Amanda Aparecida Cardoso Coimbra

Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em *Alouatta clamitans* (Primates, Platyrrhini): análise da variabilidade cromossômica dos bugios das regiões sul e sudeste do Brasil

*Cytogenetic studies in *Alouatta clamitans* (Primates, Platyrrhini): analysis of chromosomal variability of howler monkeys from South and Southeast regions of Brazil*

São Paulo

2015

Amanda Aparecida Cardoso Coimbra

Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em *Alouatta clamitans* (Primates, Platyrrhini): análise da variabilidade cromossômica dos bugios das regiões sul e sudeste do Brasil

*Cytogenetic studies in *Alouatta clamitans* (Primates, Platyrrhini): analysis of chromosomal variability of howler monkeys from South and Southeast regions of Brazil*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Biologia/Genética.

Orientadora: Dra. Celia P. Koiffmann

São Paulo

2015

Coimbra, Amanda Aparecida Cardoso

Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em *Alouatta clamitans* (Primates, Platyrrhini): análise da variabilidade cromossômica dos bugios das regiões sul e sudeste do Brasil

225 páginas

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo.

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Citogenética de primatas
 2. Variabilidade cromossômica em bugios
 3. *Alouatta*, Platyrrhini, Primates
- I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Celia P. Koiffmann
Orientadora

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, aos meus pais e à minha avó
Ermelinda, meus maiores exemplos de amor,
sabedoria, dedicação e determinação.

A vocês a minha eterna gratidão.

EPÍGRAFE

*O que eu faço é uma gota no meio de um oceano.
Mas sem ela, o oceano seria menor.*

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Celia P. Koiffmann, por ter confiado este projeto a mim e por todo o apoio e ensinamentos.

À minha "coorientadora do coração" Cristiani Gifalli-lughetti, por sempre ter acreditado na minha capacidade (até mais do que eu mesma), por confiar a mim o seu "projeto de vida", por todas as conversas e conselhos, pelo apoio de sempre e pela amizade verdadeira.

À bióloga Juliana Laurito Summa, Diretora de Divisão Técnica do DEPAVE-3 e minha ex-orientadora de estágio, pela amizade sincera, por todo o apoio, por ter me apresentado ao mundo da pesquisa (e à USP) e pela confiança em meu trabalho.

Aos biólogos Me. Brígida Gomes Fries, Dra. Anelisa Ferreira de Almeida Magalhães, Marcos Antônio Melo, Me. Maria Amélia Santos de Carvalho, Me. Ana Maria Brischi, Dra. Linda Lacerda da Silva e Dra. Maria Marcina Picelli Vicentim, aos médicos veterinários Dra. Adriana Marques Joppert da Silva, Maria Eugênia Laurito Summa, Diogo Fiori Ribas, Me. Luiz Fernando Lorangeira Lopes, Mariana Morgado Hereny, Melissa Prospero Peixoto, Marcos Kawall Vasconcellos, Sergio de Mello Novita Teixeira, em especial às minhas amigas e ex-companheiras de laboratório Me. Thais Caroline Sanches, Me. Ticiane Zwarg Dias Bianchi e Me. Alice Soares de Oliveira, a todos os estagiários e ex-estagiários, em especial à Ana Paula de Araújo e ao Caue Mourão Alleman, aos motoristas e a todos os tratadores do DEPAVE-3 (Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre) envolvidos com os cuidados, manejo, anestesia, coleta de sangue, transporte de amostras, soltura e acompanhamento dos nossos tão amados bugios e que tornaram possível o projeto "Manejo e Conservação do Bugio, *Alouatta clamitans* (Primates, Atelidae) na Região Metropolitana de São Paulo: aprimorando o programa de reintrodução". A todos vocês a minha eterna gratidão.

À médica veterinária Dra. Renata G. Vieira do CEMAS, ao médico veterinário Dr. Júlio César Souza Jr. e à bióloga Zelinda Maria Braga Hirano do Projeto Bugio pelas amostras cedidas para o desenvolvimento deste projeto.

À Profa. Dra. Angela Maria Vianna Morgante por ceder alíquotas das sondas derivadas pela citometria de fluxo (*Human Paints NCBI*) utilizadas para a elaboração deste projeto.

Ao Prof. Dr. Renato Gregorin pela atenção e pela esclarecedora opinião a respeito do exemplar M 455, analisado neste trabalho.

À Profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo por permitir o desenvolvimento da técnica de bandamento Ag-NOR em seu laboratório e pelo importante auxílio de seus alunos Felipe L. Claro e Carolina P. Gomes.

Ao Prof. Dr. Eduardo Gorab pela atenção e compreensão durante a finalização deste projeto.

Às amigas de laboratório Claudia, Carla, Estela, Monica, Rose, Luceleni e às ex-estagiárias Gislaine, Luciana e Caroline pelo apoio, amizade, confiança e pelos tantos ensinamentos (de vida e de profissão) neste período em que compartilhamos nosso tempo e nossas histórias.

Ao meu amigo Me. Paulo Alves pela sua atenção e prestatividade ao me auxiliar com o *Abstract*.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro para a elaboração deste projeto.

Agradecimentos especiais...

A Deus pela dádiva da vida, por me dar saúde e forças todas as vezes que precisei e por permitir que eu chegasse até aqui.

Ao meu eterno amor, parceiro de vida e marido, Wellington, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, por mais difíceis que sejam, por compreender todos os meus momentos de ausência e por nunca permitir que eu descreditasse no meu potencial. Tenho certeza de que as dificuldades da vida vem para nos tornar mais fortes e unidos. Obrigada por tudo!

Aos meus pais, Ilza e Eduardo e ao meu irmão Vinícius por serem a minha base e por todo o amor e credibilidade dedicados a mim. Obrigada por nunca me permitirem desistir e por serem os meus exemplos. Sem o apoio de vocês eu não chegaria a lugar algum.

À minha vó Ermelinda, que mesmo tendo partido há muitos anos, é e sempre será a minha inspiração.

À minha família Assunção, Ló, Amiga, Tio Nel, Ju, Ma, Re, Marlom e Rafael por toda a ajuda, apoio, descontração, por todos os momentos de felicidade e por transformarem a minha vida numa grande festa. Minha gratidão imensa a vocês e a Deus por permitir que nossos caminhos se cruzassem.

Aos meus “filhos de patas” Fred, Mogg, Mingau e Cowboy pela companhia, pelos momentos de felicidade compartilhados e por dedicarem a mim o mais puro amor deste mundo.

A todos que me ajudaram e estiveram ao meu lado durante o desenvolvimento deste projeto, a minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Os primatas neotropicais: apresentação e estudos citogenéticos.....	2
1.2 Filogenia e classificação.....	9
1.3 O gênero <i>Alouatta</i>	13
1.3.1 Características morfológicas e comportamentais.....	20
1.3.2 Características filogeográficas.....	24
1.3.3 Características filogenéticas.....	27
1.3.4 Características citogenéticas.....	30
1.3.4.1 O sistema sexual múltiplo em bugios.....	34
2. OBJETIVOS.....	39
2.1 Objetivo geral.....	40
2.2 Objetivos específicos.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Material.....	42
3.1.1 Caracterização dos indivíduos.....	43
3.1.2 Captura dos animais e coleta de amostras.....	45
3.2 Métodos.....	46
3.2.1 Cultura de linfócitos.....	47
3.2.2 Análise convencional.....	48
3.2.3 Bandamento GTG.....	48
3.2.4 Bandamento CBG.....	49
3.2.5 Reamplificação de sondas por PCR.....	49
3.2.6 Marcação em precipitação de sondas.....	49
3.2.7 FISH.....	50
4. RESULTADOS.....	52
4.1 Análise citogenética em coloração convencional.....	53
4.1.1 Estudo citogenético de famílias de bugios.....	71
4.2 Análise citogenética em bandamento CBG.....	77
4.3 Estudo citogenético em bandamento GTG.....	79
4.4 Análise citogenética molecular (FISH)	86
5. DISCUSSÃO.....	114
5.1 Variabilidade cariotípica em <i>Alouatta clamitans</i>	115
5.1.1 Estudo de famílias de <i>Alouatta clamitans</i>	123
5.2 Análise citogenética molecular em <i>Alouatta clamitans</i>	126

6. ESTUDO CITOGENÉTICO DE UMA FÊMEA DE <i>Alouatta clamitans</i> COM 2n=48.....	136
7. CITOGENÉTICA COMO FERRAMENTA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE.....	164
8. CONCLUSÕES.....	200
9. RESUMO.....	204
10. ABSTRACT.....	207
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	210

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica dos primatas do Novo Mundo	4
Figura 2: Distribuição geográfica dos representantes do gênero <i>Alouatta</i>	15
Figura 3: Relações filogenéticas do gênero <i>Alouatta</i>	16
Figura 4: Distribuição geográfica de <i>Alouatta clamitans</i>	18
Figura 5: Árvore filogenética obtida por Steinberg et al., 2014	28
Figura 6: Possível origem do sistema cromossômico sexual múltiplo do gênero <i>Alouatta</i>	37
Figura 7: Cariótipo convencional da fêmea M 419	56
Figura 8: Cariótipo convencional da fêmea M 280	57
Figura 9: Cariótipo convencional da fêmea M 389	58
Figura 10: Cariótipo convencional da fêmea M 483	58
Figura 11: Cariótipo convencional da fêmea M 368	59
Figura 12: Cariótipo convencional da fêmea M 350	60
Figura 13: Cariótipo convencional do macho M 385	62
Figura 14: Cariótipo convencional do macho M 399	63
Figura 15: Cariótipo convencional do macho M 484	64
Figura 16: Cariótipo convencional do macho M 275	65
Figura 17: Cariótipo convencional do macho M 335	66
Figura 18: Cariótipo convencional do macho M 300	67
Figura 19: Cariótipo convencional do macho M 342	68
Figura 20: Distribuição geográfica dos indivíduos analisados procedentes da Grande São Paulo	70
Figura 21: Cariótipo convencional da fêmea M 272	71
Figura 22: Cariótipo convencional do macho M 385	71
Figura 23: Cariótipo convencional da fêmea M 339	72
Figura 24: Cariótipo convencional da fêmea M 370	72
Figura 25: Cariótipo convencional do macho M 275	73
Figura 26: Cariótipo convencional da fêmea M 389	73
Figura 27: Cariótipo convencional do macho M 335	74
Figura 28: Cariótipo convencional da fêmea M 334	74
Figura 29: Cariótipo convencional do macho M 388	75
Figura 30: Cariótipo convencional do macho M 365	75
Figura 31: Cariótipo convencional da fêmea M 387	76
Figura 32: Cariótipo em bandamento CBG da fêmea M 309	78

Figura 33: Cariótipo em bandamento GTG da fêmea M 265	80
Figura 34: Cariótipo em bandamento GTG da fêmea M 309	81
Figura 35: Cariótipo em bandamento GTG da fêmea M 482	81
Figura 36: Cariótipo em bandamento GTG da fêmea M 483	82
Figura 37: Cariótipo em bandamento GTG do macho M 275	82
Figura 38: Cariótipo em bandamento GTG do macho M 277	83
Figura 39: Cariótipo em bandamento GTG do macho M 300	83
Figura 40: Cariótipo em bandamento GTG do macho M 385	84
Figura 41: Cariótipo em bandamento GTG do macho M 484	84
Figura 42: Cariótipo em bandamento GTG do macho M 342	85
Figura 43: FISH do espécime M 275 (HSA 3/15/17)	87
Figura 44: FISH do espécime M 275 (HSA 8/12/21)	88
Figura 45: FISH do espécime M 275 (HSA 16/19)	88
Figura 46: FISH do espécime M 275 (HSA 2/13/20)	89
Figura 47: FISH do espécime M 275 (HSA 9/11/22)	89
Figura 48: FISH do espécime M 275 (HSA 4/14/18)	90
Figura 49: FISH do espécime M 275 (HSA 5/10/7)	90
Figura 50: FISH do espécime M 275 (HSA X/6)	91
Figura 51: Cromossomos humanos submetidos à técnica de FISH	92
Figura 52: FISH do espécime M 275 (HSA 1)	93
Figura 53: Cariótipo com indicação das homeologias encontradas após a FISH do M 275.....	94
Figura 54: FISH do espécime M 277 (HSA 3/15/17)	95
Figura 55: FISH do espécime M 277 (HSA 8/12/21)	95
Figura 56: FISH do espécime M 277 (HSA 16/19)	96
Figura 57: FISH do espécime M 277 (HSA 2/13/20)	96
Figura 58: FISH do espécime M 277 (HSA 9/11/22)	97
Figura 59: FISH do espécime M 277 (HSA 14/18)	97
Figura 60: FISH do espécime M 277 (HSA 5/10/7)	98
Figura 61: FISH do espécime M 277 (HSA X/6)	99
Figura 62: FISH do espécime M 277 (HSA 1)	100
Figura 63: Cariótipo com indicação das homeologias encontradas após a FISH do M 277	101
Figura 64: FISH do espécime M 300 (HSA 3/15/17)	102
Figura 65: FISH do espécime M 300 (HSA 8/12/21)	102
Figura 66: FISH do espécime M 300 (HSA 16/19)	103

Figura 67: FISH do espécime M 300 (HSA 1)	103
Figura 68: FISH do espécime M 300 (HSA 2/13/20)	104
Figura 69: FISH do espécime M 300 (HSA 9/11/22)	104
Figura 70: FISH do espécime M 300 (HSA 4/14/18)	105
Figura 71: FISH do espécime M 300 (HSA 5/10/7)	105
Figura 72: FISH do espécime M 300 (HSA X/6)	106
Figura 73: Cariótipo com indicação das homeologias encontradas após a FISH do M 300	107
Figura 74: FISH do espécime M 483 (HSA 3/15/17)	108
Figura 75: FISH do espécime M 483 (HSA 8/12/21)	108
Figura 76: FISH do espécime M 483 (HSA 16/19)	109
Figura 77: FISH do espécime M 483 (HSA 2/13/20)	109
Figura 78: FISH do espécime M 483 (HSA 9/11/22)	110
Figura 79: FISH do espécime M 483 (HSA 4/14/18)	110
Figura 80: FISH do espécime M 483 (HSA 5/10/7)	111
Figura 81: FISH do espécime M 483 (HSA X/6)	111
Figura 82: FISH do espécime M 483 (HSA 1)	112
Figura 83: Cariótipo com indicação das homeologias encontradas após a FISH do M 483	113
Figura 84: Cariótipo convencional da fêmea M 368	132
Figura 85: Cariótipo com indicação das homeologias encontradas após a FISH em <i>Alouatta clamitans</i> e <i>A. fusca</i> (De Oliveira et al., 2002)	143
Figura 86: Cariótipo em bandamento GTG da fêmea M 368	144
Figura 87: FISH do espécime M 368 (HSA 2/13/20)	145
Figura 88: FISH do espécime M 368 (HSA 9/11)	145
Figura 89: FISH do espécime M 368 (HSA 8/12/21)	146
Figura 90: FISH do espécime M 368 (HSA 4/14/18)	146
Figura 91: FISH do espécime M 368 (HSA 3/15/17)	147
Figura 92: FISH do espécime M 368 (HSA 5/10/7)	148
Figura 93: FISH do espécime M 368 (HSA X/6)	149
Figura 94: FISH do espécime M 368 (HSA 1)	150
Figura 95: FISH do espécime M 368 (HSA 16)	150
Figura 96: FISH do espécime M 368 (HSA 19)	151
Figura 97: FISH do espécime M 368 (HSA 22)	151
Figura 98: Cariótipo com indicação das homeologias encontradas após a FISH do M 368	153

Figura 99: Cariótipo com indicação das homeologias encontradas após a FISH em <i>Alouatta clamitans</i> e <i>A. fusca</i> (De Oliveira et al., 2002)	158
Figura 100: Região geográfica de origem dos espécimes de <i>Alouatta clamitans</i> com 2n=48.....	159
Figura 101: Cariótipo convencional da fêmea M 455	171
Figura 102: Cariótipo em bandamento GTG da fêmea M 455	171
Figura 103: Cariótipo em bandamento CBG da fêmea M 455	172
Figura 104: Metáfase em bandamento Ag-NOR da fêmea M 455	172
Figura 105: FISH do espécime M 455 (2/11)	174
Figura 106: FISH do espécime M 455 (3/21)	174
Figura 107: FISH do espécime M 455 (4/X)	175
Figura 108: FISH do espécime M 455 (5/7)	175
Figura 109: FISH do espécime M 455 (6)	176
Figura 110: FISH do espécime M 455 (8/17)	176
Figura 111: FISH do espécime M 455 (9/12)	177
Figura 112: FISH do espécime M 455 (10/16)	177
Figura 113: FISH do espécime M 455 (13/19)	178
Figura 114: FISH do espécime M 455 (14/15)	178
Figura 115: FISH do espécime M 455 (18/22)	179
Figura 116: FISH do espécime M 455 (20)	179
Figura 117: FISH do espécime M 455 (1/15)	180
Figura 118: Cariótipo com indicação das homeologias encontradas após a FISH do M 455	181
Figura 119: Cariótipo com as homeologias encontradas após a FISH em <i>Alouatta clamitans</i> e <i>A. fusca</i> (De Oliveira et al., 2002).....	187
Figura 120: Ideograma de <i>Alouatta belzebul</i> com as homeologias aos cromossomos humanos	193
Figura 121: Ilustrações dos padrões de coloração da pelagem no “complexo <i>A. belzebul</i> ”	195
Figura 122: Distribuição geográfica da espécie <i>Alouatta ululata</i>	196

LISTA DE QUADROS

Quadro I: Caracterização das amostras utilizadas	43
Quadro II: Resultado das análises em coloração convencional	54
Quadro III: Resultados em coloração convencional das fêmeas analisadas	61
Quadro IV: Resultados em coloração convencional dos machos analisados	69
Quadro V: Resultados obtidos com a técnica de FISH aplicada em metáfases dos indivíduos M 275, M 277, M 300 e M 483	127
Quadro VI: Resultados obtidos com a técnica de FISH aplicada em metáfases do indivíduo M 368	152
Quadro VII: Resultados obtidos com a técnica de FISH aplicada em metáfases do indivíduo M 455	173

Foto: Julio César Bicca-Marques

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os primatas neotropicais: apresentação e estudos citogenéticos

A origem da Ordem Primates remonta ao Cretáceo, mas os eventos que deram origem às famílias modernas ocorreram ao longo do Cenozóico (Fabre et al., 2009; Pereira, 2013; Perelman et al., 2011; Springer et al., 2012). Estudos em sistemática filogenética sugerem o reconhecimento de quatro clados maiores de primatas: Strepsirrhini (lêmures e gálagos), Tarsiidae (gênero *Tarsius*), Catarrhini (primatas do velho mundo, incluindo o gênero *Homo*) e Platyrrhini (primatas neotropicais) (Steiper e Young, 2009).

Os primatas neotropicais e os primatas do Velho Mundo divergiram de um ancestral comum no Eoceno Médio, entre 40 e 43,5 milhões de anos (Goodman et al., 1998; Perelman et al., 2011; Seuánez et al., 2005; Steiper e Young, 2006). Esta radiação produziu numerosas espécies, que estão distribuídas ao longo de uma grande área do continente americano (figura 1), se estendendo do México ao norte da Argentina (Dumas et al., 2007; Goodman et al., 1998). Habitam florestas úmidas, florestas decíduas e ambientes mais secos e abertos (Rosenberger et al., 2009) e apresentam uma ampla gama de características morfológicas, etológicas e adaptações ecológicas (Dumas et al., 2007).

Os primatas do Novo Mundo tem tamanho pequeno a médio (100g a pouco mais de 10kg) e possuem uma locomoção predominantemente quadrúpede, com algumas espécies possuindo cauda preênsil. O nome do táxon (*platis*, *platus* – achatado, largo e *rhis* ou *rhino* – nariz) indica o formato do nariz destes animais, largo e achatado com narinas dispostas mais lateralmente, em oposição aos macacos do Velho Mundo e hominóides (Bicca-Marques et al., 2011).

Figura 1: Distribuição geográfica dos primatas do Novo Mundo – modificado de Pereira (2013).

Atualmente, os primatas do Novo Mundo compreendem cerca de 152 espécies (204 espécies e subespécies) agrupadas em 16 a 20 gêneros e três a cinco famílias (Groves, 2001; Rylands et. al., 2012; Schneider et al., 2004; Schneider e Sampaio, 2015). Por várias razões, entre elas a adoção do conceito de espécie filogenética e a aplicação dos estudos citogenéticos e moleculares, o número de espécies descritas tem aumentado consideravelmente nos últimos 30 anos, com a descoberta de 31 novas espécies neste período. Muitos gêneros ainda não estão bem estabelecidos, com uma resolução parcial de sua diversidade taxonômica (Rylands et al., 2012).

De acordo com a Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil (Paglia et al., 2012), o grupo dos primatas brasileiros compreende 118 espécies, pertencentes a 19 gêneros e a cinco famílias: Aotidae, Atelidae, Callitrichidae, Cebidae e Pitheciidae, representadas, respectivamente, por 6, 19, 39, 19 e 35 espécies cada. Noventa e duas espécies ocorrem na Amazônia, 24 na Mata

Atlântica, cinco no Cerrado, sete na Caatinga, cinco no Pantanal e uma nos Pampas. No Brasil, 89 destas 118 espécies ocorrem exclusivamente na Amazônia, 19 apenas na Mata Atlântica, uma é exclusiva da Caatinga (*Callicebus barbarabrownae*) e outra do Pantanal (*Callicebus pallescens*).

Entre os primatas, Platyrrhini é considerado o táxon com a maior variabilidade no número de cromossomos, com conjuntos diploides de 16 a 62 cromossomos (Müller, 2006), bem como na quantidade de rearranjos cromossômicos. Os polimorfismos são atribuídos à alta frequência de rearranjos cromossômicos complexos, tais como fusões e fissões, translocações recíprocas e inversões (Barros et al., 2003; Bonvicino et al., 2003; Eichler e Sankoff, 2003; Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008; Koiffmann, 1977, 1982; Koiffmann e Saldanha, 1974, 1977, 1981a, b, 1982; Mudry et al., 2001; Ruiz-Herrera, 2003; Stanyon et al., 2000), além das regiões heterocromáticas de muitos cromossomos que foram descritas, em sua maioria, como blocos altamente variáveis na quantidade, composição e localização cromossômica (García et al., 2003; Mudry, 1990). Estes rearranjos geram novas formas cromossômicas, fonte de variabilidade sobre a qual pode atuar a seleção natural (King, 1993; Robinson e Ruiz-Herrera, 2010), evitam a reprodução bem sucedida entre populações e podem ser um fator importante para o surgimento de novas espécies (Ferguson-Smith e Trifonov, 2007).

Várias hipóteses conflitantes sobre as relações evolutivas entre as espécies de primatas neotropicais foram propostas. As primeiras eram baseadas principalmente em estudos morfológicos e ecológicos (Ford, 1986; Hershkovitz, 1977; Kay 1990; Rosenberger, 1981). As investigações moleculares também levaram a revisões dentro de taxonomias existentes (Canavez et al., 1999a, b; Mudry et al., 2007; Ray et al., 2005; Schneider et al., 2001; Schneider e Sampaio, 2015; Steiper e Ruvolo, 2003) e a citogenética comparativa proporcionou conceitos adicionais em relação à filogenia das espécies de Platyrrhini, através da análise dos rearranjos cromossômicos que ocorreram ao longo da evolução (Gifalli-lughetti, 2008).

A citogenética clássica, com as técnicas de coloração convencional e bandamentos G, C e NOR, teve uma grande importância para a identificação dos cariótipos de cada espécie e para o estudo da variabilidade existente nos macacos do Novo Mundo (Dutrillaux, 1979; Dutrillaux e Couturier, 1981; Gifalli,

2003; Gifalli-lughetti, 2008; Koiffmann, 1972, 1977; Koiffmann e Saldanha, 1974, 1977, 1981a, b, 1982; Medeiros et al., 1997; Nagamachi et al., 1997, 1999a, b; Viegas-Péquignot et al., 1985).

Atualmente, uma das técnicas mais informativas para o estudo da evolução cromossômica é a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) de sondas de DNA em cromossomos fixados em lâminas, empregando bibliotecas de DNA cromossomo-específicas humanas como sondas (WCP - "whole chromosome painting"). Estas sondas, quando hibridadas em diferentes cromossomos de outras espécies, mostram como os grupos sintênicos foram evolutivamente fragmentados em grupos gênicos menores, possibilitando a comparação genômica entre várias espécies e uma reconstrução filogenética mais precisa. Além disso, ilustram que a evolução genômica é marcada por um alto grau de conservação de sentenias (grupos de ligação) cromossômicas (Eichler e DeJong, 2002; Enard e Pääbo, 2004; Ferguson-Smith e Trifonov, 2007; Frönicke, 2005; García et al., 2003; Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008; Graphodatsky, 2007; Müller et al., 2000, 2001).

A introdução desta técnica para análise cariotípica comparativa, juntamente com os estudos de pintura cromossômica usando sondas derivadas pela citometria de fluxo de outras espécies de Platyrrhini, marcaram uma mudança de paradigma a partir da análise da morfologia dos cromossomos em direção à análise do conteúdo do DNA cromossômico, permitindo a identificação segura da homeologia cromossômica entre as espécies (Amaral et al., 2008; De Oliveira et al., 2002; Dumas et al., 2007; Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008; Gifalli-lughetti e Koiffmann, 2008, 2009a, b; Müller et al., 2001; Neusser et al., 2001; Stanyon et al., 2001, 2004), com uma resolução de 3-5Mb dentro do grupo dos primatas e 5-10Mb quando hibridadas em cromossomos dos demais mamíferos (Müller, 2006).

Partindo do princípio de que as alterações cromossômicas são consideradas eventos pouco frequentes (uma a duas alterações a cada 10 milhões de anos), a presença de uma mesma reorganização ou grupo sintênico em diferentes linhagens filogenéticas pode ser interpretada como um caráter evolutivo ancestral, procedente de uma origem comum (formas derivadas comuns ou sinapomórficas), que filogeneticamente ligam aquelas espécies (Ruiz-Herrera, 2003; Stanyon et al., 2000). Parece existir uma força de

manutenção intensa e a pequena frequência com que estes grupos são desfeitos faz com que a citogenética molecular seja uma ferramenta importante na identificação das modificações e reestruturações cromossômicas que ocorreram durante a evolução dos diferentes grupos (De Oliveira, 2001).

Estes estudos de pintura cromossômica a partir de sondas dos cromossomos humanos ou de cromossomos de macacos neotropicais, derivadas pela citometria de fluxo, demonstraram que os cariótipos foram consideravelmente rearranjados quando comparados ao provável cariótipo ancestral de primatas (Wienberg, 2005) e permitiram o estabelecimento de mapas genômicos comparativos entre humanos e mais de vinte espécies de Platyrrhini, tornando este o grupo de espécies mais estudado entre os mamíferos (Müller, 2006).

No cariótipo ancestral proposto para os macacos do Novo Mundo com $2n=54$ cromossomos (Neusser et al., 2001), os cromossomos homeólogos (mesmos cromossomos que estão presentes em espécies distintas, ainda que tenham sofrido rearranjos estruturais – Kasahara, 2009) aos cromossomos humanos 4, 6, 9, 11, 12, 13, 17, 19, 20, 22, X e Y se encontram totalmente conservados como cromossomos individualizados. Os cromossomos 5, 14, 18 e 21 encontram-se também conservados, porém associados com outros cromossomos, formando blocos sintênicos (5/7a, 14/15a, 8a/18 e 3a/21). Os demais homeólogos humanos estão fragmentados: 1a, 1b, 1c, 2a, 2b/16b, 3b, 3c, 7b, 8b, 10a/16a, 10b e 15b (Müller, 2006).

A partir das homeologias cromossômicas descritas baseadas na comparação de bandas G e dos resultados obtidos a partir de pintura cromossômica, considera-se que o gênero *Cebus* apresenta o cariótipo mais próximo ao sugerido como ancestral para Platyrrhini e é o grupo que sofreu o menor número de reorganizações a partir do cariótipo ancestral dos primatas (Ruiz-Herrera, 2003).

A família Atelidae exclusivamente compartilha a fissão do segmento homeólogo ao cromossomo 1 humano (HSA 1), a fissão da sentença HSA 5/7, com uma quebra no segmento homeólogo ao cromossomo 5, seguido de uma inversão (7/5/7), a fissão da sentença ancestral HSA 14/15, com a quebra no segmento homeólogo ao cromossomo 15 humano e a subsequente fusão

4/15 e a fissão do cromossomo homeólogo ao HSA 4. Além disso, uma inversão da sintenia 10/16, resultando em 16/10/16/10 foi observada em *Alouatta*, *Lagothrix* e *Brachyteles*, enquanto que em *Ateles* a forma 16/10/16 está presente. O cariótipo ancestral para a família Atelidae seria, portanto, composto por 62 cromossomos, semelhante ao complemento cromossômico encontrado em *Lagothrix lagotricha* e *Brachyteles arachnoides* (De Oliveira et al., 2005, 2012; Stanyon et al., 2001).

1.2 Filogenia e classificação

Após cerca de 20 anos de pesquisas, muitos aspectos da filogenia dos macacos neotropicais foram esclarecidos. Estimativas de tempo de divergência tem indicado que a radiação dos ancestrais de *Cebus/Saimiri*, *Aotus* e as modernas linhagens de *Callitrichinae* ocorreu dentro de um curto espaço de tempo (Schneider e Sampaio, 2015), com as datas estimadas da primeira divergência (que originou o ancestral de *Cebus/Saimiri* e *Aotus*) compreendendo entre 23,2 e 19,95 milhões de anos e da segunda divergência (que deu origem ao gênero *Aotus* e aos *Callitrichinae*) entre 22,4 e 19,25 milhões de anos (Goodman et al., 1998; Opazo et al., 2006; Perelman et al., 2011; Schneider, 2000).

De acordo com Schneider (2000) e Schneider e Sampaio (2015), consideradas as incertezas sobre o arranjo do clado Cebidae e o curto espaço de tempo de divergência entre os três grupos principais (*Aotus*, *Cebus/Saimiri* e *Callitrichinae*), a escolha mais parcimoniosa para a taxonomia dos Platyrrhini parece ser separá-los em três famílias (Atelidae, Pitheciidae e Cebidae), com três subfamílias dentro de Cebidae (*Callitrichinae*, *Aotinae* e *Cebinae*). Além das controvérsias geradas em nível familiar e específico, uma série de novos gêneros também foram propostos nos últimos anos, como por exemplo, *Mico*, *Callibella*, *Oreonax* e *Sapajus* (Rylands et al., 2012; Schneider e Sampaio, 2015).

Quanto aos gêneros *Mico* e *Callithrix*, os dados moleculares tem mostrado que os saguis da Bacia Amazônica (*Mico*) são mais próximos, em termos filogenéticos, ao sagui-pigmeu (*Cebuella*) do que aos saguis da Mata Atlântica (*Callithrix*) (Barroso et al., 1997; Chaves et al., 1999; Porter et al., 1997; Rylands et al., 2000; Tagliaro et al., 1997, 2000). Perelman et al. (2011) estimaram que os saguis da Bacia Amazônica e os *Cebuella* divergiram dos saguis da Mata Atlântica há cerca de 5 milhões de anos, durante a transição do Mioceno para o Plioceno.

Em 1963, Fooden publicou uma revisão do gênero *Lagothrix* (ao qual pertencem os macacos-barrigudos), que incluía neste gênero duas espécies alopátricas: *L. lagotricha* (encontrados em toda parte superior da Bacia Amazônica e regiões vizinhas) e *L. flavicauda* (restritos a uma pequena área da encosta oriental dos Andes centrais no Norte do Peru). Considerando que o último registro da espécie peruana era de 1926, esta foi na época

considerada extinta. No entanto, Mittermeier et al. (1975) redescobriram a espécie em seu habitat natural no Peru. Com base em estudos comparativos da morfologia do crânio, Groves (2001) propôs que a espécie *L. flavicauda* deveria ser classificada no gênero *Oreonax*, separando este dos outros macacos-barrigudos, porém Matthews e Rosenberger (2008), baseados no mesmo tipo de análise, discordaram desta classificação.

Silva (2001) concluiu que a morfologia dos macacos-prego com e sem tufo é tão distinta que estes deveriam ser considerados de gêneros distintos. No entanto, apenas mais recentemente, uma ampla revisão das características morfológicas, genéticas, comportamentais, ecológicas e biogeográficas (Boubli et al., 2012; Lynch Alfaro et al., 2012a, b) permitiu o estabelecimento de uma divisão formal entre os macacos-prego com e sem tufo, classificando-os como representantes dos gêneros *Sapajus* e *Cebus*, respectivamente. Estudos moleculares baseados em DNA mitocondrial e nuclear estimam que a divergência entre estes gêneros teria ocorrido no final do Mioceno, há mais de 6 milhões de anos (Lynch Alfaro et al., 2012a, b; Perelman et al., 2011).

Apesar da diversificação de Platyrrhini e Catarrhini ter ocorrido há cerca de 43 milhões de anos, foi apenas entre o final do Oligoceno (há 25 milhões de anos) e o início do Mioceno (há 23,8 milhões de anos) que as famílias Pitheciidae, Atelidae e Cebidae se estabeleceram. Dentre os Pitheciidae, o clado *Callicebus* surgiu há aproximadamente 20 milhões de anos e começou a diversificar cerca de 1 milhão de anos mais tarde. *Pithecia* diversificou do ancestral comum de *Chiropotes* e *Cacajao* há 14 milhões de anos, mas a diversificação das espécies destes três gêneros começou muito mais recentemente, há 2-4 milhões de anos (Perelman et al., 2011).

Com relação aos macacos-prego, Lynch Alfaro et al. (2012a, b) estimaram que o primeiro evento de diversificação teve início há 6 milhões de anos, isolando o grupo amazônico (*Cebus*) do grupo da Mata Atlântica (*Sapajus*), porém, muito recentemente (há cerca de 400.000 anos), os primatas do gênero *Sapajus* reocuparam a Bacia Amazônica. Chiou et al. (2011), com base em sequências de DNA mitocondrial, estudaram a diversificação de *Saimiri* na América do Sul e sua expansão na América Central, concluindo que

este gênero passou por uma grande radiação recente, no Pleistoceno, há cerca de 1,5 milhões de anos.

Na família Atelidae, as reconstruções moleculares obtidas por Schneider et al. (2001) mostraram uma relação filogenética próxima entre *Lagothrix* e *Brachyteles*, que teriam derivado de um ancestral comum a esses dois gêneros e *Ateles*, enquanto *Alouatta* é colocado como basal, concordando com os dados obtidos por Ruíz-García e Alvarez (2003). Segundo Perelman et al., (2011), a divergência da linhagem *Alouatta* ocorreu há cerca de 16 milhões de anos, seguido pela diversificação de *Ateles* há 11,5 milhões de anos e dos gêneros *Brachyteles* e *Lagothrix*, há 9,5 milhões de anos.

1.3 O gênero *Alouatta*

As espécies pertencentes ao gênero *Alouatta* (Atelidae) são popularmente conhecidas como bugios. Este é o gênero de Platyrrhini com a maior área de distribuição geográfica (figura 2), ocorrendo desde o Estado de Vera Cruz, no México, até o Estado do Rio Grande do Sul, no Brasil e Corrientes, na Argentina, englobando um número variado de formações vegetais e diversos biomas da América do Sul e da América Central (Gregorin, 2006), podendo viver em florestas primárias, florestas secundárias e em habitats altamente perturbados pela atividade humana, tais como fragmentos florestais de poucos hectares (Bicca-Marques, 2003; Bicca-Marques et al., 2011; Gilbert e Setz, 2001) e possui uma das maiores diversidades de espécies (De Oliveira et al., 2002).

As espécies de bugios apresentam, no geral, distribuição alopátrica ou peripátrica, com os grandes rios (Amazonas, Tapajós, Madeira, Paraná, Negro) ou cadeias de montanhas (maciço da Serra do Espinhaço) formando, na maioria das vezes, barreiras geográficas efetivas entre eles. *Alouatta caraya* apresenta a maior área de distribuição geográfica dentre as espécies do gênero que ocorrem no Brasil. Apesar de a espécie ser conhecida por estar associada diretamente às formações predominantemente abertas, como o Cerrado e o Pantanal, exemplares desta espécie são encontrados nas matas ripárias e capões de mata do Brasil central, assim como nas matas decíduas do Paraguai e dos Estados de São Paulo e Minas Gerais (Gregorin, 2006).

Figura 2: Distribuição geográfica dos representantes do gênero *Alouatta* – modificado de Steinberg (2011), a partir de dados de distribuição geográfica e taxonomia de Gregorin (2006) e De Oliveira e Kierulff (2008). A distribuição apresentada para *A. clamitans* e *A. fusca* é apenas ilustrativa, e novos estudos serão necessários para definir os limites de distribuição destas espécies. Foto de *Alouatta clamitans*: Marcos Antônio Melo.

Apesar dos esforços realizados para uma melhor compreensão da taxonomia do grupo, os estudos empregando dados moleculares, morfológicos e citogenéticos tem revelado diferentes cladogramas para o gênero *Alouatta* (figura 3), principalmente devido aos métodos distintos de análise utilizados, a representatividade taxonômica incompleta e a ausência de análises mais globais (Gregorin, 2006), apesar destes estudos serem

coincidentes em mostrar que *Alouatta* é um gênero monofilético (De Oliveira, 1996, 2001; De Oliveira et al., 2002).

Figura 3: Relações filogenéticas do gênero *Alouatta* empregando: a) dados morfológicos (modificado de Gregorin, 2006); b) dados moleculares (modificado de Cortés-Ortiz et al., 2003) e c) dados citogenéticos (modificado de De Oliveira et al., 2002).

Não há consenso quanto ao número de espécies do gênero *Alouatta*, que dependendo do autor e do tipo de estudo realizado, pode variar de 7 a

14 espécies (Cortés-Ortiz et al., 2003; Gregorin, 2006; Groves, 2001, 2005; Rylands, 2000; Rylands e Mittermeier, 2009).

Segundo Cortés-Ortiz et al. (2003), os bugios sul-americanos compreendem sete espécies: *A. seniculus*, limitado à oeste pela Cordilheira dos Andes colombianos e cobrindo a maior parte do norte da América do Sul acima do rio Amazonas; *A. macconnelli*, encontrado no Suriname, Guiana Francesa e no Brasil ao norte do baixo e médio Amazonas; *A. sara*, aparentemente restrito à Amazônia boliviana; *A. belzebul*, do sul do rio Amazonas e leste do rio Tapajós ao norte da Mata Atlântica; *A. nigerrima*, limitado ao norte pelo rio Amazonas, a leste e oeste pelos rios Trombetas e Madeiras, respectivamente, e ao sul pela sua divisa supostamente parapátrica com *A. caraya*; *A. caraya*, restrito ao sul do Brasil, Paraguai e norte da Argentina; e *A. guariba* com duas subespécies distribuídas na Mata Atlântica brasileira, embora a exata distribuição destas subespécies permaneça incerta (Harris et al., 2005).

Após analisar um total de 224 indivíduos de bugios da considerada até então espécie *A. guariba*, Gregorin (2006) elevou as subespécies *Alouatta guariba clamitans* e *A. g. guariba* ao nível de espécie, denominando-as *Alouatta clamitans* e *Alouatta fusca*, respectivamente, baseado na verificação de diferentes padrões de dimensões cranianas e de coloração entre as populações, além da presença de dicromatismo sexual em *A. clamitans* e ausência em *A. fusca*. Além dos dados morfológicos, também foram considerados os estudos citogenéticos realizados por De Oliveira et al. (2002), que já haviam proposto a elevação ao nível de espécie ao verificarem diferentes números diploides em indivíduos destas duas populações, causados por rearranjos robertsonianos, que poderiam levar à inviabilidade dos híbridos devido a complicações durante a meiose (mais detalhes no tópico Características citogenéticas).

Gregorin (2006) reconheceu então 10 espécies de bugios ocorrendo no Brasil: *Alouatta caraya*, *A. fusca*, *A. clamitans*, *A. belzebul*, *A. discolor*, *A. ululata*, *A. juara*, *A. macconnelli*, *A. puruensis* e *A. nigerrima*, sendo destas, *A. clamitans* o principal objetivo deste estudo.

No Brasil, *Alouatta clamitans* ocorre por toda a vertente Atlântica (figura 4) desde o extremo sul até o litoral e porção norte do Rio de Janeiro e a região

do Rio Jequitinhonha e a Serra do Espinhaço em Minas Gerais e compreende desde a região serrana central do Estado do Rio Grande do Sul até São Paulo, (exceto nas regiões norte e noroeste) habitando regiões de floresta pluvial sempre verde da costa Atlântica do leste do Brasil, florestas semidecíduas do interior do estado de São Paulo e as Matas de Araucária das regiões montanhosas dos estados da região sul do Brasil. A espécie ocorre também na região de Misiones, nordeste da Argentina e em simpatria com *A. caraya* em alguns pontos de sua distribuição, principalmente no nordeste da Argentina e nas regiões adjacentes à margem leste do Rio Paraná (Gregorin, 2006; Rylands et al., 1988, 1996).

Figura 4: Distribuição geográfica de *Arouatta clamitans* – modificado de Gregorin (2006).

No município de São Paulo, *Arouatta clamitans* ocorre em áreas verdes remanescentes dos distritos do Ipiranga, Engenheiro Marsilac, Parelheiros, APAs Capivari-Monos e Bororé-Colônia (todos localizados na região sul), e na Serra da Cantareira, na região norte (Summa, 2010).

A taxonomia de *Arouatta clamitans* é bastante complexa. De acordo com Gregorin (2006), Ihering (1914) pioneiramente reconheceu em *A. fusca* duas subespécies: *A. f. fusca* para se referir às populações setentrionais que

ocorrem nos estados de Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo e *A. f. guariba* para as populações de distribuição mais meridional, desde o estado do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul. Cabrera (1940) modificou o nome da subespécie que ocorre mais ao norte para *A. guariba guariba* e criou o nome *A. g. clamitans* para o táxon meridional. Ainda segundo Gregorin (2006), embora *Alouatta guariba* Humboldt venha sendo empregado com frequência em trabalhos mais recentes para designar o táxon da Mata Atlântica do sul do Rio São Francisco, este nome é homônimo júnior de [*Simia*] *guariba* Geoffroy Saint-Hilaire 1806 (e sinônimo de *Alouatta belzebul*) e não deve designar os bugios do leste do Brasil.

Apesar desta proibição e da elevação de *Alouatta clamitans* ao nível de espécie, esta consta na Lista Vermelha da IUCN (*International Union for Conservation of Nature* - versão 2015.2) como uma subespécie de *Alouatta guariba* (*Alouatta guariba* ssp. *clamtans*) e na categoria “pouco preocupante” sob a justificativa de que embora ocorra na Mata Atlântica do Brasil, uma região com uma alta taxa histórica de perda florestal, ainda é amplamente distribuída, está presente em muitas áreas protegidas e as populações não estão diminuindo em um ritmo suficiente para que seja qualificada em uma categoria sob ameaça (Mendes et al., 2008).

1.3.1 Características morfológicas e comportamentais

Os bugios apresentam uma característica anatômica singular entre os Platyrrhini: um osso hioide desenvolvido com o corpo central oco formando uma câmara (Gregorin, 2006; Neville et al., 1988), que atua como um ressonador de sua vocalização característica (ronco), com o qual os indivíduos delimitam seu território e evitam confrontos intergrupais e à qual se refere seu nome popular em inglês (*howler monkey*), macaco-uivador (Bicca-Marques et al., 2011; Neville et al., 1988). Em *Alouatta* os ossos do complexo hioideo estão fundidos formando uma estrutura única, composta por uma câmara principal oca e de paredes finas, a bula hioidea. Nos machos adultos esta estrutura é bem desenvolvida e de forma globular, enquanto que nas fêmeas ela é menor, menos inflada e achatada dorsoventralmente (Gregorin, 2006).

O comprimento total da cabeça e corpo destas espécies varia de 420 a 630mm e o da cauda, de 485 a 690mm. Os bugios apresentam uma espessa barba (Cabrera e Yepes, 1960; Moynihan, 1976) e, assim como os outros atelídeos, uma cauda preênsil (Neville et al., 1988). Possuem dimorfismo sexual, sendo os machos adultos – 5,0 a 9,0kg - normalmente mais pesados que as fêmeas adultas - 3,8 a 7,0kg (Rowe, 1996).

Alouatta caraya, *A. clamitans*, *A. puruensis* e *A. ululata* destacam-se ainda pela ocorrência de outra forma de dimorfismo sexual – o dicromatismo sexual – fenômeno muito raro entre os primatas (Auricchio, 1995; Bicca-Marques et al., 2011; Crockett, 1987; Gregorin, 2006). Os filhotes de ambos os sexos de *A. clamitans* e *A. caraya* nascem com uma pelagem com coloração semelhante à das fêmeas adultas, que nos machos muda de cor ao longo de seu desenvolvimento. Enquanto os machos de *A. caraya* são completamente pretos e as fêmeas adultas são bege-acizentadas, bege-amareladas ou marrom-claras (Bicca-Marques e Calegari-Marques, 1998), as fêmeas adultas de *A. clamitans* são escuras, com coloração da pelagem dorsal e membros castanho-enegrecidos a castanho-avermelhados e os machos adultos tornam-se avermelhados em decorrência da liberação de um pigmento por glândulas apócrinas (Hirano et al., 2003), assumindo uma coloração que varia desde o

ruivo profundo ao ruivo-amarelado (avelã), com membros e cauda mais escuros que o dorso (Gregorin, 2006).

Gregorin (2006) analisou morfologicamente um total de 159 indivíduos de *A. clamitans* e notou uma ampla variação no padrão de coloração e no grau de dicromatismo sexual, com a coloração nos machos tendendo a escurecer gradativamente no sentido sul-norte enquanto que o processo inverso foi observado nas fêmeas, concluindo que o dicromatismo é expresso de forma mais acentuada nos indivíduos procedentes das áreas mais ao sul (Rio Grande do Sul e Santa Catarina) do que nos da região sudeste (São Paulo e Minas Gerais); e verificou ainda que as variáveis cranianas decrescem de Minas Gerais para Santa Catarina e que espécimes do Rio Grande do Sul são menores que os provenientes de Santa Catarina.

A variação na coloração da pelagem encontrada nos bugios da costa leste brasileira (*Alouatta clamitans* e *A. fusca*) levou Gregorin (2006) a sugerir que existem três morfos distintos ao longo do transecto sul-norte (Rio Grande do Sul - Espírito Santo): 1) os machos das populações meridionais (Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e alguns espécimes do centro de Minas Gerais) tendem a ter pelagem castanho-avermelhado (cor de cobre) a avelã, enquanto que as fêmeas são muito escuras e o dicromatismo é acentuado; 2) nas populações centrais (São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais), os machos frequentemente apresentam a pelagem ruiva (embora haja espécies com coloração avelã como no Rio Grande do Sul), e as fêmeas tem pelagem castanha, com o ápice dos pelos dorsais ruivo-queimado; o dicromatismo é menos acentuado que no morfo 1; 3) nas populações do extremo norte da distribuição (Espírito Santo, noroeste do Rio de Janeiro e norte de Minas Gerais) não há dicromatismo e o padrão de coloração enegrecida com dorso dourado é bem distinto.

Gregorin (2006), baseado em estudos de Hirano et al. (2003), afirma que contrário ao que se supõe, a coloração avermelhada da pelagem de *A. clamitans* não é proveniente de feomelanina presente no interior dos pelos, mas sim de pigmentação externa liberada por glândulas epidérmicas. Declara ainda que a variação de coloração desde a castanho-avermelhada, passando para a ruiva e atingindo a castanho-amarelada (avelã) está relacionada, nos machos, à idade e posição hierárquica nos bandos e não à

geografia, sendo que este pigmento serve à função de marcação odorífera e visual e na manutenção da hierarquia. Assim, indivíduos machos alfa tendem a ter a coloração avelã, enquanto que os subadultos ou os muito velhos tem coloração ruiva ou castanho-avermelhada. Este importante sinalizador sexual visual, ausente nos espécimes de *A. fusca*, seria um mecanismo de isolamento pré-zigótico entre ambos os táxons, ou seja, as fêmeas de *A. clamitans* não seriam atraídas visualmente pelos machos escuros de *A. fusca*.

Os bugios apresentam dieta folívoro-frugívora (Crockett e Eisenberg, 1987) alimentando-se de folhas (brotos, novas, maduras e pecíolos) e frutos (maduros, imaturos e sementes), mas também de caules, flores, cascas e líquens (Bicca-Marques e Calegari-Marques, 1995). Esta dieta relativamente pobre em energia (em comparação à dieta de espécies mais frugívoras) tem implicações importantes para seu estilo de vida, podendo estes primatas ser considerados folívoros comportamentais, pois não possuem o mesmo grau de adaptações de seu trato digestório para digerir grandes quantidades de folhas como os macacos folívoros do Velho Mundo. As adaptações comportamentais incluem um padrão de atividades diárias dominado pelo descanso, um padrão de deslocamento direcional entre as principais fontes de alimento, a utilização de locomoção quadrúpede do tipo caminhada, a baixa realização de movimentos bruscos e deslocamentos rápidos que possam aumentar a temperatura corporal e o uso de posturas corporais que podem auxiliar na conservação de calor (Paterson, 1986; Milton, 1998; Bicca-Marques e Azevedo, 2004).

Estes primatas ocupam uma variedade maior de florestas do que qualquer outro primata neotropical e são bem adaptados a ambientes fragmentados (Emmons, 1990; Jardim, 2005; Reis et al., 2006), conseguindo sobreviver nestes ambientes devido em grande parte à capacidade de incluir grandes quantidades de folhas na sua alimentação em áreas relativamente pequenas, geralmente menores que 25 hectares (Crockett, 1998; Bicca-Marques, 2003), mas que podem variar de menos de 2ha para *A. caraya* (Muhle, 2008; Prates, 2007) a cerca de 50ha para *A. belzebul* (Pinto, 2002).

Os grupos sociais formados pelos bugios podem ter de 2 a 11 indivíduos (Emmons, 1999; Neville et al., 1988) e contém geralmente um máximo de quatro fêmeas adultas e um menor número de machos adultos, além de

indivíduos subadultos, jovens e infantis. Um dos machos é o dominante ("alfa") e os demais são aparentados e mais novos (Miranda e Passos, 2005; Neville et al., 1988). As migrações entre grupos ocorrem pela cisão ou pela fusão de grupos e por indivíduos que deixam seu grupo, tornando-se temporariamente solitários e unindo-se posteriormente a outro grupo (Neville et al., 1988). Os indivíduos de ambos os sexos podem emigrar de seus grupos natais, o que normalmente ocorre quando eles se aproximam da maturidade sexual, atingida entre os 5 e 5,5 anos nos machos e entre os 3,5 e 4,5 anos nas fêmeas de *A. seniculus* (Crockett e Eisenberg, 1987), porém as fêmeas migram mais raramente do que os machos (Neville et al., 1988). Pode ocorrer a expulsão do macho dominante de um grupo por um macho adulto de outro grupo, seguido do infanticídio de filhotes pelo invasor, o que normalmente induz o cio nas fêmeas (Crockett, 2003; Neville et al., 1988).

1.3.2 Características filogeográficas

Smith (1970) propôs a hipótese de uma origem monofilética dos bugios mesoamericanos baseada na expansão da distribuição geográfica dos bugios sul-americanos após a formação do Istmo do Panamá, há cerca de 3 milhões de anos atrás (Coates et al., 2004). No entanto, outros estudos indicam que a formação do Istmo foi um processo e não um evento (Knowlton e Weigt, 1998), resultando em períodos intermitentes com conexão e separação de terras durante os últimos 18 milhões de anos. Sendo assim, outra hipótese foi postulada para explicar a atual distribuição geográfica das espécies do gênero *Alouatta*: ao invés de um único evento, poderiam ter ocorrido vários eventos de colonização na região do Istmo do Panamá durante um dos períodos em que as Américas foram conectadas, ou em ilhas do Arquipélago do Caribe (Cortés-Ortiz et al., 2003; Ellsworth e Hoelzer, 2006).

Há aproximadamente 6,8 milhões de anos, o gênero *Alouatta* foi separado em um grupo transandino, com espécies do México, América Central e costa noroeste da América do Sul (Colômbia e Equador), e um cisandino que inclui a maioria das espécies da América do Sul (Bonvicino et al., 2001; Cortés-Ortiz et al., 2003; De Oliveira et al., 2002; Ellsworth e Hoelzer, 2006).

O Mioceno foi um tempo de importante atividade orogênica nos Andes, associada a um aumento das taxas de subducção entre as placas de Nazca e Sul-americana (Posadas e Ortiz-Jaureguizar, 2011). As temperaturas globais elevadas durante o Mioceno Médio começaram a decair no início do Mioceno Tardio (Zachos et al., 2001). Em decorrência da atividade orogênica dos Andes, porém ainda com metade de sua altura atual, zonas de sombra de chuva foram constatadas no Mioceno Tardio promovendo aridez em ambos os lados da cordilheira (Posadas e Ortiz-Jaureguizar, 2011). De acordo com Cortés-Ortiz et al. (2003), estes eventos promoveram separação vicariante das espécies transandinas de *Alouatta*, isolando o ancestral de *A. palliata* e *A. pigra* no lado oeste dos Andes. Embora os tempos de divergência estimados por Pereira (2013) para a separação de *A. palliata* sejam sutilmente mais recentes do que os de Cortés-Ortiz et al. (2003), o autor concorda com a existência de um evento vicariante, possivelmente associado aos mesmos

eventos e indica também um evento de dispersão, com as datas para a colonização de *A. palliata* na América Central consistentes com a emergência do Istmo do Panamá (Leigh et al., 2013).

O período inicial de diversificação dos bugios cisandinos (há 5,1 milhões de anos) coincide com a formação do moderno Rio Amazonas, durante o Mioceno Tardio (Lundberg et al., 1998). Reconstruções paleogeográficas (Bigarella e Andrade-Lima, 1982) sugerem que o ancestral de *A. belzebul* e *A. guariba* pode ter vivido em florestas contínuas, com a especiação tendo ocorrido a partir do subsequente desenvolvimento da Caatinga no nordeste do Brasil, que separou a Amazônia oriental e a Mata Atlântica e cuja vegetação seca é um ambiente inóspito para os primatas. Sob este cenário, o movimento de *Alouatta* através das regiões secas da Caatinga seria necessário para explicar a ocorrência de *A. belzebul* no extremo norte da Mata Atlântica (Cortés-Ortiz et al., 2003). No entanto, Bigarella e Andrade-Lima (1982) relataram uma conexão entre a Amazônia e a Mata Atlântica durante o Holoceno (5000 a 6000 anos atrás), sugerindo uma possível rota de dispersão durante épocas com maior umidade.

A primeira diversificação entre as espécies de bugios do norte da Amazônia ocorreu entre *A. macconnelli* e o ancestral de *A. seniculus* e *A. sara*. *Alouatta macconnelli* tem distribuição restrita às Guianas e o nordeste do Brasil, com limites coincidentes com áreas de endemismo para muitas outras espécies de vertebrados. Sendo assim, os rios podem ter desempenhado um papel no estabelecimento desta espécie ou, pelo menos, definido limites para sua distribuição atual. O Plioceno parece ter sido um período de ativa especiação dos bugios cisandinos, com a divergência de pares de espécies mais recente por volta dos 2,4 milhões de anos (*A. seniculus* e *A. sara*) e a mais antiga há 4 milhões de anos (*A. belzebul* e *A. guariba*) (Cortés-Ortiz et al., 2003).

Segundo Harris et al., (2005), o padrão de subdivisão das populações de *A. clamitans* do Rio de Janeiro e de Santa Catarina, que apresentam grandes distâncias genéticas, pode ter surgido durante o Pleistoceno Médio, há mais de 400.000 anos, seguindo a fragmentação da floresta e/ou a formação de ecorregiões distintas que se tornaram centros de endemismo. A população de São Paulo, que compartilha haplótipos tanto com os indivíduos do Rio de Janeiro quanto com os de Santa Catarina, pode ter se formado com a

expansão das florestas (no caso de refúgios) ou como populações que se expandiram a partir de diferentes centros de endemismo, ocasionando o contato de animais portadores de haplótipos divergentes. As diferenças genéticas encontradas entre as populações do Rio de Janeiro e de Santa Catarina são maiores do que as observadas entre quaisquer indivíduos de *A. caraya* (inclusive entre indivíduos procedentes da Bolívia e de Goiás, no Brasil) e de *A. belzebul*. As razões para tal divergência ainda não são claras, mas podem estar relacionadas com as diferentes topografias dos habitats destas três espécies. *A. clamitans* habita florestas montanhosas da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira na Mata Atlântica, enquanto os habitats de *A. caraya* e *A. belzebul* são normalmente desprovidos de terreno montanhoso. A variação altitudinal também foi sugerida por Rylands et al. (1996) por desempenhar um papel importante na diferenciação de populações do gênero *Brachyteles*, igualmente endêmicas da Mata Atlântica.

1.3.3 Características filogenéticas

Um conjunto de dados diferentes compartilhando uma história comum deve mostrar o mesmo padrão filogenético. Assim o uso de diferentes fontes de caracteres pode proporcionar informações valiosas para a elucidação das relações filogenéticas (Nieves et al., 2005).

Segundo Cortés-Ortiz et al., 2003, os estudos filogenéticos com base em dados moleculares revelaram uma separação dicotômica entre as espécies trans e cisandinas de *Alouatta*. O clado transandino mostrou dois ramos separados, um levando a *A. palliata mexicana*/*A. coibensis trabeata* e o outro a *A. pigra*, enquanto o grupo cisandino se dividiu em um ramo levando a *A. belzebul*/*A. guariba* e o outro ao clado (*A. caraya* (*A. macconnelli* (*A. seniculus*, *A. sara*)).

Vários autores tem proposto que os dados cromossômicos também podem ser utilizados como marcadores filogenéticos, desde que possuam caracteres com herança do tipo mendeliana e conservados entre as espécies (Dobigny et al., 2004; Sankoff, 2003; Stanyon et al., 2008).

Quando se compara a filogenia apresentada por De Oliveira et al., (2002) baseada em dados citogenéticos com as obtidas a partir de estudos moleculares, morfológicos e biogeográficos (Gregorin 1996, Meireles et al., 1999b, Bonvicino et al., 2001), a posição mais basal de *A. caraya* e o agrupamento de *A. fusca* com as espécies amazônicas, *A. belzebul* e *A. seniculus* é um consenso. Dados contrastantes foram obtidos por Nascimento et al., (2005) e por Cortés-Ortiz et al. (2003) a partir de estudos moleculares, resultando em uma filogenia com dois clados separados, um formado por *A. belzebul* e o outro por *A. caraya* (*A. caraya*, *A. seniculus*, *A. sara* e *A. macconnelli*).

O monofiletismo de *Alouatta* é apoiado, a partir de estudos cromossômicos por De Oliveira (2001), devido a presença das associações sintênicas homeólogas aos cromossomos humanos 2/16, 3/15 e a translocação envolvendo o Y e 3/15. A filogenia obtida com os dados citogenéticos coloca *A. caraya* agrupado com *A. belzebul* em um clado, enquanto *A. fusca*, *A. clamitans*, *A. macconnelli*, *A. arctoidea* e *A. sara* formam um segundo clado. Apesar de *A. caraya* e *A. fusca* possuírem localização geográfica próxima, há

uma relação filogenética maior entre *A. fusca* e o grupo formado por *A. macconnelli*, *A. arctoidea*, e *A. sara*, corroborando a hipótese de que uma grande parte da Mata Atlântica tem uma origem muito antiga, quando as florestas Amazônica e Atlântica ainda eram interligadas. As diferenças cariotípicas entre *A. fusca* e *A. sara*, *A. arctoidea* e *A. macconnelli* são indícios de uma separação remota entre estes dois grupos.

Em um estudo mais recente, Steinberg et al. (2014) elaboraram três filogenias baseadas em dados citogenéticos e em sequências do gene *cyt b*: uma com base em dados cromossômicos, outra em dados moleculares e uma terceira baseada nos dois tipos de análises. Essas análises colocam *A. sara*, *A. arctoidea* e *A. macconnelli* em um único grupo, embora os dados moleculares não resolvam as relações entre estas espécies, formando assim uma politomia. Todas as espécies mesoamericanas foram colocadas em um clado separado das espécies sul-americanas e nenhuma politomia foi observada a partir da análise conjunta dos dados. A filogenia obtida a partir da união dos dados citogenéticos e moleculares é muito similar à publicada por Cortés-Ortiz et al (2003), com exceção da posição de *A. belzebul*, que é considerada mais basal neste estudo (figura 5) do que no estudo publicado anteriormente (figura 3b – página 16).

Figura 5: Árvore filogenética obtida por Steinberg et al., 2014 (modificado) a partir da análise conjunta de dados cromossômicos e moleculares.

Harris et al., (2005) a partir da análise de sequências de DNA mitocondrial, concluíram que as distâncias genéticas máximas encontradas entre os indivíduos de *A. clamitans* procedentes do Rio de Janeiro e de Santa Catarina são quase o dobro das encontradas entre quaisquer indivíduos de *A. caraya* ou *A. belzebul*, que apresentam uma distribuição geográfica muito mais ampla, indicando a necessidade de uma revisão taxonômica desta espécie. Além disso, verificaram que a população de Santa Catarina demonstra 4 a 15 vezes menos variação no *cyt-b* do que as populações do Rio de Janeiro ou São Paulo, respectivamente. A população de São Paulo mostrou-se extremamente variável, compartilhando haplótipos tanto da população de Santa Catarina, quanto do Rio de Janeiro.

1.3.4 Características citogenéticas

Diferentes pesquisadores nas últimas três décadas tem proposto a especiação cromossômica como um provável mecanismo evolutivo para explicar a diversidade observada entre as espécies (Clemente et al., 1990; De Oliveira et al., 2012; Dutrillaux e Couturier, 1981; Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008; Seuánez, 1979; Stanyon et al., 2008).

As espécies e subespécies do gênero *Alouatta* apresentam grande variabilidade cariotípica, com número diploide que varia de 43 a 58 cromossomos: $2n=43$ a 45 em *A. seniculus*; $2n=44$ a 45 em *A. arctoidea*; $2n=44$ a 50 em *A. macconnelli*; $2n=49, 50$ e 52 em *A. fusca*; $2n=45, 46$ e 48 a 50 em *A. clamitans*; $2n=47$ a 49 em *A. stramineus*; $2n=48$ a 51 em *A. sara*; $2n=49$ ou 50 em *A. belzebul*; $2n=50$ em *A. nigerrima*; $2n=50$ a 52 em *A. caraya*; $2n=53, 54$ ou 56 em *A. palliata* e $2n=58$ em *A. pigra* (Armada et al., 1987; Bender e Chu, 1963; Bonvicino et al., 2001; Chu e Bender, 1961, 1962; Consigliere et al., 1996, 1998; ; De Oliveira, 1996, 2001; De Oliveira et al., 1995, 1998, 2002; Egozcue e Egozcue, 1966; Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008; Koiffmann, 1972, 1977; Koiffmann e Saldanha, 1974, 1981a; Lima et al., 1990; Lima e Seuánez, 1991; Ma et al., 1975; Minezawa et al., 1985; Mudry et al., 1984, 1994, 1998, 2001, 2007; Mudry-de-Pargament et al., 1984b; Nieves et al., 2005; Rahn et al., 1996; Solari e Rahn, 2005; Solari e Rahn, 2005; Stanyon et al., 1995; Steinberg, 2011; Steinberg et al., 2008, 2014; Torres e Ramírez, 2003).

Um cariótipo ancestral com $2n=62$ foi proposto para *Alouatta* (Consigliere et al., 1998; De Oliveira et al., 2002) para explicar a evolução cariotípica em *A. arctoidea*, *A. sara*, *A. macconnelli*, *A. caraya*, *A. fusca* e *A. belzebul*. De acordo com a nomenclatura proposta por Neusser et al. (2001), este cariótipo seria formado pelos cromossomos homeólogos aos autossomos humanos $1a_1, 1a_2, 1b, 1c, 2a, 2b, 3a/21, 3b, 4a, 4b/15a_2, 4c, 5a/7a, 5b, 6, 7b, 8a/18, 8b, 9, 16a/10a/16a/10a, 10b, 11, 12, 13, 14/15a_1, 16b, 17, 19, 20, 22$ e um sistema de cromossomos sexuais múltiplos composto por $X_1 (X), X_2 (3c/15b), Y_1 (Y/15b)$ e $Y_2 (3c)$.

As associações $2/20, 5/7/5/7$ e $4/16$ definem *A. belzebul* e *A. caraya* como clados irmãos, enquanto *A. seniculus*, *A. sara*, *A. macconnelli*, *A. fusca* e *A. clamitans* compartilham a associação $2/4$ e apenas *A. seniculus*, *A.*

macconnelli e *A. sara* apresentam as associações 1/20 e 8/7/5/7. Outros seis rearranjos cromossômicos ocorreram no último ancestral comum entre *A. seniculus* e *A. sara* (Consigliere et al., 1996, 1998; De Oliveira et al., 2012; Stanyon et al., 2011).

Os principais rearranjos cromossômicos observados na evolução cariotípica de *Alouatta* são as translocações, inversões, fusões/fissões cêtricas e os mecanismos complexos (De Oliveira, 1996), que contribuíram para a redução do número diploide durante o processo evolutivo (Mudry et al., 1990, 1992; Pieczarka e Nagamachi, 1988a), com grandes diferenças cromossômicas entre espécies, populações ou cariomorfotipos de posição taxonômica incerta, como é observado em *A. arctoidea* e *A. sara*, que apresentaram uma rápida mudança cromossômica, com 12 rearranjos separando seus cariótipos (Consigliere et al., 1996).

A fixação de um grande número de alterações cromossômicas ocorridas durante a irradiação desse gênero pode se basear na estrutura e comportamento social de suas espécies, que apresentam altas taxas de endogamia. Como os rearranjos se fixam mais facilmente nestes tipos de populações, *Alouatta* pode ter diversificado cromossomicamente sem a necessidade da formação de refúgios e isolados (De Oliveira, 2001).

Estudos baseados em pintura cromossômica com sondas de cromossomos humanos revelaram que os bugios mesoamericanos compartilham um grande número de associações sintênicas com os bugios sul-americanos: HSA15/4 (15q13-q21.2/4q23-q31.2) e HSA16/10 (16p/10q) são compartilhadas por todos os bugios; HSA15/14 (15q21.3-q24/14) é compartilhada por todos os bugios, com exceção de *A. arctoidea* e *A. macconnelli*; e HSA8/18 (8p/18) é compartilhada por todos os bugios com exceção de *A. arctoidea*. Duas novas associações sintênicas, HSA4/9/11 (4pter-q22/9/11) e HSA15/14/21 (15q21.3-q24/14/21q) foram encontradas para *A. pigra* (Steinberg et al., 2014).

Os cariótipos de *A. pigra* e *A. palliata* compartilham mais associações sintênicas com *A. caraya* e *A. belzebul* do que com os representantes do antigo "grupo *A. seniculus*" (*A. arctoidea*, *A. sara* e *A. macconnelli*), suportando o agrupamento basal de *A. pigra* e *A. palliata* no clado mesoamericano e o agrupamento basal de *A. belzebul* no clado sul-

americano. As comparações cromossômicas mostraram que *A. pigra* e *A. palliata* conservam as sintenias HSA8/18 e HSA14/15 consideradas ancestrais para Platyrrhini (Stanyon et al., 2008) bem como as associações sintênicas HSA10/16/10/16, ancestrais para Atelidae (De Oliveira et al., 2002), porém a sintenia HSA3/21, ancestral para mamíferos (Müller, 2006; Müller et al., 2000) está ausente nestas duas espécies (Steinberg et al., 2014).

Alouatta seniculus, *A. arctoidea*, *A. stramineus*, *A. macconnelli*, *A. insulanus*, *A. amazonica*, *A. juara*, *A. puruensis* e *A. sara*, anteriormente consideradas subespécies de *A. seniculus*, são as únicas espécies de primatas neotropicais a apresentarem cromossomos supranumerários (Consigliere et al., 1996, 1998; Lima et al., 1990; Stanyon et al., 1995), provavelmente devido a uma grande modificação cariotípica que ocorreu neste grupo (Lima et al., 1990). Estes cromossomos supranumerários apresentam tamanho diminuto, sendo chamados de microcromossomos e provavelmente se originaram do complemento A (padrão) e seguem sua própria evolução, não constituindo elementos essenciais ao desenvolvimento. São responsáveis pela maior parte da variabilidade dos números diploides, sugerindo que contém pouca, se alguma, informação genética essencial e sua origem e significado não são conhecidos. Em teoria, podem ser produzidos durante as translocações Robertsonianas, mas geralmente são perdidos depois, sendo que sua presença nestes cariótipos poderia indicar uma origem recente destas espécies (Consigliere et al., 1996; Stanyon et al., 1995).

De Oliveira et al., (2002) ao analisarem citogeneticamente indivíduos de *Alouatta fusca* com $2n=49$ (macho) e $2n=50$ (fêmea) e compararem os resultados com os verificados para dois machos de *A. clamitans* procedentes do estado do Paraná, com $2n=45$, concluíram que estas espécies (consideradas até então como subespécies) diferem por duas translocações Robertsonianas e que um híbrido entre estes dois citotipos ($2n=49/50$ e $2n=45/46$) poderia requerer a formação de dois trivalentes, que ocasionariam sérios efeitos durante a meiose. Este estudo, como já mencionado, foi muito relevante para a elevação das subespécies ao nível de espécie por Gregorin (2006), que considerou os dados citogenéticos em adição aos dados de variação morfológica observados.

A variabilidade cromossômica observada em *Alouatta clamitans* também é bastante ampla, com indivíduos com $2n=45$ ou 46 procedentes da região Sul e indivíduos com $2n=49$ ou 50 procedentes da região Sudeste do Brasil (De Oliveira, 1996; De Oliveira et al., 2002; Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008; Koiffmann, 1977; Koiffmann e Saldanha, 1974), além de dois exemplares já descritos que apresentaram $2n=48$, procedentes dos municípios de Iguape/SP (Gifalli-lughetti, 2008) e de Registro/SP (Koiffmann, 1977; Koiffmann e Saldanha, 1974), localizados no extremo sul do estado de São Paulo. Esta variabilidade indica que a tendência à redução do número diploide apresenta-se orientada no sentido norte-sul e que *A. clamitans* parece estar em processo ativo de especiação cromossômica, com as populações do sudeste e sul do Brasil já isoladas reprodutivamente, notando-se a necessidade de uma reavaliação taxonômica para esta espécie (De Oliveira, 1996; Gifalli-lughetti, 2008).

As diferenças observadas entre populações, tanto genéticas quanto morfológicas, indicam que *A. clamitans* é representante de duas subespécies ou mesmo de duas espécies separadas (De Oliveira, 1996, 2001; De Oliveira et al., 1995, 1998, 2002; Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008; Gregorin, 2006; Harris et al., 2005; Koiffmann, 1977).

Gifalli-lughetti (2008) encontrou quatro cariótipos distintos para os machos de *Alouatta clamitans* com 49 cromossomos e três cariótipos diferentes para as fêmeas com 50 cromossomos, procedentes da região sudeste do Brasil, além de pares heteromórficos e concluiu que esses poucos rearranjos que alteram a morfologia dos cromossomos e, conseqüentemente, as fórmulas cromossômicas sem alterar o número diploide, não devem ser determinantes para uma prole bem sucedida. Entretanto, múltiplas inversões pericêntricas envolvendo vários cromossomos podem ter um efeito cumulativo na fertilidade, com força potencial para se tornar um mecanismo de isolamento pós-zigótico efetivo.

1.3.4.1 O sistema sexual múltiplo em bugios

Além da grande quantidade de mudanças cromossômicas observadas entre os bugios, sistemas de cromossomos sexuais múltiplos ocorrem em um grande número de espécies, em decorrência da translocação Y-autossomo (Armada et al., 1987; Consigliere et al., 1996; De Oliveira et al., 1995, 1998, 2002; Lima et al., 1990; Lima e Seuánez, 1989, 1991; Ma et al., 1976; Minezawa et al., 1985; Mudry et al., 1998, 2001; Rahn et al., 1996; Stanyon et al., 1995, 2011; Steinberg, 2011; Steinberg, et al., 2008, 2014).

Considerando que a região de pareamento do par sexual primitivo nestes primatas é extremamente pequena e o cromossomo Y também, a aquisição de um nova massa cromatínica pelo rearranjo do Y primitivo com um autossomo pode ter aumentado a estabilidade do pequeno Y ancestral durante o processo de meiose, oferecendo, portanto, uma vantagem seletiva. Os cromossomos menores estão mais sujeitos a erros de segregação durante o processo de divisão celular e uma forma de evitar tais erros, que levariam à esterilidade ou inviabilidade, pode ter ajudado na fixação do sistema sexual múltiplo nas diferentes espécies de bugios (Mudry et al., 2001).

Dentro da família Atelidae, com exceção de *Alouatta*, todos os gêneros possuem um sistema sexual cromossômico do tipo XX/XY, portanto pode se considerar que o ancestral de *Alouatta* possuía um sistema cromossômico de determinação sexual deste tipo (Steinberg et al., 2014). Os cromossomos sexuais contribuem para a diversidade cariotípica tanto intra quanto interespecífica, com diferentes tipos de translocações Y-autossomo observadas e diferentes autossomos envolvidos, sugerindo que estes processos sejam mais recentes que a radiação do gênero (De Oliveira, 1996) e posteriores à separação biogeográfica dos grupos mesoamericanos e sul-americanos, que adquiriram sistemas de cromossomos sexuais múltiplos baseados em translocações Y-autossomo independentes (Steinberg, 2011; Steinberg et al., 2014).

A associação sintênica HSA 3/15 foi descrita em outras espécies de Atelidae como *Ateles geoffroyi* e *Ateles belzebub hybridus*, embora não associada com o sistema cromossômico sexual (Morescalchi et al., 1997), porém não foi observada em *Lagothrix* e *Brachyteles* (De Oliveira et al., 2005;

Stanyon et al., 2001) e sequer em outros gêneros de primatas neotropicais (Mudry et al., 2001). Portanto esta associação sintênica pode ser considerada como uma condição ancestral para a família Atelidae, enquanto a associação com os cromossomos do sistema sexual múltiplo pode ser considerada uma “novidade evolutiva” (apomorfia) em bugios e a perda desta associação uma apomorfia para o grupo *Lagothrix* e *Brachyteles*, ou esta associação pode ter aparecido independentemente em *Alouatta*, envolvida na translocação Y-autossomo e em *Ateles*, não envolvida no sistema sexual cromossômico (De Oliveira et al., 2005).

Os cromossomos envolvidos na translocação Y-autossomo em *Alouatta caraya*, *A. macconnelli*, *A. guariba*, *A. clamitans*, *A. sara* e *A. seniculus arctoidea* são homólogos às mesmas regiões dos cromossomos humanos 3 e 15 (Consigliere et al., 1996, 1998; De Oliveira et al., 1995, 2002; Mudry et al., 2001; Rahn et al., 1996; Steinberg, 2011; Steinberg et al., 2014), porém estas associações não estão presentes nos cromossomos que compõem o sistema sexual de *A. pigra* e *A. palliata* (Steinberg, 2011; Steinberg et al., 2014).

Steinberg et al. (2014) sugerem que o sistema cromossômico sexual múltiplo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ pode ter surgido independentemente nas linhagens dos bugios meso e sul-americanos por uma translocação Y-autossomo (figura 6a). Em machos, duas fissões, uma na porção terminal do braço curto do cromossomo Y (Yp_{ter}) e outra na região proximal no braço longo de um cromossomo autossomo (Aq_{prox}), seguida pela translocação destes cromossomos (Aq_{prox} a $Yq-p_{prox}$), teria formado o novo cromossomo Y_1 . O segmento Yp_{ter} foi perdido e a região proximal do autossomo fissionado foi perdida ou, em algumas espécies de bugios levou à origem de microcromossomos, como em *A. seniculus* (Lima e Seuánéz, 1991; Torres e Leibovici, 2001; Yunis et al., 1976), *A. sara* (Minezawa et al., 1985) e *A. macconnelli* (Lima et al., 1990). O cromossomo homólogo ao autossomo envolvido na translocação foi então denominado X_2 . No caso dos bugios sul-americanos, o par autossômico envolvido compartilharia homeologia com o HSA3, enquanto que nas espécies mesoamericanas possuiriam homeologia com o HSA7. A partir deste sistema $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, um novo sistema sexual, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$, pode ter sido originado a partir de uma nova translocação (figura 6b). Seguindo esta hipótese, duas quebras simultâneas em X_2p_{prox} e q_{prox}

de um outro autossomo ($A'_{q_{prox}}$), seguida por uma translocação do braço longo deste autossomo à região proximal do braço curto do cromossomo X_2 , daria origem a um novo cromossomo X_2 . O fragmento acêntrico do antigo cromossomo X_2 foi perdido e o restante do cromossomo autossomo (A') também foi perdido ou pode ter sido mantido como um microcromossomo em algumas espécies. O cromossomo homólogo ao autossomo A' foi então denominado Y_2 . No caso dos bugios sul-americanos, este novo par autossômico envolvido na translocação é homeólogo ao HSA15. Uma translocação adicional entre o Y_1 e o Y_2 (figura 6c) pode explicar o padrão de hibridação destes segmentos com homeologia aos cromossomos humanos 3 e 15 observado nos sistemas cromossômicos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$ dos bugios sul-americanos (figura 6d).

Figura 6: Possível origem do sistema cromossômico sexual múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$ do gênero *Alouatta*. O cromossomo X ancestral é mostrado em branco, o cromossomo Y ancestral em cinza claro e os autossomos em cinza escuro (A) e preto (A'). Ver detalhes no texto acima. Modificado de Steinberg et al. (2014).

Segundo Steinberg et al. (2014), nas espécies mesoamericanas o sistema sexual $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$ pode ter surgido como descrito na figura 6b (com o par autossômico envolvido compartilhando homeologia com um cromossomo humano ainda não identificado) ou por uma fissão no Y_1 que pode ter dado origem a dois cromossomos, o novo Y_1 (contendo o segmento correspondente ao cromossomo Y ancestral) e o Y_2 (contendo a porção do

cromossomo autossômico com homeologia ao HSA7), no entanto esta última hipótese pode requerer a ativação centromérica no Y_2 . Os sistemas de cromossomos sexuais múltiplos são fenômenos extremamente raros, devido à complicação na meiose, com poucas exceções em que um grande número de cromossomos sexuais estão envolvidos, como em ornitorrincos e equídnas (Bick e Jackson, 1967; Renz et al., 2007). Em primatas, sistemas sexuais múltiplos são ainda menos frequentes e, além disso, *Alouatta* é o primeiro caso em que uma origem independente de sistemas de cromossomos sexuais múltiplos é descrita. Em outras taxa como *Drosophila* (Flores et al., 2008), peixes Erythrinidae (Cioffi et al., 2013) e ratos-toupeiras (Deuve et al., 2006), alguns casos tem sido observados, mas estas descrições ainda são escassas.

Em *A. clamitans* e *A. fusca*, existe um múltiplo sexual com um rearranjo adicional na região distal do Y_1 que hibrida com a sonda do cromossomo humano 1 e como consequência, tem-se a inclusão de um elemento X_3 (De Oliveira et al., 2002). Um macho de *A. clamitans* procedente da Serra da Cantareira (São Paulo/SP) com $2n=50$ e um cromossomo Y acrocêntrico já foi descrito por Koiffmann (1972), no entanto, este tipo de complemento cromossômico não foi mais verificado e desde então todos os indivíduos machos descritos apresentaram número diploide ímpar, devido à translocação Y-autossomo (De Oliveira et al., 1995, 1998, 2002; Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008).

Uma sonda do cromossomo Y de *Brachyteles arachnoides* foi produzida a partir de microdissecção cromossômica e então hibridada em metáfases de indivíduos dos gêneros *Ateles* e *Lagothrix*, que junto com *Brachyteles* formam a subfamília Atelinae, produzindo sinal positivo e portanto, comprovando a homeologia do cromossomo Y entre estes gêneros. Porém, mesmo após inúmeras tentativas de hibridar esta sonda em metáfases de espécimes da subfamília Alouattinae, que junto com a subfamília Atelinae forma a família Atelidae, não foi possível observar sinal de hibridação (Gifalli-lughetti, 2008; Gifalli-lughetti e Koiffmann, 2009).

Foto: Cyril Ruoso

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar a variabilidade cariotípica intraespecífica de *Alouatta clamitans* para melhor compreender a história evolutiva da espécie e identificar as homeologias e sintenias entre os cromossomos destes primatas e de humanos.

2.2 Objetivos específicos

- Contribuir para a citotaxonomia do bugio-ruivo (*Alouatta clamitans*);
- Estabelecer os grupos sintênicos conservados;
- Estudar a variabilidade intraespecífica e intrapopulacional dos bugios do estado de São Paulo, contribuindo para o projeto "Manejo e Conservação do Bugio, *Alouatta clamitans* (Primates, Atelidae) na Região Metropolitana de São Paulo: aprimorando o programa de reintrodução", em parceria com o DEPAVE-3, visando uma posterior soltura em região geográfica adequada;
- Orientar na composição de grupos de acasalamento para repovoamento de áreas e reprodução em cativeiro.

Foto: Cyril Ruoso

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Caracterização dos Indivíduos

As amostras de sangue periférico de espécimes de bugios que foram utilizadas para o desenvolvimento deste projeto são provenientes do DEPAVE-3 (Departamento de Parques e Áreas Verdes, Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre – São Paulo/SP), do CEMAS (Centro de Estudo e Manejo de Animais Silvestres – Fundação Florestal – São Paulo/SP) e do Projeto Bugio (Blumenau/SC).

Quadro I - Caracterização das amostras utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho:

Registro	Espécie	Sexo	Registro de Origem	Procedência
M 105	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	8331	Parelheiros - São Paulo/SP
M 131	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	11822	Serra da Cantareira/SP
M 265	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	8700	Serra da Cantareira/SP
M 272	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	18554	Serra da Cantareira/SP
M 275	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	20732	Mairiporã/SP
M 277	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	20434	Serra da Cantareira/SP
M 278	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	20374	Serra da Cantareira/SP
M 280	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	20931	Mairiporã/SP
M 300	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	09	Serra da Cantareira/SP
M 301	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	10	Serra da Cantareira/SP
M 307	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	24	Serra da Cantareira/SP
M 309	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	23	Serra da Cantareira/SP
M 333	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	30109	Mairiporã/SP
M 334	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	30446	Parelheiros - São Paulo/SP
M 335	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	23587	Embu-Guaçu/SP
M 339	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	29531	nascido no DEPAVE
M 340	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	31012	Serra da Cantareira/SP
M 342	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	01	Região Sul/Brasil
M 350	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	09	Pomerode/SC
M 358	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	27193	Grajaú - São Paulo/SP
M 361	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	31429	Mairiporã/SP
M 364	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	25932	Ibiúna/SP
M 365	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	26452	Pq. Est. Fontes do Ipiranga, São Paulo/SP
M 368	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	32338	Iguape/SP

M 370	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	32037	nascido no DEPAVE
M 372	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	34019	Embu-Guaçu/SP
M 385	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	32312	nascido no DEPAVE
M 386	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	35882	Franco da Rocha/SP
M 387	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	33102	Pq. Est. Fontes do Ipiranga, São Paulo/SP
M 388	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	35924	nascido no DEPAVE
M 389	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	35056	nascido no DEPAVE
M 396	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	36680	Grajaú - São Paulo/SP
M 399	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	34831	Parelheiros - São Paulo/SP
M 417	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	39774	Horto Florestal - São Paulo/SP
M 418	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	40079	Horto Florestal - São Paulo/SP
M 419	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	40039	Bairro Pq. de Taipas - São Paulo/SP
M 421	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	39337	Itapecerica da Serra/SP
M 425	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	41591	Bragança Paulista/SP
M 453	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	42684	Parelheiros - São Paulo/SP
M 454	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	42681	Serra da Cantareira/SP
M 455	<i>Alouatta sp.</i>	fêmea	42937	-
M 457	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	44895	Bragança Paulista/SP
M 458	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	45877	-
M 466	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	48109	Jabaquara - São Paulo/SP
M 471	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	49009	Itapecerica da Serra/SP
M 479	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	53609	Tremembé - São Paulo/SP
M 480	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	53791	Grajaú - São Paulo/SP
M 482	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	54730	Serra da Cantareira/SP
M 483	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	54802	Pq. Nat. Mun. do Jaceguava, São Paulo/SP
M 484	<i>Alouatta clamitans</i>	macho	53356	Horto Florestal - São Paulo/SP
M 486	<i>Alouatta clamitans</i>	fêmea	56067	Parelheiros - São Paulo/SP

3.1.2 Captura dos animais e coleta de amostras

A coleta de sangue dos animais foi realizada pelos veterinários responsáveis. Os animais submetidos à coleta foram capturados por seus tratadores e anestesiados pelos médicos-veterinários responsáveis em suas instituições. Após a contenção dos espécimes e término dos procedimentos, ficaram sob observação até o completo restabelecimento e foram então realocados em seus recintos.

Para os estudos citogenéticos e citogenéticos moleculares, aproximadamente 5 ml de sangue periférico foi retirado com seringa e imediatamente depositado em um tubo contendo heparina.

3.2 Métodos

3.2.1 Cultura de linfócitos

As culturas de linfócitos foram realizadas de acordo com a técnica proposta por Moorhead et al. (1960) com modificações. Os tubos contendo as amostras de sangue periférico foram colocados em repouso na posição vertical para que os constituintes sanguíneos fossem separados por sedimentação em três fases visíveis e distintas: plasma (sobrenadante), linfócitos e hemácias.

Para a obtenção de metáfases, foram feitas culturas de linfócitos utilizando o meio RPMI 1640 (Gibco ou Cultilab) enriquecido com 20% de soro fetal bovino (Cultilab), fitohemaglutinina (Difco ou Cultilab) e L-glutamina (Sigma). Para obter o pH=6,8 acrescentamos algumas gotas de bicarbonato de sódio 0,85% estéril. Cada frasco estéril para cultura celular recebeu 10ml do meio enriquecido, 20µl de antibiótico (penicilina/estreptomicina) da Cultilab, os linfócitos e o plasma sanguíneo. Os procedimentos para a preparação do meio e da cultura foram realizados em câmara asséptica (fluxo). Em seguida, os frascos foram colocados em estufa a 37°C por 96 horas. Então as culturas foram retiradas, acrescidas de 0,2 ml de colchicina (4×10^{-5} M) e recolocadas na estufa por mais 45 minutos.

As culturas foram transferidas para tubos graduados, que foram centrifugados por 5 minutos a 1500 RPM. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e 8ml de solução hipotônica (5,6g de KCl para 1l de água destilada – 0,075 M) foi adicionado a cada tubo, mantendo em repouso por 30 minutos a 37°C. Em seguida, 4ml do fixador (metanol - ácido acético 3:1 – ambos da Merck) foi adicionado.

O material foi novamente centrifugado por 5 minutos a 1500 RPM, o sobrenadante foi retirado e acrescido de fixador. Para todas as culturas utilizamos o *Cytoclear* (ProCell Reagents), que é uma mistura de detergentes que dissolve e remove o citoplasma persistente durante o estágio de fixação do procedimento de cultura cromossômica (5µl de *Cytoclear*/ml de fixador por 5 minutos a temperatura ambiente). A lavagem do material com fixador seguiu por mais 2 ou 3 vezes até que o fixador estivesse transparente e o sedimento limpo, porém na última vez o sobrenadante não foi totalmente retirado, restando 0,5 a 2ml de fixador. As suspensões concentradas de células

foram então pingadas com Pipetas Pasteur sobre lâminas limpas (que estavam armazenadas em água destilada na geladeira) e secas a temperatura ambiente. Essas suspensões foram armazenadas em tubos de microcentrífuga no freezer.

3.2.2 Análise convencional

Para a análise convencional dos cromossomos coramos a lâmina com solução tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,03 M e NaH_2PO_4 0,03 M) ou tampão fosfato Sörensen (Na_2HPO_4 0,03 M e KH_2PO_4 0,03 M) e Giemsa (Merck) por aproximadamente 5 minutos e lavamos em água corrente, deixando-a secar a temperatura ambiente. As análises foram realizadas em microscópio Axiophot 2 Motorizado (Zeiss), as imagens foram capturadas com uma vídeo-câmera CCD de alta resolução e os cariótipos foram montados com o programa IKAROS V 5.4.9 (MetaSystems).

3.2.3 Bandamento GTG

Para uma melhor precisão na identificação dos cromossomos, empregamos a técnica de bandamento G descrita por Seabright (1971) com modificações.

Pingamos algumas gotas da solução de células fixadas em uma lâmina e a envelhecemos em micro-ondas por 3 minutos. Colocamos a lâmina no banho-maria a 65°C submersa em solução de 2xSSC (cloreto de sódio 0,3 M e citrato trissódico 0,03 M) por 5 minutos. Após este tempo, submetemos a lâmina a solução de tripsina 0,025% em tampão fosfato Sörensen (pH 6,8) à 37°C por alguns segundos, mergulhamos em água destilada e em seguida em etanol 80%, ambos em temperatura ambiente. Então, coramos a lâmina com Giemsa (Merck) a 4% em tampão fosfato Sörensen por aproximadamente 5 minutos e secamos a temperatura ambiente.

A lâmina foi analisada em um microscópio Axiophot 2 Motorizado (Zeiss), as metáfases foram capturadas com o auxílio de uma vídeo-câmera

CCD de alta resolução e cariotipadas utilizando-se o programa IKAROS V 5.4.9 (Metasystems).

3.2.4 Bandamento CBG

A técnica de bandamento CBG modificada de Sumner (1972) foi realizada para a localização da heterocromatina constitutiva.

Para tal, submetemos a lâmina por 20 minutos em HCl 0,2 N e em seguida mergulhamos por aproximadamente 40 segundos em uma solução de hidróxido de bário 5% a 60°C. A lâmina foi lavada em HCl 1N e colocada por 20 minutos em 2XSSC a 60°C. Por fim, foi corada por 20 minutos com Giemsa (Merck) a 4% em tampão fosfato Sörensen, lavada em água corrente e colocada para secar a temperatura ambiente.

As metáfases foram analisadas em um microscópio Axiophot 2 Motorizado (Zeiss), capturadas com o auxílio de uma vídeo-câmera CCD de alta resolução e cariotipadas utilizando-se o programa IKAROS V 5.4.9 (Metasystems).

3.2.5 Reamplificação de sondas por PCR

As sondas das bibliotecas dos cromossomos humanos derivadas pela citometria de fluxo (*Human Paints NCBI*) foram reamplificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) [2µl Taq DNA polimerase buffer, 2µl dNTP's (2mM), 1µl MgCl₂ (50mM), 11,5µl água Mili-Q estéril, 2µl 6-MW Primer (10mM), 0,5µl Taq DNA polimerase e 1µl de DNA molde (sonda)], com um perfil de 35 ciclos em alta temperatura: 96°C por 5 minutos, 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 2 minutos, uma extensão final a 72°C por 7 minutos e 4°C ∞.

3.2.6 Marcação e precipitação de sondas

Para a utilização das sondas amplificadas das bibliotecas dos cromossomos humanos derivadas pela citometria de fluxo (*Human Paints NCBI*) em experimentos de FISH, estas foram marcadas por "nick translation" usando

os kits Biotin-Nick translation mix ou DIG-Nick translation mix, ambos da Roche, conforme a orientação do fabricante.

As sondas amplificadas por PCR e marcadas foram precipitadas antes de serem utilizadas para a FISH, a fim de eliminar os restos de sais e produtos da PCR. Em um tubo de microcentrífuga foi aliquoteado o produto da reação final obtida com a marcação, Human COT-1 DNA (Invitrogen), NaAc (3M) gelado correspondente a 10% do volume total de DNA (sonda+COT) e EtOH 100% gelado (2,5x o volume total de DNA) e deixado *overnight* no freezer. As sondas foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos em uma velocidade de 13000RPM e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Em seguida, 150µl de etanol 70% gelado foram adicionados e a centrifugação foi repetida nas mesmas condições por 15 minutos. O sobrenadante novamente foi retirado e a sonda de DNA foi colocada para secar em estufa a 37°C por aproximadamente uma hora.

3.2.7 FISH

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada com as sondas de pintura de todos os cromossomos derivados pela citometria de fluxo (*Human Paints NCBI*), em metáfases humanas para confirmar a eficiência da reamplificação pela PCR e em seguida em metáfases de exemplares do gênero *Alouatta*. As sondas, marcadas e ressuspendidas em meio de hibridação, foram deixadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos, aquecidas em água a 98°C por 10 minutos e, em seguida, colocadas em banho-maria a 37°C para a pré-hibridação por 30 minutos.

Antes da desnaturação das lâminas, um pré-tratamento foi realizado com 100µl de RNase (100µg/ml) por uma hora em estufa a 37°C. Então, as lâminas foram colocadas em três banhos de 2XSSC a temperatura ambiente por 5 minutos cada e desidratadas em série de etanol 70%, 85% e 100% por 3 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram submetidas a um banho de pepsina 0,005% por 10 minutos a 37°C e 2 banhos de PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar, foram colocadas novamente em séries de etanol 70%, 85% e 100% por 3 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se a desnaturação por 2 minutos a 72°C em solução de formamida 70% e,

novamente, foram desidratadas em séries de etanol 70%, 85% e 100% gelados por 3 minutos cada. Então, foram incubadas a 37°C, *overnight* para lâminas de material humano ou por 6 dias para material de primatas. Após o tempo de hibridação, a lâmina foi lavada em solução de formamida 50% e 2XSSC por 3 minutos cada a 37°C e, por fim, em PBT (100ml de 20xSSC, 400ml de água destilada e 250µl de Tween-20) por 5 minutos a temperatura ambiente.

As sondas marcadas com Digoxigenina foram detectadas com Antidigoxigenina-Rodamina e as sondas marcadas com Biotina foram detectadas com Avidina-FITC por 45 minutos a 37°C e, em seguida, as lâminas foram submetidas a 3 banhos de PBT a 37°C por 3 minutos cada e coradas com DAPI (4,6 diamidina-2-phenylindole) mais Vectashield (Vector Laboratories).

A técnica de FISH também foi empregada conforme indicado pelo fabricante das sondas de DNA "painting" dos cromossomos 3, 5, 7 e 21 humanos (Cytocell) e das lâminas *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome* (Cytocell), que são lâminas divididas em oito áreas, com sondas de pintura de três cromossomos humanos em cada área, marcadas em cores diferentes (vermelho, verde e azul), compreendendo todos os 24 cromossomos humanos.

A única modificação do protocolo do fabricante foi com relação à preparação das lâminas *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome*. A suspensão de linfócitos foi pingada com uso de pipeta Pasteur sobre as lâminas, que foram observadas em microscópio de fase para verificar a existência de quantidades satisfatórias de metáfases em todas as áreas. Este método se mostrou mais eficiente para a obtenção de metáfases do que o sugerido pelo fabricante (pingar 4µl da suspensão celular em cada área com o uso de micropipeta).

As lâminas foram analisadas em um microscópio Axiophot 2 Motorizado (Zeiss) e as metáfases foram capturadas em coloração DAPI e com os filtros RHO, FITC e AQUA para a observação das marcações. As imagens foram capturadas com o auxílio de uma vídeo-câmera CCD de Alta Resolução e do programa ISIS V 5.4.9 (MetaSystems).

Foto: Dario Sanchez

4. RESULTADOS

4.1 Análise citogenética em coloração convencional

O estudo cromossômico de *A. clamitans* com coloração convencional foi realizado em 28 fêmeas e 22 machos. Os resultados obtidos após a cariotipagem das metáfases destes indivíduos estão apresentados no Quadro II.

Quadro II - Resultados das análises em coloração convencional de *Alouatta clamitans* com o número do registro em nosso laboratório, a procedência, o sexo, o número diploide (2n), a quantidade de cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e acrocêntricos (fórmula cromossômica) e a morfologia dos cromossomos sexuais X e Y:

Registro	Procedência	Sexo	2n	Meta-Submeta/Acro	X	Y
M 105	Parelheiros - São Paulo/SP	Fêmea	50	20/30	submeta	-
M 131	Serra da Cantareira/SP	Fêmea	50	20/30	submeta	-
M 265	Serra da Cantareira/SP	Fêmea	50	20/30	submeta	-
M 272	Serra da Cantareira/SP	Fêmea	50	22/28	submeta	-
M 275	Mairiporã/SP	Macho	49	21/28	submeta	Y/A
M 277	Serra da Cantareira/SP	Macho	49	19/30	submeta	Y/A
M 278	Serra da Cantareira/SP	Fêmea	50	22/28	submeta	-
M 280	Mairiporã/SP	Fêmea	50	20/30	submeta	-
M 300	Serra da Cantareira/SP	Macho	49	17/32	submeta	Y/A
M 301	Serra da Cantareira/SP	Fêmea	50	20/30	submeta	-
M 307	Serra da Cantareira/SP	Fêmea	50	22/28	submeta	-
M 309	Serra da Cantareira/SP	Fêmea	50	20/30	submeta	-
M 333	Mairiporã/SP	Macho	49	20/29	submeta	Y/A
M 334	Parelheiros - São Paulo/SP	Fêmea	50	22/28	submeta*	-
M 335	Embu-Guaçu/SP	Macho	49	22/27	submeta	Y/A
M 339	nascido no DEPAVE	Fêmea	50	22/28	submeta	-
M 340	Serra da Cantareira/SP	Fêmea	50	22/28	submeta*	-
M 342	Região Sul/Brasil	Macho	45	24/21	submeta	Y/A
M 350	Pomerode/SC	Fêmea	46	25/21	submeta	-
M 358	Grajaú - São Paulo/SP	Fêmea	50	20/30	submeta	-
M 361	Mairiporã/SP	Fêmea	50	20/30	submeta	-
M 364	Ibiúna/SP	Macho	49	18/31	submeta	Y/A
M 365	Pq. Est. Fontes do Ipiranga São Paulo/SP	Macho	49	18/31	submeta	Y/A
M 368	Iguape/SP	Fêmea	48	23/25	submeta	-

M 370	nascido no DEPAVE	Fêmea	50	22/28	submeta	-
M 372	Embu-Guaçu/SP	Macho	49	20/29	submeta	Y/A
M 385	nascido no DEPAVE	Macho	49	20/29	submeta	Y/A
M 386	Franco da Rocha/SP	Macho	49	20/29	submeta	Y/A
M 387	Pq. Est. Fontes do Ipiranga São Paulo/SP	Fêmea	50	20/30	submeta	-
M 388	nascido no DEPAVE	Macho	49	19/30	submeta	Y/A
M 389	nascido no DEPAVE	Fêmea	50	23/27	submeta	-
M 396	Grajaú - São Paulo/SP	Macho	49	18/31	submeta	Y/A
M 399	Parelheiros - São Paulo/SP	Macho	49	19/30	submeta	Y/A
M 417	Horto Florestal São Paulo/SP	Macho	49	19/30	submeta	Y/A
M 418	Horto Florestal São Paulo/SP	Macho	49	20/29	submeta	Y/A
M 419	Bairro Pq. de Taipas São Paulo/SP	Fêmea	50	22/28	submeta	-
M 421	Itapecerica da Serra/SP	Fêmea	50	22/28	submeta	-
M 425	Bragança Paulista/SP	Macho	49	20/29	submeta	Y/A
M 453	Parelheiros - São Paulo/SP	Macho	49	21/28	submeta	Y/A
M 454	Serra da Cantareira/SP	Fêmea	50	22/28	submeta	-
M 457	Bragança Paulista/SP	Macho	49	19/30	submeta	Y/A
M 458	-	Macho	49	20/29	submeta	Y/A
M 466	Jabaquara - São Paulo/SP	Macho	49	19/30	submeta	Y/A
M 471	Itapecerica da Serra/SP	Fêmea	50	22/28	submeta	-
M 479	Tremembé - São Paulo/SP	Fêmea	50	20/30	submeta	-
M 480	Grajaú - São Paulo/SP	Fêmea	50	20/30	submeta	-
M 482	Serra da Cantareira/SP	Fêmea	50	22/28	submeta	-
M 483	Pq. Nat. Mun. Jaceguava São Paulo/SP	Fêmea	50	23/27	submeta	-
M 484	Horto Florestal - São Paulo/SP	Macho	49	18/31	submeta	Y/A
M 486	Parelheiros - São Paulo/SP	Fêmea	50	22/28	submeta	-

submeta = cromossomo submetacêntrico;

- = ausência;

Y/A = translocação Y/autossomo;

*= estes dois indivíduos apresentaram um dos cromossomos X submetacêntrico e o outro metacêntrico.

O estudo cromossômico das fêmeas revelou três diferentes números diploides ($2n=46$, 48 e 50) e cinco distintas fórmulas cromossômicas, como segue:

- **A)** 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 28 cromossomos acrocêntricos foram encontrados em 13 fêmeas (M 272, M 278, M 307, M 334, M 339, M 340, M 370, M 419, M 421, M 454, M 471, M 482 e M 486). Foram observados heteromorfismos no par 4 dos indivíduos M 272 e M 334, no par 5 do indivíduo M 482, no par 6 do indivíduo M 334 e no par X dos indivíduos M 334 e M 340 (figura 7);

Figura 7: a) Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 419, com $2n=50$, similar aos verificados para a maioria das fêmeas com 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 28 acrocêntricos (M 278, M 340, M 421, M 454, M 471, M 339, M 486, M 307, M 370); **b)** Pares heteromórficos encontrados: par 4 do indivíduo M 272 (similar ao mesmo par do M 334), par 5 do M 482, par 6 do M 334 e par X do M 334 (similar ao do M 340).

- **B)** 20 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 30 acrocêntricos foram verificados em 11 fêmeas (M 105, M 131, M 265, M 280, M 301, M 309, M 358, M 361, M 387, M 479 e M 480). Foram

encontrados heteromorfismos no par 4 dos indivíduos M 105, M 131, M 265, M 280, M 309, M 358, M 361 e M 479, no par 8 do indivíduo M 301 e no par 14 dos indivíduos M 105, M 131, M 265, M 280, M 358, M 361 e M 479; os exemplares M 387 e M 480 não apresentaram pares heteromórficos (figura 8);

Figura 8: a) Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 280, com $2n=50$, similar aos verificados para a maioria das fêmeas com 20 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 30 acrocêntricos. As setas indicam heteromorfismos no par 4 (similar ao dos indivíduos M 105, M 131, M 265, M 280, M 309, M 358, M 361 e M 479) e no par 14 (similar ao dos exemplares M 105, M 131, M 265, M 280, M 358, M 361 e M 479); **b)** Par 4 homomórfico do indivíduo M 387 (similar aos encontrados em M 301 e M 480), par 8 heteromórfico do indivíduo M 301 e par 14 homomórfico do exemplar M 387 (similar aos verificados em M 301, M 309 e M 480).

- **C)** 23 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 27 acrocêntricos foram encontrados em duas fêmeas (M 389 e M 483), porém com cariótipos bastante distintos (figuras 9 e 10);

Figura 9: Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 389, com $2n=50$ e com 23 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 27 acrocêntricos. A seta indica o par heteromórfico 11.

Figura 10: Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 483, com $2n=50$ e com 23 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 27 acrocêntricos. As setas indicam os pares heteromórficos 5 e 21.

- **D)** 23 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 25 acrocêntricos foram verificados para a fêmea com $2n=48$ (M 368) (figura 11).

Figura 11: Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 368, com $2n=48$ e com 23 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 27 acrocêntricos. As setas indicam os pares heteromórficos 3, 10 e 13.

- **E)** 25 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 21 acrocêntricos foram encontrados para a fêmea com $2n=46$ (M 350) (figura 12).

Figura 12: Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 350, com $2n=46$ e com 25 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 21 acrocêntricos. A seta indica o heteromorfismo no par 12.

O Quadro III apresenta um resumo da variabilidade cariotípica encontrada para as fêmeas de *Alouatta clamitans* da região sudeste do Brasil:

Quadro III - Resultados em coloração convencional das fêmeas analisadas com o número do registro em nosso laboratório, o número diploide (2n), a quantidade de cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e acrocêntricos (fórmula cromossômica) e a presença/ausência de pares heteromórficos:

Registro	2n	Meta-Submeta/Acro	Pares heteromórficos											
			3	4	5	6	8	10	11	12	13	14	21	X
M 272	50	22/28		+										
M 278	50	22/28												
M 307	50	22/28												
M 334	50	22/28		+		+								+
M 339	50	22/28												
M 340	50	22/28												+
M 370	50	22/28												
M 419	50	22/28												
M 421	50	22/28												
M 454	50	22/28												
M 471	50	22/28												
M 482	50	22/28			+									
M 486	50	22/28												
M 105	50	20/30		+								+		
M 131	50	20/30		+								+		
M 265	50	20/30		+								+		
M 280	50	20/30		+								+		
M 301	50	20/30					+							
M 309	50	20/30		+										
M 358	50	20/30		+								+		
M 361	50	20/30		+								+		
M 387	50	20/30												
M 479	50	20/30		+								+		
M 480	50	20/30												
M 389	50	23/27							+					
M 483	50	23/27			+								+	
M 368	48	23/25	+					+			+			
M 350	46	25/21								+				

+= presença

A análise cariotípica dos machos de *Alouatta clamitans* revelou dois números diploides distintos ($2n=45$ e 49) e sete fórmulas cromossômicas diferentes:

- **A')** 20 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 29 cromossomos acrocêntricos foram encontrados em sete machos (M 333, M 372, M 385, M 386, M 418, M 425 e M 458). Foram observados heteromorfismos no par 4 dos indivíduos M 333, M 385, M 386 e M 458, no par 5 do indivíduo M 425, no par 6 dos indivíduos M 333, M 385 e M 458 e no par 9 dos indivíduos M 372 e M 418 (figura 13);

Figura 13: a) Cariótipo em coloração convencional do macho M 385, com $2n=49$, similar aos verificados para a maioria dos machos com 20 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 29 acrocêntricos. As setas indicam heteromorfismos no par 4 (similar ao dos indivíduos M 333, M 386 e M 458) e no par 6 (similar ao dos exemplares M 333 e M 458); **b)** Par 4 homomórfico do indivíduo M 418 (similar aos encontrados em M 372 e M 425), par 5 heteromórfico do M 425, par 6 homomórfico do M 372 (similar ao do M 425 e M 418) e par 9 heteromórfico do M 372 (similar ao do M 418).

- **B')** 19 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 30 cromossomos acrocêntricos foram encontrados em seis machos (M 277, M 388, M 399, M 417, M 457 e M 466). Foram observados heteromorfismos no par 4 dos indivíduos M 388 e M 417, no par 5 de todos os indivíduos, no par 8 dos indivíduos M 417 e M 457 e no par 14 do indivíduo M 417 (figura 14);

Figura 14: **a)** Cariótipo em coloração convencional do macho M 399, com $2n=49$, similar aos encontrados para a maioria dos machos com 19 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 30 acrocêntricos. A seta indica o heteromorfismo no par 5, encontrado nos cariótipos de todos indivíduos deste grupo (M 277, M 388, M 399, M 417, M 457 e M 466); **b)** Da esquerda para a direita: par 4 do indivíduo M 417, que apresentou um heteromorfismo divergente do encontrado para o exemplar M 388, par 8 heteromórfico do M 417 (similar ao do M 457) e par 14 heteromórfico do M 417.

- **C')** 18 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 31 cromossomos acrocêntricos foram encontrados em quatro machos (M 364, M 365, M 396 e M 484). Foram observados heteromorfismos no par 4 do indivíduo M 484 e no par 5 de todos os indivíduos (figura 15);

Figura 15: a) Cariótipo em coloração convencional do macho M 484, com $2n=49$, similar aos encontrados para os machos com 18 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 31 acrocêntricos. As setas indicam os heteromorfismos no par 4 (encontrado apenas neste exemplar) e no par 5; **b)** Par 4 homomórfico do indivíduo M 396 (semelhante aos verificados nos exemplares M 364 e M 365) e par 5 do M 396 que apresentou um heteromorfismo similar ao dos indivíduos M 364 e M 365.

- **D')** 21 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 28 cromossomos acrocêntricos foram encontrados em dois machos (M 275 e M 453). Foram observados heteromorfismos no par 4 do indivíduo M 453, no par 5 dos dois exemplares e no par 6 do M 275 (figura 16);

Figura 16: a) Cariótipo em coloração convencional do macho M 275, com $2n=49$, similar ao encontrado para o exemplar M 453, com 21 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 28 acrocêntricos. As setas indicam os heteromorfismos no par 5 (similar ao encontrado no M 453) e no par 6; **b)** Pares 4 (heteromórfico) e 6 (homomórfico) do indivíduo M 453.

- **E')** 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 27 cromossomos acrocêntricos foram encontrados em um macho (M 335). Foi observado heteromorfismo no par 11 (figura 17);

Figura 17: a) Cariótipo em coloração convencional do macho M 335, que apresentou $2n=49$, com 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 27 acrocêntricos. Nesta metáfase observamos a ausência de um dos homólogos do par 6, porém em todas as outras, como pode ser observado em **b)**, este par está perfeitamente presente.

- **F')** 17 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 32 cromossomos acrocêntricos foram verificados em um macho, M 300. Foram verificados heteromorfismos nos pares 4 e 14 (figura 18);

Figura 18: Cariótipo em coloração convencional do macho M 300, que apresentou $2n=49$, com 17 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 32 acrocêntricos. As setas indicam os pares 4 e 14 heteromórficos.

- **G')** 24 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 21 cromossomos acrocêntricos foram verificados em um macho, com $2n=45$ (M 342). Foi observado heteromorfismo no par 12 (figura 19).

Figura 19: Cariótipo em coloração convencional do macho M 342, que apresentou $2n=45$, com 24 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 21 acrocêntricos. A seta indica o par 12 heteromórfico.

O Quadro IV apresenta um resumo da variabilidade cariotípica encontrada para os machos de *Alouatta clamitans* da região sudeste do Brasil:

Quadro IV - Resultados em coloração convencional dos machos analisados com o número do registro em nosso laboratório, o número diploide (2n), a quantidade de cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e acrocêntricos (fórmula cromossômica) e a presença/ausência de pares heteromórficos:

Registro	2n	Meta-Submeta/Acro	Pares heteromórficos							
			4	5	6	8	9	11	12	14
M 333	49	20/29	+		+					
M 372	49	20/29					+			
M 385	49	20/29	+		+					
M 386	49	20/29	+							
M 418	49	20/29					+			
M 425	49	20/29		+						
M 458	49	20/29	+		+					
M 277	49	19/30		+						
M 388	49	19/30	+	+						
M 399	49	19/30		+						
M 417	49	19/30	+	+		+				+
M 457	49	19/30		+		+				
M 466	49	19/30		+						
M 364	49	18/31		+						
M 365	49	18/31		+						
M 396	49	18/31		+						
M 484	49	18/31	+	+						
M 275	49	21/28		+	+					
M 453	49	21/28	+	+						
M 335	49	22/27						+		
M 300	49	17/32	+							+
M 342	45	24/21							+	

+ = presença

Dentre os indivíduos de *Alouatta clamitans* analisados e procedentes de vida livre, a maioria (38 de 44) é proveniente da Grande São Paulo, como pode ser verificado no Quadro II (páginas 54 e 55). A figura 20 apresenta a distribuição geográfica destes indivíduos, de acordo com o número de exemplares portadores de cada fórmula cromossômica:

Figura 20: Distribuição geográfica dos indivíduos analisados procedentes da Grande São Paulo, de acordo com o número de indivíduos portadores de cada fórmula cromossômica (número de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos/ acrocêntricos).

4.1.1 Estudo citogenético de famílias de bugios

Figura 21: Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 272, com 2n=50 e com 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 28 acrocêntricos. A seta indica o par 4 heteromórfico.

Figura 22: Cariótipo em coloração convencional do macho M 385 (filhote da fêmea M 272), com 2n=49 e com 20 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 29 acrocêntricos. As setas indicam os pares 4 e 6 heteromórficos.

Figura 23: Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 339 (filhote da fêmea M 272), com $2n=50$ e com 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 28 acrocêntricos. Um dos homólogos do par 11 apresenta quebra em um dos braços cromossômicos, que foi encontrada apenas nesta metáfase e provavelmente ocorreu *in vitro*.

Figura 24: Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 370 (filhote do macho M 275), com $2n=50$ e com 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 28 acrocêntricos.

Figura 25: Cariótipo em coloração convencional do macho M 275, com $2n=49$ e com 21 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 28 acrocêntricos. As setas indicam heteromorfismos nos pares 5 e 6.

Figura 26: Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 389, com $2n=50$ e com 23 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 27 acrocêntricos. A seta indica o heteromorfismo no par 11, com o homólogo submetacêntrico recebido do pai (ver figura 27).

Figura 27: Cariótipo em coloração convencional do macho M 335 (pai da fêmea M 389), com $2n=49$ e com 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 27 acrocêntricos. A seta indica o heteromorfismo no par 11. Apesar de nesta metáfase observarmos a ausência de um dos homólogos do par 6, em todas as outras este cromossomo está presente (ver figura 17b).

Figura 28: Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 334 (mãe da fêmea M 389), com $2n=50$ e com 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 28 acrocêntricos. As setas indicam heteromorfismos nos pares 4, 6 e X.

Figura 29: Cariótipo em coloração convencional do macho M 388 (filhote do macho M 365 e da fêmea M 387), com $2n=49$ e com 19 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 30 acrocêntricos. As setas indicam heteromorfismos nos pares 4 e 5.

Figura 30: Cariótipo em coloração convencional do macho M 365 (pai do macho M 388), com $2n=49$ e com 18 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 31 acrocêntricos. A seta indica o heteromorfismo no par 5.

Figura 31: Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 387 (mãe do macho M 388), com $2n=50$ e com 20 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 30 acrocêntricos.

4.2 Análise citogenética em bandamento CBG

Um exemplar fêmea (M 309), procedente da Serra da Cantareira/SP foi analisado por bandamento CBG (figura 32):

Figura 32: Cariótipo em bandamento CBG da fêmea M 309, com $2n=50$. As setas indicam os blocos heterocromáticos extracentroméricos.

4.3 Estudo citogenético em bandamento GTG

O bandamento GTG foi realizado em metáfases de 11 exemplares de *Alouatta clamitans*: quatro fêmeas com $2n=50$ (M 265, M309, M 482 e M 483) e uma com $2n=48$ (M 368) e cinco machos com $2n=49$ (M 275, M 277, M 300, M 385 e M 484) e um com $2n=45$ (M 342). Através desta técnica é possível distinguir com maior clareza os pares cromossômicos; sendo assim, os cariótipos foram reorganizados considerando-se o sistema sexual múltiplo da espécie, do tipo $X_1X_1X_2X_2X_3X_3/X_1X_2X_3Y_1Y_2$ (figuras 33 a 42). O cariótipo em bandamento GTG do indivíduo M 368 será apresentado adiante, em um tópico separado.

Figura 33: Cariótipo em bandamento GTG da fêmea M 265, com $2n=50$. As setas indicam os pares heteromórficos 4 e 13.

Figura 34: Cariótipo em bandamento GTG da fêmea M 309, com $2n=50$. A seta indica o par heteromórfico 4.

Figura 35: Cariótipo em bandamento GTG da fêmea M 482, com $2n=50$. A seta indica o par heteromórfico 4.

Figura 36: Cariótipo em bandamento GTG da fêmea M 483, com $2n=50$. As setas indicam os pares heteromórficos 13 e 20.

Figura 37: Cariótipo em bandamento GTG do macho M 275, com $2n=49$. A seta indica o par 13 heteromórfico.

Figura 38: Cariótipo em bandamento GTG do macho M 277, com $2n=49$. A seta indica o heteromorfismo no par 6.

Figura 39: Cariótipo em bandamento GTG do macho M 300, com $2n=49$. As setas indicam os pares 4 e 12 heteromórficos.

Figura 40: Cariótipo em bandamento GTG do macho M 385, com $2n=49$. A seta indica o heteromorfismo no par 4.

Figura 41: Cariótipo em bandamento GTG do macho M 484, com $2n=49$. A seta indica o par 4 heteromórfico.

Figura 42: Cariótipo em bandamento GTG do macho M 342, com $2n=45$.

4.4 Análise citogenética molecular (FISH)

A técnica de FISH (Hibridação *In Situ* Fluorescente) foi realizada em cinco espécimes de *Alouatta clamitans*, três machos (M 275, M 277 e M 300) e duas fêmeas (M 368 e M 483) e em um espécime de *Alouatta* sp. (M 455). Os resultados verificados para as fêmeas M 368 e M 455 serão apresentados em tópicos separados. A FISH dos machos M 275, M 277 e M 300 e da fêmea M 483 foi realizada com o emprego das lâminas Chromoprobe Multiprobe OctoChrome (Cytocell) e os resultados das hibridações estão apresentados nas figuras 43 a 83. O programa utilizado para a análise das hibridações, ISIS V 5.4.9 (MetaSystems), não possui a opção de visualização numa mesma imagem das regiões detectados em aqua e os cromossomos corados com DAPI, pois ambos são tons de azul. Sendo assim, optamos pela apresentação das imagens com todas as marcações (inclusive em aqua) e os cromossomos, originalmente corados em DAPI, estão apresentados em tons de cinza (opção *Merged colors* do programa).

▪ **M 275:**

Figura 43: a) Metáfase do espécime M 275 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 3 (vermelho), 15 (aqua) e 17 (verde).

Figura 44: **a)** Metáfase do espécime M 275 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 8 (vermelho), 12 (aqua) e 21 (verde).

Figura 45: **a)** Metáfase do espécime M 275 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 16 (aqua) e 19 (verde). A sonda HSA 1 (vermelho) não produziu marcação e a hibridação foi repetida (ver figura 52).

Figura 46: a) Metáfase do espécime M 275 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 2 (vermelho), 13 (aqua) e 20 (verde).

Figura 47: a) Metáfase do espécime M 275 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 9 (vermelho), 11 (aqua) e 22 (verde).

Figura 48: a) Metáfase do espécime M 275 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 4 (vermelho), 14 (aqua) e 18 (verde).

Figura 49: a) Metáfase do espécime M 275 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 5 (vermelho), 10 (aqua) e 7 (verde).

Figura 50: a) Metáfase do espécime M 275 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA X (vermelho) e 6 (aqua). A sonda HSA Y (verde) não apresentou marcação.

A sonda de pintura cromossômica HSA 1 da lâmina *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome* (Cytocell) não produziu sinal satisfatório. Sendo assim, foi realizada uma nova hibridação, com a sonda derivada pela citometria de fluxo. Porém, antes de serem utilizadas, as sondas de todos os cromossomos humanos foram reamplificadas por PCR e testadas em metáfases humanas. Os resultados obtidos com a realização destes testes estão apresentados na figura 51, com exceção das sondas dos cromossomos humanos 5 e 21, que não funcionaram:

Figura 51: Cromossomos humanos submetidos à técnica de FISH com as sondas de pintura derivadas pela citometria de fluxo. As sondas dos cromossomos 1, 3, 4, 8, 9, 11, 13, 15, 17, 20 e X foram marcadas com Biotina e detectadas com Avidina-FITC (verde) e as sondas dos cromossomos 2, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 22 e Y foram marcadas com Digoxigenina e detectadas com Anti-digoxigenina-rodamina (vermelho).

Após testada, a sonda HSA 1 foi então hibridada em metáfases do indivíduo M 275, conforme ilustrado na figura 52:

Figura 52: **a)** Metáfase do espécime M 275 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com a sonda HSA 1 (vermelho) derivada da citometria de fluxo.

A figura 53 representa o cariótipo em bandamento G do indivíduo M 275 (*Alouatta clamitans*) com as indicações das regiões homeólogas aos cromossomos humanos, identificadas pela técnica de FISH:

Figura 53: Cariótipo com banda G do indivíduo M 275 (*Alouatta clamitans*). As barras indicam o tamanho e a localização das homeologias encontradas após a FISH de cada sonda de pintura dos cromossomos humanos. **A sonda do cromossomo Y humano não apresentou sinal de hibridação em metáfases deste indivíduo, porém, segundo De Oliveira et al., (2002) esta seria a provável localização da região responsável pela diferenciação sexual masculina desta espécie.

Foi também realizada a técnica de FISH com o emprego da lâmina *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome* (Cytocell) para o macho M 277. Os resultados das hibridações estão apresentados nas figuras 54 a 62.

▪ M 277:

Figura 54: a) Metáfase do espécime M 277 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 3 (vermelho), 15 (aqua) e 17 (verde).

Figura 55: a) Metáfase do espécime M 277 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 8 (vermelho), 12 (aqua) e 21 (verde).

Figura 56: a) Metáfase do espécime M 277 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 16 (aqua) e 19 (verde). O sonda HSA 1 (vermelho) não produziu sinal.

Figura 57: a) Metáfase do espécime M 277 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 2 (vermelho), 13 (aqua) e 20 (verde).

Figura 58: **a)** Metáfase do espécime M 277 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 9 (vermelho), 11 (aqua) e 22 (verde).

Figura 59: **a)** Metáfase do espécime M 277 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 14 (aqua) e 18 (verde). A sonda HSA 4 (vermelho) não produziu sinal de hibridação.

Figura 60: **a)** Metáfase incompleta do espécime M 277 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 5 (vermelho), 10 (aqua) e 7 (verde). **c)** Imagem parcial de outra metáfase em escala de cinza. **d)** Mesma metáfase hibridada com a sonda HSA 10 (aqua), comprovando a marcação desta sonda em três pares de cromossomos.

Figura 61: a) Metáfase do espécime M 277 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA X (vermelho) e 6 (aqua). A sonda HSA Y (verde) não apresentou marcação.

As sondas de pintura cromossômica HSA 1 e 4 da lâmina *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome* (Cytocell) não produziram sinal satisfatório. Sendo assim, foram realizadas novas hibridações com as sondas derivadas pela citometria de fluxo. Os resultados obtidos com a hibridação da sonda HSA 1 estão apresentados na figura 61. Mesmo após algumas tentativas, a sonda de pintura cromossômica HSA 4 não produziu sinal.

Figura 62: **a)** Metáfase incompleta do espécime M 277 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com a sonda HSA 1 (vermelho) derivada da citometria de fluxo. Um dos homólogos do par 2 (submetacêntrico de tamanho grande) está ausente nesta metáfase.

A figura 63 representa o cariótipo em bandamento G do indivíduo M 277 (*Alouatta clamitans*) com as indicações das regiões homeólogas aos cromossomos humanos, identificadas através da técnica de FISH:

Figura 63: Cariótipo com banda G do indivíduo M 277. As barras indicam o tamanho e a localização das homeologias encontradas após a FISH de cada sonda de pintura dos cromossomos humanos. *Apesar da sonda HSA 4 não ter funcionado e não termos visualizado a marcação da sonda HSA 3 no par 19, foi possível indicar a localização das regiões homeólogas através da comparação com os resultados obtidos neste estudo para os demais indivíduos da mesma espécie. **A sonda do cromossomo Y humano não apresentou sinal de hibridação em metáfases deste indivíduo, porém, segundo De Oliveira et al., (2002) esta seria a provável localização da região responsável pela diferenciação sexual masculina desta espécie.

A técnica de FISH foi também realizada com o emprego da lâmina *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome* (Cytocell) para o macho M 300. Os resultados das hibridações estão apresentados nas figuras 64 a 72:

- M 300:

Figura 64: **a)** Metáfase do espécime M 300 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 3 (vermelho), 15 (aqua) e 17 (verde).

Figura 65: **a)** Metáfase do espécime M 300 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 8 (vermelho), 12 (aqua) e 21 (verde).

Figura 66: **a)** Metáfase do espécime M 300 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 16 (aqua) e 19 (verde).

Figura 67: **a)** Metáfase do espécime M 300 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 1 (vermelho).

Figura 68: a) Metáfase do espécime M 300 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 2 (vermelho), 13 (aqua) e 20 (verde).

Figura 69: a) Metáfase do espécime M 300 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 9 (vermelho), 11 (aqua) e 22 (verde).

Figura 70: a) Metáfase do espécime M 300 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 4 (vermelho), 14 (aqua) e 18 (verde).

Figura 71: a) Metáfase do espécime M 300 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 5 (vermelho), 10 (aqua) e 7 (verde).

Figura 72: **a)** Metáfase do espécime M 300 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA X (vermelho) e 6 (aqua). A sonda HSA Y (verde) não apresentou marcação.

A figura 73 representa o cariótipo em bandamento G do indivíduo M 300 (*Alouatta clamitans*) com as indicações das regiões homeólogas aos cromossomos humanos, identificadas através da técnica de FISH:

Figura 73: Cariótipo com banda G do indivíduo M 300 (*Alouatta clamitans*). As barras indicam o tamanho e a localização das homeologias encontradas após a FISH de cada sonda de pintura dos cromossomos humanos. *Apesar de não termos visualizado a marcação da sonda HSA 3 no par 19, foi possível indicar a localização da região homeóloga através da comparação com os resultados obtidos neste estudo para os demais indivíduos da mesma espécie. **A sonda do cromossomo Y humano não apresentou sinal de hibridação em metáfases deste indivíduo, porém, segundo De Oliveira et al., (2002) esta seria a provável localização da região responsável pela diferenciação sexual masculina desta espécie.

A técnica de FISH foi também empregada em metáfases de uma fêmea (M 483), com a utilização da lâmina *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome* (Cytocell). Os resultados das hibridações estão apresentados nas figuras 74 a 82:

- M 483:

Figura 74: **a)** Metáfase do espécime M 483 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 3 (vermelho), 15 (aqua) e 17 (verde).

Figura 75: **a)** Metáfase do espécime M 483 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 8 (vermelho), 12 (aqua) e 21 (verde).

Figura 76: a) Metáfase do espécime M 483 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 16 (aqua) e 19 (verde). A sonda HSA 1 (vermelho) não funcionou.

Figura 77: a) Metáfase do espécime M 483 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 2 (vermelho), 13 (aqua) e 20 (verde).

Figura 78: **a)** Metáfase do espécime M 483 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 9 (vermelho), 11 (aqua) e 22 (verde).

Figura 79: **a)** Metáfase do espécime M 483 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 4 (vermelho), 14 (aqua) e 18 (verde).

Figura 80: **a)** Metáfase do espécime M 483 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 5 (vermelho), 10 (aqua) e 7 (verde).

Figura 81: **a)** Metáfase do espécime M 483 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA X (vermelho) e 6 (aqua).

Assim como nos casos do M 275 e do M 277, a sonda de pintura cromossômica HSA 1 da lâmina *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome* (Cytocell) não produziu sinal satisfatório. Sendo assim, foi realizada uma nova hibridação com a sonda derivada pela citometria de fluxo. O resultado obtido com a hibridação da sonda HSA 1 está apresentado na figura 82:

Figura 82: **a)** Metáfase do espécime M 483 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com a sonda HSA 1 (vermelho) derivada da citometria de fluxo.

A figura 83 representa o cariótipo em bandamento G do indivíduo M 483 (*Alouatta clamitans*) com as indicações das regiões homeólogas aos cromossomos humanos, identificadas através da técnica de FISH:

Figura 83: Cariótipo com banda G do indivíduo M 483 (*Alouatta clamitans*). As barras indicam o tamanho e a localização das homeologias encontradas após a FISH de cada sonda de pintura dos cromossomos humanos. *Apesar de não termos visualizado a marcação da sonda HSA 3 no par 19, foi possível indicar a localização da região homeóloga através da comparação com os resultados obtidos neste estudo para os demais indivíduos da mesma espécie.

5. DISCUSSÃO

5.1 Variabilidade cariotípica em *Alouatta clamitans*

Segundo Kasahara (2009), através da análise de metáfases em coloração convencional, além da verificação do número diploide do indivíduo, também é possível constatar, quando presentes, algumas particularidades como constrictões secundárias em um ou mais cromossomos, satélites, quebras eventuais, falhas cromatídicas, cromossomos marcadores do tipo puntiforme, ocorrência de cromossomos B, alterações numéricas e também certos tipos de rearranjos estruturais. Embora o reconhecimento dos homólogos nem sempre seja seguro quando se emprega a coloração convencional, os cromossomos são, em geral, dispostos nos kariogramas aos pares, ainda que presumidos.

O estudo em coloração convencional sobre a variabilidade cariotípica em *Alouatta clamitans* contou com 50 espécimes, 22 machos (M 275, M 277, M 300, M 333, M 335, M 342, M 364, M 365, M 372, M 385, M 386, M 388, M 396, M 399, M 417, M 418, M 425, M 453, M 457, M 458, M 466 e M 484) e 28 fêmeas (M 105, M 131, M 265, M 272, M 278, M 280, M 301, M 307, M 309, M 334, M 339, M 340, M 350, M 358, M 361, M 368, M 370, M 387, M 389, M 419, M 421, M 454, M 471, M 479, M 480, M 482, M 483 e M 486).

A análise cromossômica das fêmeas revelou três diferentes números diploides ($2n=46$, 48 e 50) e cinco distintas fórmulas cromossômicas:

- **A)** 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos (incluindo o par de cromossomos X) e 28 cromossomos acrocêntricos foram encontrados para a maioria das fêmeas (13 de 28): M 272, M 278, M 307, M 334, M 339, M 340, M 370, M 419, M 421, M 454, M 471, M 482 e M 486. Foram observados heteromorfismos no par 4 dos indivíduos M 272 e M 334, com os braços curtos de um dos cromossomos levemente maiores do que os do outro; no par 5 do indivíduo M 482, no par 6 do indivíduo M 334 e no par X dos indivíduos M 334 e M 340, apresentando diferentes proporções entre os braços curtos e longos destes pares, provavelmente decorrente de inversões pericêntricas (figura 7);
- **B)** 20 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos (incluindo o par X) e 30 acrocêntricos compõem a segunda fórmula cromossômica mais comumente verificada para as fêmeas (11 de 28): M 105, M 131, M 265,

M 280, M 301, M 309, M 358, M 361, M 387, M 479 e M 480. Foram encontrados heteromorfismos no par 4 dos indivíduos M 105, M 131, M 265, M 280, M 309, M 358, M 361 e M 479, todos formados por um cromossomo submetacêntrico e outro acrocêntrico; no par 8 do indivíduo M 301, que apresentou diferentes proporções entre os braços curtos e longos deste par, provavelmente decorrente de uma inversão pericêntrica; e no par 14 dos indivíduos M 105, M 131, M 265, M 280, M 358, M 361 e M 479, todos formados por um cromossomo submetacêntrico e outro acrocêntrico; os exemplares M 387 e M 480 não apresentaram pares heteromórficos (figura 8);

- **C)** 23 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos (incluindo o par de cromossomos X) e 27 acrocêntricos foram encontrados em duas fêmeas (M 389 e M 483), porém com cariótipos bastante distintos. O exemplar M 389 apresentou um dos cromossomos do par 11 com morfologia submetacêntrica e outro acrocêntrico (figura 9), o que alterou sua fórmula cromossômica; este cromossomo foi herdado do pai deste exemplar, como será discutido a frente, em um tópico separado. O espécime M 483 apresentou um dos cromossomos do par 5 com os braços curtos menores do que os de seu homólogo e um aumento dos braços curtos de um dos cromossomos do par 21 em relação ao seu homólogo (figura 10), o que nos levou a acreditar que este exemplar possuía uma translocação 5p/21p, porém através da aplicação da técnica de FISH com as sondas de todos os cromossomos humanos nas metáfases deste exemplar, esta hipótese foi descartada, conforme será apresentado a seguir, no tópico 5.2 (Análise citogenética molecular em *Alouatta clamitans*);
- **D)** 23 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos (incluindo os cromossomos X) e 25 acrocêntricos foram verificados para a fêmea com $2n=48$ (M 368); foram observados heteromorfismos nos pares 3, 10 e 13 (figura 11), aparentemente devido a inversões pericêntricas; porém com o emprego das técnicas de bandamento GTG e de FISH com as sondas de todos os cromossomos humanos nas metáfases deste exemplar, os pares heteromórficos foram desconsiderados e

reorganizados, conforme será descrito a seguir, no capítulo 6 (Estudo citogenético de uma fêmea de *Alouatta clamitans* com $2n=48$).

- **E)** 25 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos (incluindo o par de cromossomos X) e 21 acrocêntricos foram encontrados para a fêmea com $2n=46$ (M 350), procedente de Pomerode/SC, que apresentou heteromorfismo no par 12, provavelmente devido a uma inversão pericêntrica (figura 12).

Entre os grupos de fêmeas analisadas com $2n=50$ e com as fórmulas cromossômicas mais comuns (grupos A e B) as principais diferenças observadas foram com relação aos pares 4 e 14 heteromórficos presentes na maioria dos exemplares do grupo B, com um destes cromossomos submetacêntricos e o outro acrocêntrico, gerando a alteração da fórmula cromossômica (ver Quadro III – página 61).

Apenas dois dos exemplares do grupo A apresentaram heteromorfismo no par 4, porém sem alterar a morfologia submetacêntrica destes cromossomos e portanto, não alterando a fórmula cromossômica, e nenhum dos representantes do grupo A apresentou heteromorfismo no par 14. Além dos pares 4 e 14 do grupo B, apenas um outro par heteromórfico foi observado, o par 8 do exemplar M 301, provavelmente devido a inversões pericêntricas que levaram a uma diferença de proporção entre o braço curto e longo deste cromossomo, sem alterar a morfologia submetacêntrica. Além destes, entre os representantes do grupo A foram observados heteromorfismos no par 5 do M 482, no par 6 do M 334 e no par X do M 334 e do M 340, todos também provavelmente devido a inversões pericêntricas que causaram uma diferença de proporção entre os braços curtos e longos destes cromossomos, porém sem alterar a morfologia submetacêntrica.

Entre todas as fêmeas analisadas, o par cromossômico que mais apresentou heteromorfismo foi o par 4 (10 de 28), seguido do par 14 (7 de 28). Os pares 1, 2, 7, 9, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23 e 24 foram homomórficos em todos os exemplares analisados; foi observado heteromorfismo no par 5 em dois exemplares (M 482 e M 483) e nos pares 3, 6, 8, 10, 11, 12, 13 e 21 em apenas um exemplar cada.

Comparando-se as fêmeas com $2n=50$ dos grupos A e C com as do grupo B, foi verificada a presença de um par de cromossomos submetacêntricos a mais nas fêmeas dos dois primeiros grupos do que no segundo grupo, totalizando dez e nove pares, respectivamente, excluindo-se o par cromossômico X (ver figuras 7, 8, 9 e 10).

A análise cariotípica dos machos de *Alouatta clamitans* revelou dois números diploides distintos ($2n=45$ e 49) e sete fórmulas cromossômicas diferentes:

- **A')** 20 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 29 cromossomos acrocêntricos foram encontrados em sete dos 22 machos analisados (M 333, M 372, M 385, M 386, M 418, M 425 e M 458). Foram observados heteromorfismos no par 4 dos indivíduos M 333, M 385, M 386 e M 458, com um dos cromossomos submetacêntrico e o outro acrocêntrico, no par 5 do indivíduo M 425, também com um dos cromossomos submetacêntrico e o outro acrocêntrico, no par 6 dos indivíduos M 333, M 385 e M 458, com diferenças na proporção dos braços curtos e longos, provavelmente devido a uma inversão pericêntrica, que não alterou a morfologia submetacêntrica destes cromossomos, e no par 9 dos indivíduos M 372 e M 418, com um dos cromossomos submetacêntrico e o outro acrocêntrico, provavelmente devido a uma inversão pericêntrica, que neste caso alterou a morfologia destes cromossomos (figura 13);
- **B')** 19 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 30 cromossomos acrocêntricos foram encontrados em seis machos (M 277, M 388, M 399, M 417, M 457 e M 466). Foram observados heteromorfismos no par 4 dos indivíduos M 388 e M 417, no par 5 de todos os indivíduos, no par 8 dos indivíduos M 417 e M 457, que mostraram diferenças na proporção dos braços curtos e longos, e no par 14 do indivíduo M 417, com um dos cromossomos submetacêntrico e o outro acrocêntrico (figura 14);

- **C')** 18 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 31 cromossomos acrocêntricos foram encontrados em quatro machos (M 364, M 365, M 396 e M 484). Foram observados heteromorfismos no par 4 do indivíduo M 484, com um dos cromossomos submetacêntrico e outro acrocêntrico, e no par 5 de todos os indivíduos, porém no M 484 este par era submetacêntrico, com diferença no tamanho e na proporção dos braços curtos e longos, enquanto nos demais indivíduos, um dos cromossomos deste par era submetacêntrico e o outro acrocêntrico (figura 15);
- **D')** 21 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 28 cromossomos acrocêntricos foram encontrados em dois machos (M 275 e M 453). Foram observados heteromorfismos no par 4 do indivíduo M 453, com um dos cromossomos com o braço curto menor do que o outro, no par 5 dos dois exemplares e no par 6 do M 275, com diferenças na proporção dos braços curtos e longos (figura 16);
- **E')** 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 27 cromossomos acrocêntricos foram encontrados em um macho (M 335). Foi observado heteromorfismo no par 11, com um dos cromossomos submetacêntrico e o outro acrocêntrico, provavelmente devido a uma inversão pericêntrica (figura 17);
- **F')** 17 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 32 cromossomos acrocêntricos foram verificados em um macho, M 300. Foram verificados heteromorfismos nos pares 4 e 14, com diferenças na proporção dos braços curtos e longos (figura 18);
- **G')** 24 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 21 cromossomos acrocêntricos foram verificados em um macho, com $2n=45$ procedente da região sul do Brasil (M 342). Foi observado heteromorfismo no par 12, provavelmente causado por uma inversão pericêntrica (figura 19).

A redução de um cromossomo no número diploide dos machos em relação às fêmeas é devida à ausência aparente do cromossomo Y, decorrente de uma translocação Y-autossomo.

Entre os grupos de machos estudados com $2n=49$ com as fórmulas cromossômicas mais comuns (grupos A' e B') as principais diferenças observadas foram com relação aos pares heteromórficos: todos os representantes do grupo B' apresentaram heteromorfismo no par 5, enquanto apenas um dos exemplares do grupo A' (M 425) mostrou heteromorfismo neste par. Dentre os indivíduos do grupo A', o heteromorfismo mais comum (4 em 7) foi o do par 4. Além disso, todos os cariótipos do grupo A' foram organizados com 10 pares de cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos, enquanto os cariótipos do grupo B' apresentaram 9 pares destes cromossomos, com exceção do cromossomo X (figuras 13 e 14).

Conforme ilustrado no Quadro IV (página 69), entre todos os machos analisados em coloração convencional, o par cromossômico que mais apresentou heteromorfismo foi o par 5 (13 de 22), seguido do par 4, com heteromorfismo presente em 9 indivíduos, o par 6 (4 de 22) e dos pares 8, 9 e 14, com dois exemplares portadores de heteromorfismo nestes pares (M 417 e M 457; M 372 e M 418, e M 417 e M 300, respectivamente). Os pares 1, 2, 3, 7, 10, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24 foram homomórficos em todos os exemplares machos analisados; apenas um exemplar apresentou heteromorfismo nos pares: 11 (M 335) e 12 (M 342).

Foram observados heteromorfismos no par cromossômico 4 de dez espécimes de fêmeas (M 272, M 334, M 105, M 131, M 265, M 280, M 309, M 358, M 361 e M 479) e em nove machos (M 300, M 333, M 385, M 386, M 458, M 388, M417, M 484 e M 453), totalizando 38% dos indivíduos desta espécie analisados. Os pares 1, 2, 7, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23 e 24 se mostraram homomórficos para todos os indivíduos analisados.

As fêmeas analisadas apresentaram um par de cromossomos X submetacêntricos de tamanho médio, com exceção dos indivíduos M 334 e M 340 que mostraram heteromorfismo neste par, com um dos cromossomos submetacêntrico e outro metacêntrico. Entre os machos estudados, todos apresentaram um cromossomo X submetacêntrico de tamanho médio.

Considerando que com o emprego da coloração convencional não é possível parear os cromossomos homólogos com total certeza, por convenção, os cromossomos preparados a partir desta técnica foram organizados nos

cariótipos em ordem decrescente de tamanho dos metacêntricos e submetacêntricos, seguido pelo mesmo padrão de organização dos cromossomos acrocêntricos. Não foram considerados os cromossomos do sistema sexual múltiplo devido à impossibilidade de determiná-los neste tipo de coloração, principalmente diante de tamanha variabilidade encontrada nesta espécie.

A figura 20 apresenta a distribuição geográfica dos indivíduos analisados procedentes da Grande São Paulo, de acordo com o número de indivíduos portadores de cada fórmula cromossômica (número de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos/acrocêntricos). A partir da análise desta figura é possível notar que os indivíduos portadores das mesmas fórmulas cromossômicas são procedentes de diferentes regiões da Grande São Paulo, ou seja, apesar dos pequenos fragmentos florestais existentes nesta região, aparentemente ainda existe certa variabilidade genética e, portanto, a fragmentação ainda não levou ao isolamento genético destas populações. Estudos envolvendo um maior número de indivíduos e também a aplicação de outras técnicas de citogenética e biologia molecular serão importantes para confirmar ou refutar esta hipótese.

5.1.1 Estudo de famílias de *Alouatta clamitans*

Quatro famílias de *Alouatta clamitans* foram estudadas, sendo que todos os filhotes nasceram no DEPAVE-3 (figuras 21 a 31):

- A fêmea M 272, procedente da Serra da Cantareira/SP e seus dois filhotes, um macho (M 385) e uma fêmea (M 339): o exemplar M 272 apresentou 50 cromossomos, divididos em 22 metacêntricos e submetacêntricos e 28 acrocêntricos e um par heteromórfico, o par 4, com diferentes tamanhos do braço curto destes cromossomos, porém ambos mantendo a morfologia submetacêntrica. A fêmea M 339 apresentou a mesma fórmula cromossômica da mãe, e o par 4 homomórfico, formado por dois cromossomos submetacêntricos. O macho mostrou 20 cromossomos meta ou submetacêntricos e 30 cromossomos acrocêntricos, e heteromorfismo no par 4 (com um dos cromossomos submetacêntrico, doado pela mãe, e outro acrocêntrico, doado pelo pai) e também no par 6, com diferentes proporções entre os braços curtos e longos. As fêmeas apresentaram dois cromossomos X submetacêntricos e o macho um único cromossomo de mesma morfologia.
- Um filhote fêmea (M 370) e seu pai (M 275), procedente de Mairiporã/SP: a fêmea apresentou 50 cromossomos, divididos em 22 metacêntricos e submetacêntricos e 28 acrocêntricos e nenhum par heteromórfico e o pai (M 275) apresentou dois pares heteromórficos, os pares 5 e 6. Os cromossomos X são submetacêntricos de tamanho médio.
- Um filhote fêmea (M 389) e seus pais, o macho M 335 (procedente de Embu-Guaçu/SP) e a fêmea M 334 (procedente de Parelheiros, São Paulo/SP): a fêmea M 389 apresentou 23 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 27 acrocêntricos e um heteromorfismo no par 11, com o homólogo submetacêntrico recebido do pai, que mostrou $2n=49$, com 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 27

acrocêntricos, e apresentou o mesmo tipo de heteromorfismo no par 11. A fêmea M 334 apresentou $2n=50$, divididos em 22 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 28 acrocêntricos e heteromorfismos nos pares 4, 6 e X, que não foram observados na prole.

- Um filhote macho (M 388) e seus pais, o macho M 365 e a fêmea M 387, ambos procedentes do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. O filhote M 388 mostrou $2n=49$, separados em 19 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 30 acrocêntricos, e heteromorfismos nos pares 4 e 5. O macho M 365 apresentou $2n=49$, com 18 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 31 acrocêntricos e heteromorfismo no par 5, formado por um cromossomo submetacêntrico e outro acrocêntrico (nota-se que o cromossomo doado pelo pai é o submetacêntrico). A fêmea M 387 apresentou $2n=50$, divididos em 20 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 30 acrocêntricos, e nenhum par heteromórfico. A fêmea apresentou dois cromossomos X e os machos um único cromossomo, todos submetacêntricos de tamanho médio.

O bandamento GTG foi realizado em metáfases de 11 exemplares de *Alouatta clamitans*: em quatro fêmeas com $2n=50$ (M 265, M 309, M 482 e M 483), em cinco machos com $2n=49$ (M 275, M 277, M 300, M 385 e M 484) e em um macho com $2n=45$ (M 342). Através desta técnica é possível distinguir com maior clareza os pares cromossômicos; sendo assim, os cariótipos foram reorganizados considerando-se o sistema sexual múltiplo da espécie, do tipo $X_1X_1X_2X_2X_3X_3/X_1X_2X_3Y_1Y_2$ (figuras 33 a 42).

Foram observados heteromorfismos no par 4 do M 265, M 300, M 309, M 385, M 482 e M 484, no par 6 do M 277, no par 12 do M 300, no par 13 do M 275, M 265 e do M 483 e no par 20 do M 483, aparentemente devido a inversões pericêntricas, com exceção dos heteromorfismos dos pares 13 e 20 do exemplar M 483, já que com a utilização desta técnica não foi possível descartar a hipótese de translocação entre estes cromossomos.

Com exceção dos machos M 300 ($2n=49$) e M 342 ($2n=45$), todos os demais cariótipos apresentaram 8 pares de cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos não envolvidos no sistema sexual múltiplo. O M 300 mostrou 7 pares destes cromossomos, enquanto o M 342 mostrou 10 pares.

Os rearranjos que alteram a morfologia dos cromossomos e, conseqüentemente, as fórmulas cromossômicas sem alterar o número diploide, não devem ser determinantes para uma prole bem sucedida. Entretanto, múltiplas inversões envolvendo vários cromossomos podem ter um efeito cumulativo, com força potencial para se tornar um mecanismo de isolamento pós-zigótico efetivo. Entre os 50 indivíduos analisados, foram encontrados no máximo quatro pares heteromórficos por espécime.

A grande variabilidade cariotípica intraespecífica e intrapopulacional observada em nosso estudo, com diferentes números diploides e fórmulas cromossômicas, é decorrente de processos de inversões pericêntricas, fusões, fissões e outros rearranjos.

Um macho de *Alouatta clamitans* da Serra da Cantareira com $2n=50$ e um cromossomo Y acrocêntrico já foi descrito por Koiffmann (1972). Tanto na nossa amostra quanto em outros trabalhos, este complemento cromossômico não foi mais observado.

Com a análise dos cariótipos em conjunto à procedência geográfica dos exemplares analisados, a tendência à redução do número diploide orientada no sentido norte-sul proposta por De Oliveira (1996) foi corroborada.

Todos os resultados até agora obtidos em nosso laboratório (Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008 e presente estudo) mostram importantes diferenças cromossômicas entre as populações do sul e sudeste do Brasil e sugerem que estas populações possam estar reprodutivamente isoladas, evidenciando a necessidade de revisão taxonômica, pois estas diferenças podem indicar que *A. clamitans* é representante de duas subespécies ou mesmo duas espécies distintas.

5.2 Análise citogenética molecular em *Alouatta clamitans*

Após os resultados das análises de citogenética tradicional, resolvemos realizar a técnica de FISH com emprego das lâminas *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome* (Cytocell) para os exemplares M 275, M 277, M 300 e M 483, para melhor compreender a variabilidade cariotípica verificada. Algumas sondas não produziram sinal de hibridação satisfatório e foram novamente testadas, através da reamplificação, marcação e precipitação das sondas derivadas pela citometria de fluxo. O Quadro V apresenta um resumo dos resultados encontrados com a técnica de FISH para estes espécimes, com o número de pares hibridados e o número de sinais visualizados em cada metáfase.

Quadro V – Resultados obtidos com a técnica de FISH aplicada em metáfases dos indivíduos M 275, M 277, M 300 e M 483:

Sonda	Número de pares hibridados	Número de sinais visualizados
1 (FS)	4	8
2 (FS)	2	4
3 (©)	2	4
4 (FS)	2	4
5 (©)	1	2
6 (FS)	1	2
7 (©)	2	6
8 (FS)	2	4
9 (FS)	1	2
10 (FS)	3	6
11 (FS)	1	2
12 (FS)	1	2
13 (FS)	1	2
14 (FS)	1	2
15 (FS)	3	6
16 (FS)	3	6
17 (FS)	1	2
18 (FS)	1	2
19 (FS)	1	2
20 (FS)	1	2
21 (©)	1	2
22 (FS)	1	2
X (FS)	1 (♀)/1 cr (♂)	2 (♀)/1 (♂)

FS = sondas derivadas pela citometria de fluxo;

© = sondas comerciais (Cytocell);

cr = cromossomo

As regiões homeólogas aos cromossomos humanos encontradas estão listadas abaixo:

- Hibridação com as sondas de pintura dos cromossomos 2, 13 e 20 humanos: a região homeóloga ao HSA (*Homo sapiens*) 2 (marcação vermelha) se encontra em toda a extensão do braço curto do maior par cromossômico submetacêntrico, o par 1, dos quatro exemplares analisados e em toda a extensão do braço longo do par 12, acrocêntrico grande destes indivíduos, com exceção do M 300, em que este par foi nomeado como 11; o homeólogo ao HSA 13 (sinal aqua) marcou em toda a extensão do braço longo do par 15, um acrocêntrico de tamanho médio destes indivíduos, com exceção do M 300, em que este par foi nomeado como 14; e a sonda de pintura do HSA 20 (marcação verde) hibridou em todo o braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos pequenos, o par 21 (figuras 46, 57, 68 e 77).
- Hibridação com as sondas de pintura dos cromossomos 9, 11 e 22 humanos: a região homeóloga ao HSA 9 (sinal vermelho) está localizada em toda a extensão do braço longo dos cromossomos acrocêntricos do par 14, com exceção do M 300, em que este par foi nomeado como 13; enquanto o homeólogo ao HSA 11 (sinal aqua) marcou em todo o braço longo dos cromossomos acrocêntricos que formam o par 10, com exceção do M 300, em que este par foi nomeado como 9; a região homeóloga ao HSA 22 (sinal vermelho) está localizada em todo o braço curto do par 5, submetacêntrico de tamanho pequeno (figuras 47, 58, 69 e 78).
- Hibridação com as sondas de pintura dos cromossomos 8, 12 e 21 humanos: a homeologia com o HSA 8 (marcação vermelha) está na região proximal do braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos médios, o par 3, e em toda a extensão do braço longo dos cromossomos do par 13, com exceção do M 300, em que este par foi nomeado como 12. O par 13 dos espécimes M 275 e M 483 e o par 12 do indivíduo M 300 apresentaram heteromorfismos, com um dos cromossomos submetacêntrico e o outro acrocêntrico; A homeologia com o HSA 12

(sinal aqua) está localizada em todo o braço longo dos cromossomos acrocêntricos que formam par 11 com exceção do M 300, em que este par foi nomeado como 10; a região homeóloga ao HSA 21 (sinal verde) está presente na região distal do braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos pequenos, o par 19 (figuras 44, 55, 65 e 75).

- Hibridação com as sondas de pintura dos cromossomos 4, 14 e 18 humanos: o cromossomo 4 humano (marcação vermelha) é homeólogo às regiões proximal e intersticial do braço longo do maior par de cromossomos submetacêntricos, o par 1, e à toda a extensão do par cromossômico 6, metacêntrico de tamanho pequeno, com exceção da região centromérica; a região homeóloga ao HSA 14 (sinal aqua) está localizada na região intersticial do braço longo do par cromossômico 2, um submetacêntrico de tamanho grande; e a homeologia ao HSA 18 foi detectada em praticamente toda a extensão do braço curto do par 3, um submetacêntrico de tamanho médio (figuras 48, 59, 70 e 79).
- Hibridação com as sondas de pintura dos cromossomos 3, 15 e 17 humanos: a hibridação do HSA 3 (sinal vermelho) mostrou marcação em todo o braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos médios, o par 16, com exceção do M 300, em que este par foi nomeado como 15, na região proximal do braço longo do par 19 do exemplar M 275, em toda a extensão do braço longo do(s) cromossomo(s) X_2 e em toda a extensão do cromossomo Y_2 ; as regiões homeólogas ao HSA 15 estão presentes em três pares cromossômicos: nas regiões intersticiais dos cromossomos dos pares 1 e 2, submetacêntricos de tamanho grande, em todo o braço curto do(s) cromossomo(s) X_2 e no braço curto do cromossomo Y_1 ; já a sonda do HSA 17 hibridou nas regiões intersticial e distal do par 3, submetacêntrico de tamanho médio (figuras 43, 54, 64 e 74).
- Hibridação com as sondas de pintura dos cromossomos 5, 7 e 10 humanos: a técnica de FISH com estas sondas mostrou que a região homeóloga ao cromossomo 5 humano (marcação vermelha) está localizada em toda a extensão do braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos grandes, o par 9, com exceção do M 300, em que este par foi nomeado

como 8 e na região intersticial do braço longo do cromossomo 1, entre outras duas regiões homeólogas ao HSA 7 (sinais verdes), formando um padrão 7/5/7; a sonda do cromossomo 7 humano ainda hibridou em toda a extensão do braço longo do par de cromossomos 4, submetacêntrico de tamanho médio, e nenhuma sonda de pintura dos cromossomos humanos produziu sinal de hibridação nos braços curtos deste par cromossômico; três regiões mostraram homeologia ao HSA 10: a região proximal do braço longo do par 5, submetacêntrico de tamanho pequeno, as porções intersticial e distal do braço longo do par 18, com exceção do M 300, em que este par foi nomeado como 17, acrocêntrico pequeno, e toda a extensão do braço longo do menor par de cromossomos acrocêntricos, o par 22 (figuras 49, 60, 71 e 80).

- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 6 e X humanos: a hibridação mostrou que a sonda do cromossomo 6 (vermelha) marcou na metade proximal do braço curto e nas regiões proximal e intersticial do braço longo do par de cromossomos 2, submetacêntricos grandes; a região distal do braço curto deste cromossomo possui um bloco heterocromático extracentromérico (ver figura 32), presente em todos os indivíduos desta espécie já estudados (presente estudo, Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008); a sonda do cromossomo X humano produziu sinal (vermelho) em toda a extensão do par de cromossomos X₁, submetacêntricos de tamanho médio, com exceção do centrômero (figuras 50, 61, 72 e 81).
- Hibridação com a sonda de pintura do cromossomo 1 humano: as regiões homeólogas a este cromossomo (sinais vermelhos) estão presentes em quatro pares de cromossomos: na região distal do braço longo do par 2, em toda a extensão dos braços longos dos cromossomos acrocêntricos do par 17 com exceção do M 300, em que este par foi nomeado como 16, em toda a extensão do par de cromossomos 20, com exceção da região centromérica e da porção proximal do braço longo, que possui uma região organizadora de nucléolo típica desta espécie (ver De Oliveira et al., 1998, 1999), em toda a extensão dos cromossomos X₃ e no braço longo

do cromossomo Y₁ (figuras 52, 62, 67 e 82).

- Hibridação com a sonda de pintura do cromossomo 16 e 19 humanos: as homeologias ao HSA 16 estão presentes em três pares de cromossomos: na região distal do braço longo do par 5, no braço curto do par submetacêntrico 7, com exceção do M 300, em que este par foi nomeado como 18, por apresentar morfologia acrocêntrica, e na região proximal dos braços longos dos cromossomos do par 18, acrocêntricos de tamanho pequeno, com exceção do M 300, em que este par foi nomeado como 17; a HSA 19 marcou em toda a extensão do par de cromossomos 8, com exceção do M 300, em que este par foi nomeado como 7, submetacêntricos de tamanho pequeno, com exceção da região centromérica (figuras 45, 56, 66 e 76).

A sonda HSA Y não produziu sinal de hibridação, corroborando o verificado por diversos autores.

Para *Alouatta clamitans*, foi descrita a hibridação com sondas de pintura dos cromossomos humanos em um espécime macho com 45 cromossomos, procedente da região sul do Brasil (De Oliveira et al., 2002; figura 84) e a hibridação das sondas totais dos cromossomos 14 e 15 humanos em uma fêmea com 2n=50 (Gifalli-Iughetti e Koiffmann, 2009a). De Oliveira et al. (2002) também publicou os resultados de hibridação em *Alouatta fusca* (2n=49) (figura 84), espécie filogeneticamente mais próxima de *A. clamitans*, que ocorre na metade norte da Mata Atlântica. Segundo estes autores, a diferença entre os cariótipos de *A. fusca* e *A. clamitans* é uma fusão dos pares 10 e 12 do primeiro que forma o par 3 do segundo e a fusão dos pares 9 e 13 de *A. fusca* que origina o par 5 de *A. clamitans*.

Figura 84: A) Cariótipo com banda G de *Alouatta clamitans* com as regiões cromossômicas homeólogas humanas a direita (no detalhe os cromossomos sexuais observados na fêmea de *A. fusca*). **B)** Resumo dos cromossomos que diferem entre *A. clamitans* ($2n=45$) e *A. fusca* ($2n=49$) por rearranjos Robertsonianos (De Oliveira et al., 2002 – modificado).

A comparação entre os padrões de hibridação das sondas humanas de pintura cromossômica observados para os indivíduos M 275, M 277, M 300 e M 483 (figuras 53, 63, 73 e 83) e os verificados para *A. clamitans* e *A. fusca* por De Oliveira et al. (2002) (figura 84) nos mostrou que estes exemplares possuem cromossomos hibridados pelas sondas HSA 2, 11, 9 e 12 de morfologia acrocêntrica, assim como os encontrados por estes autores em exemplares de *A. fusca* (figura 84B) e não de morfologia metacêntrica e submetacêntrica como o observado em indivíduos de *A. clamitans*. Sendo assim, as principais diferenças observadas entre os exemplares de *Alouatta clamitans* analisados neste estudo (com $2n=49$ e 50 e procedentes da região sudeste) e os

exemplares procedentes da região sul do Brasil, como o espécime com $2n=45$ estudado por De Oliveira et al (2002), são as mesmas que foram encontradas por estes autores entre os representantes das espécies *Alouatta fusca* e *A. clamitans* (consideradas até então como subespécies). De Oliveira et al. (2002) concluíram que um híbrido entre estes dois citotipos ($2n=49/50$ e $2n=45/46$) poderia requerer a formação de dois trivalentes, que poderiam levar à inviabilidade dos híbridos devido a complicações durante a meiose e sugeriram, portanto, a elevação ao nível de espécie. Este estudo teve grande influência para que Gregorin (2006), em adição às variáveis morfológicas observadas, realizasse a elevação ao nível de espécie destes *taxa*. Estes resultados demonstram, portanto, que as principais diferenças cariotípicas observadas entre os exemplares de *Alouatta clamitans* procedentes da região sudeste e os da região sul do Brasil são as mesmas observadas entre indivíduos já considerados de espécies distintas, indicando a necessidade de uma revisão taxonômica para este grupo.

Com relação às sondas dos demais cromossomos humanos, foi observado um padrão de hibridação muito similar ao descrito por De Oliveira et al. (2002) para o indivíduo de *A. clamitans* com $2n=45$ (figura 84A), com exceção dos pares 3 dos exemplares analisados neste estudo, que apresentaram padrão 18/8/17, já que a sonda do HSA 18 hibridou no braço curto e a sonda do HSA 8 produziu sinal de hibridação na região proximal do braço longo destes cromossomos, enquanto que o mesmo par, classificado como par 4 do exemplar descrito na literatura apresentou padrão 8/18/17, com a sonda do HSA 8 produzindo sinal de hibridação no braço curto e a sonda do HSA 18 hibridando na região proximal do braço longo destes cromossomos; esta diferença pode ter sido ocasionada por uma inversão pericêntrica deste segmento.

Os braços curtos dos cromossomos do par 4 de todos os exemplares, do par 7 do M 275, M 277 e M 483 e os braços curtos dos cromossomos submetacêntricos do par 13 do M 275 e do M 483 não foram hibridados por nenhuma sonda humana. Além disso, notamos que o par 9 do exemplar da literatura, hibridado pela sonda HSA 1 é submetacêntrico, enquanto que nos exemplares analisados este par é acrocêntrico (par 20), com exceção do exemplar M 483, que apresentou este par heteromórfico, com um dos

cromossomos submetacêntrico e o outro acrocêntrico. Assim como no exemplar na literatura, nenhuma sonda produziu sinal de hibridação no braço curto deste submetacêntrico do espécime M 483.

A principal diferença encontrada entre o cariótipo do exemplar M 300 e o dos demais indivíduos analisados com citogenética molecular foi que um dos pares hibridados pela sonda HSA 16 neste indivíduo apresentou morfologia acrocêntrica (par 18), enquanto que nos demais (M 275, M 277 e M 483) este par é submetacêntrico (par 7).

Pequenas diferenças com relação à extensão das marcações também foram notadas, como quando comparamos as regiões hibridadas pela sonda HSA 16 no par 18 dos indivíduos M 275, M 277 e M 483 e no par 17 do M 300 com a região hibridada pela mesma sonda no par 19 do exemplar da literatura (figura 84A).

Não foi observado sinal de hibridação da sonda HSA 3 no par que hibridou com a sonda HSA 21 dos exemplares M 277, M 300 e M 483 e onde é conhecido ocorrer a sintenia 3/21, que é considerada ancestral de mamíferos placentários, com exceção dos macacos do Velho-Mundo (Haig, 1999; Murphy et al., 2001; Frönicke, 2005), porém, no presente estudo este sinal foi visualizado em metáfases do exemplar M 275 de *Alouatta clamitans* e portanto, foi considerada como válida.

Por convenção, organizamos o cariótipo em ordem decrescente de tamanho dos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, seguido pelo mesmo padrão de organização dos cromossomos acrocêntricos e por este motivo, a ordem dos cromossomos no cariótipo descrito no presente estudo difere da ordem apresentada por De Oliveira et al. (2002), o que não altera a interpretação dos resultados.

O padrão de hibridação das sondas nos cromossomos do sistema sexual múltiplo foi similar para M 483 ao verificado por De Oliveira et al. (2002) para a fêmea de *A. fusca* e similar para M 275, M 277 e M 300 ao encontrado neste mesmo estudo para o macho de *A. clamitans* (figura 84).

Através da análise citogenética molecular, foi possível verificar que a região provavelmente envolvida numa translocação entre os cromossomos 13p e 20p no indivíduo M 483, responsável pelos heteromorfismos observados em coloração convencional e bandamento GTG, não foram hibridadas por

quaisquer sondas humanas (figura 83). Recebemos informações de que este exemplar estava prenhe e teve um filhote saudável durante o período de permanência no DEPAVE-3.

Foi também interessante notar que alguns cromossomos que apresentaram diferentes morfologias entre os espécimes analisados, e foram responsáveis pelas diferentes fórmulas cromossômicas observadas, apresentaram regiões que não foram hibridadas por quaisquer sondas humanas (exemplo dos braços curtos dos cromossomos submetacêntricos do par 13 do M 275 e do M 483 e do braço curto do par 7 submetacêntrico do M 275, M 277 e M 483, que se mostrou acrocêntrico no exemplar M 300 (par 18).

Esta é a primeira descrição citogenética molecular com a hibridação de todas as sondas de cromossomos humanos em exemplares com $2n=49$ e $2n=50$ de *Alouatta clamitans*. A aplicação desta técnica foi de extrema importância para a verificação da variabilidade interespecífica e intrapopulacional desta espécie, indicando grandes diferenças entre os cariótipos destes indivíduos, principalmente ao compararmos os exemplares procedentes da região sudeste com os da região sul do Brasil.

**6. Estudo citogenético de uma fêmea de *Alouatta clamitans*
com $2n=48$**

Introdução

As espécies pertencentes ao gênero *Alouatta* (Atelidae) são popularmente conhecidas como bugios. Este é o gênero de Platyrrhini com a maior área de distribuição geográfica, ocorrendo desde o Estado de Vera Cruz, no México, até o Estado do Rio Grande do Sul, no Brasil e Corrientes, na Argentina, englobando um número variado de formações vegetais e diversos biomas da América do Sul e da América Central (Gregorin, 2006), podendo viver em florestas primárias, florestas secundárias e em habitats altamente perturbados pela atividade humana, tais como fragmentos florestais de poucos hectares (Bicca-Marques, 2003; Bicca-Marques et al., 2011; Gilbert e Setz, 2001) e possui uma das maiores diversidades de espécies (De Oliveira et al., 2002).

No Brasil, *Alouatta clamitans* ocorre por toda a vertente Atlântica desde o extremo sul até o litoral e porção norte do Rio de Janeiro e a região do Rio Jequitinhonha e a Serra do Espinhaço em Minas Gerais e compreende desde a região serrana central do Estado do Rio Grande do Sul até São Paulo, exceto nas regiões norte e noroeste do último, habitando regiões de floresta pluvial sempre verde da costa Atlântica do leste do Brasil, florestas semidecíduas do interior do estado de São Paulo e as Matas de Araucária das regiões montanhosas dos estados da região sul do Brasil. A espécie ocorre também na região de Misiones, nordeste da Argentina e em simpatria com *A. caraya* em alguns pontos de sua distribuição, principalmente no nordeste da Argentina e nas regiões adjacentes à margem leste do Rio Paraná (Gregorin, 2006; Rylands et al., 1988, 1996).

Gregorin (2006) notou uma ampla variação no padrão de coloração de *A. clamitans* e no grau de dicromatismo sexual, com a coloração nos machos tendendo a escurecer gradativamente no sentido sul-norte enquanto que o processo inverso foi observado nas fêmeas, concluindo que o dicromatismo é expresso de forma mais acentuada nos indivíduos procedentes das áreas mais ao sul (Rio Grande do Sul e Santa Catarina) do que nos da região sudeste (São Paulo e Minas Gerais); e verificou ainda que as variáveis cranianas decrescem de Minas Gerais para Santa Catarina e que espécimes do Rio Grande do Sul são menores que os provenientes de Santa Catarina.

Após analisar um total de 224 indivíduos de bugios da considerada até então espécie *A. guariba*, Gregorin (2006) elevou as subespécies *Alouatta guariba clamitans* e *A. g. guariba* ao nível de espécie, denominando-as *Alouatta clamitans* e *Alouatta fusca*, respectivamente, baseado na verificação de diferentes padrões de dimensões cranianas e de coloração (que levariam a um isolamento reprodutivo) entre as populações, além da presença de dicromatismo sexual em *A. clamitans* e ausência em *A. fusca*. Além dos dados morfológicos, também foram considerados os estudos citogenéticos realizados por De Oliveira et al. (2002), que ao analisarem citogeneticamente indivíduos de *Alouatta fusca* com $2n=49$ (macho) e $2n=50$ (fêmea) e compararem os resultados com os verificados para dois machos de *A. clamitans* procedentes do estado do Paraná, com $2n=45$, concluíram que estas espécies (consideradas até então como subespécies) diferem por duas translocações Robertsonianas e que um híbrido entre estes dois citotipos ($2n=49/50$ e $2n=45/46$) poderia requerer a formação de dois trivalentes, que poderiam levar à inviabilidade dos híbridos devido a complicações durante a meiose e já tinham sugerido, portanto, a elevação ao nível de espécie.

A variabilidade cromossômica observada em *Alouatta clamitans* é bastante ampla, com indivíduos com $2n=45$ ou 46 procedentes da região Sul e indivíduos com $2n=49$ ou 50 procedentes da região Sudeste do Brasil (De Oliveira, 1996; De Oliveira et al., 2002; Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008; Koiffmann, 1977; Koiffmann e Saldanha, 1974), além de dois exemplares já descritos que apresentaram $2n=48$, procedentes dos municípios de Iguape/SP (Gifalli-lughetti, 2008) e de Registro/SP (Koiffmann, 1977; Koiffmann e Saldanha, 1974), localizados no extremo sul do estado de São Paulo.

O indivíduo com $2n=48$ descrito por Koiffmann (1977) e Koiffmann e Saldanha (1974), era um macho, com 20 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos (incluindo o cromossomo X) e 28 acrocêntricos (incluindo o cromossomo Y), e o exemplar descrito por Gifalli-lughetti (2008), era uma fêmea, que apresentou um cromossomo submetacêntrico a mais (cromossomo X) e um acrocêntrico a menos (ausência do cromossomo Y) do que o macho descrito anteriormente. Após estudar este exemplar fêmea com 48 cromossomos em coloração convencional, Gifalli-lughetti (2008) concluiu que este cariótipo poderia ser resultante do acasalamento de indivíduos com

50 e 46 cromossomos e o "fitness" reduzido do híbrido resultaria em poucos indivíduos naturais ou que este poderia ser um cariótipo intermediário entre as populações do sul com 46 cromossomos e as do sudeste com 50 cromossomos, e a progressiva fragmentação da Mata Atlântica teria reduzido drasticamente e isolado estas populações com $2n=48$.

A variabilidade encontrada indica que a tendência à redução do número diploide apresenta-se orientada no sentido norte-sul e que *A. clamitans* parece estar em processo ativo de especiação cromossômica, com as populações do sudeste e sul do Brasil já isoladas reprodutivamente, notando-se a necessidade de uma reavaliação taxonômica para esta espécie (De Oliveira, 1996; Gifalli-lughetti, 2008).

As diferenças observadas entre populações, tanto genéticas quanto morfológicas, indicam que *A. clamitans* é representante de duas subespécies ou mesmo de duas espécies separadas (De Oliveira, 1996, 2001; De Oliveira et al., 1995, 1998, 2002; Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008; Gregorin, 2006; Harris et al., 2005; Koiffmann, 1977).

Os objetivos deste estudo foram estudar, através da citogenética tradicional e molecular, um exemplar fêmea de *Alouatta clamitans* com $2n=48$, estabelecendo os grupos sintênicos conservados, para melhor compreender a variabilidade cromossômica da espécie e identificar se este se trata de um cariótipo intermediário entre o das populações da região sul ($2n=45/46$) e da região sudeste ($2n=49/50$) ou se este seria um exemplar resultante do acasalamento de indivíduos portadores de diferentes cariótipos.

Material

A amostra de sangue periférico do espécime de bugio utilizada é proveniente do DEPAVE-3 (Departamento de Parques e Áreas Verdes, Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre – São Paulo/SP), cadastro de origem 32338, procedente do município de Iguape, extremo sul do estado de São Paulo e foi cadastrado em nosso laboratório como M 368.

A coleta de sangue do animal foi realizada pelos veterinários responsáveis. O animal submetido à coleta foi capturado por seus tratadores e

anestesiado pelos médicos-veterinários responsáveis. Após a contenção do espécime e término dos procedimentos, este ficou sob observação até o completo restabelecimento e foi então realocado em seu recinto.

Para o estudo citogenético, aproximadamente 5 ml de sangue periférico foi retirado com seringa e imediatamente depositado em um tubo contendo heparina.

Métodos

A cultura de linfócitos foi realizada de acordo com a técnica proposta por Moorhead et al. (1960) com modificações. A técnica de bandamento G empregada foi a de Seabright (1971) com modificações.

As lâminas foram analisadas em um microscópio Axiophot 2 Motorizado (Zeiss), as metáfases foram capturadas com o auxílio de uma vídeo-câmera CCD de alta resolução e cariotipadas utilizando-se o programa IKAROS V 5.4.9 (Metasystems).

As sondas das bibliotecas dos cromossomos humanos derivadas pela citometria de fluxo (*Human Paints NCBI*) foram reamplificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) [2µl Taq DNA polimerase buffer, 2µl dNTP's (2mM), 1µl MgCl₂ (50mM), 11,5µl água Mili-Q estéril, 2µl 6-MW Primer (10mM), 0,5µl Taq DNA polimerase e 1µl de DNA molde (sonda)], com um perfil de 35 ciclos em alta temperatura: 96°C por 5 minutos, 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 2 minutos, uma extensão final a 72°C por 7 minutos e 4°C ∞.

Para a utilização das sondas amplificadas das bibliotecas dos cromossomos humanos derivadas pela citometria de fluxo (*Human Paints NCBI*) em experimentos de FISH, estas foram marcadas por "nick translation" usando os kits Biotin-Nick translation mix ou DIG-Nick translation mix, ambos da Roche, conforme a orientação do fabricante.

As sondas amplificadas por PCR e marcadas foram precipitadas antes de serem utilizadas para a FISH, a fim de eliminar os restos de sais e produtos da PCR. Em um tubo de microcentrífuga foi aliquoteado o produto da reação final obtida com a marcação, Human COT-1 DNA (Invitrogen), NaAc (3M) gelado

correspondente a 10% do volume total de DNA (sonda+COT) e EtOH 100% gelado (2,5x o volume total de DNA) e deixado *overnight* no freezer. As sondas foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos em uma velocidade de 13000RPM e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Em seguida, 150µl de etanol 70% gelado foram adicionados e a centrifugação foi repetida nas mesmas condições por 15 minutos. O sobrenadante novamente foi retirado e a sonda de DNA foi colocada para secar em estufa a 37°C por aproximadamente uma hora.

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada com as sondas de pintura dos cromossomos HSA 1, 16, 19 e 22 derivados pela citometria de fluxo, em metáfases humanas para confirmar a eficiência da reamplificação pela PCR e em seguida em metáfases do exemplar M 368. As sondas, marcadas e ressuspendidas em meio de hibridação, foram deixadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos, aquecidas em água a 98°C por 10 minutos e, em seguida, colocadas em banho-maria a 37°C para a pré-hibridação por 30 minutos.

Antes da desnaturação das lâminas, um pré-tratamento foi realizado com 100µl de RNase (100µg/ml) por uma hora em estufa a 37°C. Então, as lâminas foram colocadas em três banhos de 2XSSC a temperatura ambiente por 5 minutos cada e desidratadas em série de etanol 70%, 85% e 100% por 3 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram submetidas a um banho de pepsina 0,005% por 10 minutos a 37°C e 2 banhos de PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar, foram colocadas novamente em séries de etanol 70%, 85% e 100% por 3 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se a desnaturação por 2 minutos a 72°C em solução de formamida 70% e, novamente, foram desidratadas em séries de etanol 70%, 85% e 100% gelados por 3 minutos cada. Então, foram incubadas a 37°C, *overnight* para lâminas de material humano ou por 6 dias para o material deste primata. Após o tempo de hibridação, as lâminas foram lavadas em solução de formamida 50% e 2XSSC por 3 minutos cada a 37°C e, por fim, em PBT (100ml de 20xSSC, 400ml de água destilada e 250µl de Tween-20) por 5 minutos a temperatura ambiente.

As sondas marcadas com Digoxigenina foram detectadas com Antidigoxigenina-Rodamina e as sondas marcadas com Biotina foram

detectadas com Avidina-FITC por 45 minutos a 37°C e, em seguida, as lâminas foram submetidas a 3 banhos de PBT a 37°C por 3 minutos cada e coradas com DAPI (4,6 diamidina-2-phenylindole) mais Vectashield (Vector Laboratories).

A técnica de FISH também foi empregada conforme indicado pelo fabricante das lâminas *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome* (Cytocell), que são lâminas divididas em oito áreas, com sondas de pintura de três cromossomos humanos em cada área, marcadas em cores diferentes (vermelho, verde e azul), compreendendo todos os 24 cromossomos humanos.

A única modificação do protocolo do fabricante foi com relação à preparação das lâminas *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome*. A suspensão de linfócitos foi pingada com uso de pipeta Pasteur sobre a lâmina, que foi observada em microscópio de fase para verificar a existência de quantidades satisfatórias de metáfases em todas as áreas. Este método se mostrou mais eficiente para a obtenção de metáfases do que o sugerido pelo fabricante (pingar 4µl da suspensão celular em cada área com o uso de micropipeta).

As lâminas foram analisadas em um microscópio Axiophot 2 Motorizado (Zeiss) e as metáfases foram capturadas em coloração DAPI e com os filtros RHO, FITC e AQUA para a observação das marcações. As imagens foram capturadas com o auxílio de uma vídeo-câmera CCD de Alta Resolução e do programa ISIS V 5.4.9 (MetaSystems).

Resultados

O estudo cromossômico do exemplar fêmea de *A. clamitans* M 368 com coloração convencional mostrou 23 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos (incluindo o par de cromossomos X) e 25 cromossomos acrocêntricos. O resultado obtido está apresentado na figura 85.

Figura 85: Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 368, com $2n=48$. As setas indicam os pares heteromórficos 3, 10 e 13.

O estudo citogenético em bandamento GTG mostrou que o par 3 considerado em coloração convencional como um par heteromórfico (figura 85) na verdade não consistia em um par e que cada um destes cromossomos pareava com outros dois cromossomos acrocêntricos (pares 10 e 11). Também foi possível organizar os cromossomos do sistema sexual múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2X_3X_3$ (figura 86).

Figura 86: Cariótipo em bandamento GTG da fêmea M 368, com $2n=48$. O par 10 é formado por um cromossomo metacêntrico e dois acrocêntricos e o par 11 constitui-se de um cromossomo submetacêntrico e dois acrocêntricos. A seta indica o par heteromórfico X_3 .

Os resultados das hibridações (FISH) estão apresentados nas figuras 87 a 98:

Figura 87: **a)** Metáfase da fêmea M 368 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 2 (vermelho), 13 (aqua) e 20 (verde). Um dos pares hibridados pela sonda HSA 2 é heteromórfico.

Figura 88: **a)** Metáfase da fêmea M 368 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 9 (vermelho) e 11 (aqua). Os pares hibridados são heteromórficos.

Figura 89: **a)** Metáfase da fêmea M 368 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 8 (vermelho), 12 (aqua) e 21 (verde). O par hibridado pela sonda HSA 12 é heteromórfico. Dois cromossomos hibridados pela sonda HSA 8 (um submetacêntrico e outro acrocêntrico) estão sobrepostos no centro da imagem.

Figura 90: **a)** Metáfase da fêmea M 368 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 4 (vermelho), 14 (aqua) e 18 (verde).

Figura 91: **a)** Metáfase incompleta do espécime M 368 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 3 (vermelho), 15 (aqua) e 17 (verde). **c)** Imagem parcial de outra metáfase em escala de cinza. **d)** Mesma metáfase hibridada com a sonda HSA 15 (aqua), comprovando a marcação desta sonda em três pares de cromossomos.

Figura 92: **a)** Metáfase incompleta do espécime M 368 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 5 (vermelho), 10 (aqua) e 7 (verde). **c)** Imagem parcial de outra metáfase em escala de cinza. **d)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA 5 (vermelho) e 10 (aqua), comprovando a marcação destas sondas em dois e três pares de cromossomos, respectivamente.

Figura 93: **a)** Metáfase da fêmea M 368 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas HSA X (vermelho) e 6 (aqua).

As sondas de pintura cromossômica HSA 1, 16, 19 e 22 da lâmina *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome* (Cytocell) não produziram sinal satisfatório. Sendo assim, foram realizadas novas hibridações com as sondas derivadas pela citometria de fluxo (*Human Paints NCBI*). Para isto, estas sondas foram reamplificadas por PCR, marcadas por "nick translation" e precipitadas, conforme protocolos descritos anteriormente. Os resultados obtidos com as hibridações destas sondas estão apresentados nas figuras 94 a 97:

Figura 94: **a)** Metáfase da fêmea M 368 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com a sonda HSA 1 (vermelho) derivada pela citometria de fluxo.

Figura 95: **a)** Metáfase da fêmea M 368 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com a sonda HSA 16 (vermelho) derivada pela citometria de fluxo.

Figura 96: **a)** Metáfase da fêmea M 368 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com a sonda HSA 19 (vermelho) derivada pela citometria de fluxo.

Figura 97: **a)** Metáfase da fêmea M 368 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com a sonda HSA 22 (vermelho) derivada pela citometria de fluxo.

O resumo dos resultados obtidos está apresentado no Quadro VI.

Quadro VI – Resultados obtidos com a técnica de FISH aplicada em metáfases do indivíduo M 368:

Sonda	Número de pares hibridados	Número de sinais visualizados
1 (FS)	4	8
2 (FS)	2	4
3 (©)	2	4
4 (FS)	2	4
5 (©)	1	2
6 (FS)	1	2
7 (©)	2	6
8 (FS)	2	4
9 (FS)	1	2
10 (FS)	3	6
11 (FS)	1	2
12 (FS)	1	2
13 (FS)	1	2
14 (FS)	1	2
15 (FS)	3	6
16 (FS)	3	6
17 (FS)	1	2
18 (FS)	1	2
19 (FS)	1	2
20 (FS)	1	2
21 (©)	1	2
22 (FS)	1	2
X (FS)	1	2

FS = sondas derivadas pela citometria de fluxo;

© = sondas comerciais (Cytocell);

A figura 98 representa o cariótipo em bandamento G do indivíduo M 368 (*Alouatta clamitans*) com as indicações das regiões homeólogas aos cromossomos humanos, identificadas através da técnica de FISH. A partir da análise das imagens da FISH, foi possível verificar que as sondas dos cromossomos HSA 2, 11, 9 e 12 hibridaram em pares heteromórficos:

Figura 98: Cariótipo com banda G do indivíduo M 368 (*Alouatta clamitans*). As barras indicam o tamanho e a localização das homeologias encontradas após a FISH de cada sonda de pintura dos cromossomos humanos. *Apesar de não termos visualizado a marcação da sonda HSA 3 no par 17, foi possível indicar a localização da região homeóloga através da comparação com os resultados obtidos para os demais indivíduos da mesma espécie.

Discussão

O cariótipo do espécime M 368 em coloração convencional foi levemente divergente do verificado por Gifalli-lughetti (2008) ao analisar este mesmo indivíduo. Neste estudo, foram encontrados 23 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos (incluindo o par de cromossomos X) e 25 cromossomos acrocêntricos e heteromorfismos nos pares 3, 10 e 13 (figura 85), enquanto que em seu trabalho, a autora considerou 21 cromossomos de morfologia meta ou submetacêntrica e 27 cromossomos acrocêntricos e um único par heteromórfico, o par 5.

Com o bandamento G, notamos que o par 3 considerado em coloração convencional como um par heteromórfico (figura 86) não consistia em um par e que cada um destes cromossomos pareava com outros dois

cromossomos acrocêntricos (pares 10 e 11), o que também explica o heteromorfismo observado no par 13 em coloração convencional, já que estes cromossomos também formam os pares 10 e 11, e portanto, não são pares. Também foi possível organizar os cromossomos do sistema sexual múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2X_3X_3$ e o par heteromórfico 10 foi então classificado como X_3 (figura 86).

A técnica de FISH com emprego da lâmina *Chromoprobe Multiprobe OctoChrome* (Cytocell) revelou as regiões homeólogas aos cromossomos humanos que se encontram listadas abaixo:

- Hibridação tripla com as sondas de pintura dos cromossomos 2, 13 e 20 humanos: a região homeóloga ao HSA (*Homo sapiens*) 2 (marcação vermelha) se encontra em toda a extensão do braço curto do maior par cromossômico submetacêntrico, o par1, em todo o braço curto do cromossomo metacêntrico e em toda a extensão do braço longo de um dos cromossomos acrocêntricos que compõem o par 10; o homeólogo ao HSA 13 (sinal aqua) marcou em toda a extensão do braço longo do par 13, um acrocêntrico de tamanho médio; e a sonda de pintura do HSA 20 (marcação verde) hibridou em todo o braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos pequenos, o par 19 (figura 87).
- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 9 e 11 humanos: a região homeóloga ao HSA 9 (sinal vermelho) está localizada em todo o braço curto do cromossomo submetacêntrico e em toda a extensão do braço longo de um dos cromossomos acrocêntricos que formam o par 11; enquanto o homeólogo ao HSA 11 (sinal aqua) marcou em todo o braço longo, tanto do cromossomo metacêntrico, quanto de um dos cromossomos acrocêntricos que formam o par 10 (figura 88).
- Hibridação tripla com as sondas de pintura dos cromossomos 8, 12 e 21 humanos: a homeologia com o HSA 8 (marcação vermelha) está na região proximal do braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos médios, o par 3, e em toda a extensão do braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos grandes, o par 12; Já, a

homeologia com o HSA 12 (sinal aqua) está localizada em todo o braço longo, tanto do cromossomo submetacêntrico, quanto de um dos cromossomos acrocêntricos que formam o par 11; a região homeóloga ao HSA 21 (sinal verde) está presente na região distal do braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos pequenos, o par 17 (figura 89).

- Hibridação tripla com as sondas de pintura dos cromossomos 4, 14 e 18 humanos: o cromossomo 4 humano (marcação vermelha) é homeólogo às regiões proximal e intersticial do braço longo do maior par de cromossomos submetacêntricos, o par 1, e à toda a extensão do par cromossômico 6, metacêntrico de tamanho pequeno, com exceção da região centromérica; a região homeóloga ao HSA 14 (sinal aqua) está localizada na região intersticial do braço longo do par cromossômico 2, um submetacêntrico de tamanho grande; e a homeologia ao HSA 18 foi detectada em praticamente toda a extensão do braço curto do par 3, um submetacêntrico de tamanho médio, com exceção da região proximal (figura 90).
- Hibridação tripla com as sondas de pintura dos cromossomos 3, 15 e 17 humanos: a hibridação do HSA 3 (sinal vermelho) mostrou marcação em todo o braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos médios, o par 14, e em toda a extensão do braço longo do par X₂, submetacêntrico de tamanho médio; as regiões homeólogas ao HSA 15 estão presentes em três pares cromossômicos: nas regiões intersticiais do cromossomos dos pares 1 e 2, submetacêntricos de tamanho grande, e em todo o braço longo do par X₂; já a sonda do HSA 17 hibridou nas regiões intersticial e distal do par 3, submetacêntrico de tamanho médio (figura 91).
- Hibridação tripla com as sondas de pintura dos cromossomos 5, 7 e 10 humanos: a técnica de FISH com estas sondas mostrou que a região homeóloga ao cromossomo 5 humano (marcação vermelha) está localizada em toda a extensão do braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos grandes, o par 9, e na região intersticial do braço longo do cromossomo 1, entre outras duas regiões homeólogas ao HSA 7 (sinais verdes), formando um padrão 7/5/7; a sonda do cromossomo

7 humano ainda hibridou em toda a extensão do braço longo do par de cromossomos 4, submetacêntrico de tamanho médio, e nenhuma sonda de pintura dos cromossomos humanos produziu sinal de hibridação nos braços curtos deste par cromossômico; outras três regiões mostraram homeologia ao HSA 10: a região proximal do braço longo do par 5, submetacêntrico de tamanho pequeno, as porções intersticial e distal do braço longo do par 16, acrocêntrico pequeno, e toda a extensão do braço longo do menor par de cromossomos acrocêntricos, o par 20 (figura 92).

- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 6 e X humanos: a hibridação mostrou que a sonda do cromossomo 6 (vermelha) marcou na metade proximal do braço curto e nas regiões proximal e intersticial do braço longo do par de cromossomos 2, submetacêntricos grandes; a região distal do braço curto deste cromossomo possui um bloco heterocromático extracentromérico, presente em todos os indivíduos desta espécie já estudados (presente estudo, Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008); a sonda do cromossomo X humano produziu sinal (vermelho) em toda a extensão do par de cromossomos X_1 , submetacêntricos de tamanho médio, com exceção do centrômero (figura 93).
- Hibridação com a sonda de pintura do cromossomo 1 humano: as regiões homeólogas a este cromossomo (sinais vermelhos) estão presentes em quatro pares de cromossomos: na região distal do braço longo do par 2, em toda a extensão dos braços longos dos cromossomos acrocêntricos do par 15, em toda a extensão do par de cromossomos 18, com exceção da região centromérica e da porção proximal do braço longo, que possui uma região organizadora de nucléolo típica desta espécie (ver De Oliveira *et al.*, 1998, 1999) e em toda a extensão do par heteromórfico X_3 , formado por um cromossomo submetacêntrico e outro acrocêntrico, com exceção do centrômero (figura 94).
- Hibridação com a sonda de pintura do cromossomo 16 humano: as

homeologias a este cromossomo (sinais vermelhos) estão presentes em três pares de cromossomos: na região distal do braço longo do par 5, em toda a extensão do par 7, submetacêntrico de tamanho pequeno, com exceção do centrômero, e na região proximal dos braços longos dos cromossomos do par 16, acrocêntricos de tamanho pequeno (figura 95).

- Hibridação com a sonda de pintura do cromossomo 19 humano: esta sonda marcou em toda a extensão do par de cromossomos 8, submetacêntricos de tamanho pequeno, com exceção da região centromérica (figura 96).
- Hibridação com a sonda de pintura do cromossomo 22 humano: a região homeóloga a este cromossomo está presente em todo o braço curto do par 5, submetacêntrico de tamanho pequeno (figura 97).

Para *Alouatta clamitans*, foi descrita a hibridação com sondas de pintura dos cromossomos humanos em um espécime macho com 45 cromossomos, procedente da região sul do Brasil (De Oliveira *et al.*, 2002; figura 99) e a hibridação das sondas totais dos cromossomos 14 e 15 humanos em uma fêmea com $2n = 50$ (Gifalli-lughetti e Koiffmann, 2009a), além do presente estudo com espécimes machos ($2n=49$) e fêmeas ($2n=50$) procedentes do estado de São Paulo. De Oliveira *et al.* (2002) também publicou os resultados de hibridação em *Alouatta fusca* ($2n=49$) (figura 99), espécie filogeneticamente mais próxima de *A. clamitans*, que ocorre na metade norte da Mata Atlântica. Segundo estes autores, a diferença entre os cariótipos de *A. fusca* e *A. clamitans* é uma fusão dos pares 10 e 12 do primeiro que forma o par 3 do segundo e a fusão dos pares 9 e 13 de *A. fusca* que origina o par 5 de *A. clamitans*.

Figura 99: A) Cariótipo com banda G de *Alouatta clamitans* com as regiões cromossômicas homeólogas humanas a direita (no detalhe os cromossomos sexuais observados na fêmea de *A. fusca*). **B)** Resumo dos cromossomos que diferem entre *A. clamitans* ($2n = 45$) e *A. fusca* ($2n = 49$) por rearranjos Robertsonianos (De Oliveira et al., 2002 – modificado).

A comparação entre o padrão de hibridação das sondas humanas de pintura cromossômica observado para o indivíduo M 368 (figura 98) e o verificado para *A. clamitans* (figura 99 e presente estudo) nos mostrou que este exemplar possui cromossomos hibridados pelas sondas HSA 2, 11, 9 e 12 tanto metacêntricos e submetacêntricos (típicos dos indivíduos procedentes da região sul do Brasil, como é o caso do exemplar com $2n=45$ estudado por De Oliveira et al., 2002), quanto acrocêntricos (típicos dos exemplares de *A. clamitans* procedentes do estado de São Paulo analisados no presente estudo, com $2n=49$ para machos e $2n=50$ para fêmeas; figuras 53, 63, 73 e 83).

Este padrão de hibridação comprova que o exemplar M 368 é resultante do acasalamento de indivíduos portadores de diferentes cariótipos, com um dos genitores com $2n=45♂$ ou $46♀$ e outro com $2n=49♂$ ou $50♀$. Este tipo de acasalamento é possível pois o exemplar é procedente do município de Iguape/SP, localizado no extremo sul do estado de São Paulo, região de transição entre as regiões sudeste e sul do Brasil e onde aparentemente existe uma população portadora de diferentes cariótipos, já que o outro exemplar com $2n=48$ já estudado (Koiffmann, 1977; Koiffmann e Saldanha, 1974) era procedente de Registro/SP, município vizinho de Iguape/SP (figura 100).

Figura 100: Mapa da região geográfica de origem dos espécimes de *Alouatta clamitans* já descritos com $2n=48$: Iguape/SP (M 368) e Registro/SP (Koiffmann, 1977; Koiffmann e Saldanha, 1974). Fonte dos mapas: IBGE (<ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas/escolares/mudos/municipios/SP/3520301.pdf>) – modificado.

Este padrão de hibridação das sondas HSA 2, 11, 9 e 12 verificado no exemplar M 368 confirmou a presença dos pares 10 e 11. Durante a divisão meiótica, o pareamento destes cromossomos pode levar a erros de segregação dos cromossomos devido à não disjunção, com a subsequente formação de gametas aneuploides, portadores de porções a mais (trissomia) ou a menos (monossomia) dos segmentos homeólogos aos cromossomos humanos 2, 11, 9 e 12, o que levaria à redução ou à perda da fertilidade deste

espécime. O exemplar M 368, por apresentar cariótipo divergente do apresentado para a maioria dos indivíduos analisados, foi encaminhado para cativeiro formando casal com um macho castrado e portanto, não temos maiores informações sobre sua fertilidade.

Com relação às sondas dos demais cromossomos humanos, foi observado um padrão de hibridação muito similar ao descrito por De Oliveira et al., (2002) para o indivíduo de *A. clamitans* com $2n=45$ (figura 99A), com exceção do par 3 do M 368, que apresentou padrão 18/8/17, já que a sonda do HSA 18 hibridou no braço curto e a sonda do HSA 8 produziu sinal de hibridação na região proximal do braço longo deste cromossomo, enquanto que o mesmo par, classificado como par 4 do exemplar descrito na literatura apresentou padrão 8/18/17, com a sonda do HSA 8 produzindo sinal de hibridação no braço curto e a sonda do HSA 18 hibridando na região proximal do braço longo deste cromossomo; esta diferença pode ter sido ocasionada por uma inversão pericêntrica deste segmento. Os demais indivíduos desta espécie analisados no presente estudo produziram padrão de hibridação do tipo 18/8/17, similar ao indivíduo M 368 (figuras 53, 63, 73 e 83).

O padrão de hibridação das sondas nos cromossomos do sistema sexual múltiplo foi similar à verificada por De Oliveira et al. (2002) para a fêmea de *A. fusca* e similar à encontrada para a outra fêmea de *A. clamitans* analisada no presente estudo (figura 83).

Os braços curtos dos cromossomos do par 4 não foram hibridados por nenhuma sonda humana. Além disso, notamos que o par 9 do exemplar da literatura, hibridado pela sonda HSA 1 é submetacêntrico, enquanto que no M 368 sua morfologia é acrocêntrica (par 15). Pequenas diferenças com relação à extensão das marcações também foram notadas, como quando comparamos a região hibridada pela sonda HSA 16 do par 16 do indivíduo M 368 (figura 98) com a região hibridada pela mesma sonda no par 19 do exemplar da literatura (figura 99A). Não foi observado sinal de hibridação da sonda HSA 3 no par cromossômico 17 deste indivíduo, que hibridou com a sonda HSA 21 e onde é conhecido ocorrer a sintenia 3/21, que é considerada ancestral de mamíferos placentários, com exceção dos macacos do Velho-Mundo (Haig, 1999; Murphy et al., 2001; Frönicke, 2005), porém, no presente estudo este sinal foi visualizado em metáfases de um exemplar macho desta

espécie (M 275) e portanto, foi considerada na figura 98 como válida. Por convenção, organizamos o cariótipo em ordem decrescente de tamanho dos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, seguido pelo mesmo padrão de organização dos cromossomos acrocêntricos (com exceção dos pares 10 e 11 que possuem as duas morfologias) e por este motivo, a ordem dos cromossomos no cariótipo descrito no presente estudo difere da ordem apresentada por De Oliveira et al. (2002), o que não altera a interpretação dos resultados.

Esta é a primeira descrição citogenética molecular com a hibridação de todas as sondas de cromossomos humanos em um exemplar de *Alouatta clamitans* com $2n=48$. A aplicação desta técnica foi de extrema importância para a confirmação da origem genética deste exemplar e de seu cariótipo, resultante do acasalamento de indivíduos portadores de diferentes cariótipos, com um dos genitores com $2n=45\text{♂}$ ou 46♀ e outro com $2n=49\text{♂}$ ou 50♀ . A formação dos trivalentes durante a divisão meiótica e as consequentes implicações causadas para a formação dos gametas, podendo reduzir ou impedir a fertilidade dos indivíduos portadores deste cariótipo, constitui um mecanismo de isolamento pós-zigótico e é mais um indicador de que as populações das regiões sul e sudeste do Brasil já estão isoladas a ponto de constituírem espécies diferentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BICCA-MARQUES, J. C.; GARBER, P. A. Experimental field study of the relative costs and benefits to wild tamarins (*Saguinus imperator* and *S. fuscicollis*) of exploiting contestable food patches as single-and mixed-species troops. **American Journal of Primatology**, Hoboken, v. 60, n.4, p. 139-153, 2003.
- BICCA-MARQUES, J. C.; SILVA, V. M. da; GOMES, D. F. Ordem Primates. In: REIS, N. R. dos; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, E. P. (Ed.). **Mamíferos do Brasil**. 2. ed. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2011. p. 107-150.
- DE OLIVEIRA, E. H. C.; LIMA, M. M. C.; SBALQUEIRO, I. J. Chromosomal variation in *Alouatta fusca*. **Neotrop. Prim.** 3: 181-183, 1995.
- DE OLIVEIRA, E. H. C.; LIMA, M. M. C.; SBALQUEIRO, I. J.; PISSINATTI, A. The karyotype of *Alouatta fusca clamitans* from Rio de Janeiro State, Brazil: evidence for a Y-autosome translocation. **Genet. Mol. Biol.** 31: 361-364, 1998.

- DE OLIVEIRA, E.H.C.; NEUSSER, M.; FIGUEIREDO, W. B.; NAGAMACHI, C.; PIECZARKA, J.C.; SBALQUEIRO, I. J.; WIENBERG, J.; MÜLLER, S. The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. **Chromosome Res.** 10: 669-683, 2002.
- DE OLIVEIRA, E. H. C.; LIMA, M. M. C.; SBALQUEIRO, I. J.; SILVA, A. S. F. Analysis of polymorphic NORs in *Alouatta* species (Primates, Atelidae). **Caryologia** 52: 169-175, 1999.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; NEUSSER, M.; FIGUEIREDO, W. B.; NAGAMACHI, C.; PIECZARKA, J.C.; SBALQUEIRO, I. J.; WIENBERG, J.; MÜLLER, S. The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. **Chromosome Res.** 10: 669-683, 2002.
- DE OLIVEIRA, E. H. C. Estudos citogenéticos e evolutivos nas espécies brasileiras e argentinas do gênero *Alouatta* Lacépède 1799 (Primates, Atelidae). Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 1996.
- DE OLIVEIRA, E. H. C. Filogenia da subfamília Atelinae (Primates, Platyrrhini): análise comparativa por pintura cromossômica multicolor. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.
- FRÖNICKE, L. Origins of primate chromosomes – as delineated by Zoo-FISH and alignments of human and mouse draft genome sequences. **Cytogenet. Genome Res.** 108: 122-138, 2005.
- GIFALLI-IUGHETTI, C.; KOIFFMANN, C. P. Synteny of human chromosomes 14 and 15 in the platyrrhines (Primates, Platyrrhini). **Genet. Mol. Biol.** 32: 786-791, 2009.
- GIFALLI-IUGHETTI C. Evolução cromossômica: estudo da variabilidade cariotípica em *Platyrrhini* e das homeologias e sentenias com cromossomos humanos. **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- GIFALLI, C. C. Estudo da variabilidade cariotípica em *Platyrrhini* (Primates) e da homeologia com o cromossomo 15 humano. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- GILBERT, K. A.; SETZ, E. Z. F. Primates in a fragmented landscape: Six species in Cenral Amazonia. In: BIER-Regaard, R. O. et al (Ed.). Lessons from Amazonia: The Ecology and Conservation of a Fragmented Forest. **New Haven: yale University Press**, 2001. P. 262-270.
- GREGORIN R. Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. **Rev. Bras. Zool.** 23: 64-144, 2006.
- HAIG, D. A brief history of human autosomes. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B** 354: 1447-1470, 1999.
- HARRIS, E. E.; GIFALLI-IUGHETTI, C.; BRAGA, Z. H.; KOIFFMANN, C. P. Cytochrome b sequences show subdivision between populations of the brown howler monkey (*Alouatta guariba*) from Rio de Janeiro and Santa Catarina, Brazil. **Neotropical Primates** 13: 16-21, 2005.

- KOIFFMANN, C. P.; SALDANHA, P. H. Cytogenetics of Brazilian monkeys. **J. Hum. Evol.** 3: 275-282, 1974.
- KOIFFMANN, C. P.; SALDANHA, P. H. Importância do estudo cromossômico em macacos sul-americanos. **Ciencia e Cultura** 29: 162-170, 1977.
- MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocyte cultures from human peripheral blood. **Exp. Cell. Res.** 20: 613-616, 1960.
- MURPHY, W. J.; STANYON, R.; O'BRIEN, S. J. Evolution of mammalian genome organization inferred from comparative gene mapping. **Genome Biol.** 2: 2001.
- RYLANDS, A. B.; SPIRONELO, V. L.; TORNISIELO, R. L.; DE SA.; KIERULFF, M.C.M.; SANTOS, I. B. 1988. Primates of the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Primate Conservation**, Washigton, 9: 10-109.
- RYLANDS, A. B.; FONSECA, G. A. B. da.; LEITE, Y. L. R.; MITTERMEIER, R. A. M. Primates of the Atlantic Forest: Origin, distributions, endemism, and communities. In: **Adaptive Radiations of Neotropical Primates**, M. Norconk, A. L. Rosenberger and P. A. Garber (eds.), Plenum Press, New York, 21-51, 1996.
- SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosome. **Lancet** 2: 971-972, 1971.

Foto: Marcos Antônio Melo

7. CITOGÉNÉTICA COMO FERRAMENTA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE

Introdução

As espécies pertencentes ao gênero *Alouatta* (Atelidae), são popularmente conhecidas como bugios. Este é o gênero de Platyrrhini com a maior área de distribuição geográfica, ocorrendo desde o Estado de Vera Cruz, no México, até o Estado do Rio Grande do Sul, no Brasil e Corrientes, na Argentina, englobando um número variado de formações vegetais e diversos biomas da América do Sul e da América Central (Gregorin, 2006), podendo viver em florestas primárias, florestas secundárias e em habitats altamente perturbados pela atividade humana, tais como fragmentos florestais de poucos hectares (Bicca-Marques, 2003; Bicca-Marques et al., 2011; Gilbert e Setz, 2001) e possui uma das maiores diversidades de espécies (De Oliveira et al., 2002).

Os bugios apresentam uma característica anatômica singular entre os Platyrrhini: um osso hioide desenvolvido com o corpo central oco formando uma câmara (Gregorin, 2006; Neville et al., 1988), que atua como um ressonador de sua vocalização característica (ronco), com o qual os indivíduos delimitam seu território e evitam confrontos intergrupais e à qual se refere seu nome popular em inglês (*howler monkey*), macaco-uivador (Bicca-Marques et al., 2011; Neville et al., 1988).

Alouatta caraya, *A. clamitans*, *A. puruensis* e *A. ululata* destacam-se ainda pela ocorrência de outra forma de dimorfismo sexual – o dicromatismo sexual – fenômeno muito raro entre os primatas (Auricchio, 1995; Bicca-Marques et al., 2011; Crockett, 1987; Gregorin, 2006). Os filhotes de ambos os sexos de *A. clamitans* nascem com uma pelagem com coloração semelhante à das fêmeas adultas, que nos machos muda de cor ao longo de seu desenvolvimento. As fêmeas adultas de *A. clamitans* são escuras, com coloração da pelagem dorsal e membros castanho-enegrecidos a castanho-avermelhados e os machos adultos tornam-se avermelhados em decorrência da liberação de um pigmento por glândulas apócrinas (Hirano et al., 2003), assumindo uma coloração que varia desde o ruivo profundo ao ruivo-amarelado (avelã), com membros e cauda mais escuros que o dorso (Gregorin, 2006).

No Brasil, *Alouatta clamitans* ocorre por toda a vertente Atlântica desde o extremo sul até o litoral e porção norte do Rio de Janeiro e a região do Rio Jequitinhonha e a Serra do Espinhaço em Minas Gerais e compreende desde a região serrana central do Estado do Rio Grande do Sul até São Paulo, exceto nas regiões norte e noroeste do último, habitando regiões de floresta pluvial sempre verde da costa Atlântica do leste do Brasil, florestas semidecíduas do interior do estado de São Paulo e as Matas de Araucária das regiões montanhosas dos estados da região sul do Brasil. A espécie ocorre também na região de Misiones, nordeste da Argentina e em simpatria com *A. caraya* em alguns pontos de sua distribuição, principalmente no nordeste da Argentina e nas regiões adjacentes à margem leste do Rio Paraná (Gregorin, 2006; Rylands et al., 1988, 1996).

A variabilidade cromossômica observada em *Alouatta clamitans* é bastante ampla, com indivíduos com $2n=45$ ou 46 procedentes da região Sul e indivíduos com $2n=49$ ou 50 procedentes da região Sudeste do Brasil (De Oliveira, 1996; De Oliveira et al., 2002; Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008; Koiffmann, 1977; Koiffmann e Saldanha, 1974), além de dois exemplares já descritos que apresentaram $2n=48$, procedentes dos municípios de Iguape/SP (Gifalli-lughetti, 2008) e de Registro/SP (Koiffmann, 1977; Koiffmann e Saldanha, 1974), localizados no extremo sul do estado de São Paulo. O objetivo do presente trabalho foi o de estudar o cariótipo com técnicas de citogenética tradicional e molecular, de um exemplar fêmea de bugio apreendido pelo IBAMA e entregue ao DEPAVE-3 que apresentou características morfológicas divergentes das encontradas para os indivíduos de *Alouatta clamitans*, a espécie que ocorre na suposta região geográfica de origem deste espécime.

Material e métodos

A amostra de sangue periférico deste espécime de bugio é proveniente do DEPAVE-3 (Departamento de Parques e Áreas Verdes, Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre – São Paulo/SP), cadastro de origem 42937, supostamente procedente de Ibiúna/SP e foi cadastrado em nosso laboratório como M 455.

A coleta de sangue do animal foi realizada pelos veterinários

responsáveis. O animal submetido à coleta foi capturado por seus tratadores e anestesiado pelos médicos-veterinários responsáveis. Após a contenção do espécime e término dos procedimentos, ficou sob observação até o completo restabelecimento e foi realocado em seu recinto.

Para o estudo citogenético e citogenético molecular, aproximadamente 5 ml de sangue periférico foi retirado com seringa e imediatamente depositado em um tubo contendo heparina.

A cultura de linfócitos foi realizada de acordo com a técnica proposta por Moorhead et al. (1960) com modificações.

Para a análise convencional dos cromossomos coramos a lâmina com solução tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,03 M e NaH_2PO_4 0,03 M) ou tampão fosfato Sörensen (Na_2HPO_4 0,03 M e KH_2PO_4 0,03 M) e Giemsa (Merck) por aproximadamente 5 minutos e lavamos em água corrente, deixando-a secar a temperatura ambiente.

Para uma melhor precisão na identificação dos cromossomos, empregamos a técnica de bandamento G descrita por Seabright (1971) com modificações.

As análises foram realizadas em microscópio Axiophot 2 Motorizado (Zeiss), as imagens foram capturadas com uma vídeo-câmera CCD de alta resolução e os cariótipos foram montados com o programa IKAROS V 5.4.9 (MetaSystems).

A técnica de bandamento CBG empregada foi a de Sumner (1972) modificada.

Para a visualização das regiões organizadoras de nucléolo, foi empregada a técnica descrita por Howell e Black (1980), com modificações.

As metáfases foram analisadas em um microscópio Axiophot 2 Motorizado (Zeiss), capturadas com o auxílio de uma vídeo-câmera CCD de alta resolução e cariotipadas utilizando-se o programa da Metasystems IKAROS V 5.4.9.

As sondas das bibliotecas dos cromossomos humanos derivadas pela citometria de fluxo (*Human Paints NCBI*) foram reamplificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) [2µl Taq DNA polimerase buffer, 2µl dNTP's (2mM), 1µl MgCl_2 (50mM), 11,5µl água Mili-Q estéril, 2µl 6-MW Primer (10mM), 0,5µl Taq

DNA polimerase e 1µl de DNA molde (sonda)], com um perfil de 35 ciclos em alta temperatura: 96°C por 5 minutos, 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 2 minutos, uma extensão final a 72°C por 7 minutos e 4°C ∞.

Para a utilização das sondas amplificadas das bibliotecas dos cromossomos humanos derivadas pela citometria de fluxo (*Human Paints NCBI*) em experimentos de FISH, estas foram marcadas por "nick translation" usando os kits Biotin-Nick translation mix ou DIG-Nick translation mix, ambos da Roche, conforme a orientação do fabricante.

As sondas amplificadas por PCR e marcadas foram precipitadas antes de serem utilizadas para a FISH, a fim de eliminar os restos de sais e produtos da PCR. Em um tubo de microcentrífuga foi aliquotado o produto da reação final obtida com a marcação, Human COT-1 DNA (Invitrogen), NaAc (3M) gelado correspondente a 10% do volume total de DNA (sonda+COT) e EtOH 100% gelado (2,5x o volume total de DNA) e deixado *overnight* no freezer. As sondas foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos em uma velocidade de 13000RPM e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Em seguida, 150µl de etanol 70% gelado foram adicionados e a centrifugação foi repetida nas mesmas condições por 15 minutos. O sobrenadante novamente foi retirado e a sonda de DNA foi colocada para secar em estufa a 37°C por aproximadamente uma hora.

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada com as sondas de pintura de todos os cromossomos derivados pela citometria de fluxo, em metáfases humanas para confirmar a eficiência da reamplificação pela PCR e em seguida em metáfases do exemplar M 455, com exceção da sonda do cromossomo Y, por se tratar de um espécime fêmea e das sondas dos cromossomos 3, 5, 7 e 21 (foram utilizadas as sondas comerciais destes cromossomos). As sondas derivadas pela citometria de fluxo, marcadas e ressuspendidas em meio de hibridação, foram deixadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos, aquecidas em água a 98°C por 10 minutos e, em seguida, colocadas em banho-maria a 37°C para a pré-hibridação por 30 minutos.

Antes da desnaturação das lâminas, um pré-tratamento foi realizado com 100µl de RNase (100µg/ml) por uma hora em estufa a 37°C. Então, as lâminas foram colocadas em três banhos de 2XSSC a temperatura ambiente

por 5 minutos cada e desidratadas em série de etanol 70%, 85% e 100% por 3 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram submetidas a um banho de pepsina 0,005% por 10 minutos a 37°C e 2 banhos de PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar, foram colocadas novamente em séries de etanol 70%, 85% e 100% por 3 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se a desnaturação por 2 minutos a 72°C em solução de formamida 70% e, novamente, foram desidratadas em séries de etanol 70%, 85% e 100% gelados por 3 minutos cada. Então, foram incubadas a 37°C, *overnight* para lâminas de material humano ou por 6 dias para o material deste primata. Após o tempo de hibridação, as lâminas foram lavadas em solução de formamida 50% e 2XSSC por 3 minutos cada a 37°C e, por fim, em PBT (100ml de 20xSSC, 400ml de água destilada e 250µl de Tween-20) por 5 minutos a temperatura ambiente.

As sondas marcadas com Digoxigenina foram detectadas com Antidigoxigenina-Rodamina e as sondas marcadas com Biotina foram detectadas com Avidina-FITC por 45 minutos a 37°C e, em seguida, as lâminas foram submetidas a 3 banhos de PBT a 37°C por 3 minutos cada e coradas com DAPI (4,6 diamidina-2-phenylindole) mais Vectashield (Vector Laboratories).

A técnica de FISH também foi empregada conforme indicado pelo fabricante das sondas de DNA "painting" dos cromossomos 3, 5, 7 e 21 humanos (Cytocell).

As lâminas foram analisada em um microscópio Axiophot 2 Motorizado (Zeiss) e as metáfases foram capturadas em coloração DAPI e com os filtros RHO e FITC para a observação das marcações. As imagens foram capturadas com o auxílio de uma vídeo-câmera CCD de Alta Resolução e do programa ISIS V 5.4.9 (MetaSystems).

Resultados

O exemplar fêmea de *Alouatta* sp. que foi cadastrado em nosso laboratório como M 455 (fotos 1 a 3) e como procedente do município de Ibiúna/SP, conforme informado pelo órgão de origem da amostra, apresentou despigmentação da pele na região anterior do pescoço e na porção

posterior dos braços e uma coloração de pelagem que não é característica de fêmeas de *Alouatta clamitans*, a espécie de bugio que ocorre nesta região geográfica. Apresentou ainda o peso (6,750Kg) superior ao peso médio encontrado para as fêmeas desta espécie recebidas no DEPAVE-3 (3,6Kg) e também superior ao peso máximo verificado para uma destas fêmeas (5,3Kg).

Fotos 1 a 3: Espécime fêmea de bugio (M 455) anestesiado. Face e vistas dorsal e ventral, respectivamente, apresentando características fenotípicas divergentes das verificadas para as fêmeas de *Alouatta clamitans*.

O estudo cromossômico com coloração convencional revelou 50 cromossomos divididos em 24 metacêntricos ou submetacêntricos (incluindo o par de cromossomos X) e 26 cromossomos acrocêntricos (figura 101).

Figura 101: Cariótipo em coloração convencional da fêmea M 455, com $2n=50$. As setas indicam os pares heteromórficos 7 e 8.

O bandamento GTG está apresentado na figura 102:

Figura 102: Cariótipo em bandamento GTG da fêmea M 455, com $2n=50$. A seta indica uma inversão paracêntrica em um dos cromossomos do par 15.

A análise com bandamento CBG pode ser vista na figura 103.

Figura 103: Cariótipo em bandamento CBG da fêmea M 455, com $2n=50$. As setas indicam os blocos heterocromáticos extracentroméricos.

A análise em bandamento Ag-NOR está apresentada na figura 104.

Figura 104: Metáfase em bandamento Ag-NOR da fêmea M 455. As setas indicam os cromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolo (um dos cromossomos do par 5 e os pares 17 e 20).

A técnica de FISH (Hibridação *In Situ* Fluorescente) foi empregada em metáfases do espécime fêmea M 455, com as sondas de biblioteca de todos os cromossomos humanos derivadas pela citometria de fluxo (*Human Paints NCBI*), com exceção das sondas dos cromossomos 5 e 21. Estas sondas foram reamplificadas por PCR, marcadas por "nick translation" e precipitadas, conforme protocolos descritos anteriormente. Além destas, sondas de "painting" comerciais dos cromossomos 3, 5, 7 e 21 (Cytocell) também foram usadas. Como as associações sintênicas 3/21 e 5/7 são consideradas ancestrais, de mamíferos placentários e primatas do Novo Mundo respectivamente, tínhamos como propósito testar as sintenias em hibridações duplas.

O resumo dos resultados obtidos está apresentado no Quadro VII.

Quadro VII – Resultados obtidos com a técnica de FISH aplicada em metáfases do indivíduo M 455:

Sonda	Número de pares hibridados	Número de sinais visualizados
1 (FS)	4	8
2 (FS)	2	4
3 (©)	2	6
4 (FS)	3	6
5 (©)	1	2
6 (FS)	1	4
7 (©)	2	4
8 (FS)	2	4
9 (FS)	1	2
10 (FS)	2	6
11 (FS)	1	2
12 (FS)	1	2
13 (FS)	1	2
14 (FS)	1	2
15 (FS)	3	6
16 (FS)	2	6
17 (FS)	1	2
18 (FS)	1	2
19 (FS)	1	2
20 (FS)	1	2
21 (©)	1	2
22 (FS)	1	2
X (FS)	1	2

FS = sondas derivadas pela citometria de fluxo; © = sondas comerciais (Cytocell).

Os resultados obtidos após a realização da técnica de FISH estão apresentados nas figuras 105 a 118:

Figura 105: **a)** Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 2 (verde) e 11 (vermelho). As setas apontam as marcações.

Figura 106: **a)** Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 3 (verde) e 21 (vermelho). As setas apontam as marcações. Em detalhe o par cromossômico de outra metáfase com as duas marcações da sonda HSA 3.

a)

b)

Figura 107: **a)** Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 4 (vermelho) e HSA X (verde). As setas apontam as marcações.

a)

b)

Figura 108: **a)** Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 5 (verde) e 7 (vermelho); setas apontam as marcações.

Figura 109: **a)** Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 6 (vermelho). As setas indicam as marcações.

Figura 110: **a)** Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 8 (verde) e 17 (vermelho); setas apontam as marcações.

a)

b)

Figura 111: a) Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. b) Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 9 (verde) e 12 (vermelho). As setas indicam as marcações.

a)

b)

Figura 112: Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. b) Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 10 (verde) e 16 (vermelho) humanos. Setas apontam todas as marcações.

a)

b)

Figura 113: Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 13 (verde) e HSA 19 (vermelha). As setas mostram os sinais obtidos.

a)

b)

Figura 114: Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 14 (verde) e HSA 15 (vermelho); setas apontam as marcações.

Figura 115: Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 18 (vermelho) e 22 (verde). As setas apontam as marcações.

Figura 116: Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 20 (vermelho). As setas apontam as marcações.

Figura 117: Metáfase da fêmea M 455 em escala de cinza. **b)** Mesma metáfase hibridada com as sondas dos cromossomos HSA 1 (vermelho) e 15 (verde). As setas apontam as marcações.

A figura 118 representa o cariótipo em bandamento G do indivíduo M 455 com as indicações das regiões homeólogas aos cromossomos humanos, identificadas através da técnica de FISH.

Figura 118: Cariótipo com banda G do indivíduo M 455. As barras indicam o tamanho e a localização das homeologias encontradas após a FISH de cada sonda de pintura dos cromossomos humanos.

Discussão

Análises citogenéticas foram realizadas em metáfases da fêmea M 455 que foi cadastrada em nosso laboratório como procedente do município de Ibiúna/SP, porém, conforme referido anteriormente, apresentou características morfológicas que não são características de fêmeas de *Alouatta clamitans*, a espécie de bugio que ocorre nesta região geográfica.

Esta fêmea foi analisada com as técnicas de citogenética tradicional (coloração convencional e bandamentos GTG, CBG e Ag-NOR) e experimentos de FISH foram realizados com todas as sondas de pintura dos cromossomos humanos, com exceção do cromossomo Y, por tratar-se de uma exemplar fêmea.

A heterocromatina constitutiva foi observada nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos e em blocos extracentroméricos nas regiões distais dos braços curtos dos cromossomos dos pares 4 e 5, região proximal do braço longo dos cromossomos 15, com um bloco mais distal em um dos cromossomos com relação ao seu par devido a uma inversão paracêntrica (figuras 102 e 103), e região intersticial do braço longo dos cromossomos que formam o par 17. Tanto na literatura (De Oliveira *et al.*, 1998) quanto nos espécimes de *Alouatta clamitans* que foram analisados com esta técnica em nosso laboratório (Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008), observa-se uma variabilidade muito grande na quantidade e localização dos blocos de heterocromatina extracentromérica, com exceção de um que está localizado na porção distal dos braços curtos do par 2 de todos os exemplares. Porém, em M 455 este bloco está ausente, com a presença de um muito semelhante na região distal dos braços curtos do par 5.

A literatura reporta, para *Alouatta clamitans* ($2n=45$ e 49), dois pares de cromossomos acrocêntricos pequenos com regiões organizadoras de nucléolo (NORs), ambos na região proximal do braço longo (De Oliveira *et al.*, 1998, 1999). Em M 455, observamos que as NORs estão localizadas na região proximal do braço longo de dois pares de cromossomos acrocêntricos, um pequeno e o outro de tamanho médio (com uma localização mais proximal que a de seu homólogo), e na região proximal do braço curto de um cromossomo submetacêntrico de tamanho médio (figura 104). Embora o gênero *Alouatta* represente um caso de variação cromossômica entre os primatas neotropicais, com diferentes sistemas cromossômicos de determinação sexual, cromossomos supranumerários e variação interespecífica e intraespecífica do número diploide, esta análise reforça a existência de inúmeras divergências entre o cariótipo da fêmea M 455 e o dos indivíduos de *A. clamitans* já estudados.

As sondas de pintura dos cromossomos humanos foram hibridadas em metáfases deste bugio e as regiões homeólogas aos cromossomos humanos encontradas estão listadas abaixo:

- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 2 e 11 humanos ("flow sorting"): o homeólogo ao HSA (*Homo sapiens*) 2

(marcação verde) se encontra em toda a extensão do braço longo do par cromossômico 3, um submetacêntrico de tamanho grande, e nas regiões proximal e intersticial do braço longo do par 12, o maior par de cromossomos acrocêntricos, enquanto o homeólogo ao HSA 11 (sinal vermelho) marcou em quase toda a extensão do braço curto do par 1, o maior par de submetacêntricos, com exceção da região proximal (figura 105).

- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 3 e 21 humanos (Cytocell): o homeólogo ao HSA 3 (sinal verde) mostrou seis sinais em dois pares de cromossomos acrocêntricos de tamanho médio, sendo todo o braço longo do par 15 e as regiões intersticial e distal e outra marcação na região proximal do braço longo do par 17; enquanto o homeólogo ao HSA 21 (sinal vermelho) marcou em uma região intersticial do braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos de tamanho médio, o par 18 (figura 106).
- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 4 e X humanos ("flow sorting"): a homeologia com o HSA 4 (marcação vermelha) está em todo o braço longo de um par de submetacêntricos grandes, o par 4, em toda a extensão do par 11, um par de submetacêntricos pequenos, com exceção da região centromérica, e na região proximal dos braços longos de um par de acrocêntricos de tamanho médio, o par 19. Já, a homeologia com o HSA X se encontra em todo o par de cromossomos X, submetacêntricos de tamanho médio, com exceção do centrômero (figura 107).
- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 5 e 7 humanos (Cytocell): o cromossomo 5 humano (marcação verde) é homeólogo à praticamente toda a extensão do braço longo do maior par de cromossomos submetacêntricos, o par 1, com exceção da região distal que hibridou com a sonda do 7 (sinal vermelho). Outro par de acrocêntricos de tamanho médio, o par 13, também foi marcado pela sonda do cromossomo 7 humano em todo o braço longo (figura 108).

- Hibridação com a sonda de pintura do cromossomo 6 humano ("flow sorting"): a hibridação desta sonda (sinal vermelho) mostrou uma marcação em quase todo o braço longo, com exceção da região proximal, e outra na região proximal do braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos grandes, o par 5, fornecendo 4 marcações por metáfase (figura 109).

- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 8 e 17 humanos ("flow sorting"): a técnica de FISH com estas sondas mostrou que a região homeóloga ao cromossomo 8 humano (verde) está localizada no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos de tamanho médio, o par 8, e em toda a extensão do braço longo de um par de cromossomos acrocêntricos de tamanho médio, o par 16; um outro par de cromossomos submetacêntricos de tamanho médio, o par 9, foi marcado pela sonda do 17 (vermelha), com exceção da região centromérica (figura 110).

- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 9 e 12 humanos ("flow sorting"): a hibridação destas sondas mostrou que a sonda do 9 (verde) marcou em quase todo o braço curto de um par de cromossomos metacêntricos grandes, o par 2, com exceção da região proximal, enquanto o braço longo deste mesmo par cromossômico foi hibridado pela sonda de pintura do cromossomo 12 humano (vermelha), também com exceção da região proximal (figura 111).

- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 10 e 16 humanos ("flow sorting"): observamos que a região homeóloga ao cromossomo 10 (marcação verde) está localizada nas regiões proximal do braço curto e intersticial e distal do braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos de tamanho médio, o par 7, com a região distal do braço curto e proximal do braço longo destes cromossomos marcadas pela sonda do cromossomo 16 (sinal vermelho), com exceção da região centromérica, mostrando um padrão 16/10/16/10. Outro sinal da

sonda total do cromossomo 10 humano foi encontrado em todo o braço longo de um par acrocêntrico pequeno, o par 22. Outra marcação com a sonda de pintura do cromossomo 16 humano foi localizada em na região proximal do braço curto de um par submetacêntrico grande, o par 4 (figura 112).

- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 13 e 19 humanos ("flow sorting"): esta hibridação mostrou que a sonda do cromossomo 13 humano (verde) marcou todo o braço longo de um par acrocêntrico de tamanho médio, o par 14, e a sonda do cromossomo 19 humano (vermelha) marcou toda a extensão de um par de submetacêntricos pequenos, o par 10, com exceção da região centromérica (figura 113).
- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 14 e 15 humanos ("flow sorting"): os resultados obtidos com esta hibridação nos mostraram que a sonda do cromossomo 14 humano (verde) marcou nas regiões intersticial e distal do braço longo de um par de submetacêntricos de tamanho médio, o par 6, junto à região homeóloga ao cromossomo 15 (vermelha) na região proximal destes mesmos braços cromossômicos. Os outros sinais obtidos com a sonda HSA 15 estavam localizados em dois pares de cromossomos acrocêntricos, um de tamanho médio (par 19) e o outro pequeno (par 24), sendo uma marcação nas regiões intersticial e distal do braço longo do primeiro par e a outra em toda a extensão do braço longo do segundo par (figura 114).
- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 18 e 22 humanos ("flow sorting"): A sonda do cromossomo 18 (vermelha) marcou em toda a extensão do braço longo de um par de cromossomos submetacêntricos de tamanho médio, o par 8, e a sonda HSA 22 hibridou em toda a extensão do braço curto de um par submetacêntrico de tamanho médio, o par 6 (figura 115).
- Hibridação com a sonda de pintura do cromossomo 20 humano ("flow sorting"): esta sonda hibridou na região terminal do braço longo do maior

par de cromossomos acrocêntricos, o par 12 (figura 116).

- Hibridação dupla com as sondas de pintura dos cromossomos 1 e 15 humanos ("flow sorting"): Para confirmar a extensão das marcações da sonda HSA 15, foi realizada uma segunda hibridação, desta vez em dupla com a sonda HSA 1. Os resultados obtidos com esta hibridação nos mostraram que a sonda do cromossomo 1 humano (vermelho) marcou em praticamente toda a extensão do braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos de tamanho grande, o par 3, com exceção de uma pequena região proximal, em toda a extensão dos braços longos de dois pares de cromossomos acrocêntricos pequenos (pares 20 e 23) e nas regiões proximal e intersticial de um par de cromossomos acrocêntricos pequenos, o par 21, revelando no total, oito sinais. As marcações da sonda HSA 15 (verde) foram idênticas às verificadas na figura 112: na região proximal de um par de submetacêntricos de tamanho médio, o par 6, e em dois pares de cromossomos acrocêntricos, um de tamanho médio (par 19) e o outro pequeno (par 24), sendo uma marcação nas regiões intersticial e distal do braço longo do primeiro par e a outra em toda a extensão do braço longo do segundo par (figura 117).

Para *Alouatta clamitans*, existe um relato de hibridação com sondas de pintura dos cromossomos humanos em um espécime macho com 45 cromossomos (De Oliveira et al., 2002; figura 119) e outro com a hibridação das sondas totais dos cromossomos 14 e 15 humanos em uma fêmea com $2n=50$ (Gifalli-lughetti e Koiffmann, 2009a). De Oliveira et al. (2002) também publicou os resultados de hibridação em *Alouatta fusca* ($2n=49$) (figura 119), espécie filogeneticamente mais próxima de *A. clamitans*, que ocorre na metade norte da Mata Atlântica.

Figura 119: A) Cariótipo com banda G de *Alouatta clamitans* com as regiões cromossômicas homeólogas humanas a direita (no detalhe os cromossomos sexuais observados na fêmea de *A. fusca*). **B)** Resumo dos cromossomos que diferem entre *A. clamitans* ($2n = 45$) e *A. fusca* ($2n = 49$) por rearranjos Robertsonianos (De Oliveira et al., 2002 – modificado).

A comparação entre o padrão de hibridação das sondas humanas de pintura cromossômica observado para o indivíduo M 455 (figura 118) e o verificado na literatura para *A. clamitans* (figura 119) nos mostrou o seguinte:

- Par 1 (M 455): é homeólogo aos cromossomos 11 e 5 e a segmentos do cromossomo 7 humano, com a região proximal do braço curto sem homeologia; enquanto que nos espécimes analisados por De Oliveira *et al.* (2002) este par é homeólogo a segmentos dos cromossomos 2, 4, 15, 7 e 5 humanos.
- Par 2 (M 455): este par é homeólogo aos cromossomos 9 e 12 humanos, com a região proximal do braço curto sem marcação. No espécime de *A. fusca* analisado por De Oliveira *et al.* (2002), os pares 12 e 10 são homeólogos aos cromossomos humanos 9 e 12, respectivamente. Portanto, o par 2 de M 455 representa um fusão destes dois cromossomos, como encontrado no par 3 de *A. clamitans* (De Oliveira *et al.*, 2002), além de outros segmentos ainda não determinados que fizeram com que este cromossomo de M 455 se tornasse metacêntrico.
- Par 3 (M 455): apresenta o braço longo homeólogo à segmentos do cromossomo 2 humano e o braço curto foi hibridado por segmentos do cromossomo HSA1, enquanto que o exemplar de *A. clamitans* analisado por De Oliveira *et al.* (2002), não possui nenhum par cromossômico homeólogo a porções destes dois cromossomos humanos.
- Par 4 (M 455): com homeologia à segmentos do cromossomo 16 humano na região proximal do braço curto e à segmentos do cromossomo 4 humano no braço longo. A região distal do braço curto não possui correspondência com cromossomos humanos e é portadora de um bloco heterocromático extracentromérico (figura 103). Para os espécimes da literatura, estas homeologias foram estabelecidas para o cromossomo 11 e região proximal do braço longo do par 1, respectivamente.
- Par 5 (M 455): é homeólogo ao cromossomo 6 humano, com a sentença interrompida. De Oliveira *et al.* (2002) atribuiu esta homeologia às regiões proximais dos braços curto e longo do par 2, com a região distal do braço curto sem correspondência por se tratar de um bloco de heterocromatina extracentromérica. Com isso, confirmamos a hipótese levantada com a análise cariotípica em bandamento CBG de que este bloco estaria presente na região distal do braço curto do par cromossômico 5 no cariótipo de M 455, que também não apresentou marcação.

- Par 6 (M 455): o braço curto deste par é homeólogo ao cromossomo 22 humano, enquanto que o braço longo é homeólogo ao cromossomo 14 e à segmentos do cromossomo 15 humano. A homeologia do braço curto está presente no mesmo braço do par 8 dos espécimes da literatura, enquanto as homeologias do braço longo de M 455 corresponde à região intersticial do braço longo do par 2 analisado por De Oliveira *et al.* (2002).
- Par 7 (M 455): apresenta a região distal do braço curto e proximal do braço longo homeólogas à segmentos do cromossomo 16 humano e a região proximal do braço curto e intersticial e distal do braço longo homeólogas à segmentos do cromossomo 10 humano. Para os exemplares analisados por De Oliveira *et al.* (2002), estas homeologias correspondem ao braço longo do cromossomo 8 e ao cromossomo 19.
- Par 8 (M 455): este par tem homeologia no braço curto com segmentos do cromossomo 8 humano e no braço longo com o cromossomo 18 humano. Esta mesma sentença foi encontrada no par 4 dos espécimes da literatura, porém associada ao cromossomo 17 humano, que em M 455 corresponde a um par de cromossomos separados, o par 9.
- Par 9 (M 455): possui homeologia com o cromossomo 17 humano, com exceção da região centromérica. Nos espécimes da literatura, a sonda do cromossomo 17 humano hibridou na região distal do braço longo do par 4.
- Par 10 (M 455): homeólogo ao cromossomo 19 humano, menos a região centromérica, e corresponde ao par cromossômico 7 dos exemplares analisados por De Oliveira *et al.* (2002).
- Par 11 (M 455): este par mostra homeologia com segmentos do cromossomo 4 humano e está representado nos cariótipos da literatura como o par cromossômico 10.
- Par 12 (M 455): a homeologia observada para este par corresponde a segmentos do cromossomo 2 humano na região proximal e intersticial do braço longo e do cromossomo 20 humano na região distal do braço longo. De Oliveira *et al.* (2002) observou a homeologia ao cromossomo 2 humano no braço curto do par 1 para os espécimes por eles analisados, e ao cromossomo 20 no em toda a extensão do braço longo do par 17.
- Par 13 (M 455): homeólogo à segmentos do cromossomo 7 humano, este par corresponde ao par 6 da literatura, porém com morfologia diferente,

sendo acrocêntrico no nosso espécime e submetacêntrico para os exemplares da literatura.

- Par 14 (M 455): homeólogo ao cromossomo 13 humano, corresponde ao par cromossômico 13 dos exemplares analisados por De Oliveira *et al.* (2002).
- Par 15 (M 455): este par é homeólogo a segmentos do cromossomo 3 humano e está representado nos cariótipos de De Oliveira *et al.* (2002) como o braço longo do par de cromossomos X₂.
- Par 16 (M 455): este par é homeólogo a segmentos do cromossomo 8 humano, assim como o par 18 dos indivíduos da literatura.
- Par 17 (M 455): a região proximal, bem como as regiões intersticial e distal do braço longo apresentaram homeologia com o cromossomo 3 humano, com um pequeno bloco heterocromático extracentromérico entre as marcações (figura 100). Nos exemplares da literatura, observamos mais dois sinais com a sonda do 3 humano: em um par de cromossomos acrocêntricos, em sintenia com a sonda do cromossomo 21 humano, e no braço longo de um par submetacêntrico (do sistema sexual múltiplo), que é heteromórfico no macho, juntamente com segmentos da sonda do 15 humano.
- Par 18 (M 455): apresenta homeologia com o cromossomo 21 humano na região intersticial do braço longo. Os espécimes da literatura mostram a homeologia deste cromossomo humano em sintenia com a sonda do 3, formando o par 16 (De Oliveira *et al.*, 2002). A sonda dos cromossomos humanos 3 e 21 foram hibridadas diversas vezes neste exemplar, porém a associação sintênica HSA 3/21, considerada ancestral de mamíferos placentários, não foi visualizada no bugio fêmea M 455.
- Par 19 (M 455): a homeologia com os cromossomos humanos observada para este par é formada por segmentos cromossômicos do 4 e 15. Esta mesma sintenia é vista na região intersticial do braço longo do par cromossômico 1 dos espécimes estudados por De Oliveira *et al.* (2002).
- Par 20 (M 455): possui o braço longo homeólogo à segmentos do cromossomo 1 humano e provavelmente ao par de cromossomos 9 da literatura. Apresenta também NOR na porção proximal do braço longo (figura 104)

- Par 21 (M 455): apresenta a região proximal do braço longo homeóloga à sonda HSA 1, enquanto que os bugios da literatura não apresentam este tipo de marcação parcial.
- Par 22 (M 455): apresentou homeologia com segmentos do cromossomo 10 humano e corresponde ao par 20 dos exemplares da literatura.
- Par 23 (M 455): homeólogo a segmentos do cromossomo 1 humano e corresponde ao par X₃ dos exemplares da literatura (De Oliveira *et al.*, 2002)
- Par 24 (M 455): homeólogo a segmentos do cromossomo 15 humano, que nos bugios analisados por De Oliveira *et al.* (2002) está associado a segmentos do cromossomo 3 humano, formando o cromossomo X₂ da fêmea e do macho, ou associado ao suposto cromossomo Y, compondo o cromossomo Y₁ do macho.
- Par X (M 455): homeólogo ao cromossomo X humano, que corresponde ao cromossomo X₁ dos espécimes da literatura.

Após os resultados obtidos, foi possível perceber que este indivíduo apresentava diferenças cromossômicas importantes quando comparado aos cariótipos de outros indivíduos de *Alouatta clamitans* já publicados na literatura e também já analisados em nosso laboratório (Koiffmann, 1972; Koiffmann e Saldanha, 1974, 1977; Koiffmann, 1977, 1982; Gifalli, 2003; Gifalli-lughetti, 2008), como por exemplo:

- Presença de um par de cromossomos com dois braços a mais do que o maior número de autossomos com esta morfologia já verificados (10 pares) e, conseqüentemente, um par de cromossomos acrocêntricos a menos, já que manteve o mesmo número diploide das fêmeas procedentes da região sudeste do Brasil desta espécie (2n=50);
- Diferenças na proporção dos braços curtos e longos dos pares 2, 3 e 4;
- Combinação de diferentes blocos sintênicos evidenciados pela técnica de FISH quando comparado ao exemplar macho com 2n=45 de *Alouatta clamitans* descrito por De Oliveira *et al.* (2002);
- Ausência de bloco heterocromático na região distal do braço curto do par cromossômico 2, verificado em todos indivíduos desta espécie já

analisados com bandamento CBG em nosso laboratório, enquanto que no indivíduo M 455, um bloco muito semelhante foi verificado na porção distal dos braços curtos do cromossomo 5.

Devido às diferenças cariotípicas observadas através da análise citogenética e morfológicas relatadas neste espécime, este animal foi destinado a cativeiro.

Considerando as diferenças encontradas entre o cariótipo do indivíduo M 455 e os demais *Alouatta clamitans* e os demais resultados das hibridações com as sondas dos cromossomos humanos divergentes dos dados obtidos por De Oliveira et al. (2002), resolvemos comparar os resultados da FISH desta bugio com os descritos na literatura para outras espécies do mesmo gênero (Consigliere et al., 1996, 1998; De Oliveira, 2001; De Oliveira et al., 2002; Mudry et al., 2001). Verificamos que os nossos resultados são muito similares aos descritos por Consigliere et al. (1998) para um exemplar macho de *Alouatta belzebul* (figura 120), com exceção da posição de alguns pares no ideograma e da extensão de algumas marcações.

Figura 120: Ideograma de *Aouatta belzebul* com as regiões cromossômicas homeólogas humanas a direita (Consigliere et al., 1998).

Quanto à posição no cariótipo, podemos notar que os cromossomos 4 e 5 estão com posições invertidas quando comparamos o cariótipo do indivíduo M 455 com o ideograma descrito por Consigliere et al. (1998). O mesmo ocorre para os pares 19 e 20.

Todas as homeologias com os cromossomos humanos verificadas com a técnica de FISH no indivíduo M 455 foram também identificadas por Consigliere et al (1998) no indivíduo de *Aouatta belzebul*, porém a sentença 3/21 presente no cromossomo 18 do espécime descrito na literatura não foi

verificada em nossos testes com as sondas comerciais de pintura cromossômica.

Apesar dos vários testes de FISH realizados, resultantes na não visualização da sintenia 3/21 para este espécime, ainda mais testes com a sonda do cromossomo 3 humano deverão ser realizados para confirmar ou refutar a ausência deste bloco sintênico neste espécime, já que se trata de uma sintenia considerada ancestral de mamíferos placentários, com exceção dos macacos do Velho-Mundo (Haig, 1999; Murphy et al., 2001; Frönicke, 2005).

Com base em análises geográficas e dados morfológicos, Gregorin (2006) elevou as subespécies do antigo "complexo *Alouatta belzebul*" (*Alouatta belzebul belzebul*, *A. b. discolor*, *A. b. nigerrima* e *A. b. ululata*) (Rylands et al., 1995) ao nível de espécie, sendo consideradas para este grupo, atualmente, as espécies *Alouatta belzebul*, *A. discolor* e *A. ululata*.

Entre estas espécies, segundo Gregorin (2006), *Alouatta ululata* apresenta como características diagnósticas o dicromatismo sexual (figura 121), com coloração da pelagem do macho negra brilhante com mãos, pés, extremidade da cauda e flancos ruivos a castanho-avermelhados e a fêmea com coloração parda-amarelada e pelos acinzentados esparsos, resultando em uma tonalidade olivácea.

Figura 121: Ilustrações, em vista dorsal, mostrando os padrões de coloração da pelagem no "complexo *A. belzebul*". Da esquerda para a direita: *A. discolor*, *A. belzebul*, *A. ululata* macho e *A. ululata* fêmea, demonstrando o dicromatismo sexual diagnóstico de *A. ululata* (Gregorin, 2006 - modificado).

Segundo Gregorin (2006), *Alouatta ululata* apresenta distribuição restrita ao norte do estado do Maranhão, Piauí e Ceará. A distribuição mais ao sul e oeste da espécie é a região limítrofe entre a vegetação de transição tipicamente aberta e a floresta pluvial amazônica. O limite de distribuição à leste coincide com o término da vegetação de transição e o início da Caatinga (figura 122).

Figura 122: Distribuição geográfica da espécie *Aouatta ululata* (Fonte: <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=918>).

As fotos do exemplar M 455 foram então enviadas por e-mail para o Prof. Dr. Renato Gregorin, um dos principais taxonomistas do gênero *Aouatta* do Brasil e autor do trabalho que elevou a subespécie *A. belzebul ululata* ao nível de espécie, *A. ululata* (Gregorin, 2006). Neste e-mail, foi solicitada ao professor Renato uma opinião baseada nas características morfológicas deste espécime, em adição aos nossos resultados obtidos a partir de estudos citogenéticos, e muito atenciosamente recebemos a seguinte resposta: “A pelagem amarelada meio olivácea é típica de fêmeas de *A. ululata*, embora elas apresentem certa variação, mas certamente não é *A. clamitans-fusca-guariba*, a não ser que seja uma variação que nunca observei em peles de museus. Elas sempre são escuras.... Também não parece ser de *A. caraya*, pois em geral elas apresentam uma faixa sagital no meio do dorso mais escura. Considerando a pelagem e a semelhança cariotípica tem grande chance de ser de fato *A. ululata*”.

Considerando as características morfológicas e cariotípicas do indivíduo M 455 divergentes das verificadas para os *Aouatta clamitans* já estudados, a similaridade de seu cariótipo ao descrito por Consigliere et al. (1998), a

presença de heterocromatismo como caráter diagnóstico da espécie *Alouatta ululata*, com as fêmeas mais claras do que os machos, e a esclarecedora opinião do Prof. Dr. Renato Gregorin, concluímos que a bugio M 455 provavelmente seja um indivíduo de *Alouatta ululata* e esta seria, portanto, a primeira descrição cariotípica de um exemplar desta espécie, até o momento indisponível na literatura.

Aparentemente, este se trata de mais um caso de retirada ilegal de animais da natureza, seguido de apreensão pelo IBAMA e encaminhamento ao DEPAVE-3 com histórico incerto de procedência do espécime. Esta retirada resultou na destinação do animal a um criadouro, impedindo o cumprimento de seu papel ecológico, além da privação de sua liberdade.

Sendo assim, a citogenética mostrou-se uma importante ferramenta para a luta contra o tráfico de animais, para a identificação da espécie e da correta origem geográfica do indivíduo, além de ter contribuído para evitar a introdução na fauna do município de São Paulo de um exemplar não endêmico desta região, o que poderia ter resultado em sérios prejuízos para a fauna local, que já se encontra restrita a pequenos fragmentos florestais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AURICCHIO, P. Primatas do Brasil. **Terra Brasilis eds.** São Paulo, Brasil, 1995.
- BICCA-MARQUES, J. C.; GARBER, P. A. Experimental field study of the relative costs and benefits to wild tamarins (*Saguinus imperator* and *S. fuscicollis*) of exploiting contestable food patches as single-and mixed-species troops. **American Journal of Primatology**, Hoboken, v. 60, n.4, p. 139-153, 2003.
- BICCA-MARQUES, J. C.; SILVA, V. M. da; GOMES, D. F. Ordem Primates. In: REIS, N. R. dos; PERACCHI, A. L; PEDRO, W. A; LIMA, E. P (Ed.). **Mamíferos do Brasil**. 2. ed. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2011. p. 107-150.
- CONSIGLIERE, S.; STANYON, R.; KOEHLER, U.; ARNOLD, N.; WIENBERG, J. *In situ* hybridization (FISH) maps chromosomal homologies between *Alouatta belzebul* (Platyrrhini, Cebidae) and other primates and reveals extensive interchromosomal rearrangements between howler monkey genomes. **Am. J. Primatol.** 46: 119-133, 1998.
- CONSIGLIERE, S.; STANYON, R.; KOEHLER, U.; AGORAMOORTHY, G.; WIENBERG, J. Chromosome painting defines genomic rearrangements between red howler monkey subspecies. **Chromosome Res.** 4: 264-270, 1996.

- CROCKETT, C. M. Diet, dimorphism and dography; Perspectives from howlers to hominids. In KINZEY, W. G. (Ed.). The Evolution of Human Behavior: Primate models, **Nem York: State university of New York Press**, 1987. P. 115-135.
- DE OLIVEIRA, E. H. C.; LIMA, M. M. C.; SBALQUEIRO, I. J.; PISSINATTI, A. The karyotype of *Alouatta fusca clamitans* from Rio de Janeiro State, Brazil: evidence for a Y-autosome translocation. **Genet. Mol. Biol.** 31: 361-364, 1998.
- DE OLIVEIRA, E. H. C.; LIMA, M. M. C.; SBALQUEIRO, I. J.; SILVA, A. S. F. Analysis of polymorphic NORs in *Alouatta* species (Primates, Atelidae). **Caryologia** 52: 169-175, 1999.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; NEUSSER, M.; FIGUEIREDO, W. B.; NAGAMACHI, C.; PIECZARKA, J.C.; SBALQUEIRO, I. J.; WIENBERG, J.; MÜLLER, S. The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. **Chromosome Res.** 10: 669-683, 2002.
- DE OLIVEIRA, E. H. C. Estudos citogenéticos e evolutivos nas espécies brasileiras e argentinas do gênero *Alouatta* Lacépède 1799 (Primates, Atelidae). Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 1996.
- DE OLIVEIRA, E. H. C. Filogenia da subfamília Atelinae (Primates, Platyrrhini): análise comparativa por pintura cromossômica multicolor. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001
- FRÖNICKE, L. Origins of primate chromosomes – as delineated by Zoo-FISH and alignments of human and mouse draft genome sequences. **Cytogenet. Genome Res.** 108: 122-138, 2005.
- GIFALLI-IUGHETTI, C.; KOIFFMANN, C. P. Synteny of human chromosomes 14 and 15 in the platyrrhines (Primates, Platyrrhini). **Genet. Mol. Biol.** 32: 786-791, 2009a.
- GIFALLI-IUGHETTI, C.; KOIFFMANN, C. P. The Y chromosome of the *Atelidae* family (Platyrrhini): study by chromosome microdissection. **Cytogenet. Genome Res.** 125: 46-53, 2009b.
- GIFALLI, C. C. Estudo da variabilidade cariotípica em *Platyrrhini* (Primates) e da homeologia com o cromossomo 15 humano. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- GILBERT, K. A.; SETZ, E. Z. F. Primates in a fragmented landscape: Six species in Cenral Amazonia. In: BIER-Regaard, R. O. et al (Ed.). Lessons from Amazonia: The Ecology and Conservation of a Fragmented Forest. **New Haven: yale University Press**, 2001. P. 262-270.
- GREGORIN R. Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. **Rev. Bras. Zool.** 23: 64-144, 2006.
- HAIG, D. A brief history of human autosomes. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B** 354: 1447-1470, 1999.
- HIRANO, Z. M. B. ET AL. Morphology of epidemal glands resposible for the release of colored secretionsin Aloutta guariba damitans. **Laboratory Primate Newsletter, Providence**, v. 42, p. 4-7, 2003.

- HOWELL, W.M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36: 1014-1015, 1980.
- KOIFFMANN, C. P.; SALDANHA, P. H. Cytogenetics of Brazilian monkeys. **J. Hum. Evol.** 3: 275-282, 1974.
- KOIFFMANN, C. P. Citogenética de símios brasileiros. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.
- KOIFFMANN, C. P.; SALDANHA, P. H. Importância do estudo cromossômico em macacos sul-americanos. **Ciencia e Cultura** 29: 162-170, 1977.
- KOIFFMANN, C. P.; SALDANHA, P. H. Karyotypic studies in *Atelinae* monkeys. **Rev. Brasil. Genet.** 4: 773-792, 1982.
- OORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocyte cultures from human peripheral blood. **Exp. Cell. Res.** 20: 613-616, 1960.
- MUDRY, M. D.; RAHN, I. M.; SOLARI, A. J. Meiosis and chromosome painting of sex chromosome systems in Ceboidea. **Am. J. Primatol.** 54: 65-78, 2001.
- MURPHY, W. J.; STANYON, R.; O'BRIEN, S. J. Evolution of mammalian genome organization inferred from comparative gene mapping. **Genome Biol.** 2: 2001.
- NEVILLE, M. K. et. al. The howling monkeys, genus *Alouatta*. In: MITTERMEIER, A. et al. (Ed.) Ecology and Behavior of Neotropical Primates, vol. 2. **Washington: World Wildlife Fund**, 1988. P. 349-453.
- RYLANDS, A. B.; FONSECA, G. A. B. da.; LEITE, Y. L. R.; MITTERMEIER, R. A. M. Primates of the Atlantic Forest: Origin, distributions, endemism, and communities. In: **Adaptive Radiations of Neotropical Primates**, M. Norconk, A. L. Rosenberger and P. A. Garber (eds.), Plenum Press, New York, 21-51, 1996.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; RODRÍGUEZ-LUNA, E. A species list for the New World primates (Platyrrhini): distribution by country, endemism, and conservation status according to the Mace-Land System. **Neotropical Primates**, Washington, 3: 113-160, 1995.
- SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosome. **Lancet** 2: 971-972, 1971.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell. Res.** 75: 304-306, 1972.

Foto: Juliana Laurito Summa

8. CONCLUSÕES

- Foi observada grande variabilidade cromossômica entre os 50 espécimes de *Alouatta clamitans* analisados. A análise cariotípica das fêmeas revelou três diferentes números diploides ($2n=46$, 48 e 50) e cinco distintas fórmulas cromossômicas, enquanto que para os machos foram encontrados dois números diploides distintos ($2n=45$ e 49) e sete fórmulas cromossômicas diferentes;
- A redução de um cromossomo no número diploide dos machos em relação às fêmeas é devido à ausência aparente do cromossomo Y, decorrente de uma translocação Y-autossomo;
- Apesar dos pequenos fragmentos florestais remanescentes existentes na região da Grande São Paulo, nossos resultados mostraram a presença de variabilidade genética nestas populações, indicando que a fragmentação ainda não levou ao isolamento genético destes grupos, porém estudos envolvendo um maior número de indivíduos e também a aplicação de outras técnicas serão importantes para confirmar ou refutar esta hipótese;
- Foi verificado para *Alouatta clamitans* o sistema sexual múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2X_3X_3/X_1X_2X_3Y_1Y_2$, corroborando os dados de De Oliveira et al. (2002);
- Os rearranjos que alteram a morfologia dos cromossomos e, conseqüentemente, as fórmulas cromossômicas sem alterar o número diploide, não devem ser determinantes para uma prole bem sucedida. Entretanto, múltiplas inversões envolvendo vários cromossomos podem ter um efeito cumulativo, com força potencial para se tornar um mecanismo de isolamento pós-zigótico efetivo. Entre os indivíduos analisados, foram encontrados no máximo quatro pares heteromórficos por espécime.
- Com a análise dos cariótipos em conjunto à procedência geográfica dos exemplares analisados, corroboramos a tendência à redução do número diploide orientada no sentido norte-sul proposta por De Oliveira (1996).
- Esta é a primeira descrição citogenética molecular com a hibridação de todas as sondas de cromossomos humanos em exemplares com $2n=48$, 49 e 50 de *Alouatta clamitans*. A aplicação desta técnica foi de

extrema importância para a verificação da variabilidade interespecífica e intrapopulacional desta espécie.

- As principais diferenças cariotípicas observadas com a técnica de FISH entre os exemplares de *Alouatta clamitans* procedentes da região sudeste e os da região sul do Brasil são as mesmas observadas entre indivíduos de *A. clamitans* e *A. fusca*, que compreendem espécies distintas, indicando a necessidade de uma revisão taxonômica para este grupo.
- Alguns cromossomos que apresentaram diferentes morfologias entre os espécimes analisados e foram responsáveis pelas diferentes fórmulas cromossômicas observadas, apresentaram regiões que não foram hibridadas por quaisquer sondas humanas.
- O padrão de hibridação das sondas humanas de pintura cromossômica observado para um exemplar fêmea com $2n=48$, procedente de Iguape/SP nos mostrou que este exemplar possui tanto cromossomos típicos dos indivíduos procedentes da região sul do Brasil, quanto os típicos dos exemplares de *A. clamitans* procedentes do estado de São Paulo, comprovando que este exemplar é resultante do acasalamento de indivíduos portadores de diferentes cariótipos, com um dos genitores com $2n=45♂$ ou $46♀$ e outro com $2n=49♂$ ou $50♀$. Este complemento cromossômico levaria a formação de dois trivalentes durante a divisão meiótica, com conseqüentes implicações causadas para a formação dos gametas, que poderiam reduzir ou impedir a fertilidade dos indivíduos portadores deste cariótipo, constituindo um mecanismo de isolamento pós-zigótico. Este é mais um indicador de que as populações das regiões sul e sudeste do Brasil já estão isoladas a ponto de constituírem espécies diferentes.
- A citogenética também mostrou-se uma importante ferramenta para a identificação da espécie e da correta origem geográfica de um exemplar fêmea de bugio apreendido pelo IBAMA e entregue ao DEPAVE-3 que apresentou características morfológicas divergentes das encontradas para os indivíduos de *Alouatta clamitans*, a espécie que ocorre na suposta região geográfica de origem deste espécime. Foi possível concluir que a bugio M 455 provavelmente é um indivíduo de

Alouatta ululata e esta seria, portanto, a primeira descrição cariotípica de um exemplar desta espécie, restrita geograficamente ao norte do estado do Maranhão, Piauí e Ceará.

- A análise citogenética também contribuiu para evitar a introdução na fauna do município de São Paulo de um exemplar não endêmico desta região, o que poderia ter resultado em sérios prejuízos para a fauna local, que já se encontra restrita a pequenos fragmentos florestais;
- Através deste projeto também contribuimos para a reintrodução à natureza de vários indivíduos que fizeram parte do Projeto “Manejo e Conservação do Bugio, *Alouatta clamitans* Primates, Atelidae na Região Metropolitana de São Paulo: aprimorando o programa de reintrodução” em parceria com o DEPAVE-3.

9. RESUMO

Estudamos os cariótipos de 50 espécimes (22 machos e 28 fêmeas) de *Alouatta clamitans* (bugio-ruivo) com técnicas citogenéticas tradicionais e de FISH com as sondas de pintura de todos os cromossomos humanos. Para os machos, foram observados dois números diploides diferentes ($2n=45$ e 49), com a ausência aparente do cromossomo Y devido à translocação Y-autossomo, e sete fórmulas cromossômicas distintas, com 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 24 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 21, 27, 28, 29, 30, 31 ou 32 cromossomos acrocêntricos. Para as fêmeas encontramos uma maior variabilidade no número diploide ($2n=46$, 48 e 50) e cinco fórmulas cromossômicas distintas, com 20, 22, 23 ou 25 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 21, 25, 27, 28 ou 30 cromossomos acrocêntricos. Os cromossomos X eram submetacêntricos, com exceção de duas fêmeas que apresentaram heteromorfismo neste par, com um dos cromossomos submetacêntrico e o outro metacêntrico. O sexo dos espécimes foi confirmado pela análise dos cariótipos. Pares heteromórficos autossomos também foram verificados. Dentre os indivíduos procedentes da Grande São Paulo, foram observadas as mesmas fórmulas cromossômicas em espécimes oriundos de diferentes fragmentos florestais, indicando que a fragmentação ainda não levou ao isolamento genético destas populações. A redução do número diploide orientada no sentido norte-sul foi corroborada, com espécimes procedentes do estado de São Paulo apresentando $2n=49$ ou 50 além de um exemplar do extremo sul deste estado com $2n=48$ e os demais indivíduos oriundos de Santa Catarina com $2n=45$ ou 46. Com a aplicação das técnicas de bandamento GTG e de FISH, foi possível verificar o sistema sexual múltiplo da espécie, do tipo $X_1X_1X_2X_2X_3X_3/X_1X_2X_3Y_1Y_2$. Esta é a primeira descrição citogenética molecular com a hibridação de todas as sondas de cromossomos humanos em exemplares desta espécie com $2n=48$, 49 e 50. Alguns cromossomos que apresentaram diferentes morfologias entre os espécimes analisados e foram responsáveis pelas diferentes fórmulas cromossômicas observadas, apresentaram regiões que não foram hibridadas por quaisquer sondas humanas. A partir da técnica de FISH foi possível determinar que o exemplar fêmea com $2n=48$ é resultante do acasalamento de indivíduos portadores de diferentes cariótipos, com um dos genitores com o número diploide típico de espécimes procedentes da região sul ($2n=45$ ou 46) e o outro típico de espécimes procedentes da região sudeste do Brasil ($2n=49$ ou 50). Este padrão levaria à formação de dois trivalentes durante a divisão meiótica, com implicações causadas para a formação dos gametas que poderiam reduzir ou impedir a fertilidade dos indivíduos portadores

deste cariótipo, constituindo um mecanismo de isolamento pós-zigótico e indicando que as populações do sudeste e sul do Brasil já estão isoladas a ponto de constituírem espécies diferentes. Também analisamos com citogenética tradicional e com a hibridação de todas as sondas de cromossomos humanos um exemplar que foi apreendido pelo IBAMA e entregue ao DEPAVE-3 e que apresentou características morfológicas divergentes das encontradas para *Alouatta clamitans*. Os dados nos levaram a concluir que este indivíduo é um representante de *Alouatta ululata*, sendo esta a primeira descrição cariotípica desta espécie, restrita geograficamente ao norte do estado do Maranhão, Piauí e Ceará. Sendo assim, a citogenética se mostrou uma importante ferramenta para a identificação da espécie e da correta origem geográfica dos indivíduos, além de ter contribuído para evitar a introdução na fauna do município de São Paulo de um exemplar não endêmico desta região. Contribuímos também para a reintrodução de outros indivíduos que fizeram parte do Projeto "Manejo e Conservação do Bugio, *Alouatta clamitans* (Primates, Atelidae) na Região Metropolitana de São Paulo: aprimorando o programa de reintrodução", em parceria com o DEPAVE-3.

10. ABSTRACT

We studied the karyotypes of 50 specimens (22 males and 28 females) of *Alouatta clamitans* (brown howler monkey) with traditional and FISH cytogenetic techniques with painting probes of all human chromosomes. For the males were observed two different diploid number ($2n=45$ and 49), with the apparent absence of Y chromosome due to translocation Y-autosome and seven distinct chromosomal formulas, with 17, 18, 19, 20, 21, 22 or 24 biarmed chromosomes and 21, 27, 28, 29, 30, 31 or 32 acrocentric chromosomes. For females we found greater variability in the diploid number ($2n = 46, 48$ and 50) and five distinct chromosomal formulas, 20, 22, 23 or 25 biarmed chromosomes and 21, 25, 27, 28 or 30 acrocentric chromosomes. The X chromosomes were submetacentric, except for two females who had heteromorphic pairs, with one of submetacentric chromosomes and the other metacentric. Autosomes heteromorphic pairs were also observed. Among the coming individuals in the Grande São Paulo, the same chromosomal formulas in specimens from different forest fragments were observed, indicating that fragmentation has not yet led to genetic isolation these populations. The reductions of diploid number oriented in north-south direction was observed, with coming state specimens from São Paulo presented $2n=49$ or 50 as well as an extreme Southern copy of this state with $2n=48$ and other individuals from Santa Catarina with $2n=45$ or 46 . We verified the multiple sex chromosome system $X_1X_1X_2X_2X_3X_3/X_1X_2X_3Y_1Y_2$. This is the first description of hybridization with all human chromosomes painting probes in specimens with $2n=48, 49$ and 50 . It was also determined that the female specimen with $2n=48$ is the result of the mating of individuals with different karyotypes, with one parent with the typical diploid number of specimens coming from the South ($2n=45$ or 46) and other typical specimens coming from the Southeast of Brazil ($2n=49$ or 50). This standard would lead to the formation of two trivalent during meiotic division, with implications due to the formation of gametes that could reduce or prevent the fertility of individuals of this karyotype, being a post-zygotic isolation mechanism and indicating that the southeastern and southern Brazil populations are already isolated enough to constitute different species. We also analyze a specimen that was seized by IBAMA and delivered to DEPAVE-3 and presented different morphological characteristics found to *Alouatta clamitans*, the species occurring in the supposed geographic region origin of this specimen (Ibiúna/SP). This individual was classified as *Alouatta ululata*, geographically restricted to the northern state of Maranhão, Piauí and Ceará. Thus, karyological studies proved an important tool for species identification and the correct geographic origin of individuals. We also contributed to

reintroducing individuals who were part of the project "Manejo e Conservação do bugio *Alouatta clamitans* (Primates, Atelidae) na Região Metropolitana de São Paulo: aprimorando o programa de reintrodução" in partnership with the DEPAVE-3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, P.J.S.; FINOTELO L.F.M.; DE OLIVEIRA E.H.C.; PISSINATTI A.; NAGAMACHI C.Y.; PIECZARKA J.C. Phylogenetic studies of the genus *Cebus* (Cebidae-Primates) using chromosome painting and G-banding. **BMC Evol. Biol.** 8: 169. DOI: 10.1186/1471-2148-8-169, 2008.
- ARMADA J. L. A.; BARROSO, C. M. L.; LIMA, M. M. C.; MUÑIZ, J. A. P. C.; SEUÁNEZ, H. N. Chromosome studies in *Alouatta belzebul*. **Am. J. Primatol.** 13: 283-296, 1987.
- AURICCHIO, P. Primatas do Brasil. **Terra Brasilis eds.** São Paulo, Brasil, 1995.
- 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.; MÜLLER, S. Chromosomal studies in *Callicebus donacophilus pallescens*, with classic and molecular cytogenetic approaches: multicolor FISH using human and *Saguinus oedipus* painting probes. **Chromosome Res.** 11: 327-334, 2003.
- BARROSO, C. M. L.; SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M. P.C.; SAMPAIO, I.; HARADA, M. L.; CZELUSNIAK, J.; GOODMAN, M.; Update on the phylogenetic systematics of new world monkeys: further DNA evidence for placing the pygmy marmoset (*Cebuella*) within the genus *Callithrix*. **Int. J. Primatol.** 18: 651-674, 1997.
- BENDER, M. A.; CHU, E. H. Y. The chromosomes of primates. In: **Evoluf. Genet. Biol. Primat.** Janusch B.J. eds. London: Academic Press, 261-310, 1963.
- BENDER M. A.; METTLER L. E. Chromosomes studies of primates. **Science.** 128: 186-190, 1958.
- BICCA-MARQUES, J. C.; AZEVEDO, R. B. The "thermoregulation hypothesis" does not explain the evolution of sexual dichromatism in the brown howler monkey (*Alouatta guariba clamitans*). **Folia Primatologica, Basel**, v.75, suppl. 1, p.236, 2004.
- BICCA-MARQUES, J. C.; CALEGARO-MARQUES, C. Ecologia alimentar do gênero *Alouatta* Lacépède, 1799 (Primates, Cebidae). **Cadernos UFAC**, Série "B", Rio Branco, v. 3, p. 23-49, 1995.
- BICCA-MARQUES, J. C.; CALEGARO-MARQUES, C. Behavioral thermoregulation in a sexually and developmentally dichromatic neotropical primate, the black-and-gold howling monkey (*Alouatta caraya*). **American Journal of Physical Anthropology**, Hoboken, v. 106, n. 4, p. 533-546, 1998.
- BICCA-MARQUES, J. C.; GARBER, P. A. Experimental field study of the relative costs and benefits to wild tamarins (*Saguinus imperator* and *S. fuscicollis*) of exploiting contestable food patches as single-and mixed-species troops. **American Journal of Primatology**, Hoboken, v. 60, n.4, p. 139-153, 2003.
- BICCA-MARQUES, J. C.; SILVA, V. M. da; GOMES, D. F. Ordem Primates. In: REIS, N. R. dos; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, E. P (Ed.). **Mamíferos do Brasil**. 2. ed. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2011. p. 107-150.
- BICK Y. A. E.; JACKSON, W. D. (1967) Karyotype of the Monotremes *Ornithorhynchus anatinus* (Platypus) and *Tachyglossus aculeatus* (Echidna). **Nature** 214: 600-601. doi: 10.1038/214600a0
- BIGARELLA, J. J.; ANDRADE-LIMA, D. DE. 1982. Paleoenvironmental changes in Brazil.: Prance, G.T. (Ed.), Biological Diversification in the Tropics. **Columbia University Press**, New York, pp. 27-40.

- BONVICINO, C. R.; LEMOS, B.; SEUÁNEZ, H. 2001. Molecular Phylogenetics of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini) a comparison with karyotypic data. **Chromosoma** 110: 241-246.
- BONVICINO, C. R.; BOUBLI, J. P.; OTAZÚ, I. B.; ALMEIDA, F. A.; NASCIMENTO, F. F.; COURA, J. C.; SEUÁNEZ, H. N. Morphologic, karyotypic and molecular evidence of a new form of Chiropotes (Primates, Pitheciinae). **Am. J. Primatol.** 61: 123-133, 2003.
- BOUBLI J. P.; RYLANDS A. B.; FARIAS I. P.; ALFARO M. E.; LYNCH ALFARO J. W. *Cebus* phylogenetic relationships: a preliminary reassessment of the diversity of the untufted capuchin monkeys. **Am. J. Primatol.** 74: 381-393, 2012.
- CABRERA, A.; YEPES, J. Mamíferos Sud-Americanos. 2 ed. Buenos Aires: Ediar, 1960. 347p.
- CANAVEZ, F. C.; LADASKY, J. J.; MUNIZ, J. A. P. C.; SEUÁNEZ, H. N.; PARHAM, P. β 2-microglobulin in Neotropical primates (Platyrrhini). **Immunogenetics.** 48, 133-140, 1998.
- CANAVEZ, F. C.; MOREIRA, M. A. M.; LADASKY, J. J.; PISSINATI, A.; PARHAM, P.; SEUÁNEZ, H. N. Molecular phylogeny of New World primates (Platyrrhini) based on β 2-microglobulin DNA sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.** 12: 74-82, 1999a.
- CANAVEZ, F. C.; MOREIRA, M. A. M.; SIMON, F.; PARHAM, P.; SEUÁNEZ, H. N. Phylogenetic relationships of the *Callitrichinae* (Platyrrhini, Primates) based on beta2-microglobulin DNA sequences. **Am. J. Primatol.** 48: 225-236, 1999b.
- CANAVEZ, F. C.; MOREIRA, M. A. M.; BONVICINO, C. R.; OLICIO, R.; SEUÁNEZ, H. N. Gene assignment in the spider monkey (*Ateles paniscus chamek*): APE-MYH7 to 2q; AR-GLA-F8C to the X chromosome. **J. Hered.** 90: 460-463, 1999c.
- CHAVES, R.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, M. P.; SCHNEIDER, H.; PAGE, S. L.; GOODMAN M. The place of *Callimico goeldii* in the callitrichine phylogenetic tree: evidence from von Willebrand factor gene intron II sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.** 13, 392-404, 1999.
- CHIOU, K. L.; POZZI, L.; LYNCH-ALFARO, J.; DI FIORE, A. Pleistocene diversification of living squirrel monkeys (*Saimiri* spp.) inferred from complete mitochondrial genome sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.** 59, 736-745. 2011.
- CHU, E. H.; BENDER, M. A. Chromosome cytology and evolution in primates. **Science** 133: 1399-1405, 1961.
- CHU, E. H. Y.; BENDER, M. A. Cytogenetics and evolution of primates. Ann. N.Y. **Acad. Sci.** 102: 253-266, 1962.
- CIOFFI, M. B., LIEHR, T.; TRIFONOV, V.; MOLINA, W. F.; BERTOLLO L. A. C. (2013) Independent Sex Chromosome Evolution in Lower Vertebrates: A Molecular Cytogenetic Overview in the Erythrinidae Fish Family. **Cytogenetic and Genome Research** 141(2-3): 186-194. doi: 10.1159/000354039
- CLEMENTE, I.C.; PONSÀ, M.; GARCÍA, M.; EGOZCUE, J. (1990) Evolution of the simiiformes and the phylogeny of human chromosomes. **Human Genetics** 84(6): 493-506. doi: 10.1007/BF00210798
- COATES, A. G.; COLLINS, L. S.; AUBRY, M. P.; BERGGREN, W. A. (2004) The Geology of the Darien, Panama, and the late Miocene-Pliocene collision of the Panama

- arc with northwestern South America. **Bulletin of Geological Society of America** 116(11/12): 1327–1344. doi: 10.1130/B25275.1
- CONSIGLIERE, S.; STANYON, R.; KOEHLER, U.; AGORAMOORTHY, G.; WIENBERG, J. Chromosome painting defines genomic rearrangements between red howler monkey subspecies. **Chromosome Res.** 4: 264-270, 1996.
- CONSIGLIERE, S.; STANYON, R.; KOEHLER, U.; ARNOLD, N.; WIENBERG, J. *In situ* hybridization (FISH) maps chromosomal homologies between *Alouatta belzebul* (Platyrrhini, Cebidae) and other primates and reveals extensive interchromosomal rearrangements between howler monkey genomes. **Am. J. Primatol.** 46: 119-133, 1998.
- CORTÉS-ORTIZ, L.; BERMINGHAM, E.; RICO, C.; RODRÍGUEZ-LUNA, E.; SAMPAIO, I.; RUIZ-GARCÍA, M. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: 64-81, 2003.
- CROCKETT, C. M. Diet, dimorphism and dography; Perspectives from howlers to hominids. In KINZEY, W. G. (Ed.). *The Evolution of Human Behavior: Primate models*, **Nem York: State university of New York Press**, 1987. P. 115-135.
- CROCKETT, C. M. Conservation biology of the genus *alouatta*. **Internacional Journal of Primatology**, New York, p. 549-578, 1998.
- CROCKETT, C. M. Re-evaluting the sexual selection hypothesis for infanticide by *alouatta* males. In JONES, C. B. (Ed.). *Sexual Selection and Reproductive Competition in Primates: New Perspectives and Directions*. **Norman: American Society of Primatologists**, 2003. P. 327-365,
- CROCKETT, C. M.; EISENBERG, J. F. Howlers: Variations in group size and demography. In: SMUTS, B.B. et al. (Ed.) *Primate Societies*. **Chicago: The University of Chicago Press**, 1987. P. 54-68
- DE BOER LEM, DE BRUIJN, M. Chromosomal distinction between the red-faced and black-faced spider monkeys (*Ateles paniscus paniscus* and *A. p. chamek*). **Zoo. Biol.** 9: 307-316, 1990.
- DE BOER LEM. Cytotaxonomy of the Platyrrhini (Primates). **Genen. Phaenen.** 17: 1-115, 1974.
- DE OLIVEIRA, E. H. C. Filogenia da subfamília Atelinae (Primates, Platyrrhini): análise comparativa por pintura cromossômica multicolor. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.
- DE OLIVEIRA, E. H. C.; LIMA, M. M. C.; SBALQUEIRO, I. J. Chromosomal variation in *Alouatta fusca*. **Neotrp. Prim.** 3: 181-183, 1995.
- DE OLIVEIRA, E. H. C. Estudos citogenéticos e evolutivos nas espécies brasileiras e argentinas do gênero *Alouatta* Lacépède 1799 (Primates, Atelidae). Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 1996.
- DE OLIVEIRA, M. M.; KIERULFF, M. C. M. 2008. *Alouatta ululata*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 20 July 2015.
- DE OLIVEIRA, E. H. C.; LIMA, M. M. C.; SBALQUEIRO, I. J.; PISSINATTI, A. The karyotype of *Alouatta fusca clamitans* from Rio de Janeiro State, Brazil: evidence for a Y-autosome translocation. **Genet. Mol. Biol.** 31: 361-364, 1998.
- DE OLIVEIRA, E. H. C.; LIMA, M. M. C.; SBALQUEIRO, I. J.; SILVA, A. S. F. Analysis of

- polimorphic NORs in *Alouatta* species (Primates, Atelidae). **Caryologia** 52: 169-175, 1999.
- DE OLIVEIRA, E. H.C.; NEUSSER, M.; MÜLLER, S. (2012) Chromosome Evolution in New World Monkeys (Platyrrhini). **Cytogenetics and Genome Research** 137(2-4): 259-272. doi: 10.1159/000339296.
- DE OLIVEIRA, E.H.C.; NEUSSER, M.; FIGUEIREDO, W. B.; NAGAMACHI, C.; PIECZARKA, J.C.; SBALQUEIRO, I. J.; WIENBERG, J.; MÜLLER, S. The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. **Chromosome Res.** 10: 669-683, 2002.
- DE 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 and Genome Research** 108(1-3): 183-90. doi: 10.1159/000080814
- DEUVE, J.; BENNETT, N.; O'BRIEN, P.; FERGUSON-SMITH, M.; FAULKES, C.; BRITTON-DAVIDIAN, J.; ROBINSON, T. (2006) Complex evolution of X and Y autosomal translocations in the giant mole-rat, *Cryptomys mechowi* (Bathyerigidae). **Chromosome Research** 14(6): 681-691. doi: 10.1007/s10577-006-1080-3
- DOBIGNY, G.; DUCROZ, J. F.; ROBINSON, T. J.; VOLOBOUEV, V. (2004) Cytogenetics and Cladistics. **Systematic Biology** 53(3): 470-484. doi: 10.1080/10635150490445698
- DUMAS, F.; STANYON, R.; SINEO, L.; STONE, G.; BIGONI, F. Phylogenomics of species from four genera of New World monkeys by flow sorting and reciprocal chromosome painting. **BMC Evol. Biol.** 7: s11. DOI: 10.1186/1471-2148-7-S2-S11, 2007.
- DUTRILLAUX, B. Chromosomal evolution in primates: tentative phylogeny from *Microcebus murinus* (prosimian) to man. **Hum. Genet.** 48: 251-314, 1979.
- DUTRILLAUX, B.; COUTURIER, J. The ancestral karyotype of platyrrhine monkeys. **Cytogenet. Cell. Genet.** 30: 232-242, 1981.
- EGOZCUE, J.; EGOZCUE, M. V. The chromosome complement of the howler monkey *Alouatta caraya*, Humboldt, 1812]. *Cytogenet. Cell. Genet.* 5: 20-27, 1966.
- EICHLER, E. E.; DEJONG, P. J. Biomedical applications and studies of molecular evolution: a proposal for a primate genomic library resource. **Genome Res.** 12: 673-678, 2002.
- EICHLER, E. E.; SANKOFF, D. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. **Science** 301: 793-797, 2003.
- ELLSWORTH, J. A.; HOELZER, G. A. (2006) Genetic Evidence on the Historical Biogeography of Central American Howler Monkeys. In: Lehman SM, Fleagle JG (Eds) **Primate Biogeography**. New York, USA, 81-103. doi: 10.1007/0-387-31710-4_3
- EMMONS, L. H. Neotropical Rainforest Mammals: a field guide. **The University of Chicago Press**, Chicago, 1999. 307 p.
- EMMONS, L. H.; FEER, F. Neotropical Rainforest Mammals: A field guide. **Chicago: University of Chicago Press**, 1990, xiv+281 p.
- ENARD, W.; PÄÄBO, S. Comparative primate genomics. **Annu. Rev. Genomics Hum.**

- Genet.** 5: 351-378, 2004.
- FABRE, P. H.; RODRIGUES, A.; DOUZERY, E. J. P. 2009. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 53, 808–825.
- FERGUSON-SMITH, M. A.; TRIFONOV, V. Mammalian karyotype evolution. **Nat. Rev. Genet** 8: 950-962, 2007.
- FLORES S. V.; EVANS, A. L.; MCALLISTER, B. F.; (2008) Independent Origins of New Sex-Linked Chromosomes in the melanica and robusta Species Groups of *Drosophila*. **BMC Evolutionary Biology** 8(1): 33. doi: 10.1186/1471-2148-8-33
- FORD, S. M.; Systematics of the New World monkeys. In: **Comparative primate biology**. Swindler DR, Erwin J. eds. Liss, New York 1: 73-135, 1986.
- FRÖNICKE, L. Origins of primate chromosomes – as delineated by Zoo-FISH and alignments of human and mouse draft genome sequences. **Cytogenet. Genome Res.** 108: 122-138, 2005.
- GARCÍA, M.; CABALLÍN, M. R.; ARAGONÉS, J.; GODAY, C.; EGOZCUE, J. Banding patterns of the chromosomes of *Ateles geoffroyi* with descriptions of two cases of pericentric inversion. **J. Med. Primatol.** 4: 108-113, 1975.
- GARCÍA, F.; GARCÍA, M.; MORA, L.; ALARCÓN, L.; EGOZCUE, J.; PONSÀ, M. Qualitative analysis of constitutive heterochromatin and primate evolution. **Biol. J. Linn. Soc.** 80: 107-124, 2003.
- GARCÍA, F.; RUIZ-HERRERA, A.; EGOZCUE, J.; PONSÀ, M.; GARCÍA, M. Chromosomal homologies between *Cebus* and *Ateles* (Primates) based on Zoo-FISH and G-banding comparisons. **Am. J. Primatol.** 57: 177-188, 2002.
- GEOFFROY SAINT-HILAIRE, E. 1806. Mémoire les Singes à main importante en les Ateles. **Annals Museum Histoire Naturelle de Paris**, Paris, 7: 260-273.
- GILBERT, K. A.; SETZ, E. Z. F. Primates in a fragmented landscape: Six species in Cenral Amazonia. In: BIER-Regaard, R. O. et al (Ed.). Lessons from Amazonia: The Ecology and Conservation of a Fragmented Forest. **New Haven: yale University Press**, 2001. P. 262-270
- GIFALLI, C. C. Estudo da variabilidade cariotípica em *Platyrrhini* (Primates) e da homeologia com o cromossomo 15 humano. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- GIFALLI-IUGHETTI C. Evolução cromossômica: estudo da variabilidade cariotípica em *Platyrrhini* e das homeologias e sintenias com cromossomos humanos. **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- GIFALLI-IUGHETTI, C.; Koiffmann, C. P. Microdissection of the Y chromosome of *Brachyteles arachnoides* (Primates, *Platyrrhini*) using the Eppendorf TransferMan NK 2. Hamburg 2008 (**Applications - Eppendorf** - Application Note 191).
- GIFALLI-IUGHETTI, C.; KOIFFMANN, C. P. Synteny of human chromosomes 14 and 15 in the platyrrhines (Primates, *Platyrrhini*). **Genet. Mol. Biol.** 32: 786-791, 2009a.
- GIFALLI-IUGHETTI, C.; KOIFFMANN, C. P. The Y chromosome of the *Atelidae* family (*Platyrrhini*): study by chromosome microdissection. **Cytogenet. Genome Res.** 125: 46-53, 2009b.
- GOODMAN, M.; PORTER, C. A.; CZELUSNIAK, J.; PAGE, S. L.; SCHNEIDER, H.; SHOSHANI, J.; GUNNELL, G.; GROVES, C. P. Toward a phylogenetic classification

- of primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. **Mol. Phylogenet. Evol.** 9: 585-598, 1998.
- GRAPHODATSKY, A. S. Comparative chromosomics. **Molecular Biology** 41: 361-375, 2007.
- GREGORIN R. Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. **Rev. Bras. Zool.** 23: 64-144, 2006.
- GREGORIN, R. Variação geográfica e taxonomia das espécies brasileiras do gênero *Alouatta* Lacépède, 1799 (Primates, Atelidae). **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- GROVES, C. P. Primate Taxonomy. **Smithsonian Institution Press**, Washington, DC. 2001.
- GROVES, C. P. Order Primates. In: **Mammal Species of the World**. Wilson DE, Reeder DM. eds. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD: 111-184, 2005.
- HAIG, D. A brief history of human autosomes. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B** 354: 1447-1470, 1999.
- HARRIS, E. E.; GIFALLI-IUGHETTI, C.; BRAGA, Z. H.; KOIFFMANN, C. P. Cytochrome b sequences show subdivision between populations of the brown howler monkey (*Alouatta guariba*) from Rio de Janeiro and Santa Catarina, Brazil. **Neotropical Primates** 13: 16-21, 2005.
- HERSHKOVITZ, P. Living New World monkeys (Platyrrhini) with an introduction to primates. **University of Chicago Press**, Chicago, 1: 9-10, 1977.
- HIRANO, Z. M. B. ET AL. Morphology of epidemal glands responsible for the release of colored secretions in *Alouatta guariba damitans*. **Laboratory Primate Newsletter, Providence**, v. 42, p. 4-7, 2003.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36: 1014-1015, 1980.
- IHERING, H. V. Os bugios do gênero *Alouatta*. **Revista do Museu Paulista**, São Paulo, 9: 231-280, 1914.
- JARDIM, M. M. A. Ecologia Populacional de Bugios-Ruivos (*Alouatta guariba*) nos Municípios de Porto Alegre e Viamão, RS, Brasil. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas. 2005. 114p.
- KASAHARA, S. Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 2009.
- KAY, R. F. The phyletic relationships of extant and fossil *Pitheciinae* (Platyrrhini, *Anthropoidea*). **J. Hum. Evol.** 19: 175-208, 1990.
- KELLOGG, R.; GOLDMAN, E. A. Review of the spider monkeys. **Proc. US Natl. Mus.** 96: 1-45, 1944.
- KING, M. 1993. Species Evolution: The Role of Chromosome Change. **Cambridge University Press**. 339 pages
- KNOWLTON, N.; WEIGT, L. A. (1998) New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. **Proceedings of the Royal Society B** 265(1412): 2257-2263. doi: 10.1098/rspb.1998.0568
- KOIFFMANN, C. P. Citogenética de símios brasileiros. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.

- KOIFFMANN, C. P.; SALDANHA, P. H. Cytogenetics of Brazilian monkeys. **J. Hum. Evol.** 3: 275-282, 1974.
- KOIFFMANN, C. P.; SALDANHA, P. H. Importância do estudo cromossômico em macacos sul-americanos. **Ciencia e Cultura** 29: 162-170, 1977.
- KOIFFMANN, C. P.; SALDANHA, P. H. Chromosome variability in the family Cebidae (Platyrrhini). **Rev. Brasil. Genet.** 4: 667-677, 1981a.
- KOIFFMANN, C. P.; SALDANHA, P. H. The karyotype of *Cacajao melanocephalus* (Platyrrhini, Primates). **Folia Primatol.** 36: 150-155, 1981b.
- KOIFFMANN, C. P.; SALDANHA, P. H. Karyotypic studies in *Atelinae* monkeys. **Rev. Brasil. Genet.** 4: 773-792, 1982.
- LEIGH, E. G.; O'DEA, A.; VERMEIJ, G. J. 2013. The historical biogeography of the Isthmos of Panama. **Biological Reviews**, doi: 10.1111/brv.12048.
- LIMA, M. M. C.; SAMPAIO, M. I. C.; SCHNEIDER, M. P. C.; SCHEFFRAHN, W.; SCHNEIDER H.; SALZANO, F. M. (1990) Chromosome and protein variation in red howler monkeys. **Revista Brasileira de Genetica** 13(4): 789-802.
- LIMA, M. M. C.; SEUÁNEZ, H. N. Cytogenetic characterization of *Alouatta belzebul* with atypical pelage coloration. **Folia Primatol.** 52: 97-101, 1989.
- LIMA, M. M. C.; SEUÁNEZ, H. (1991) Chromosome studies in the red Howler Monkey, *Alouatta seniculus stramineus* (Platyrrhini, Primates): description of an X1X2Y1Y2/X1X1X2X2 sex chromosome system and karyological comparisons with other subspecies. **Cytogenetics and Cell Genetics** 57(2-3): 151-156. doi: 10.1159/000133135
- LUNDBERG, J.G.; MAESHAL, L. G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, C. S. L.; WESSELINGH, F. 1998. The stage of Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A.S. (Eds.), **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, pp. 13-48.
- LYNCH ALFARO, J. W.; BOUBLI, J. P.; OLSON, L.E.; DI FIORE, A.; WILSON, B.; GUTIÉRREZ-ESPELETA, G. A; CHIOU, K. L.; SCHULTE, M.; NEITZEL, S.; ROSS, V.; SCHWOCHOWD, NGUYEN MTT; FARIAS I.; JANSON C. H.; ALFARO, M. E. Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. **J. Biogeogr.** 39, 272-288, 2012a.
- LYNCH ALFARO, J. W.; SILVA JÚNIOR, J. S.; RYLANDS, A. B. How different are robust and gracile capuchin monkeys? An argument for the use of *Sapajus* and *Cebus*. **Am. J. Primatol.** 74: 273-286, 2012b.
- MA, N. S. F.; ELLIOTT, M. W.; MORGAN, L.; MILLER, A.; JONES, T. C. (1976) Translocation of Y chromosome to an autosome in the Bolivian owl monkey, *Aotus*. **American Journal of Physical Anthropology** 45(2): 191-201. doi: 10.1002/ajpa.1330450205
- MA, N. S. F.; JONES, T. C.; THORINGTON, R. W.; MILLER, A. C.; MORGAN, L. M. Y-autosome translocation in the howler monkeys, *Alouatta palliata*. **J. Med. Primatol.** 4: 299-307, 1975.
- MARTINEZ. R.; TORRES, E.; NIEVES, M.; SZAPKIEVICH, V.; RODRÍGUEZ, S.; SHININI, A.; ASCURRA, M.; MUDRY, M. D. Genetic variability in two captive colonies of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) from eastern Paraguay. **Caryologia.** 57: 332-336, 2004.

- MATTHEWS, L. J.; ROSENBERGER, A. L. Taxon combinations, parsimony analysis (PAUP*), and the taxonomy of the yellow-tailed woolly monkey, *Lagothrix flavicauda*. **Am. J. Phys. Anthropol.** 137, 245–255, 2008.
- MEDEIROS, M. A.; BARROS, R. M. S.; PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y.; PONSÁ, M.; GARCÍA, M.; GARCÍA, F.; EGOZCUE, J. Radiation and speciation of spider monkeys, Genus *Ateles*, from the cytogenetic viewpoint. **Am. J. Primatol.** 42: 167–178, 1997.
- MEIRELES, C. M.; CZELUSNIAK, J.; SCHNEIDER, M. P. C.; MUÑIZ, J. A. P. C.; BRIGIDO, M. C.; FERREIRA, H. S.; GOODMAN, M. Molecular phylogeny of Ateline New World monkeys (Platyrrhini, Atelinae) based on v-globine gene sequences: evidence that *Brachyteles* is the sister group of *Lagothrix*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12: 10–33, 1999b.
- MENDES, S. L.; RYLANDS, A. B.; KIERULFF, M. C. M.; DE OLIVEIRA, M. M. 2008. *Alouatta guariba ssp. clamitans*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 22 June 2015.
- MILTON, K. Physiological ecology of howlers (*Alouatta*): Energetic and digestive consideration and comparison with the Colobinae. **Internacional Journal of Primatology**, New York, v. 19, n. 3, p. 513–548, 1998.
- MINEZAWA, M.; HARADA, M.; JORDAN, O. C.; BORDA, C. J. V. (1985) Cytogenetics of Bolivian endemic red howler monkeys (*Alouatta seniculus sara*): accessory chromosomes and Y-autosome translocation-related numerical variations. **Research Report on New World Monkeys** 5: 7–16
- MIRANDA, J. M. D.; PASSOS, F. C. Composição e dinâmica de grupos de *Alouatta guariba clamitans* Cabrera (Primates, Atelidae) em floresta ombrófila mista no Estado do Paraná, Brasil.
- MITTERMEIER, R. A.; COIMBRA-FILHO, A. F.; CONSTABLE, I. D. Conservation of Eastern Brazilian Primates. **Report to World Wildlife Fund**, 1981.
- MITTERMEIER, R. A.; DE MACEDO; RUIZ, H.; LUSCOMBE, A. A. woolly monkey rediscovered in Peru. **Oryx**. 13, 41–46, 1975.
- MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A. F. Systematics: species and subspecies, an update. In: **Ecology and Behaviour of Neotropical Primates**. MITTERMEIER RA, RYLANDS AB, COIMBRA-FILHO AF, DA FONSECA GAB. **World Wildlife Fund**. 2: 13–75, 1988.
- MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocyte cultures from human peripheral blood. **Exp. Cell. Res.** 20: 613–616, 1960.
- MOREIRA, M. A. M.; CANAVEZ, F. C.; PARHAM, P.; SEUÁNEZ, H. N. Assignment of TCF1, TGM1, CALM1, CKB, THBS1, B2M, and FES in *Ateles paniscus chamek* (Platyrrhini, Primates). **Cytogenet. Cell. Genet.** 79: 92–96, 1997.
- MORESCALCHI, M. A.; SCHEMPF, W.; CONSIGLIERE, S.; BIGONI, F.; WIENBERG, J.; STANYON, R. Mapping chromosomal homology between humans and the black-handed spider monkey by fluorescence *in situ* hybridization. **Chromosome Res.** 5: 527–536, 1997.
- MOYNIHAN, M. The New World Primates. **Princeton: Princeton University Press**, 1976. 262 p.

- MUDRY, M. D.; LABAL DE VINUESA, M. L.; COLILLAS, O. J.; BRIEUX DE SALUM, S. (1984) Banding patterns of *Alouatta caraya*. **Revista Brasileira de Genética** 7: 373–379.
- MUDRY, M. D.; NIEVES, M.; BOLZÁN, A. D. Chromosomal localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in eight species of New World Primates (Neotropical Primates, Platyrrhini). **Cytogenet. Genome Res.** 119: 221–224, 2007.
- MUDRY, M. D.; PONSÀ, M.; BORRELL, A.; EGOZCUE, J.; GARCÍA, M. (1994) Prometaphase chromosomes of the howler monkey (*Alouatta caraya*): G, C, NOR, and restriction enzyme (RES) banding. **American Journal of Primatology** 33(2): 121–132. doi: 10.1002/ajp.1350330206
- MUDRY, M. D.; RAHN, M.I.; GOROSTIAGA, M.; HICK, A.; MERANI, M. S.; SOLARI, A. J. (1998) Revised Karyotype of *Alouatta caraya* (Primates: Platyrrhini) Based on Synaptonemal Complex and Banding Analyses. **Hereditas** 128(1): 9–16. doi: 10.1111/j.1601-5223.1998.00009.x
- MUDRY, M. D.; RAHN, I. M.; SOLARI, A. J. Meiosis and chromosome painting of sex chromosome systems in Ceboidea. **Am. J. Primatol.** 54: 65–78, 2001.
- MUDRY, M. D.; SLAVUTSKY, I.; LABAL-de-VINUESA, M. Chromosome among five species of Platyrrhini (*Alouatta caraya*, *Aotus azarae*, *Callithrix jacchus*, *Cebus apella* and *Saimiri sciureus*). **Primates** 31: 415–420, 1990.
- MUDRY, M.; SLAVUTSKY, I.; ZUNINO, G.; DELPRAT, A.; BROWN, A. A new karyotype of *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini) from Argentina. **Rev. Brasil. Genet.** 14: 729–738, 1991.
- MUDRY, M. D.; ZUNINO, G. E.; SLAVUTSKY, I.; DELPRAT, A. Características oblacionales y cariotípicas del mono aullador negro (*Alouatta caraya*) de Argentina. **Boletín Primatológico Latinoamericano** 3: 1–11, 1992.
- MUDRY-DE-PARGAMENT, M. D.; LABAL-DE-VINUESA, M. L.; COLILLAS, O. J.; BRIEUX-DE-ALUM, S. Banding patterns of *Alouatta caraya*. **Rev. Brasil. Genet.** 7: 373–379, 1984b.
- MUHLE, C. B. Estratégias adaptativas de um grupo de bugios-pretos, *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812), em um bosque dominado por eucaliptos. 2008. 44f. **Dissertação (Mestrado em Zoologia)** – Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- MÜLLER, S. Primate chromosome evolution. In: Genomic disorders. The genomic basis of disease. LUPSKI JR, STANKIEWICZ P. **Humana Press**, 133–152, 2006.
- MÜLLER, S.; STANYON, R.; FINELLI, P.; ARCHIDIACONO, N.; WIENBERG, J. (2000) Molecular cytogenetic dissection of human chromosomes 3 and 21 evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 97(1): 206–211. doi: 10.1073/pnas.97.1.206
- MURPHY, W. J.; STANYON, R.; O'BRIEN, S. J. Evolution of mammalian genome organization inferred from comparative gene mapping. **Genome Biol.** 2: 2001.
- MÜLLER, S.; WIENBERG, J. “Bar-coding” primate chromosomes: molecular cytogenetic screening for the ancestral hominoid karyotype. **Hum. Genet.** 109: 85–94, 2001.
- NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; MUNIZ, J. A.; BARROS, R. M. S.; MATTEVI, M. S. Proposed chromosomal phylogeny for the South American primates of the Callitrichidae family (Platyrrhini). **Am. J. Primatol.** 49: 133–152, 1999a.

- NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; PISSINATI, A.; RODRIGUES, L. R. R.; GONÇALVES, A. C. O.; BARROS, R. M. S. Dados citogenéticos apoiam a colocação de *Callicebus personatus* (Primates, Cebidae) em um grupo próprio. **IX Congresso Brasileiro de Primatologia**, Santa Tereza, E. S., Brasil, 78, 1999b.
- NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; SCHWARZ, M.; BARROS, R. M.; MATTEVI, M. S. Chromosomal similarities and differences between tamarins, *Leontopithecus* and *Saguinus* (Platyrrhini, Primates). **Am. J. Primatol.** 43: 265-276, 1997.
- NASCIMENTO, F. F.; BONVICINO, C. R.; DA SILVA, F. C. D.; SCHNEIDER, M. P. C.; SEUÁNEZ, H. N. Cytochrome b polymorphisms and population structure of two species of *Alouatta* (Primates). **Cytogenet. Genome Res.** 108: 106-111, 2005.
- NEUSSER, M.; STANYON, R.; BIGONI, F.; WIENBERG, J.; MÜLLER, S. Molecular cytotaxonomy of the New World monkeys (Platyrrhini) – comparative analysis of five species by multi-color chromosome painting gives evidence for a classification of *Callimico goeldii* within the family of *Callitrichidae*. **Cytogenet. Cell. Genet.** 94: 206-215, 2001.
- NEVILLE, M. K. et al. The howling monkeys, genus *Alouatta*. In: MITTERMEIER, A. et al. (Ed.) Ecology and Behavior of Neotropical Primates, vol. 2. **Washington: World Wildlife Fund**, 1988. P. 349-453.
- NIEVES, M.; ASCUNCE, M. S.; RAHN, M. I.; MUDRY, M. D. Phylogenetic relationships among some *Ateles* species: the use of chromosomic and molecular characters. **Primates.** 46: 155-164, 2005.
- NIEVES, M.; DE OLIVEIRA, E. H. C.; AMARAL, P. J. S.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; MÜHLMANN, M. C.; MUDRY, M. D. Analysis of the heterochromatin of *Cebus* (Primates, Platyrrhini) by micro-FISH and banding pattern comparisons. **Journal of Genetics.** 90: 111-117, 2011.
- OPAZO, J. C.; WILDMAN, D. E.; PRYCHITKO, T.; JOHNSON, R. M.; GOODMAN, M. Phylogenetic relationships and divergence times among New World monkeys (Platyrrhini, Primates). **Mol. Phylogenet. Evol.** 40, 274–280, 2006.
- PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. B. da.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. da C.; MITTERMEIER, R. A.; PATTON, J. L. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. 2. Ed. *Occasional Papers in Conservation Biology*, No. 6. **Conservation International**, Arlington, VA. 2012.
- PATERSON, J. D. Shape as a factor in primate thermoregulation. In: TAUB, D. M.; KING, F. A. (Ed). Current Perspectives in Primate Social Dynamics. **New York: Van Nostrand**, 1986. P. 228-242.
- PEREIRA, J. E. S. Padrões e processos na evolução de primatas neotropicais (Platyrrhini, Primates). **Tese de doutorado**. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.
- PERELMAN, P.; JOHNSON, W. E.; ROOS, C.; SEUÁNEZ, H. N.; HORVATH, J. E.; MOREIRA, M. A. M.; KESSING, B.; PONTIUS, J.; ROELKE, M.; RUMPLER, Y.; SCHNEIDER, M. P. C.; SILVA, A.; O'BRIEN, S. J.; PECON-SLATTERY, J. A molecular phylogeny of living primates. **PLoS Genet.** 7: 2011.

- PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y.; BARROS, R. M. S. The karyotype of *Ateles paniscus paniscus* (Cebidae, Primates): $2n = 32$. **Rev. Brasil. Genet.** 12: 543-551, 1989.
- PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y. Cytogenetic studies of *Aotus* from eastern Amazonia: Y/autosome rearrangement. **Am. J. Primatol.** 14: 255-263, 1988a.
- PINTO, L. P. Dieta, padrão de atividades e área de vida de *Alouatta belzebul discolor* (Primates, Atelidae) no sul da Amazônia. 2002, 116f. **dissertação (Mestrado em Ecologia)** – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2002.
- PORTER, C. A.; CZELUSNIAK, J.; SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M. P. C.; SAMPAIO, I.; GOODMAN, M. Sequences of the primate ϵ -globin gene: implications for systematics of the marmosets and other New World primates. **Gene.** 205, 59–71, 1997.
- POSADAS, P.; ORTIZ-JAUREGUIZAR, E. 2011. Evolução da Região Andina da América do Sul. In: Carvalho, C.J.B., Almeida, E.A.B. (eds.), Biogeografia da América do Sul: Padrões e processos. **Editora Roca, São Paulo**, pp. 175-188.
- PRATES, H. M. Ecologia e comportamento de um grupo de bugios-preto (*Alouatta caraya*) habitante de um pomar em Alegrete, RS, Brasil. 2007. 81f. **Dissertação (Mestrado em Zoologia)** – Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- RAHN, M. I.; MUDRY, M. D.; MERANI, M. S.; SOLARI, A. J. (1996) Meiotic behavior of the X1X2Y1Y2 quadrivalent of the Primate *Alouatta caraya*. **Chromosome Research** 4(5): 350–356. doi: 10.1007/BF02257270
- RAY, D. A.; XING, J.; HEDGES, D. J.; HALL, M. A.; LABORDE, M. E.; ANDERS, B. A.; WHITE, B. R.; STOILOVA, N.; FOWLKES, J. D.; LANDRY, K. E.; CHEMNICK, L. G.; RYDER, O. A.; BATZER, M. A. Alu insertion loci and platyrrhine primate phylogeny. **Mol. Phylogenet. Evol.** 35: 117-126, 2005.
- REIS, N. R; PERACCHI, A. L; PEDRO, W. A; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2006.
- RENS, W.; O'BRIEN, P. C.; GRÜTZNER, F.; CLARKE, O.; GRAPHODATSKAYA, D.; TSEND-AYUSH, E.; TRIFONOV, V. A.; SKELTON, H.; WALLIS, M. C.; JOHNSTON, S.; VEYRUNES, F.; GRAVES, J. A.; FERGUSON-SMITH, M. A. (2007) The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian Z. **Genome Biology** 8(11): R243. doi: 10.1186/gb-2007-8-11-r243
- ROBINSON, T.J.; RUIZ HERRERA, E. 2010. Mammalian Chromosomal Evolution: From Ancestral States to Evolutionary Regions. En *Evolutionary Biology – Concepts, Molecular and Morphological Evolution*, ed. Pierre pontarotti, 143-158. Berlin, **Heidelberg: Springer-Verlag**.
- ROOSMALEN, M. G. M. VAN.; KLEIN, L. L. The spider monkeys, genus *Ateles*. In: **Ecology and Behaviour of Neotropical Primates**. MITTERMEIER RA, RYLANDS AB, COIMBRA-FILHO AF, DA FONSECA GAB. **World Wildlife Fund.** 2: 455-537, 1988.
- ROSENBERGER, A. L. Systematics: The higher taxa. In: **Ecology and behavior of Neotropical primates**. Coimbra-Filho AF, Mittermeier R. eds.. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro 1: 9-27, 1981.

- ROSENBERGER, A. L.; TEJEDOR, M. F.; COOKE, S. B.; PEKAR, S. 2009. Platyrrhine ecophylogenetics in space and time, in: Garber, P.A., Estrada, A., Bicca-Marques, J.C., Heymann, E.W., Strier, K.B. (Eds.), *South American Primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation*. **Springer Science+Business Media**, New York, pp. 69-113.
- ROWE, N. *The Pictorial Guide to the Living Primates*. East Hampton: Pogonias Press, 1996. 263p.
- RUÍZ-GARCÍA, M.; ALVAREZ, D. RFLP analysis of mtDNA from six platyrrhine genera: phylogenetic inferences. **Folia Primatol.** 74: 59- 70, 2003.
- RUIZ-HERRERA, A. Implicaciones de los lugares frágiles y las secuencias teloméricas intersticiales en la evolución cromosómica de los Primates. **Tese de Doutorado**. Unitat de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona, 2003.
- RYLANDS, A. B.; FONSECA, G. A. B. da.; LEITE, Y. L. R.; MITTERMEIER, R. A. M. Primates of the Atlantic Forest: Origin, distributions, endemism, and communities. In: **Adaptive Radiations of Neotropical Primates**, M. Norconk, A. L. Rosenberger and P. A. Garber (eds.), Plenum Press, New York, 21-51, 1996.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; RODRÍGUEZ-LUNA, E. A species list for The New World primates (Platyrrhini): distribution by country, endemism, and conservation status according to the Mace-Land System. **Neotrop. Primates**. 3: 113-160.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; SILVA JÚNIOR, J. S. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. **Int. Zoo Yb.** 46: 11-24, 2012.
- RYLANDS, A. B.; SPIRONELO, V. L.; TORNISIELO, R. L.; DE SA.; KIERULFF, M.C.M.; SANTOS, I. B. 1988. Primates of the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Primate Conservation**, Washigton, 9: 10-109.
- RYLANDS, A. B.; SCHNEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A.; GROVES, C. P.; RODRIGUES, L. R. An assessment of the diversity of New World primates. **Neotrop. Primates** 8: 61-93, 2000.
- SANKOFF, D. (2003) Rearrangements and chromosomal evolution. *Current Opinion in Genetics and Development* 13(6): 583-587. doi: 10.1016/j.gde.2003.10.006
- SCHNEIDER, H.; CANAVEZ, F. C.; SAMPAIO, I.; MOREIRA, M. A. M.; TAGLIARO, C. H.; SEUÁNEZ, H. N. Can molecular data place each Neotropical monkey in its own branch? **Chromosoma**. 109: 515-523, 2001.
- SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. The systematics and evolution of New World primates – a review. **Mol. Phylogenet. Evol.** 82: 348-357, 2015.
- SCHNEIDER, I.; SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M. P.; SILVA, A. The prion protein and New World primate phylogeny. **Genet. Mol. Biol.** 27: 505-510, 2004.
- SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosome. **Lancet** 2: 971-972, 1971.
- SEUÁNEZ, H. N. (1979) *The phylogeny of human chromosomes*. Springer-Verlag, New York, USA, 208 pp. doi: 10.1007/978-3-642-67260-6
- SEUÁNEZ, H. N.; BONVICINO, C. R.; MOREIRA, M. A. M. The primates of the Neotropics: genomes and chromosomes. *Cytogenet.* **Genome Res.** 108: 38-46,

- 2005.
- SEUÁNEZ, H. N.; ALVES, G.; O'BRIEN, S. J. Genetic characterization of parental cell lines and biochemical analysis of somatic cell hybrids between mouse (RAG) cells and fibroblasts of *Ateles paniscus chamek* (Primates, Platyrrhini). **Am. J. Primatol.** 30: 181-194, 1993.
- SEUÁNEZ, H. N.; ALVES, G.; O'BRIEN, S. J. Gene mapping in the spider monkey (*Ateles paniscus chamek*). **J. Hered.** 85: 466-473, 1994.
- SEUÁNEZ, H. N.; ARMADA, J. L. A.; FREITAS, L.; ROCHA E SILVA, R.; PISSINATTI, A.; COIMBRA-FILHO, A. F. Intraspecific chromosome variation in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini). The chromosomes of the yellow breasted capuchin *Cebus apella xanthosternos* Wied, 1920. **Am. J. Primatol.** 10: 237-247, 1986.
- SEUÁNEZ, H. N.; LACHTERMACHER, M.; CANAVEZ, F. C.; MOREIRA, M. A. M. The human chromosome 3 gene cluster ACY1-CACNA1D-ZNF64-ATP2B2 is evolutionarily conserved in *Ateles paniscus chamek* (Platyrrhini, Primates). **Cytogenet. Cell. Genet.** 77: 314-317, 1997.
- SEUÁNEZ, H. N.; LIMA, C. R.; LEMOS, B.; BONVICINO, C. R.; MOREIRA, M. A. M.; CANAVEZ, F. C. Gene assignment in *Ateles paniscus chamek* (Platyrrhini, Primates). Allocation of 18 markers of human syntenic groups 1, 2, 7, 14, 15, 17 and 22. **Chromosome Res.** 9: 631-639, 2001.
- SILVA-LÙPEZ, G.; MOTTA-GILL, SANCHES-HERNANDEZ AI. Taxonomic notes on *Ateles geoffroyi*. In: **Neotropical Primates**. RYLANDS A, RODRIGUEZ LUNA E. **Conservation International**, Minas Gerais, Brazil, 4, 1996.
- SILVA, J. S. Jr. Espécieção nos macacos-prego e caiararas, gênero *Cebus*, Erxleben, 1777 (Primates, Cebidae). **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- SMITH, J. D. (1970) The systematic status of the black howler monkey, *Alouatta pigra* Lawrence. *Journal of Mammalogy* 51(2): 358-369. <http://www.jstor.org/stable/1378486>, doi: 10.2307/1378486
- SOLARI, A. J.; RAHN, M. I. (2005) Fine structure and meiotic behaviour of the male multiple sex chromosomes in the genus *Alouatta*. **Cytogenetics and Genome Research** 108(1-3): 262-267. doi: 10.1159/000080825
- SPRINGER, M. S.; MEREDITH, R. W.; GATESY, J.; EMERLING, C. A.; PARK, J.; RABOSKY, D. L.; STADLER, T.; STEINER, C.; RYDER, O. A.; JANECKA, J. E.; FISHER, C. A.; MURPHY, W. J. 2012. Macroevolutionary dynamics and historical biogeography of primates diversification inferred from a species supermatrix. **Plos One** 7(11), e49521.
- STANYON, R.; BIGONI, F.; SLABY, T.; MÜLLER, S.; STONE, G.; BONVICINO, C. R.; NEUSSER, M.; SEUANEZ, H. N. Multi-directional chromosome painting maps homologies between species belonging to three genera of New World monkeys and humans. **Chromosoma** 113: 305-315, 2004.
- STANYON, R.; CONSIGLIERE, S.; BIGONI, F.; FERGUSON-SMITH, M.; O'BRIEN, P. C. M.; WIENBERG, J. Reciprocal chromosome painting between a New World primate, the woolly monkey, and humans. **Chromosome Res.** 9: 97-106, 2001.
- STANYON, R.; CONSIGLIÉRE, S.; MÜLLER, S.; MORESCALCHI, A.; NEUSSER, M.; WIENBERG, J. Fluorescence in situ hybridization (FISH) maps chromosomal

- homologies between the dusky titi and squirrel monkey. **Am J Primatol** **50**: 95–107 (2000).
- STANYON, R.; GAROFALO, F.; STEINBERG, E. R.; CAPOZZI, O.; DI MARCO, S. ET AL. Chromosome painting in two genera of South American monkeys: species identification, conservation, and management. **Cytogenet Genome Res** **134**: 40–50 (2011).
- STANYON, R.; ROCCHI, M.; CAPOZZI, O.; ROBERTO, R.; MISCEO, D.; VENTURA, M.; CARDONE, M. F.; BIGONI, F.; ARCHIDIACONO, N. (2008) Primate chromosome evolution: ancestral karyotypes, marker order and neocentromeres. **Chromosome Research** **16**(1): 17–39. doi: 10.1007/s10577-007-1209-z
- STANYON, R.; TOFANELLI, S.; MORESCALCHI, M. A.; AGORAMOORTHY, G.; RYDER, O. A.; WIENBERG, J. 1995. Cytogenetic analysis shows extensive genomic rearrangements between red howler (*Alouatta seniculus*, Linnaeus) subspecies. **Am. J. Primatol.** **35**, 171–183.
- STEINBERG, E. R.; CORTÉS-ORTIZ, L.; NIEVES, M.; BOLZÁN, A. D.; GARCÍA-ORDUÑA, F.; HERMIDA-LAGUNES, J.; CANALES-ESPINOSA, D.; MUDRY, M. D. (2008) The karyotype of *Alouatta pigra* (Primates: Platyrrhini): mitotic and meiotic analyses. **Cytogenetics and Genome Research** **122** (2): 103–109. doi: 10.1159/000163087
- STEINBERG, E. R. Determinación sexual en primates neotropicales: el caso de los monos aulladores. **Tese de doutorado**. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 2011.
- STEINBERG, E. R.; NIEVES, M.; MUDRY, M. D. Multiple sex chromosome systems in howler monkeys (Platyrrhini, *Alouatta*). **Comparative Cytogenetics**, **8**(1): 43–69, 2014.
- STEIPER, M. E.; YOUNG, N. M. 2009. Primates (Primates). In Hedges, S.B., Kumar, S. (eds), *The Timetree of Life*. **Oxford University Press**, pp. 482–486.
- STEIPER, M. E.; YOUNG, N. M. Primate molecular divergence dates. **Mol. Phylogen. Evol.** **41**: 384–394, 2006.
- SUMMA, J. L. Estudo populacional do bugio *Alouatta clamitans* na península do Bororé-SP, utilizando microssatélites. **Projeto de mestrado**. São Paulo, 2010.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell. Res.** **75**: 304–306, 1972.
- TAGLIARO, C. H.; SCHNEIDER, M. P. C.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; STANHOPE, M. Marmoset phylogenetics, conservation perspectives, and evolution of the mtDNA control region. **Mol. Biol. Evol.** **14**, 674–684, 1997.
- TAGLIARO, C. H.; SCHNEIDER, M. P. C.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; STANHOPE, M. Molecular studies of *Callithrix pygmaea* (Primates, Platyrrhini) based on transferrin intronic and ND1 regions: implications for taxonomy and conservation. **Genet. Mol. Biol.** **23**, 729–737, 2000.
- TORRES, O. M.; LEBOVICI, M. (2001) Caracterización del cariotipo del mono aullador colorado *Alouatta seniculus* que habita en Colombia. *Caldasia* **23**(2): 537–548. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/cal/article/view/17722>
- TORRES, O. M.; RAMÍREZ, C. Estudio citogenético de *Alouatta palliata* (Cebidae). *Caldasia* **25**: 193–198, 2003.
- TURLEAU, C.; de GROUCHY, J.; KLEIN, M. Caryotype d'un atèle male (*Ateles paniscus*). **Ann. Génét.** **17**: 213–215, 1974.

- VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.; KOIFFMANN, C. P.; DUTRILLAUX, B. Chromosomal phylogeny of *Lagothrix*, *Brachyteles* and *Cacajao*. **Cytogenet. Cell. Genet.** 39: 99-104, 1985.
- WIENBERG, J. Fluorescence *in situ* hybridization to chromosomes as a tool to understand human and primate genome evolution. **Cytogenet. Genome Res.** 108: 139-160, 2005.
- YUNIS, E. J.; DE CABALLERO, O. M. T.; RAMÍREZ, C.; EFRAÍN RAMÍREZ, E. (1976) Chromosomal Variations in the Primate *Alouatta seniculus seniculus*. **Folia Primatologica** 25(2-3): 215–224. doi: 10.1159/000155714
- ZACHOS, J.; PAGANI, M.; SLOAN, L.; THOMAS, E.; BILLUPS, K. 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. **Science** 292, 686-693.