

**MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE PRIMATAS
BRASILEIROS**

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA-PIBIC/ICMBio

Análise Comparativa da variabilidade cariotípica de *Cebus flavius*

(Schreber, 1774) e *Cebus libidinosus* Spix, 1823.

**Kalidiane Vieira da Silva
Amely Branquinho Martins**

**JOÃO PESSOA
AGOSTO/2010**

Resumo

O gênero *Cebus* (Erxleben, 1777) agrupa os primatas neotropicais conhecidos popularmente como macacos-prego e caiararas, sendo considerado o grupo taxonômico mais complexo entre os mamíferos neotropicais. Nesse sentido, todo o investimento que vise caracterizar as espécies e definir padrões específicos é de extrema importância. Recentemente, em fragmentos florestais no litoral dos estados de Pernambuco e Paraíba, uma variação fenotípica do gênero *Cebus* foi encontrada: *Cebus flavius*. A falta de informação sobre as populações que ocorrem entre as distribuições conhecidas de *C. flavius* e *C. libidinosus* não permite definir claramente o limite das espécies, gerando incertezas sobre a identidade taxonômica das mesmas. Para auxiliar na compreensão dos processos evolutivos relacionados a este grupo de animais, muitas ferramentas podem ser utilizadas, como é o caso da citogenética. Assim, caracterizar e comparar os cariótipos de *Cebus flavius* e *Cebus libidinosus* foram os principais objetivos do presente trabalho. Para a obtenção de células em suspensão realizou-se uma cultura temporária de linfócitos. Empregou-se a técnica de coloração convencional, onde as metáfases mais elucidativas foram fotografadas para a montagem dos cariótipos. Foram analisados 4 espécimes de *C. flavius* e 3 *C. libidinosus*. Os cariótipos foram descritos pela primeira vez na literatura, constituídos por um $2n=54$ e $NF=73$ para ambas as espécies. Tanto o número quanto a morfologia dos cromossomos foram idênticos para ambas as espécies; a única diferença verificada esteve relacionada ao tamanho dos autosomos, menores em *C. libidinosus*. Os resultados obtidos servem de subsídio para a composição de grupos regionais de acasalamento e estudos citogenéticos futuros.

Palavras-chave: *Cebus flavius*, *Cebus libidinosus*, citogenética.

Abstract

The genus *Cebus* (Erxleben, 1777) belong to the new world primates popularly named capuchin monkeys and *caiararas* is considered the most complex group of neotropical mammals. Thus, all efforts in characterize species and define specific patterns are deeply important. Recently, *Cebus flavius*, a new phenotypic variation, was found in forest fragments of Paraíba and Pernambuco Brazilian states. The lack of knowledge about populations of *C. flavius* and *C. libidinosus* difficult to define clearly the distribution borders, which creates doubts about these species taxonomic identity. Many tools, like cytogenetics, can be used to assist the knowledge of *Cebus* evolutionary processes. Therefore, this work aim to understand and compare the *Cebus flavius* and *Cebus libidinosus* karyotypes. It was performed a temporary lymphocytes culture to obtain cells in suspension. Conventional staining was applied and the most informative metaphases were photographed to assembly the karyotypes. It was analyzed 4 specimens of *C. flavius* and 3 specimens of *C. libidinosus*. Both these species karyotypes were firstly described in the literature and presented $2n=54$ e $FN=73$. Additionally, both karyotypes presented the same number and morphology. The only difference observed between *C. flavius* and *C. libidinosus* karyotypes was the higher size autossomes in the latter. Our results can support future studies with taxonomy, regional breeding groups and cytogenetic.

Keywords: *Cebus flavius*, *Cebus libidinosus*, cytogenetic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica do gênero <i>Cebus</i> , retirado do BSGEOPRIM (2002)	10
Figura 2: Foto de <i>Cebus flavius</i>	17
Figura 3: Foto de <i>Cebus libidinosus</i>	18
Figura 4: Cariótipo de um macho de <i>C. flavius</i> (n ^a de registro 443), proveniente da Paraíba Barra = 1 μm	32
Figura 5: Cariótipo de uma fêmea de <i>C. flavius</i> (n ^o de registro 446), proveniente da Paraíba. Barra = 1 μm	33
Figura 6: Cariótipo de um macho de <i>C. libidinosus</i> , (n ^o de registro 442) proveniente de Alagoas. Barra = 1 μm	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Informações sobre os espécimes processados.....	24
Quadro 2: Relação dos espécimes estudados citogeneticamente	31

LISTA DE ABREVIATURAS

BIOPRIM	Banco de Material Biológico de Primatas Brasileiros CPB/ICMBio.
CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres.
CPB	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Primatas Brasileiros.
IBAMA Renováveis.	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.
IUCN	União Internacional para Conservação da Biodiversidade.
NF	Número fundamental: Número de braços cromossômicos existentes no conjunto cariotípico de uma espécie.
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade.
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba.
UFPB	Universidade Federal da Paraíba.
2n	Número diplóide: Número de cromossomos existentes no cariótipo de uma espécie.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	07
1.1. ORDEM PRIMATES: CONSIDERAÇÕES GERAIS	07
1.2. OS PRIMATAS DO NOVO MUNDO	07
1.3. O GÊNERO <i>CEBUS</i>	09
1.3.1. Aspectos Gerais	09
1.3.2. Taxonomia	11
1.4. ESPÉCIES ESTUDADAS	13
1.4.1. <i>Cebus flavius</i> SCHREBER (1774).....	13
1.4.2. <i>Cebus libidinosus</i> , SPIX (1823).....	15
1.5. CITOGENÉTICA	19
1.5.1. Breve histórico do avanço tecnológico no campo da citogenética	19
1.5.2. Citogenética dos Primatas do Novo Mundo	21
1.5.3. Citogenética do gênero <i>Cebus</i>	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS	23
2.2. CAPTURA DOS ANIMAIS	23
2.2.1. Animais de vida livre	24
2.2.2. Animais de Cativeiro	25
2.3. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	26
2.4. OBTENÇÃO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	26
2.5. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS	27
2.6. TÉCNICA DE COLORAÇÃO: CONVENCIONAL	27
2.7. ANÁLISE DAS LÂMINAS E FOTOGRAFIA DAS METÁFASES	27
2.8. EDIÇÃO DAS IMAGENS E MONTAGEM DOS CARIÓTIPOS	28
3. RESULTADOS	29
3.1. RELAÇÃO DE ESPÉCIMES ANALISADOS	29
3.2. ANÁLISE DAS METÁFASES	29
3.3. ANÁLISE DOS CARIÓTIPOS	30
4. DISCUSSÃO	35
5. AGRADECIMENTOS	41
6. BIBLIOGRAFIA	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 ORDEM PRIMATES: CONSIDERAÇÕES GERAIS

As espécies de primatas constituem uma Ordem extremamente variada; desde os macacos menores, com o tamanho corporal variando de 35 a 80g (como o lêmur), até os grandes primatas (por exemplo, o gorila macho). Independente do seu tamanho esses animais são essencialmente arbóreos e tropicais, apesar de espécies ocuparem todos os principais tipos de ambientes, indo da floresta tropical, ao bosque, savanas e campo semidesértico (LEWIN, 1999).

Desde o surgimento da Ordem Primates várias propostas taxonômicas foram feitas na tentativa de organizar os diferentes Taxa, todas baseadas principalmente em caracteres morfológicos. Entretanto, a despeito das discussões que se estabelecem a esse respeito, uma das propostas mais utilizadas é a de Hershkovitz (1977), onde Catarrhini (Primatas do Velho Mundo) e Platyrrhini (Primatas do Novo Mundo) são consideradas Infra-Ordens (AMARAL, 2002).

Os primatas estão distribuídos na América Central e América do Sul (Platyrrhini), Ásia, África e Madagascar (Prosimii, Catarrhini e Hominoidea) (AMARAL, 2002).

1.2 OS PRIMATAS DO NOVO MUNDO

Os primatas do Novo Mundo ou primatas Neotropicais (Infra-ordem Platyrrhini), representam o táxon com o maior número de espécies entre os primatas (IUGHETTI, 2008) e apresentam um grande espectro de modificações morfológicas e comportamentais (FLEAGLE, 1988).

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 ao seu grupo irmão Catarrhini (REIS, 2006) que une os macacos do Velho Mundo, grandes macacos e humanos (NOWAK, 1999).

Dados moleculares sugerem que o início da divergência Platyrrhini-Catarrhini ocorreu entre 35 e 5 milhões de anos atrás (STEIPER e YOUNG, 2006), e a análise dos fósseis indica que a maioria das linhagens já se encontrava diferenciada desde o Mioceno (FLEAGLE, 1988). Apesar de esclarecida sua origem africana, não se entende como os Platyrrhini colonizaram a América do Sul, visto que quando os primatas apareceram no Novo Mundo os dois continentes já haviam se separado (GRAPHODATSKY, 2007).

Atualmente, os primatas neotropicais estão distribuídos em uma vasta região do Novo Mundo, se estendendo do México ao norte da Argentina (FLEAGLE, 1988; STEIPER e YOUNG, 2006; SEUANEZ, *et al.*, 2005). Desde então, a radiação filética desta infra-ordem explica, morfológica e cariotipicamente, a ampla diversidade dos diferentes taxa (SEUANEZ, *et al.*, 2005).

A filogenia dos Platyrrhini tem sido repetidamente investigada, e a origem monofilética é a hipótese mais aceita (SEUANEZ, *et al.*, 2005; SCHNEIDER, *et al.*, 2004; GOODMAN, *et al.*, 1998). Embora muitas publicações tenham analisado as relações filogenéticas entre os Platyrrhini, ainda não há um consenso definitivo (GARCIA *et al.*, 2002); entretanto, pode-se afirmar que os primatas do Novo Mundo estão atualmente agrupados em cinco famílias: **Atelidae** (com os gêneros *Alouatta*, *Ateles*, *Lagothrix*, *Oreonax* e *Brachyteles*), **Aotidae** (com o gênero *Aotus*), **Callitrichidae** (com os gêneros *Cebuella*, *Mico*, *Callithrix*, *Callimico*, *Saguinus* e

Leontopithecus), **Pitheciidae** (com os gêneros *Callicebus*, *Pithecia*, *Chiropotes* e *Cacajao*) e **Cebidae** (com os gêneros *Saimiri* e *Cebus*) (PRIMATE-SG, 2009).

1.3 O GÊNERO *CEBUS*

1.3.1 Aspectos Gerais

O gênero *Cebus* (Erxleben, 1777), incluído na família *Cebidae*, agrupa os primatas neotropicais conhecidos popularmente como macacos-prego e caiararas. Os macacos-prego são primatas de médio porte, medindo em torno de 90cm de comprimento total e peso variando de 3 a 5 kg. São arborícolas, diurnos, têm dieta onívora, possuem uma cauda semi-preensil e pelos eriçados no alto da cabeça, chamados de tufo, que variam em seu formato nas distintas espécies (FREESE e OPPENHEIMER, 1981; BICCA-MARQUES *et al.*, 2006).

Os macacos-prego e caiararas se distribuem por quase toda a região Neotropical, vivendo em grupos sociais numerosos, e ocupando virtualmente todos os tipos de ambientes florestados; desde os mais secos, como as florestas da costa da Colômbia e da Venezuela, Cerrados e Caatingas no Brasil, até os mais úmidos, como a Amazônia e a Mata Atlântica (BICCA-MARQUES *et al.*, 2006; FREESE e OPPENHEIMER, 1981). (Figura 1).

Acredita-se que os limites da distribuição geográfica de *Cebus* não estejam bem definidos, pois algumas espécies demonstram áreas de sobreposição, gerando, assim, a idéia de áreas transicionais e indicando, como consequência, a possibilidade de hibridização (SILVA, 2010).

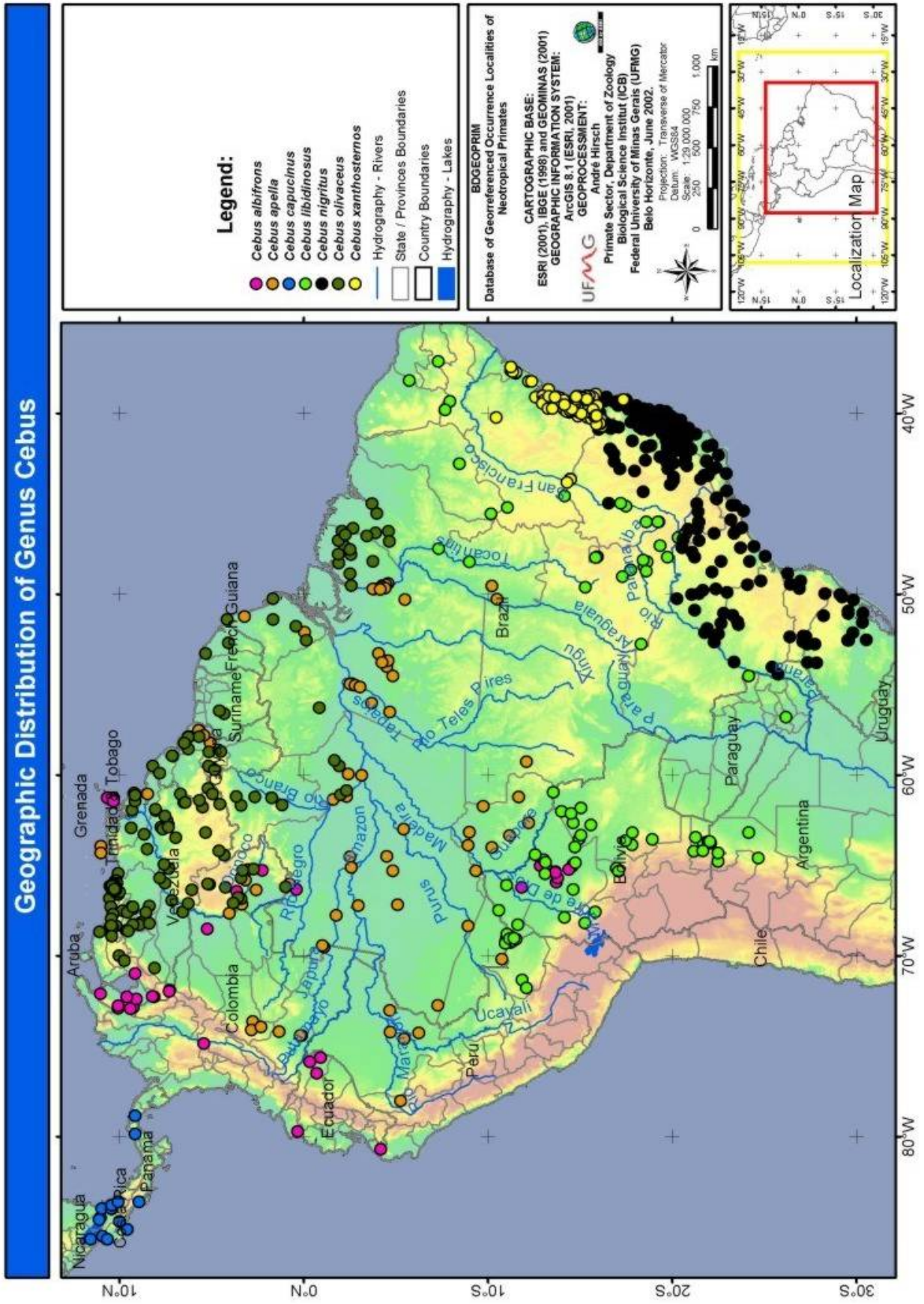


Figura 1: Distribuição geográfica do gênero *Cebus*, retirado do BDGEOPRIM (2002)

1.3.2 Taxonomia

A taxonomia do gênero *Cebus* é um assunto controverso. Indivíduos deste gênero mostram intensa variação na cor do pelo e padrões que dependem da idade, gênero e localização geográfica. Dessa forma, *Cebus* pode ser considerado um dos grupos com classificação mais complexa entre os mamíferos Neotropicais.

Em 1949, Herszhkovitz publicou um trabalho clássico no qual dividiu *Cebus* em dois grupos de espécies, tomando por base, entre outros caracteres, a presença ou não de tufo de pelos na parte frontal da cabeça. Nesse trabalho, Herszhkovitz (1949) indicou que o grupo de espécies com tufo, apesar de polimórfico, seria monoespecífico, compreendendo apenas *Cebus apella* Linnaeus, 1758. Por sua vez, o grupo sem tufo seria composto por três espécies: *Cebus capucinus* Linnaeus, 1758, *Cebus albifrons* Humboldt, 1812 e *Cebus nigrivittatus* Wagner, 1848 (SILVA-JUNIOR, 2001).

Após revisar o grupo de macacos-prego com tufo, que atualmente inclui *Cebus flavius* e *Cebus libidinosus*, Hill (1960) descreveu 16 subespécies para *C. apella*.

Mittermeier *et al.*, (1988) fizeram uma revisão onde consideraram dentro do grupo dos sem tufo *C. olivaceus* o nome correto para *C. nigrivittatus*. Além disso, mantiveram *C. apella* como única espécie válida para o grupo com tufo, possuindo cinco subespécies. Esta classificação, que já está desatualizada, ainda é amplamente utilizada, levando a muitos erros de identificação.

Torres de Assumpção (1983, 1988) analisou o grupo com tufo usando métodos estatísticos para estudos taxonômicos. Com este procedimento ela reconheceu cinco subespécies para *C. apella*, que foi considerada como a única espécie válida para o grupo com tufo.

Groves (2001) utiliza o termo *capucinus* e grupo *apella* para denominar o grupo sem tufo e com tufo, respectivamente. No primeiro grupo ele manteve praticamente a mesma classificação de Hershkovitz (1949). Além disso, ele adiciona ao grupo *capucinus* *C. kaapori* Queiroz 1992, que possui sua distribuição restrita aos estados do Pará e Maranhão (QUEIROZ, 1992) e apresenta, aparentemente, distribuição disjunta das outras espécies sem tufo (SILVA-JUNIOR, 2001)

Para as espécies de *Cebus* com tufo, o mesmo autor reconhece quatro espécies com subespécies: **Cebus apella** (*C. a. apella*, *C. a. fatuellus*, *C. a. macrocephalus*, *C. a. peruanus*, *C. a. tocantinus* e *C. a. margaritae*), **C. libidinosus** (*C. l. libidinosus*, *C. l. pallidus*, *C. l. paraguayanus* e *C. l. juruanus*), **C. nigrinus** (*C. n. nigrinus*, *C. n. robustus* e *C. n. cucullatus*) e **C. xanthosternos**.

Silva-Júnior (2001) realizou a revisão mais recente e abrangente de *Cebus*. Este subdividiu o gênero em dois subgêneros, *Cebus* e *Sapajus*, baseado em diferenças morfométricas, padrões de coloração da pelagem e distribuição geográfica. Contudo, em um estudo posterior, o mesmo autor considerou os dois subgêneros como gêneros distintos (SILVA-JUNIOR, 2002).

Percebemos que a questão sobre a diversidade de taxa no gênero *Cebus* tem sido investigada por vários autores, que divergem entre si quanto ao número de espécies e subespécies reconhecidas como válidas, propondo diferentes arranjos taxonômicos.

À medida que novas formas vêm sendo descritas, aumentam-se as dificuldades de compreensão da taxonomia do gênero (HERSHKOVITZ, 1987; HILL, 1960; TORRES DE ASSUMPÇÃO, 1983, 1988). Para Hill (1960) e Torres de Assumpção (1983,1988), a principal fonte dessa dificuldade é o grande polimorfismo encontrado, além dos problemas relacionados à amostragem, conforme afirma Silva-Júnior (2001).

Nos indivíduos deste gênero, partes diferentes do corpo possuem colorações distintas, gerando padrões na coloração, cuja variação intraespecífica da cor da pelagem, combinada com a variação na forma do tufo, trazem dificuldades na identificação taxonômica (Torres de Assumpção, 1983).

Ainda segundo Torres de Assumpção (1983), algumas das variações observadas decorrem das alterações ontogenéticas, diferenças sexuais e hibridização entre populações adjacentes, mas a maioria delas é de natureza puramente individual, aparecendo em membros das mesmas populações.

Desse modo, todo o investimento que vise caracterizar as espécies e definir padrões específicos é de extrema importância.

1.4 ESPÉCIES ESTUDADAS

1.4.1 *Cebus flavius* SCHREBER (1774)

Recentemente, em fragmentos florestais no litoral dos estados de Pernambuco e Paraíba, uma variação fenotípica do gênero *Cebus* foi encontrada: o macaco-pregalego, *Cebus flavius* (figura 2). Esta espécie, registrada inicialmente por Marcgrave (1648) e Schreber (1774), permaneceu ignorada por mais de dois séculos até ser redescoberta por um estudo conjunto do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Primatas Brasileiros (CPB) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e da Universidade Federal da Paraíba-UFPB (OLIVEIRA e LANGGUTH, 2006). Estes autores concluíram que esta forma realmente diferia das outras duas espécies de macacos-prego geograficamente mais próximas (*C. libidinosus* e *C. xanthosternos*), mas verificaram que já havia um nome disponível para ela, *Símia flavia* Schereber, 1774. Eles então revalidaram *Símia flavia*, que, por combinação,

passou a se chamar *Cebus flavius*, e designaram um neótipo para a espécie (MIRANDA, 2008).

Cebus flavius possui coloração homogênea e não apresenta contraste na coloração entre o corpo e as extremidades dos ombros e cauda. A cor dos pelos varia do amarelo-camurça ao castanho-amarelado. Os pelos esbranquiçados oriundos da testa invadem o alto da cabeça, posicionando a mancha coronal mais para trás da cabeça, diferente da espécie mais próxima geograficamente, *Cebus libidinosus* (figura 3), em que a mancha coronal toma toda superfície do capuz. Em *C. flavius*, os tufo se apresentam deitados sobre a cabeça, aparentando a ausência de tal caractere (OLIVEIRA e LANGGUTH, 2006).

Sua distribuição geográfica restringe-se a esparsos remanescentes de Mata Atlântica do nordeste brasileiro ao norte do Rio São Francisco (OLIVEIRA e LANGGUTH, 2006), que atualmente possui apenas 7% de sua cobertura original, totalmente fragmentada (TABARELLI *et al.*, 2005). Nesse contexto, *C. flavius* encontra-se com todas suas populações isoladas e mal distribuídas, sendo considerada uma espécie criticamente ameaçada pela IUCN (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Os limites norte e leste da distribuição é o Oceano Atlântico. Ao Sul, a distribuição apresenta parapatria com *C. xanthosternos*, sendo a barreira geográfica entre as espécies o Rio São Francisco. A oeste, seu limite está mal definido, devido à falta de registros no leste da Caatinga e áreas de transição com a Mata Atlântica (SILVA, 2010). Essa falta de informação sobre as populações que ocorrem entre as distribuições conhecidas de *C. flavius* e *C. libidinosus* não permite definir claramente o limite das espécies, gerando incertezas sobre a identidade taxonômica das mesmas. A possível

presença de uma área de intercessão colocaria em questão a validade de *C. flavius* e *C. libidinosus* como espécies diferentes.

1.4.2 *Cebus libidinosus*, SPIX (1823)

Apresentando uma coloração que varia do camurça ao marrom avermelhado, este animal tem os pelos das extremidades dos membros e da cauda na cor marrom escura. Possui macha pré-auricular marrom escura, com pelos da região ventral amarelo-alaranjado. Suas diferenças morfológicas externas com *C. flavius* consistem, principalmente, no formato do capuz (*C. libidinosus* apresentam freqüentemente pelos eretos) e no contraste na coloração dos pelos das extremidades corporais (antebraços e cauda) em relação ao restante do corpo, conspícuo em *C. libidinosus* (SILVA-JUNIOR, 2001; SILVA, 2010) (Figura 3).

Esta é uma espécie de ampla distribuição geográfica, contígua com a maioria das outras espécies de *Sapajus*, se estendendo pelos domínios Atlântico, das Caatingas e dos Cerrados. (SILVA-JUNIOR, 2001).

C. libidinosus ocupa a área central da distribuição de *Cebus*, tendo como limite norte o Oceano Atlântico, e seu limite oeste definido pela Amazônia. Com a identificação de *C. flavius* como habitante da Mata Atlântica do nordeste, o limite leste de *C. libidinosus* torna-se impreciso, necessitando de novos estudos para esclarecer sua distribuição geográfica e suas relações taxonômicas com *C. flavius*.

Assim, torna-se necessário proceder a uma nova tentativa de organização do conhecimento, acrescida de informações atualizadas, para estabelecer um arranjo de taxa do gênero *Cebus* que possa auxiliar a compreender os processos evolutivos relacionados a este grupo de animais. Este esforço deverá solucionar um dos problemas da sistemática

de mamíferos neotropicais e dar subsídios aos inventários de diversidade faunística, que dão suporte às decisões sobre áreas geográficas prioritárias para a conservação (SILVA-JÚNIOR, 2001).



Amely Branquinho - Banco de Imagens do CPB/ICMBio

Figura 2: Foto de *Cebus flavius*



Figura 3: Foto de *Cebus libidinosus*

1.5 CITOGENÉTICA

1.5.1 Breve histórico do avanço tecnológico no campo da citogenética.

Nas primeiras décadas da Citogenética para muitos autores o cariótipo não tinha qualquer significado evolutivo, pois se entendia que os cromossomos não eram relevantes, mas sim os genes que eles continham. A importância da citogenética na evolução foi aventada somente após a descoberta do efeito de posição (STURTEVANT, 1925 *apud* BENAZZI, 1973), segundo o qual “o efeito de um locus não depende apenas da natureza do gene, mais também da sua posição em relação a outros genes”. Desde então ficou evidente que a base física da evolução é representada não apenas por genes, mais também por cromossomos como entidades morfológicas bem definidas, caracterizadas por determinadas associações e seqüências gênicas, posições dos centrômeros e distribuições de eucromatina e heterocromatina dentro do genoma de cada espécie. (AMARAL, 2002).

Os métodos de comparação cariotípica foram desenvolvidos há décadas para estudar espécies relacionadas e progressivamente mais distantes. Nesse sentido, as inovações técnicas foram um fator essencial para o crescimento da citogenética (AMARAL, 2002). Na década de 50 houve um grande desenvolvimento de estudos citogenéticos de mamíferos, impulsionados por pesquisas realizadas com cariótipos humanos, com a técnica de cultura de tecidos, uso de colchicina, solução hipotônica e fixação em álcool e ácido acético. Tal fato permitiu o conhecimento do número cromossômico correto de determinadas espécies, e o uso da colchicina possibilitou melhor caracterização dos dados obtidos, uma vez que permitiu o uso de células metafásicas. Dessa forma, houve uma grande expansão nos estudos citogenéticos de

diversos grupos de mamíferos, com a identificação do número e da morfologia dos cromossomos das espécies estudadas (SILVA, 1999).

Na década de 70 começaram a ser utilizados os métodos de bandamento como base para estudos de filogenia, permitindo uma noção mais detalhada das relações filogenéticas geradas durante os milhões de anos de evolução dos primatas (DUTRILLAUX e COUTURIER, 1983; FERGUSON-SMITH e TRIFONOV, 2007).

A partir dos anos 80, novas técnicas somaram-se às informações fornecidas pela Citogenética Convencional, permitindo a análise de novos dados. Esse conjunto de novas técnicas é genericamente denominado de Citogenética Molecular, por lidar com informações diretamente relacionadas à composição de bases do DNA (AMARAL, 2002).

Além de estudos moleculares, muitas ferramentas (como estudos baseados na morfologia e biogeografia) têm sido utilizadas juntamente à Citogenética Clássica. Assim, a citogenética apresenta-se como uma ferramenta fundamental (CONSIGLIERE *et al.*, 1996), no sentido de permitir uma melhor compreensão dos processos evolutivos das espécies, já que não se baseia apenas em características superficiais.

Uma caracterização clara e precisa do cariótipo de uma espécie é de suma importância quando se deseja comparar citogeneticamente espécies diferentes, examinar a variação de indivíduos de uma mesma espécie ou detectar variação geográfica (GUERRA, 1988). A citogenética torna-se, então, um procedimento fundamental no estudo de primatas, visto que permite uma melhor caracterização das espécies.

1.5.2 Citogenética dos Primatas do Novo Mundo.

Os macacos neotropicais formam um dos grupos taxonômicos mais variáveis cariologicamente (CONSIGLIERE *et al.*, 1996; GARCIA *et al.*, 2002; NIEVES *et al.*, 2005), considerados em pleno processo de especiação cromossômica. Apresentam espécies irmãs quase idênticas morfológicamente, mas divergentes geneticamente (DUMAS *et al.*, 2005; CONSIGLIERE *et al.*, 1998), com uma implicação importante para a teoria da especiação e conservação.

A extensa variabilidade cromossômica intra e interespecífica e intrapopulacional ($2n=16$ a 62) e os polimorfismos encontrados são atribuídos à alta frequência de rearranjos cromossômicos complexos e Robertsonianos (fusão e fissão), translocações recíprocas e inversões (NAGAMACHI *et al.*, 1990).

A evolução cariotípica dos Platyrrhini ainda não é compreendida (STANYON *et al.*, 2000; MUDRY *et al.*, 2001). Os cariótipos de algumas espécies tem mudado pouco ao longo dos anos (SEUANEZ *et al.*, 1988), embora alguns grupos apresentem uma proporção mais rápida de reorganizações cromossômicas (STANYON *et al.*, 2000). Inclusive algumas variações na morfologia dos cromossomos e nos números diplóides estão associadas à origem geográfica dos espécimes (DE OLIVEIRA *et al.*, 1995).

1.5.3 Citogenética do gênero Cebus

Dentre todos os gêneros, *Cebus* é o que apresenta o cariótipo mais conservado em relação ao ancestral dos Platyrrhini (GARCIA *et al.*, 1983, 2002; Nieves *et al.*, 2005).

Apesar do pouco conhecimento que se tem atualmente (SALDANHA e KOIFFMANN, 1981), os estudos citogenéticos no gênero *Cebus* mostram que o número diplóide varia de 52 a 54 cromossomos (AMARAL *et al.*, 2008; 2002).

Silna-Júnior (2001) identificou que as espécies de *Cebus* com tufo parecem possuir um número diplóide constante ($2n=54$), enquanto as espécies sem tufo apresentam número diplóide variável ($2n=52$ ou 54).

Os cariótipos das espécies de *Cebus* possuem como característica comum a presença de uma grande quantidade de heterocromatina constitutiva, poucos cromossomos metacêntricos, uma grande quantidade de acrocêntricos e presença de constrição secundária em dois pares acrocêntricos pequenos (GARCIA *et al.*, 1983).

Com relação aos cariótipos de *C. flavius* e *C. libidinosus*, ainda não há nenhum registro na literatura atual. Nesse sentido, seria de grande importância essas informações cromossômicas, em decorrência da grande semelhança fenotípica encontrada entre as duas espécies. Assim, o suprimento dessa carência de dados seria interessante para ambas as espécies no sentido de auxiliar no esclarecimento de suas relações, e especialmente para *C. flavius*, por ser considerada uma espécie criticamente ameaçada pela IUCN.

Desse modo, padronizar os cariótipos de *Cebus flavius* e *Cebus libidinosus* e realizar uma avaliação comparativa baseada na descrição e análise de seus cromossomos, através da técnica de coloração convencional, são os principais objetivos do presente trabalho. Além disso, são também objetivos secundários verificar se há ocorrência de variação intra-específica entre os espécimes e contribuir para a revisão taxonômica das espécies estudadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS.

As amostras de sangue periférico de *C. flavius* e *C. libidinosus* utilizadas para o desenvolvimento dessa monografia foram provenientes de animais de vida livre, capturados na Mata do rio vermelho/Usina Japungu-Santa Rita/Paraíba e de animais sem procedência definida, provenientes dos CETAS (Centro de triagem de animais silvestres)/IBAMA da Paraíba e Alagoas (Quadro 1).

2.2 CAPTURA DOS ANIMAIS

A realização de todas as atividades foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), mediante a Autorização para Atividades com Finalidade Científica (SISBIO) N° 19927-1, com o consentimento dos responsáveis pelas áreas de estudo.

Quadro 1 – Informações Sobre os Espécimes Processados			
Número de registro	Espécie	Sexo	Procedência
CPB 32	<i>Cebus libidinosus</i>	fêmea	CETAS/PB
CPB 45	<i>Cebus libidinosus</i>	macho	CETAS/PB
CPB 135	<i>Cebus libidinosus</i>	macho	CETAS/PB
CPB 141	<i>Cebus libidinosus</i>	macho	CETAS /PB
CPB 279	<i>Cebus libidinosus</i>	macho	CETAS/PB
CPB 383	<i>Cebus flavius</i>	macho	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 429	<i>Cebus flavius</i>	fêmea	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 430	<i>Cebus flavius</i>	fêmea	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 431	<i>Cebus flavius</i>	fêmea	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 432	<i>Cebus flavius</i>	fêmea	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 433	<i>Cebus flavius</i>	macho	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 434	<i>Cebus flavius</i>	macho	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 435	<i>Cebus flavius</i>	macho	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 441	<i>Cebus libidinosus</i>	macho	CETAS/AL
CPB 442	<i>Cebus libidinosus</i>	macho	CETAS /AL
CPB 444	<i>Cebus flavius</i>	macho	CETAS /AL
CPB 445	<i>Cebus flavius</i>	macho	CETAS /AL
CPB 446	<i>Cebus flavius</i>	fêmea	CETAS/PB
CPB 447	<i>Cebus libidinosus</i>	macho	CETAS/PB
CPB 449	<i>Cebus flavius</i>	macho	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 450	<i>Cebus flavius</i>	macho	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 451	<i>Cebus flavius</i>	macho	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 452	<i>Cebus flavius</i>	fêmea	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 453	<i>Cebus flavius</i>	macho	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 454	<i>Cebus flavius</i>	macho	Mata do rio vermelho/Usina Japungu- Santa Rita/PB
CPB 455	<i>Cebus libidinosus</i>	macho	CETAS/PB
CPB 456	<i>Cebus libidinosus</i>	macho	CETAS/PB
CPB 457	<i>Cebus libidinosus</i>	macho	CETAS/PB
CPB 458	<i>Cebus libidinosus</i>	macho	CETAS/PB
Total	29	F M	

Quadro 1. Número de registro, espécie, sexo e origem dos espécimes processados.

2.2.1 Animais de vida livre

Para a captura e processamento foi adotado o protocolo do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Primatas Brasileiros (CPB, 2005). Os grupos foram previamente observados e cevados em pontos estratégicos (local de percurso dos

animais). Inicialmente, em cada ponto de ceva, foram montados jiraus onde foram oferecidas espigas de milho e, em algumas ocasiões, cana-de-açúcar. Observando-se o consumo por parte dos animais, espigas de milho passaram a ser colocadas dentro de armadilhas metálicas tipo “Tomahawk” abertas, porém travadas, para que os macacos-prego se habituassem a entrar nas mesmas. Uma vez habituados, as armadilhas foram acionadas para a captura. Todos os procedimentos de captura foram realizados pela equipe técnica do CPB.

Uma vez capturados, os espécimes foram retirados das armadilhas e anestesiados por médico veterinário do CPB, com Cloridrato de Cetamina. Foram então submetidos a exame clínico e coleta de sangue periférico. Para cada indivíduo foram coletadas informações de sexo, faixa etária, peso, medidas, estado reprodutivo, marcas individuais e outras características julgadas pertinentes. Além disso, receberam uma identificação individual (código de registro no CPB) e tatuagem na coxa esquerda. Após recuperação total da anestesia, os animais foram soltos no mesmo local de captura. Os dados coletados foram anotados em fichas individuais de processamento.

2.2.2 Animais de Cativeiro

Os animais submetidos à coleta foram capturados com uso de puçás, por seus tratadores, e anestesiados pelos médicos-veterinários responsáveis com Cloridrato de Cetamina. Todos os indivíduos foram submetidos a exame clínico geral, registro de dados morfométricos e coleta de sangue periférico. Após a contenção dos espécimes e término dos procedimentos, estes permaneceram sob observação até o completo restabelecimento e depois foram realocados em seus recintos. Os dados coletados foram anotados em fichas individuais de processamento.

2.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

O sangue periférico foi coletado em tubo heparinizado e aproximadamente 1 a 2mL de sangue foi retirado.

Todo o material biológico coletado está depositado no banco de materiais biológicos do CPB (BIOPRIM).

2.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

Para obtenção de células em suspensão realizamos uma cultura temporária de linfócitos, seguindo a técnica proposta por Moorhead *et.al.*, (1960) modificada. Utilizamos, para cada 1ml de sangue periférico, 10ml de meio RPMI 1640 completo (20% de soro bovino fetal, SBF; 2% de fitohemaglutinina; 30 unidades de heparina, 100UI/mL de penicilina e 50mg/ml de estreptomicina) por 72 horas em estufa a 37°C.

Após as 72 horas de cultivo das células do sangue, foi adicionado 0,5 mL de colchicina a 0,5M. Os tubos foram homogeneizados e recolocados na estufa a 37° por mais 2 horas.

A cultura seguiu então para a centrifuga a 2000 R.P.M por 10min. Depois de centrifugado o material, o sobrenadante foi retirado. Adicionou-se 10ml de solução hipotônica (KCl a 0,075M) e deixou-se em banho-maria a 37° por 30 min. Em seguida, o fixador Carnoy (1 parte de ácido acético para 3 partes de metanol) foi adicionado. O material permaneceu em repouso por 1 a 5 min e este foi novamente centrifugado, retirado o sobrenadante e acrescido de fixador. A lavagem com fixador seguiu por mais duas vezes até que o “pellet” se mostrasse límpido. Após a última centrifugação

adicionou-se uma quantidade de fixador proporcional ao volume do precipitado a fim de se obter uma diluição adequada para o preparo das lâminas.

2.5. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

As lâminas foram identificadas, higienizadas com álcool e subsequentemente aquecidas em banho-maria a 60°, onde foram gotejadas duas gotas do material previamente ressuspendido por lâmina. O restante do concentrado celular foi, então, armazenado em freezer a -20°C.

2.6 TÉCNICA DE COLORAÇÃO: CONVENCIONAL

Para a análise do número e morfologia dos cromossomos, as lâminas com preparações cromossômicas foram coradas com Giemsa, diluído em tampão fosfato Sorensen (NaHPO₄ 0,03 M e KH₂PO₄ 0,03 M) pH 6,8 por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente.

2.7 ANÁLISE DAS LÂMINAS E FOTOGRAFIA DAS METÁFASES

As análises foram realizadas em um microscópio de marca Olympus, modelo BX-41.

As metáfases encontradas em cada lâmina foram registradas, bem como o número de cromossomos, obtendo-se uma moda do número diplóide (2n) de cada indivíduo analisado, e o número fundamental (NF), ou seja, a quantidade de braços cromossômicos existente em cada cariótipo.

A determinação da moda do número de cromossomos por metáfase é importante porque há freqüentemente perda de cromossomos ou junção de metáfases adjacentes no

momento em que a suspensão celular é gotejada na lâmina, diminuindo e aumentando, respectivamente, o número diplóide, podendo, assim, levar a uma imprecisão do $2n$ da espécie a ser estudada.

As metáfases mais elucidativas foram fotografadas com câmera digital acoplada ao microscópio, modelo Q-color – 5 com 05 megapixels de resolução, em objetiva de imersão, com aumento de 1000x, usando filtro de densidade neutra no microscópio.

2.8 EDIÇÃO DAS IMAGENS E MONTAGEM DOS CARIÓTIPOS

As fotografias foram trabalhadas no programa Photoshop CS3, com a finalidade de corrigir a densidade e aumentar o contraste.

Os cariótipos foram montados segundo o padrão utilizado na literatura; agrupando os cromossomos de acordo com o tamanho e a posição do centrômero, sendo ordenado primeiramente os cromossomos de 2 braços e, por fim, os acrocêntricos, sempre em ordem decrescente de tamanho.

Os dados resultantes do emparelhamento dos homólogos foram comparados com informações existentes na literatura, de modo a tirar conclusões e inferir os possíveis mecanismos de evolução cromossômica que os originaram.

3 RESULTADOS

3.1 RELAÇÃO DE ESPÉCIMES ANALISADOS

Dentre os 29 indivíduos processados, 7 espécimes apresentaram resultados e tiveram, conseqüentemente, seus conjuntos cromossômicos analisados. A padronização do cariótipo de *C. flavius* foi baseada em 4 indivíduos, sendo 3 machos de vida livre e uma fêmea do CETAS, todos provenientes do estado da Paraíba. Para padronizar o cariótipo de *C. libidinosus*, foram analisados 3 indivíduos do sexo masculino, provenientes dos estados da Paraíba e Alagoas. (Quadro 1)

3.2 ANÁLISE DAS METÁFASES

Das metáfases obtidas a partir das células sanguíneas, nem todas se apresentaram qualitativamente adequadas para análise, com cromossomos bem espalhados e morfologia nítida; estas foram, portanto, desconsideradas. Das metáfases elucidativas, foram contados o número diplóide ($2n$) e o número fundamental (NF), obtendo-se o número diplóide modal ($2n$ modal) para cada indivíduo, conforme mencionado na metodologia.

Desse modo, todos os espécimes analisados apresentaram uma moda de 54 cromossomos, ou seja, ambas as espécies apresentaram um $2n=54$. Para *Cebus flavius* este resultado esteve presente em 37 das 41 metáfases avaliadas. Para *Cebus libidinosus* o $2n=54$ foi observado em 51 das 60 metáfases examinadas.

3.3 ANÁLISE DOS CARIÓTIPOS

Baseado nas metáfases analisadas, foi padronizado o cariótipo de *Cebus flavius* para ambos os sexos (Figuras 4 e 5) e de *Cebus libidinosus* para o sexo masculino (Figura 6).

A análise cromossômica em coloração convencional evidenciou que a espécie *C. flavius* apresenta um cariótipo com $2n=54$ e um $NF=73$, constituído por 8 pares de cromossomos submetacêntricos, um pequeno par metacêntrico e 17 pares de acrocêntricos. O cromossomo X observado foi um submetacêntrico de tamanho médio e o Y foi um pequeno acrocêntrico.

Para *C. libidinosus*, o conjunto cariotípico encontrado apresentou 26 pares de autossomos, com um $2n=54$, assim como *C. flavius*. O cariótipo de *C. libidinosus* é composto por 8 pares de submetacêntricos, 1 pequeno par de metacêntrico e 17 pares de acrocêntricos. O cromossomo X mostrou-se como sendo um submetacêntrico e o Y apresentou-se como um pequeno acrocêntrico (figura 4).

Quadro 2 – Relação dos Espécimes Estudados Citogeneticamente						
Espécie	Espécimes analisados	Localidade	Número de registro	Data de coleta	2n	NF
<i>Cebus libidinosus</i>	1 (M)	Alagoas	CPB442	06/out/2009	54	73
	1 (M)	Paraíba	CPB141	22/mar/2010	54	73
	1 (M)	Paraíba	CPB457	22/mar/2010	54	73
<i>Cebus flavius</i>	1 (M)	Paraíba	CPB433	12/ago/2009	54	73
	1 (M)	Paraíba	CPB434	12/ago/2009	54	73
	1 (M)	Paraíba	CPB435	12/ago/2009	54	73
	1 (F)	Paraíba	CPB446	09/out/2009	54	73
TOTAL	7					

Quadro 2: Relação dos espécimes estudados citogeneticamente, onde: TOTAL = número total de exemplares; M = macho; F = fêmea, Número de registro = número de tombamento no Banco de Material Biológico (BIOPRIM/CPB); Data de coleta = data em que o material biológico foi coletado; 2n = número diplóide; e NF = número fundamental.

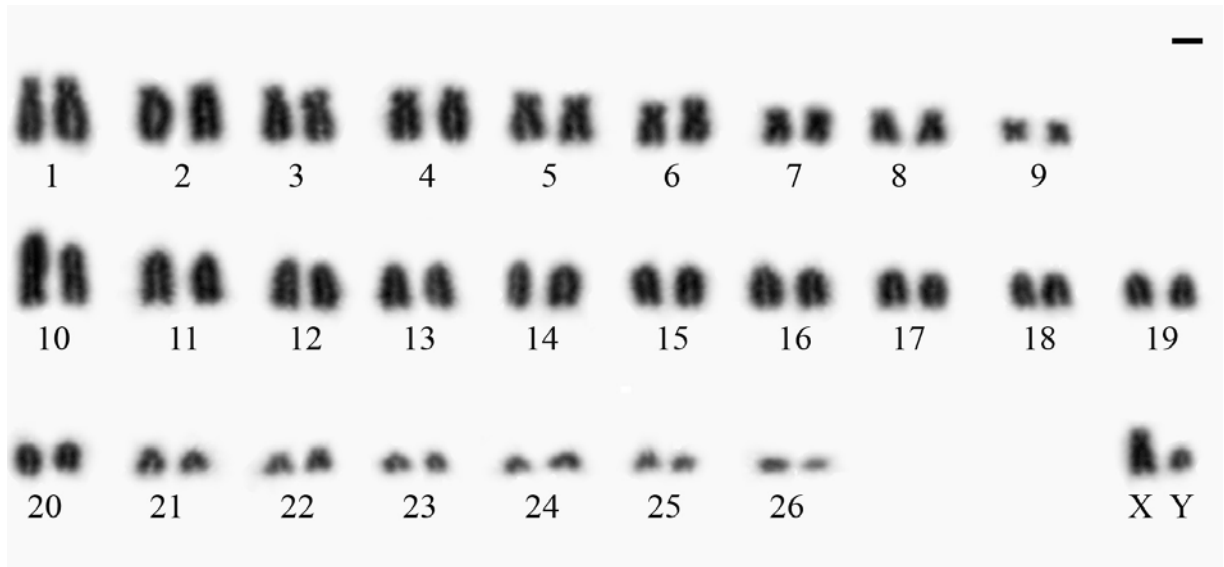


Figura 4 - Cariótipo de um macho de *C. flavius* (nº de registro 433) proveniente da Paraíba. Barra = 1 µm.

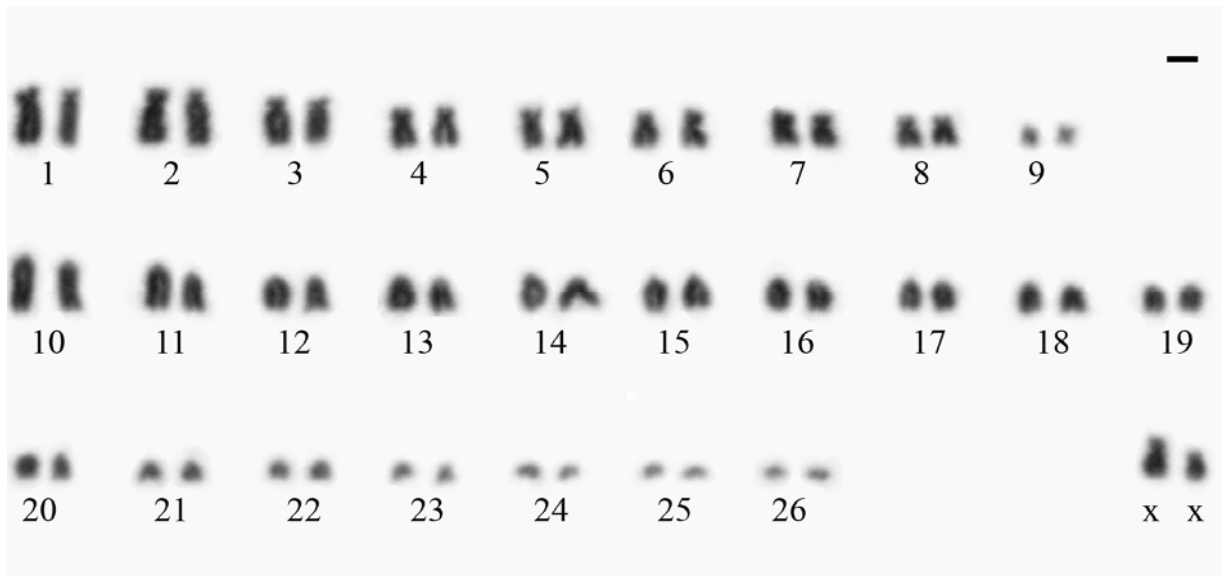


Figura 5 - Cariótipo de uma fêmea de *C. flavius* (nº de registro 446), proveniente da Paraíba. Barra = 1 µm.

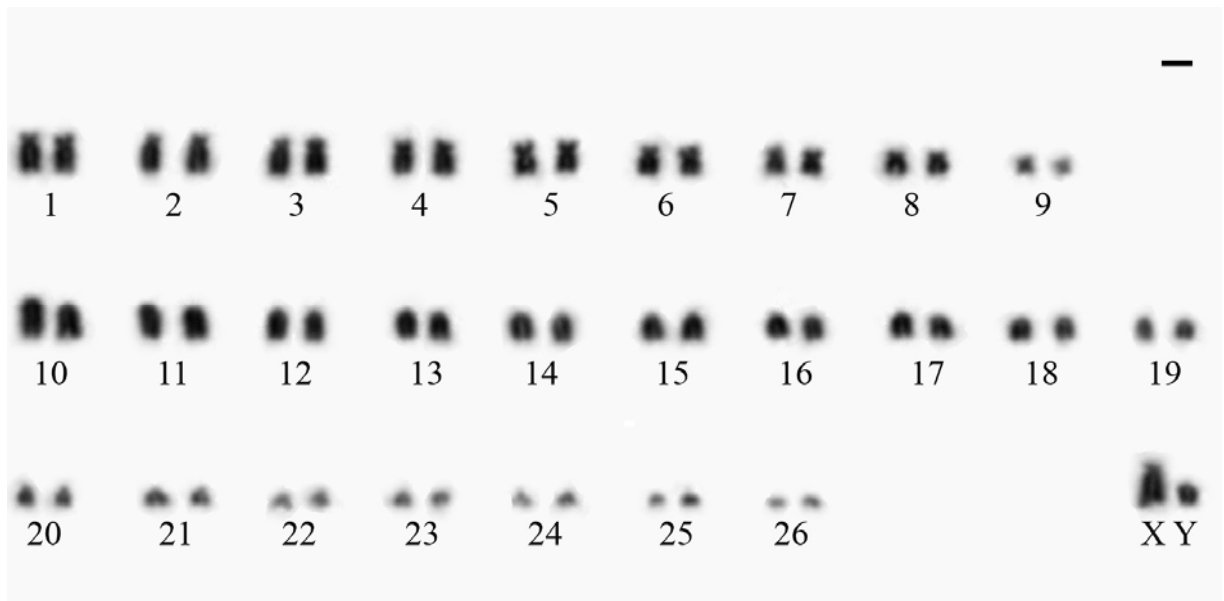


Figura 6 - Cariótipo de um macho de *C. libidinosus*, (nº de registro 442) proveniente de Alagoas.
Barra = 1 μ m

DISCUSSÃO

Baseado nos exemplares analisados, os cariótipos de *Cebus flavius* e *Cebus libidinosus* puderam ser estudados pela primeira vez na literatura. Através da coloração convencional utilizada, o conjunto cariotípico de ambas as espécies foram padronizados e comparados quanto ao número de cromossomos e sua morfologia.

Um aspecto que merece ser discutido refere-se ao tamanho das amostras utilizadas. Nesse sentido, embora o n amostral de indivíduos de *C. libidinosus* disponível seja menor do que o verificado para *C. flavius*, o número de metáfases encontradas de *C. libidinosus* foi bem maior, o que de certa forma compensa esse déficit. Além disso, o fator mais importante para a caracterização cariotípica básica é o n de metáfases encontradas por indivíduo, para que assim o cariótipo de determinada espécie possa ser descrito com segurança.

Outra questão que merece ser discutida refere-se à dificuldade em adquirir fêmeas de *C. libidinosus*. Devido à impossibilidade de capturar indivíduos de vida livre, dependeu-se da disponibilidade de animais nos CETAS, que normalmente apreendem maior número de machos. Desse modo, não foi possível a descrição cariotípica para este sexo, uma vez que os poucos espécimes estudados não proporcionaram resultados suficientes e consistentes para tal padronização.

Finalmente, não podemos deixar de mencionar a dificuldade laboratorial encontrada por nós, o que terminou por se refletir em nossos resultados, haja vista que dentre os 29 espécimes analisados obtivemos resultados em apenas 7. Todavia, esse evento é considerado normal; quem realiza esse tipo de trabalho tem ciência de que para se obter o mínimo de resultado é necessário um considerável esforço. Nestes

experimentos é imprescindível o controle de uma gama de fatores. Assim, todas as etapas da metodologia aqui descritas devem ser rigorosamente cumpridas, e livres de influências externas, o que a torna bastante difícil, mesmo com todo o cuidado dispensado. A cultura de células primárias do sangue é um exemplo dessa complexidade, pois qualquer fator externo que escape de nosso controle pode prejudicá-la. Ademais, a pequena quantidade de sangue por indivíduo permitida para a coleta, a descarga de hormônios (como a adrenalina) na hora da captura do primata, e a própria contaminação do ambiente, principalmente quando parte do processamento ocorre no campo, longe das condições ideais, são fatores que também podem prejudicar a densidade celular e, assim, a diminuição de resultados em potencial.

Por serem consideradas espécies irmãs quase idênticas morfológicamente, mas divergentes geneticamente (DUMAS *et al.*, 2005; CONSIGLIERE *et al.*, 1998) os primatas neotropicais acabam contribuindo para a teoria da especiação e conservação (CONSIGLIERE *et al.*, 1998).

Apesar desses primatas apresentarem uma grande variabilidade cariotípica, incluindo não só o número modal, mas também os rearranjos genômicos entre espécies do mesmo gênero (DUTRILLAUX e COUTURIER, 1981, MEDEIROS *et al.*, 1997; WIENBERG e STANYON, 1998), não houve variação do número diplóide das duas espécies de *Cebus* estudadas, o que indica ausência de possíveis rearranjos Robertsonianos (do tipo fusão/fissão cêntrica) envolvendo pares de cromossomos.

O presente conhecimento da genética de *Cebus* é ainda incompleto, entretanto, os escassos estudos citogenéticos neste gênero têm mostrado que o número diplóide varia de 52 a 54 cromossomos (AMARAL *et al.*, 2008).

Segundo Silva-Júnior (2001) as espécies do gênero *Cebus* com tufo parecem possuir um número diplóide constante ($2n=54$), corroborando, assim, com os resultados obtidos no presente trabalho; enquanto os sem tufo apresentam um $2n$ variável ($2n=52$ ou 54). O número diplóide igual a 52 já foi observado em indivíduos de todas as espécies de *Cebus* sem tufo, e em nenhuma de *Cebus* com tufo (EGOZCUE e EGOZCUE, 1966; FREITAS e SEUANEZ, 1982; CLEMENTE *et al.*, 1987).

Gifalli (2008), ao compilar informações em seu estudo sobre variabilidade cariotípica em primatas do novo mundo, estabeleceu uma morfologia para os cromossomos de espécies de *Cebus*. Em seu trabalho, além de propor um $2n=54$ para o gênero, ela afirmou que os cromossomos sexuais podem se apresentar como acrocêntricos ou submetacêntricos. Além disso, ela estabeleceu, ainda, um número de 17-24, 26, para autossomos metacêntricos e/ou submetacêntricos e 28, 30-37 para autossomos acrocêntricos. Esses dados ratificam nossos resultados de $2n$ e NF para o gênero, visto que obtivemos um total de 18 autossomos meta/submeta e 34 autossomos acrocêntricos.

Na comparação entre os cariótipos das duas espécies estudadas, cuja morfologia dos cromossomos se apresentava desconhecida até o momento, foi possível verificar que todos os cromossomos, tanto os autossomos quanto os sexuais não variaram com relação às características analisadas no presente estudo, exceto pelo tamanho dos autossomos que se apresentaram visualmente menores em *C. libidinosus*; ou seja, ao compararmos os cariótipos de *C. flavius* e *C. libidinosus* observamos que tanto o NF quanto o $2n$ foram idênticos para ambas as espécies.

Embora não tenha sido verificada variação cariotípica (relacionada ao $2n$ e NF) entre as espécies estudadas, não se pode afirmar que se tratam de uma mesma espécie,

uma vez que as várias espécies de *Cebus* com tufo possuem o mesmo número diplóide ($2n=54$). Também devemos levar em consideração o número de indivíduos analisados até o momento; nesse sentido seria interessante a realização de mais estudos para a ampliação da amostragem. Além disso, sabemos que mudanças cariotípicas têm papel importante no processo de especiação (NAVARRO e BARTON, 2003), mas as variações nas características qualitativas da heterocromatina, que não foram analisadas neste trabalho, são, igualmente, importantes indicadoras desse processo (GARCIA *et al.*, 2003). Nesse contexto, técnicas citogenéticas mais específicas também devem ser empregadas em estudos futuros (como o bandamento C e G), tornando este ainda mais completo, pois embora nosso trabalho não seja conclusivo em relação às dúvidas taxonômicas das espécies, são uma importante fonte das informações cariotípicas básicas.

Em detrimento das semelhanças morfológicas, Silva (2010), baseado em distribuição geográfica, análise taxonômica e estatística, constatou que *C. flavius* e *C. libidinosus* são duas espécies válidas, apresentando características morfológicas distintas e ausência de áreas de hibridização no tempo presente. Assim, mesmo consideradas duas espécies diferentes, nossos resultados indicam que *C. flavius* e *C. libidinosus* são muito próximas filogeneticamente, frente às semelhanças cariotípicas encontradas, ou seja, se forem realmente duas espécies distintas, o grau de proximidade na escala evolutiva é bastante elevado.

A variabilidade inter e intra-específica no número e estrutura de cromossomos presente nas espécies da família *Cebidae* indica que mudanças cromossômicas numéricas e estruturais são importantes na especiação deste grupo de primatas (KOIFFMANN e SALDANHA, 1981).

Desse modo, com relação à variação intra-específica, também não foi observada diferença considerável entre os cariótipos dos indivíduos de *C. flavius*, exceto pelo tamanho de alguns cromossomos, inclusive os sexuais, que se apresentaram maiores em alguns indivíduos, como no macho representado na figura 4. Todavia, este resultado ainda não é conclusivo em decorrência do pequeno número de espécimes analisados.

Em *C. libidinosus* a análise da variação intra-específica não pôde ser realizada devido à má qualidade das imagens dos cromossomos de alguns indivíduos.

Algumas variações na morfologia e no número de cromossomos de uma espécie estão associadas à origem geográfica dos indivíduos (DE OLIVEIRA *et al.*, 1995). Isso demonstra a importância de se capturar espécimes de vida livre, com origem geográfica conhecida; como é o caso dos espécimes de *C. flavius* utilizados nesta pesquisa.

Silva-Júnior (2001), ao reunir informações para seu estudo e assim auxiliar na tomada de decisões sobre a validade dos taxa, destacou a carência de dados para indivíduos de vida livre. Segundo ele, a maioria dos cariótipos descritos é proveniente de animais de cativeiro, sem origens geográficas conhecidas, com identificações vagas e pouco confiáveis. Dessa forma, embora a relação variação cariotípica *versus* distribuição geográfica não tenha sido analisada no presente trabalho, este, além de auxiliar na caracterização da população de *Cebus flavius* da Mata do rio Vermelho, servirá como base para futuros estudos.

A despeito da simplicidade da coloração cromossômica empregada, esta se mostra extremamente importante, pois os primeiros resultados obtidos através dessa técnica tornam-se de valor singular para as espécies de primatas estudadas, cujas informações citogenéticas eram, até então, inexistentes. Assim, a escassez de informação genética para o gênero *Cebus* e a lacuna de dados genéticos na literatura atual para *C.*

flavius e *C. libidinosus* realçam a importância do nosso trabalho, especialmente as informações citogenéticas pertencentes a *C. flavius*, sobretudo por ser considerada uma espécie criticamente ameaçada pela IUCN (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Nossos resultados podem contribuir, ainda, para a composição de grupos regionais de acasalamento, com a finalidade de repovoamento de áreas ou manutenção em cativeiro de espécies ameaçadas de extinção (GIFALLI, 2003). Além de servir como base para estudos citogenéticos futuros e fornecer informações importantes para comparar com as análises morfológicas já realizadas por vários autores, podendo assim, refinar as hipóteses de relações filogenéticas e biogeográficas entre estas duas espécies.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa, à equipe técnica do CPB pelo apoio na captura dos animais e coleta do material biológico, aos Profs. Drs. Demetrius Antonio Machado de Araújo e Alfredo Ricardo Langguth Bonino pelo acesso aos laboratórios para a realização dos experimentos e análises; e à Amely Martins pela orientação.

6 BIBLIOGRAFIA

AMARAL, P.J.S. **Estudos Citogenéticos em *Cebus Apella* e *Cebus Nigrivittatus* (*Cebidae*, *Primates*)**. Trabalho de Conclusão de Curso. UFPA. Belém, 2002.

AMARAL, P. J. S.; FINOTELO, L. F. M.; OLIVEIRA; *et al.* Phylogenetic studies of the genus *Cebus* (*Cebidae*-*Primates*) using chromosome painting and G-banding. **BMC Evolutionary Biology**.v. 8, p.169, 2008.

BICCA-MARQUES, J. C.; SILVA, V. M. e GOMES, D. F. Ordem Primates. In **Mamíferos do Brasil**. Reis, N. R.; Peracchi, A. L.; Pedro, W. A. e Lima, I. P. (eds). Londrina, Paraná. 437 pp, 2006.

CENTRO DE PROTEÇÃO DE PRIMATAS BRASILEIROS/IBAMA. **Protocolo para captura e processamento de Cebídeos em Vida Livre**. 2005.

CLEMENTE, I.C.; GARCIA, M; PONSÀ, M e EGOZCUE, J. Hight resolution chromosom banding studies in *Cebus apella*, *Cebus albifrons*, and *Lagothrix lagothricha*: comparison with the human karyotype. **Am. J. Primatology**, v. 13, p. 23-36, 1987.

CONSIGLIERE, S.; STANYON, R.; KOEHLER, U.; *et al.* Chromosome painting defines genomic rearrangements between red howler monkeys subspecies. **Chromosome Res.** v. 4, p. 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.** v. 46, p. 119-133, 1998.

DE OLIVEIRA, E. H. C.; LIMA, M. M. C.; SBALQUEIRO, I. J. Chromosomal variation in *Alouatta fusca*. **Neotrp. Prim.** v. 3, p. 181-183, 1995.

DUMAS, F.; BIGONI, F.; STONE, G.; SINEO, L.; STANYON, R. Mapping genomic rearrangements in *titi* monkeys by chromosome flow sorting and multidirectional *in-situ* hybridization. **Chromosome Res.** v.13, p. 85-96, 2005.

DUTRILLAUX, B.; COUTURIER, J. The ancestral karyotype os carnivora: Comparison with that of *Platyrrhini* monkeys. **Cytogenet. Cell. Genet.** v. 35, p. 200-208, 1983.

DUTRILLAUX, B.; COUTURIER, J. The ancestral karyotype of *Platyrrhine* monkeys. **Cytogenet. Cell. Genet.** v. 30, p. 232-242, 1981.

EGOZCUE, J. e EGOZCUE, M.V. The chromosomes of *Cebus capucinus*. **Mammal, Chrom. Newsl.** v. 20, p.71-72, 1996.

FERGUSON-SMITH, M. A.; TRIFONOV, V. Mammalian karyotype evolution. **Nat. Rev. Genet.** v. 8, p. 950-952, 2007.

FLEAGLE, J. G. **Primate Adaptation and Evolution.** San Diego. Academic Press, 1988.

FREESE, C. H. e OPPENHEIMER, J. R. The capuchin monkeys, genus *Cebus*, pp. 331-390. In: **Ecology and behavior of Neotropical primates**, vol 1. A. F. Coimbra-Filho and R.A. Mittermeier (eds.), Academia brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. 1981.

FREITAS, L. e SEUÁNEZ, H. Chromosome heteromorphisms in *Cebus apella*. **J. Hum. Evol.** v.10, p.173-180, 1982.

GARCÍA, M.; MIRÒ, R.; ESTOP, A.; PONSÀ, M. AND EGOZCUE, J. Constitutive Heterochromatin Polymorphism in *Lagothrix lagothricha cana*, *Cebus apella* and *Cebus capucinus*, **American Journal of Primatology**, v.4, p.117-126, 1983.

GARCÍA, F.; GARCÍA, M; MORA, L.; *et al.* Qualitative analysis of constitutive heterochromatin and primate evolution. **Biol. J. Linn. Soc.** v. 80: 107-124, 2003.

GIFALLI, C.C. **Estudo da variabilidade cariotípica em *Platyrrhini* (Primates) e da homeologia com o cromossomo 15 humano.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências, Universidade de São paulo, São paulo, 2003.

IUGHETTI, C. G. **Evolução cromossômica: Estudo da variabilidade Cariotípica em *Platyrrhini* e das Homeologias e Sintenias com Cromossomos Humanos.** Tese de Doutorado em Genética, USP. São Paulo, Brasil. 273 pp. 2008.

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.** v.9, p.585-598, 1998.

GRAPHODATSKY, A. S. Comparative chromosomics. **Molecular Biology** v. 41, p.361-375, 2007.

GROVES, C. **Primate Taxonomy (Hardcover).** v.1. 1st edition. Washington: Smithsonian; 2001.

GUERRA, M. S. **Introdução à Citogenética Geral.** Ed. Guanabara, 1988. Rio de Janeiro – RJ.

HERSHKOVITZ, P. **Mammals of Northern Colombia preliminary report no. 4: monkeys (Primates), with taxonomic revisions of some forms.** Proc. U.S. natn. Mus., v. 3232, n. 98, p.323-427, 1949.

HILL, O. C. **Primates comparative anatomy and taxonomy.** v. 1 – *Cebidae*, Part A. Edinburgh University Press. 1960.

KOIFFMANN, C. P. AND SALDANHA, P. H. Chromosome variability in the family Cebidae (Platyrrhini). **Rev. Brasil. Genet.** v.4, n.4, p.667-677, 1981 (Brazil. J. Genetics).

LEWIN, R. **Evolução Humana.** Ed. Atheneu, Câmara Brasileira do Livro, São Paulo, p.123-134, 1999.

MEDEIROS, M.A.; BARROS, R.M.S.; PIECZARCA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y.; PONSÁ, M.; GARCIA, M.; GARCIA, F; EGOZCUE, J. Radiation and speciation of spider monkeys, Genus *Ateles*, from the Cytogenetic viewpoint. **Am. J. Primatol.** v. 42, p. 167-178, 1997.

MIRANDA, C. L. **Desenvolvimento do dimorfismo sexual em espécies de macacos-prego, gênero *Cebus* erxleben, 1777 (Primates, Cebidae)**. Belém-PA. Tese de mestrado. 2008.

MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B. e COIMBRA-FILHO, A.F. Systematics: species and subspecies – an update. In: **Ecology and behavior of Neotropical primates**, v. 2. R. A. Mittermeier, A. B. Rylands; A. f. Coimbra-Filho and G.A.B da Fonseca (eds.), Washington, WWF Press. 1998.

MOORHEAD, P S.; NORWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood, **Experimental Cell Research** v. 20, p. 613-615, 1960.

MUDRY, M. D.; RAHN, I. M.; SOLARI, A. J. Meiosis and chromosome painting of sex chromosome systems in *Ceboidea*. **Am. J. Primatol.** v. 54, p. 65-78, 2001.

NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; BARROS, R. M. S. Cytogenetic study of *Saguinus midas midas* (Callithricidae, Primata) from Jari, Brazilian Amazon region. Comparison with the karyotype of *Saguinus midas niger*. **Rev. Brasil. Genet.** v. 13, p. 89-96, 1990.

NAVARRO, A.; BARTON, N. H. Chromosomal speciation and molecular divergence-accelerated evolution in rearranged chromosomes. **Science.** v. 300, p. 321-324, 2003.

NIEVES, M.; MUHLMANN, M. AND MUDRY, M. D. Heterochromatin and chromosome evolution: a FISH probe of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) developed by chromosome microdissection **Genetics and Molecular Research** v.4, n.4, p. 675-683, 2005.

NOWAK, R, M. **Primates of the world**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md, p.100-101, 1999.

OLIVEIRA, M. M., BOUBLI, J. P. e KIERULFF, M.C.M. 2008. *Cebus flavius*. In: IUCN 2009. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2009.1. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 07 Março 2010.

OLIVEIRA, M. M.; LANGGUTH, A. Rediscovery of Marcgraves capuchin monkey and designation of a neotype for *Símia flavia* Schreber, 1774 (Primates, *Cebidae*). **Boletim do Museu Nacional** v. 523, p. 1-16, 2006.

PRIMATE SPECIALIST GROUP. **Primates of the Neotropics. Taxonomy and Conservation Status**. January 2009. Disponível em: <<http://www.primatesg.org/diversity.htm>>. Acesso em jan. 2010.

QUEIROZ, H. L. A new species of capuchin monkey, genus *Cebus* Erxleben, 1777 (*Cebidae*: Primates), from eastern Brazilian **Amazonia**. **Goeldiana Zoologia**, v. 14, p. 1-17, 1992.

REIS, N. R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W. A; *et al.* **Mamíferos do Brasil**. Londrina. Paraná. 2006.

SCHNEIDER, I.; SCHNEIDER, H; SCHNEIDER, M. P.; SILVA, A. The prion protein and New World primate phylogeny. **Genet. Mol. Biol.** v. 27, p. 505-510, 2004.

SEUÁNEZ, H.N; BONVICINO, C.R.; MOREIRA, M.A.M. The primates of the Neotropics: genomes and chromosomes. **Cytogenet. Genome Res.** v. 108, p. 38-46, 2005.

SEUÁNEZ, H. N.; FORMAN, L.; ALVES, G. Comparative chromosome morphology in three *Callitrichid* genera: *Cebuella*, *Callithrix*, and *Leontopithecus*. **J. Hered.** v. 79, p. 418-424, 1988.

GARCIA, F; A. RUIZ-HERRERA; J. EGOZCUE; M. PONSÁ; AND M. GARCIA. Chromosomal Homologies Between *Cebus* and *Ateles* (Primates) Based on ZOO-FISH and G-Banding Comparisons. **American Journal of Primatology**. v. 57, p.177–188, 2002.

SILVA-JÚNIOR, J. S. **Especiação nos Macacos-Prego e Caiararas, gênero Cebus ERXLEBEN, 1777 (Primates, Cebidae)**. Tese de Doutorado em Genética, UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil. 377pp. 2001.

SILVA-JÚNIOR J. S: Taxonomy of capuchin monkeys *Cebus* Erxleben, 1777. **Neotropical Primates**. v. 10, p.1-29, 2002.

SILVA, M.J. **Estudos dos processos de diferenciação cariotípica, baseados em citogenética convencional e molecular, em quatro gêneros de roedores brasileiros.** Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, USP. 1999.

SILVA, T. C. F. **Estudo da Variação na Pelagem e da Distribuição Geográfica em *Cebus flavius* SCHREBER, 1774 e *Cebus libidinosus* SPIX, 1823 (PRIMATES, CEBIDAE).** Dissertação de mestrado em Zoologia, UFPB, Paraíba, Brasil. 2010.

STANYON, R.; CONSIGLIERE, S.; MULLER, 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.** v. 50, p.95-107, 2000.

STEIPER, M. R.; YUOUNG, N. M. Primate molecular divergence dates. **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 41, p.384-394, 2006.

STURTEVANT 1925 *apud* BENAZI, M. Cytotaxonomy and evolution: general remarks In: Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution, 1ed. Vol. 1. (Eds: Chiarelli, A. B.; Capanna, E.), **Academic Press**, Londres, p. 3-14,1973.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C. da; HIROTA, M.; BEDÊ, L. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 132-138, 2005.

TORRES DE ASSUMPÇÃO, C. **An ecological study of the primates of Southeastern Brazil, with a reappraisal of *Cebus apella* races.** Edinbough, University of Edinbough. Ph.D. Thesis. 1983

TORRES DE ASSUMPÇÃO, C. Resultados preliminares da reavaliação das raças de macaco-prego *Cebus apella* (Primates, Cebidae). **Revista Nordestina de Zoologia**, v. 6, n.1, p. 15-28, 1988.

WIENBERG, J.; STANYON, R. Comparative chromosome painting of primate genomes. **Ilar. J.** v. 39, p 77-91, 1998.