoólica: 70%, 95% e 100% por 5 min cada;
- Secar ao ar;
- Secar em estufa 60 °C por 1h;
- Preparar o MIX das sondas por lâmina: 2 microlitros da sonda escolhida + 18 microlitros de HybMix. MISTURAR MUITO BEM. Termociclador no programa HybMix: 10 min 75 °C e 2 min 4 °C;
- 3 min em jarra de coplin em banho maria 37 °C contendo: 1mL HCl 1N + 99mL água destilada + 500 microlitros pepsina + 5 microlitros RNase;
- Jogar fora a solução acima e adicionar 1xPBS por 5min temperatura ambiente;
- Secar ao ar;
- Adicionar 100 microlitros de solução de paraformaldeído 1% em lamínulas e aplicar nas lâminas por 10 min;
- Ligar placa aquecedora 75 °C;
- Descartar as lamínulas e 1xPBS por 5 min temperatura ambiente;
- Desidratar em série alcoólica: 70%, 95% e 100% por 2 min cada;
- Secar ao ar;
- Adicionar 100 microlitros de formamida 70%, cobrir com lamínula e colocar na placa aquecedora 75 °C por 3 min;
- Desidratar em série alcoólica: 70% GELADO, 95% e 100% por 2 min cada;
- Secar ao ar;
- Adicionar 20 microlitros do MIX em cada lâmina, colocar a lâmina invertida dentro da câmara úmida 37 °C overnight.

2° Dia

- Ligar banho Maria 65 °C por uma hora;
- 5 min em solução 5mL 20xSSC + 95mL água destilada (solução colocada previamente no banho Maria até atingir 65 °C);

- Descartar a solução salina acima e adicionar 4xSSCTween por 5 min (Shaker);
- Lavar rapidamente em 1xPBS;
- Desidratar em série alcoólica: 70%, 95% e 100% por 2 min cada;
- Secar ao ar;
- Adicionar 2 gotas de solução DAPI e cobrir com lamínulas;
- Conservar na geladeira (e no escuro) até tirar as fotos.

RNAse:

5 microlitros RNAse 10micrograma/mL

975 microlitros 2xSSC

Pepsina

990 microlitros de água mili-Q

10 microlitros de HCl 1M

2,5 microlitros pepsina 20ng/mL

10xPBS

75,8g NaCl (1,36M)

9,93g Na₂HPO₄ (70mM) ou 12,45g de Na₂HPO₄x2H₂O

4,14g NaH₂PO₄ (30mM)

Dissolver em 1L de água mili-Q e autoclavar

Solução de Paraformaldeído 1%

1ml de paraformaldeído + 99ml de água destilada

20xSSC pH 7,0

175,6g NaCl

88,2g Citrato de sódio

Dissolver em 1L de água mili-Q

Formamida 70%

70 mL de formamida

30 mL de 2xSSC**4xSSCTween**

200 mL de 20xSSC pH 7,0

500 microlitros de Tween puro ou 5mL de Tween 10%

Completar para 1L de água mili-Q em balão volumétrico

Solução DAPI

900 microlitros antifading

2,1 microlitros DAPI 0,2 ng/mL