

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

DISSERTAÇÃO

**ANÁLISE FENOTÍPICA E GENÉTICA EM
INDIVÍDUOS DE *CALLITHRIX* (CALLITRICHIDAE: PRIMATES)
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Monique Oliveira de Macedo Silva

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**ANÁLISE FENOTÍPICA E GENÉTICA EM
INDIVÍDUOS DE *CALLITHRIX* (CALLITRICHIDAE: PRIMATES)
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

MONIQUE OLIVEIRA DE MACEDO SILVA

Sob orientação da Professora
Denise Monnerat Nogueira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biologia Animal**, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração em Conservação de Grupos Silvestres.

Seropédica, RJ
Março de 2018

S586a

Silva, Monique Oliveira de Macedo, 08/05/1990-
Análise fenotípica e genética em indivíduos de
Callithrix (Callithrichidae: Pimates) no estado do Rio de
Janeiro / Monique Oliveira de Macedo Silva. - 2018.
112 f.: il.

Orientadora: Denise Monnerat Nogueira.
Dissertação (Mestrado). - Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Biologia
Animal, 2018.

1. *Callithrix*. 2. Fenótipo. 3. Citogenética. 4.
Genética Molecular. 5. Rio de Janeiro. I. Nogueira,
Denise Monnerat, 1961-, orient. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós
Graduação em Biologia Animal III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

MONIQUE OLIVEIRA DE MACEDO SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biologia Animal**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Dissertação aprovada em ___/___/___.

Dr. Jorge Luís Azevedo de Armada

Dr. Carlos Eduardo da Silva Verona

Dr. Rodrigo Salles de Carvalho

AGRADECIMENTOS

“Tudo concorre para o bem daqueles que amam a Deus”; “Faça a sua parte, entregue nas mãos de Deus as suas preocupações e saiba aguardar, pois na hora certa, no momento certo, Deus irá agir” – Essas foram as frases que alimentaram o meu pensamento durante a minha jornada no mestrado, porém eu sei que não cheguei até o final dessa etapa sozinha. Ao longo desse meu percurso pude contar com muita ajuda divina e espiritual, e com a ajuda de muitas pessoas de diversas áreas do conhecimento que contribuíram para o resultado deste trabalho.

Primeiramente eu te agradeço Deus, por toda a força que tem me dado, por ser meu guia e por me ajudar principalmente nos momentos mais difíceis da minha vida. Com o Senhor ao meu lado eu nunca pensei em desistir, tive dúvidas, mas não desanimei em nenhum momento sequer, consegui seguir em frente sem nunca desviar do meu caminho. Foi o meu amor e a minha fé no Senhor que me ajudaram a superar todos os obstáculos.

Agradeço aos meus pais, Sonia e Waldemir, por todo apoio, principalmente pelo amor incondicional que vocês tem por mim. Obrigada pela educação e respeito que me deram, por cada palavra de conforto e carinho, e por cada preocupação que tiveram por mim. O amor de vocês, o amor por Deus e por nossa família, é o que me move diariamente.

Agradeço a minha orientadora, Denise Monnerat Nogueira, que desde setembro de 2010 tem orientado, me acompanhado e me incentivado a ser uma profissional com competência, crítica e com valores éticos e morais. Buscarei sempre colocar em prática todos os seus ensinamentos, assim seja na vida pessoal como na vida profissional.

Agradeço ao Carlos Eduardo Verona (Kadu) por ter me ajudado em todas as coletas de material biológico dos indivíduos de *Callithrix* sp. presentes no Jardim Botânico do Rio de Janeiro/JBRJ e no Biotério da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os seus ensinamentos, as suas ideias, contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho e colaboraram para a minha atuação profissional em campo. Desta forma agradeço também ao veterinário responsável do Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro/CETAS-RJ, Daniel Marchesi Neves por ter me ajudado na coleta de material biológico dos animais desse local, e ao Dr. Alcides Pissinatti, diretor do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro e à Dr^a. Sílvia, veterinária desta instituição, pela autorização e apoio na obtenção de amostras biológicas de *Callithrix aurita* e dos híbridos deste gênero, que foram cruciais para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Professor Jorge Armada pelos ensinamentos com a análise citogenética e pelas ideias e contribuições no meu trabalho e na minha formação profissional ao longo desses anos no laboratório de Genética Animal. Assim como a Professora Maria Amélia Soares, que inclusive me deu aula durante a graduação e tem me acompanhado também nas atividades laboratoriais.

Gostaria de agradecer ao Núcleo de Conservação da Fauna do JBRJ, em especial as funcionárias Gabriela Heliodoro (Gabi) e Cristiane Rangel (Cris), e a estagiária Jehnnifer Mendonça, pela captura dos saguis desse locais, pela troca de conhecimento e pelas conversas sobre conservação da biodiversidade. Deste mesmo modo agradeço também a Professora, Dr^a. Flávia Spreaficono, por ter permitido que coletássemos material biológico dos saguis do Biotério da UFRJ e ter colaborado com parte desse estudo.

Agradeço aos meus colegas do laboratório de Genética Animal, Diego, Diogo, Bia e em especial meu amigo, Leonardo Ferreira, pelas discussões sobre as análises feitas, pelas conversas que amenizaram as tensões durante o trabalho e principalmente quando algo não ocorria da forma que era esperado, todos estavam sempre dispostos a ajudar e a contribuir com novas ideias.

Agradeço também ao aluno de doutorado Tailan Moretti, ao Professor/Dr. Gerson e a Dr^a Taynara Franco por terem me ajudado com as análises estatísticas do meu trabalho. Assim como o engenheiro Florestal, Humberto Amaral, e o engenheiro de Agrimensura, Diogo Pereira, que me ajudaram nas respectivas figuras dos mapas de distribuição das espécies de *Callithrix* no Brasil e no mapa dos locais de coleta. Além disso, agradeço ao Angelo Marzano, artista plástico que contribuiu na produção da caixa com iluminação de LED, a qual fotografamos os saguis e o fotógrafo naturalista José Felipe que nos concedeu a foto do indivíduo de *Callithrix penicillata* e que me deu dicas sobre o tratamento de imagens no *Photoshop*.

Agradeço também aos meus familiares, minha prima Tayná e meus amigos, em especial Marina, Evelyn, Gabi, Filipão e Marquinhos pelo carinho e pela torcida de sempre para que eu alcance os meus objetivos. Além disso, agradeço ao meu amigo Lucas Romanelli, pelo companheirismo e por me proporcionar muitos momentos de felicidade.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado que me foi concedida e que foi essencial nesses dois anos de mestrado.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Genética e ao funcionário da Rural, Jorge Nestor, que me acompanha desde o primeiro dia que entrei na universidade e que sempre conversa comigo e me incentiva a progredir.

Agradeço aos meus animais de estudo, os meus saguis, os quais despertaram em mim um grande interesse como pesquisadora. Espero que eu possa contribuir com esse trabalho ainda mais no conhecimento sobre as espécies puras e sobre os híbridos de *Callithrix*.

Finalmente agradeço a todos que de certa forma contribuíram para meu trabalho e que me incentivaram ao longo desse percurso, inclusive agradeço até aqueles que duvidaram se eu conseguiria chegar a algum resultado, porque isso me motivou mais ainda e fez eu me dedicar até mais para eu concluir o meu trabalho, o que permitiu eu crescer tanto pessoalmente, quanto profissionalmente.

RESUMO

SILVA, Monique Oliveira de Macedo. **Análise Fenotípica e Genética em indivíduos de *Callithrix* (Callitrichidae: Primates) no estado do Rio de Janeiro.** 2018. 112p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

No Sudeste do Brasil, as espécies exóticas invasoras *Callithrix jacchus* e *C. penicillata* representam uma ameaça à espécie nativa, *C. aurita*, pela competição por recursos e hibridação. Experimentos com híbridos de *Callithrix* demonstraram a fertilidade e a variação fenotípica. O cariótipo observado nesse gênero é $2n=46,XX$ ou XY . O cromossomo Y é acrocêntrico em *C. aurita*, submetacêntrico ou metacêntrico em *C. penicillata* e pode apresentar as três morfologias em *C. jacchus*. O quimerismo hematopoiético, $2n=46,XX/46,XY$ é comumente encontrado nos saguis. Com relação ao gene *SRY*, *C. aurita* é a única espécie do gênero que possui uma deleção de 9 pares de bases na sua sequência (exceto *C. flaviceps*, ainda não estudada). Esta característica pode ser útil na identificação da linhagem paterna nos casos de hibridação. Do mesmo modo, o polimorfismo dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade II (COII) pode auxiliar na identificação da linhagem materna. Foram analisados 52 indivíduos de *Callithrix* oriundos de diferentes localidades no estado do Rio de Janeiro. Os objetivos deste trabalho foram: descrever o cariótipo dos indivíduos de *Callithrix* sp. amostrados; comparar os dados biométricos e a pelagem de *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita* com os registrados para os indivíduos identificados como *Callithrix* sp. devido à variabilidade fenotípica; investigar a ocorrência de quimerismo e amplificar por Reação em Cadeia da Polimerase/PCR, segmentos dos genes *SRY* e COII buscando identificar as linhagens parentais dos animais estudados. Foram avaliadas a cor da pelagem do corpo e da face, por meio de fotografias. O comprimento da cabeça, corpo, cauda, pé, mão e orelha direita e circunferência do peito e pescoço foram tomados com fita métrica e paquímetro e analisadas pela Análise dos Componentes Principais, Anova Fatorial e Teste *Tukey*. A Análise Discriminante foi realizada a partir dos valores de RGB obtidos de quatro pontos da face: tufos auriculares, centro da testa, face lateral e topo da cabeça. Os cromossomos metafásicos foram obtidos por cultura dos linfócitos e a extração de DNA foi feita por precipitação salina. Fragmentos do gene *SRY* e COII foram amplificados por PCR. Os indivíduos analisados apresentaram tufos auriculares variando entre branco, cinza, marrom e negro e a pelagem da face e do corpo variou entre cinza e marrom. A média do peso, comprimento do corpo e da cauda dos indivíduos de *Callithrix* sp. correspondeu ao das espécies puras e pela Análise Discriminante o padrão de coloração da face foi intermediário ao destas, o que é sugestivo de hibridação. O cariótipo correspondeu ao descrito para o gênero. O quimerismo hematopoiético foi detectado em 32% dos indivíduos, pela análise citogenética e genética molecular. Em duas fêmeas quimeras foi amplificado um fragmento do gene *SRY* com aproximadamente 198pb, semelhante ao observado para *C. aurita*. Os demais indivíduos apresentaram fragmentos semelhantes ao de *C. jacchus* e *C. penicillata*. O sequenciamento dos amplicons dos genes *SRY* e COII, poderá confirmar as espécies progenitoras e, se de fato, ocorreu a hibridação.

Palavras-chave: Saguis, Morfologia, DNA.

ABSTRACT

SILVA, Monique Oliveira de Macedo. **Phenotypic and Genetic Analysis in *Callithrix* (Callitrichidae: Primates) individuals in the state of Rio de Janeiro.** 2018. 112p. Dissertation (Master Science in Animal Biology) Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

In the Southeast of Brazil, invasive exotic species *Callithrix jacchus* and *C. penicillata* threaten the native species, *C. aurita*, by competition for resources and hybridization. Experiments with *Callithrix* hybrids showed fertility and phenotypic variation. The karyotype observed in this genus is $2n=46,XX$ or XY . The Y chromosome is acrocentric in *C. aurita*, submetacentric or metacentric in *C. penicillata* and may present the three morphologies in *C. jacchus*. Hematopoietic chimerism $2n=46,XX/46,XY$ is commonly found in the marmosets. Regarding the *SRY* gene, *C. aurita* is the only species of the genus that has a deletion of nine base pairs (bp) in its sequence (except *C. flaviceps*, not studied yet). This feature may be useful in identifying the paternal lineage in cases of hybridization. Likewise, the polymorphism of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II (COII) gene haplotypes may aid in the identification of the maternal lineage. Fifty-two *Callithrix* individuals were analyzed from different locations in the state of Rio de Janeiro. The goals of this study were: to describe the karyotype of *Callithrix* sp. Individuals sampled; to compare the biometric data and the pelage of *C. jacchus*, *C. penicillata* and *C. aurita* with those recorded for individuals identified as *Callithrix* sp. due to phenotypic variability; to investigate the occurrence of chimerism and to amplify by Polymerase Chain Reaction/PCR, segments of the *SRY* and COII genes seeking to identify the parental lineages of the studied animals. The color of the pelage of the body and the face were evaluated by means of photographs. The length of head, body, tail, -right foot, hand and ear -, as well as chest and neck circumference were measured with a tape measure and caliper and analyzed by Principal Component Analysis, Factorial Anova and Tukey Test. The Discriminant Analysis was performed from the RGB values obtained from four points of the face: auricular tufts, forehead center, lateral face and top of the head. The metaphase chromosomes were obtained by culture of the lymphocytes and DNA was extracted by saline precipitation. Fragments of the *SRY* and COII gene were amplified by PCR. The individuals analyzed showed auricular tufts ranging from white, gray, brown and black and the pelage of the face and body varied between gray and brown. The average of the weight, body and tail length of *Callithrix* sp. corresponded to that of the pure species and by Discriminant Analysis the face coloring pattern was intermediate to those, which suggests hybridization. The karyotype corresponded to that described for the genus. Hematopoietic chimerism was detected in 32% of the individuals, by both cytogenetic and molecular genetic analyzes. In two female chimeras, a fragment with approximately 198bp of the *SRY* gene, were amplified, corresponding to that observed for *C. aurita*. The other individuals presented fragments similar to that of *C. jacchus* and *C. penicillata*. Sequencing of the *SRY* and COII amplicons may confirm the parental species and, if indeed, the hybridization occurred.

Key words: Marmosets, Morphology, DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribuição das espécies de *Callithrix* no Brasil segundo dados da International Union for Conservation of Nature List of Threatened Species/IUCN (2017). No entanto existem zonas híbridas no limite das áreas de distribuição das espécies (Rylands *et al.*, 1996). Ilustração por: Humberto Amaral Neto. Fonte: IUCN (<http://www.iucnredlist.org/search>)8

Figura 2: Padrões de complexidade de cores faciais nos primatas do Novo Mundo. As cores mais quentes indicam a maior complexidade dos padrões de cores faciais de acordo com Santana *et al.* (2012), ilustrado por Stephen Nash. (1) *Cacajao calvus*, (2) *Callicebus hoffmannsi*, (3) *Ateles belzebuth*, (4) *Alouatta caraya*, (5) *Aotus trivirgatus*, (6) *Cebus nigrinus*, (7) *Saimiri boliviensis*, (8) *Leontopithecus rosalia*, (9) *Callithrix kuhlii*, (10) *Saguinus martinsi* e (11) *Saguinus imperator*. Fonte: Santana *et al.*, 2012, p. 2205.....10

Figura 3: Espécies de saguis encontradas no Rio de Janeiro, Brasil. A- *Callithrix aurita* – espécie nativa da Mata Atlântica do Sudeste brasileiro. B- *Callithrix jacchus* – espécie originalmente da Caatinga/Nordeste brasileiro e é considerada espécie invasora do Sudeste do Brasil. C- *Callithrix penicillata* – espécie originalmente do Cerrado/ Centro-Oeste do Brasil, também invasora do Sudeste do Brasil. Figura A e B, fonte: Arquivo pessoal, fotografias retiradas no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro-CPRJ/ INEA/IBAMA. Figura C, fonte: José Felipe M. Pereira, fotógrafo naturalista, retirada no CPRJ/INEA/IBAMA.....11

Figura 4: Espécimes da coleção do Museu de Santa Amaro/BA/BR, evidenciando a coloração do dorso do indivíduo híbrido com intergradação entre *Callithrix jacchus* (à esquerda) e *C. penicillata* (à direita). Fonte: Hershkovitz, 1975, p. 149.....12

Figura 5: Espécimes da coleção do Museu de Santa Amaro/BA/BR, com ênfase para a coloração da cabeça, onde são observados os tufos auriculares no híbrido, com um fenótipo intermediário entre *Callithrix jacchus* e *C. penicillata*. A- *C. penicillata*; B- Indivíduo híbrido com intergradação entre *C. jacchus* e *C. penicillata*; C- *C. jacchus*. Fonte: Hershkovitz, 1975, p. 148.....13

Figura 6: (A) Mapa do Estado do Rio de Janeiro, o quadrado delimita a área de coleta e captura dos indivíduos de *Callithrix* sp.; (B) As setas indicam os pontos de coleta e captura dos indivíduos de *Callithrix* sp. 1. Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro/CETAS-RJ/IBAMA, em Seropédica; 2. Jardim Botânico do Rio de Janeiro/JBRJ, cidade do Rio de Janeiro; 3. Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade do Rio de Janeiro/ Biotério-UFRJ, Ilha do Fundão. Ilustração por: Diogo Pereira. Fonte: *Google Earth* (<https://www.google.com.br/maps>)15

Figura 7: Área do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ). Os pontos A, B e C representam as regiões onde ocorreram as capturas de *Callithrix* sp. (A) Canteiro 32; (B) Orquidário; (C): Região Amazônica. Imagem obtida pelo *Google Earth* (<https://www.google.com.br/maps>)17

Figura 8: Superfície interna da tampa da caixa de papelão circundada por luz de LED para padronizar a luminosidade em todas as fotos tiradas dos indivíduos de *Callithrix* sp. A seta destaca o orifício em que se posiciona a câmera fotográfica modelo *Sony Cyber-Shot* 16.2 megapix.....19

Figura 9: (A) Manuseio da caixa para receber o indivíduo de *Callithrix* sp.; (B) Câmera modelo *Sony Cyber-Shot* 16.2 megapix, posicionada no orifício da caixa e, em destaque no círculo, a imagem do indivíduo de *Callithrix* sp. no interior da caixa.....19

Figura 10: Macho de *Callithrix* sp. identificado como Csp011 no interior da caixa de papelão fechada com luz de LED interna. (A) Animal em decúbito dorsal (B) Animal em decúbito ventral (C) Animal em decúbito lateral.....20

Figura 11: Tomada das medidas morfológicas de um indivíduo de *Callithrix* sp. (A) Medida do comprimento do corpo com o auxílio de fita métrica (precisão de 1mm). (B) Medida do pé direito, tomada com o paquímetro de comprimento total de 118mm.20

Figura 12: Indivíduo de *Callithrix* sp. identificado como Csp005. Os números 1, 2, 3 e 4 na face representam os locais usados para avaliar o fenótipo desta região nos possíveis híbridos e nos indivíduos puros de *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*. 1- Tufo auricular direito. 2- Centro da estrela na testa. 3- Face lateral direita. 4- Topo da cabeça.21

Figura 13: Fotografia de um indivíduo de *Callithrix* sp. identificado como Csp008, inserida no programa *Adobe Photoshop® CS3* em modo de Fotografia. A seta destaca a ferramenta Contasgotas utilizada para se obter o valor numérico do sistema de cores aditivas, formadas pelo vermelho (*red*), verde (*green*) e azul (*blue*)/RGB, o qual de se encontra circundado.....22

Figura 14: Imagem do site *Colour lovers* < <http://www.colourlovers.com/palettes/add> >, onde foi gerada a paleta de cores individual resultante dos valores numéricos do sistema de cores aditivas, formadas pelo vermelho (*red*), verde (*green*) e azul (*blue*)/RGB, obtidos no programa *Adobe Photoshop® CS3* (em destaque no quadrado vermelho) a partir dos quatro pontos selecionados na face dos indivíduos de *Callithrix* sp. analisados no presente estudo.....22

Figura 15: Gráfico gerado pela Análise de Componentes Principais (PCA) a partir dos dados biométricos dos indivíduos de *Callithrix* sp. capturados em três localidades do estado do Rio de Janeiro. Estão dispersos ao longo do eixo X as variáveis em destaque do peso e da circunferência do peito de acordo com o comprimento do corpo, e ao longo do eixo Y as variáveis do comprimento da orelha direita e do comprimento da cabeça em destaque, também de acordo com o comprimento do corpo. O *Convex hulls* em vermelho representa os indivíduos do CETAS-RJ/IBAMA, em azul os do JBRJ e em verde do Biotério da UFRJ.....25

Figura 16: Variáveis mensuradas nos indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e do Biotério-UFRJ que se destacaram na Análise de Componentes Principais ao longo do eixo X e Y. (A) Eixo X, as setas indicam as variáveis do Peso (P) e da Circunferência do peito (Cip). (B) Eixo Y, as setas indicam as variáveis do Comprimento da cabeça (Ccb) e da Orelha direita (Cod).26

Figura 17: Gráfico Boxplot gerado pela ANOVA Fatorial, mostrando a diferença significativa da variável peso ($p=0,00223$) dos indivíduos de *Callithrix* sp. estudados em relação aos locais de coleta, CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ.28

Figura 18: Gráfico Boxplot gerado pela ANOVA Fatorial, mostrando a diferença significativa da variável comprimento da cabeça ($p=0,0003$) dos indivíduos de *Callithrix* sp. estudados em relação aos locais de coleta, CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ.28

Figura 19: Gráfico Boxplot gerado pela ANOVA Fatorial, mostrando a diferença significativa da variável circunferência do peito ($p=0,1171$) dos indivíduos de *Callithrix* sp. estudados em relação aos locais de coleta, CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ.....29

Figura 20: Gráfico de distribuição canônica gerado pela Análise Discriminante. Estão representados os 53 indivíduos analisados por meio do valor de RGB, agrupados de acordo com o fenótipo nos seguintes grupos: 1- Grupo *Callithrix* sp. (Azul); 2- Grupo *C. jacchus* (vermelho); 3- Grupo *C. penicillata* (verde), alocado grupo centróide; 4- Grupo *C. aurita* (laranja).....31

Figura 21: Classificação dos grupos pela Análise Discriminante mais conservadora com 98,1% dos casos originais agrupados corretamente. Entre os 46 indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, 45 pertencem ao Grupo 1- *Callithrix* sp. e um indivíduo, o HB1 do CPRJ/INEA/IBAMA, que é híbrido confirmado entre *C. aurita* x *C. jacchus*, pertence ao Grupo 4- *C. aurita*. Dois indivíduos pertencem ao Grupo 2- *C. jacchus* (Cj1 e Cj2) e um ao Grupo 3- *C. penicillata* (Cp1)32

Figura 22: Classificação dos grupos pela Análise Discriminante menos conservadora, com 94,3% dos casos originais agrupados corretamente. A associação prevista dos grupos mostrou que entre os 46 indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, 43 pertencem ao Grupo 1- *Callithrix* sp., sendo que, dois indivíduos (Csp038 do Biotério da UFRJ e HB2 do CPRJ/INEA/IBAMA) foram alocados ao Grupo 2- *C. jacchus* e um indivíduo (HB1 do CPRJ/INEA/IBAMA) que é híbrido confirmado entre *C. aurita* x *C. jacchus*, foi classificado no Grupo 4- *C. aurita*. Dois indivíduos pertencem ao Grupo 2- *C. jacchus* (Cj1 e Cj2) e um ao Grupo 3- *C. penicillata* (Cp1).....32

Figura 23: Associação dos grupos prevista na Análise Discriminante que incluiu no Grupo 4 - *Callithrix aurita*, o indivíduo HB1 tanto na análise mais conservadora, quanto na menos conservadora. Esse indivíduo é oriundo do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro/CPRJ/INEA/IBAMA. À esquerda, a foto dos quatro indivíduos de *C. aurita* (Ca1; Ca2; Ca3; Ca4) e do HB1, híbrido confirmado de *C. aurita* e *C. jacchus*. À direita, imagem das respectivas paletas de cores dos indivíduos, geradas com base no valor de RGB (<http://www.colourlovers.com/palettes/add>) do ponto 1 (P1- tufo auricular direito), ponto 2 (P2- centro da estrela na testa), ponto 3 (P3- face lateral direita) e ponto 4 (P4- topo da cabeça).....33

Figura 24: Associação dos grupos prevista na Análise Discriminante menos conservadora que incluiu no Grupo 2- *Callithrix jacchus*, os indivíduos Csp038 (do Biotério da UFRJ) e HB2 (do CPRJ/INEA/IBAMA). À esquerda, foto dos indivíduos de *C. jacchus* (Cj1 e Cj2) oriundos do

Centro de Primatologia do Rio de Janeiro/CPRJ/INEA/IBAMA, de *Callithrix* sp. Csp038 do Biotério da UFRJ, e do HB2, também do CPRJ. À direita, imagem das respectivas paletas de cores dos indivíduos, geradas com base no valor de RGB (<http://www.colourlovers.com/palettes/add>) do ponto 1 (P1- tufo auricular direito), ponto 2 (P2- centro da estrela na testa), ponto 3 (P3- face lateral direita) e ponto 4 (P4- topo da cabeça).....34

Figura 25: Associação dos grupos prevista na Análise Discriminante menos conservadora e mais conversadora que incluiu o indivíduo Cp1 no Grupo 3- *Callithrix penicillata*. À esquerda, a foto do indivíduo Cp1, obtida no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro/CPRJ/INEA/IBAMA, cedida pelo fotógrafo naturalista José Felipe. À direita, a imagem da paletas de cores desse indivíduo, gerada com base no valor de RGB (<http://www.colourlovers.com/palettes/add>) do ponto 1 (P1- tufo auricular direito), ponto 2 (P2- centro da estrela na testa), ponto 3 (P3- face lateral direita) e ponto 4 (P4- topo da cabeça).....34

Figura 26: Comparação do padrão de Banda G dos cromossomos de 5 espécies do gênero *Callithrix*, descritas por Nagamachi *et al.*, 1997, onde cada par está representado por um dos homólogos. O retângulo vermelho destaca a morfologia do cromossomo Y que difere entre as espécies. CGE - *Callithrix geoffroyi*; CAU- *C. aurita*; CPE - *C. penicillata*; CKU- *C. kuhlii*; CJA- *C. jacchus*. Fonte: Nagamachi *et al.* (1997), p. 158.....44

Figura 27: Cariótipo em coloração convencional de um macho de *Callithrix* sp. 2n=46, XY.....52

Figura 28: Cariótipo em coloração convencional de uma fêmea de *Callithrix* sp. 2n=46, XX.....52

Figura 29: Cariótipo com coloração convencional de um indivíduo macho de *Callithrix* sp. (Csp009) com quimerismo hematopoiético. A e B, apresentam respectivamente a linhagem celular, 2n=46,XX [20]/46,XY[5]. [] número de metáfases encontrado para cada linhagem celular.....53

Figura 30: Gel de poliacrilamida de 12% (dimensões: 30x23cm) com produtos do gene *SRY* amplificados por PCR a partir de amostras biológicas de 27 indivíduos de *Callithrix* sp. amostrados em três localidades do estado do Rio de Janeiro. 1-DNA ladder 100pb; 2- Controle positivo macho de *C. aurita*, 198pb (Ca); 3- Controle positivo macho de *C. jacchus* (Cj1), 207pb; 4-Controle positivo macho de *C. penicillata* (Cp1), 207pb; 5- Macho Csp001; 6- Macho Csp003; 7- Macho Csp004; 8- Fêmea Csp006; 9- Macho Csp007; 10- Macho Csp008; 11- Macho Csp009; 12- Macho Csp010; 13- Macho Csp012; 14- Macho Csp013; 15- Fêmea Csp015 (possível *C. aurita*); 16- Fêmea Csp016; 17- Macho Csp017; 18- Macho Csp018; 19- Macho Csp019; 20- Macho Csp021; 21- Macho Csp028; 22- Macho Csp022; 23- Fêmea Csp029 (possível *C. aurita*); 24- Fêmea Csp030; 25- Macho Csp031; 26- Macho Csp033; 27- Macho Csp035; 28- Fêmea Csp036; 29- Fêmea Csp037; 30- Macho Csp039; 31- Macho Csp040; 32- Macho Csp041; 33- Negativo.....55

Figura 31: Gel de poliacrilamida de concentração 5%, com os fragmentos amplificados do gene COII apresentando tamanho entre 500 e 600 pb, nas amostras de 23 indivíduos de *Callithrix* sp. provenientes de três localidades do estado do Rio de Janeiro. 1- DNA padrão de

peso molecular conhecido (DNA *ladder* 100pb); 2- Csp003; 3- Csp006; 4- Csp007; 5- Csp008;
6- Csp009; 6- Csp009; 7- Csp010; 8- Csp011; 9- Csp013; 10- Csp014; 11- Csp015; 12- Csp017;
13- Csp018; 14- Csp028; 15- Csp029; 16- Csp031; 17- Csp033; 18- Csp034; 19- Csp35; 20-
Csp036; 21- Csp037; 22- Csp038; 23- Csp39; 24- Csp041; 25- Negativo.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de indivíduos de *Callithrix* amostrado em cada local de coleta.....14

Tabela 2: Correlação dos Componentes Principais (CP) com as variáveis de maior importância presentes no Eixo X (CP1) e Y (CP2). No Componente Principal 1, aproximadamente 34% dos dados da variação morfométrica são explicados, com as variáveis do peso e da circunferência do peito em destaque. No Componente Principal 2, em torno de 16% da variação é explicada e as variáveis que se destacaram foram o comprimento da orelha direita e o comprimento da cabeça. A seta vermelha destaca os CP 1, 2, 3 e 4 com a soma dos autovalores superiores a 1 (Kaiser 1960), correspondendo a aproximadamente 73% da variância dos dados.....24

Tabela 3: Média do peso (P), do comprimento do corpo (Cc) e da cauda (Cca) de *Callithrix aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata* descrita por Oliveira *et al.* (2015) e dos indivíduos de *Callithrix* sp. capturados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro.....27

Tabela 4: Valores de F (ANOVA Fatorial) e teste de *Tukey* para comparações das variáveis: peso (P), comprimento da cabeça (Ccab), do corpo (Cc), da mão direita (Cmd), circunferência do peito (Cip), comprimento da cauda (Cca), comprimento do pé direito (Cpd) e circunferência do pescoço (Cipe) obtidas de indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, estado do Rio de Janeiro, ao nível de significância ($p \leq 0.05$)27

Tabela 5: Variáveis biométricas do peso (P), comprimento do corpo (Cc) e circunferência do peito (Cipe) que diferiram significativamente em relação ao sexo nos indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, estado do Rio de Janeiro.....29

Tabela 6: Variável biométrica do peso (P) obtida a partir de indivíduos de *Callithrix* sp. das localidades do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, comparando ao sexo e a localidade.....30

Tabela 7: Cariótipos dos 20 indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, estado do Rio de Janeiro, com o código de identificação, sexo, local e linhagens celulares observadas para cada indivíduo. [] número de metáfases encontrado para cada linhagem celular.....51

Tabela 8: Relação dos indivíduos de *Callithrix* sp. (23 machos e 7 fêmeas) onde a partir de amostras de DNA, foi amplificado por PCR um fragmento de aproximadamente 200pb do gene *SRY*, incluindo código de identificação, sexo, idade e local.54

Tabela 9: Relação dos indivíduos de *Callithrix* sp. (14 machos e 9 fêmeas) onde a partir de amostras de DNA, foi amplificado por PCR um fragmento aproximado de 500pb do gene mitocondrial COII, incluindo código de identificação, sexo, idade e local.56

LISTA DE ABREVIACÕES

ANOVA	Análise de Variância
BIOTÉRIO-UFRJ	Biotério da Universidade Federal do Rio de Janeiro
CETAS-RJ/IBAMA	Centro de Triagem de Animais Silvestres do estado do Rio de Janeiro/IBAMA
Cca	Comprimento da cauda
Ccab	Comprimento da cabeça
Cc	Comprimento do corpo
Cip	Circunferência do peito
Cipe	Circunferência do pescoço
Cmd	Comprimento da mão direita
Cod	Comprimento da orelha direita
COII	Citocromo oxidase c subunidade II
Cpd	Comprimento do pé direito
CPRJ	Centro de Primatologia do Rio de Janeiro
Csp	<i>Callithrix</i> sp.
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
F	Valor na Anova Fatorial
HB	Híbrido
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
INEA	Instituto Estadual do Meio Ambiente
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature List of Threatened Species</i>
JBRJ	Jardim Botânico do Rio de Janeiro
min.	minutos
mm	milímetros
MMA	Ministério do Meio Ambiente
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> /Reação em Cadeia da Polimerase
P	Peso
<i>p</i>	Valor significativo
pb	pares de bases
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> / Análise de Componentes Principais
PC1	<i>Main Component 1</i> /Componente principal 1
PC2	<i>Main Component 2</i> /Componente principal 2
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> /Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição
RGB	<i>Red/Green/Blue</i>
Sisbio	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SR _Y	<i>Sex-determining region Y</i>
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I: ANÁLISE FENOTÍPICA EM INDIVÍDUOS DE <i>CALLITHRIX</i> (CALLITRICHIDAE: PRIMATES) NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	4
1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Distribuição do gênero <i>Callithrix</i> Erlxleben, 1977	7
1.2 Hibridação no gênero <i>Callithrix</i>	9
1.3 Aspectos morfológicos e ecológicos em <i>Callithrix</i>	9
1.4 Aspectos fenotípicos em <i>Callithrix</i>	10
Aspectos fenotípicos em híbridos de <i>Callithrix</i>	12
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1 Área de Estudo e Número Amostral.....	14
2.2 Centro de Triagem de Animais Silvestres do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, no Estado do Rio de Janeiro (CETAS- RJ/IBAMA).....	15
2.3 Jardim Botânico do Rio de Janeiro/JBRJ	16
2.4 Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Biotério-UFRJ).....	17
2.5 Contenção Física	17
2.6 Contenção Química	18
2.7 Identificação e registro individual	18
2.8 Caracterização Fenotípica.....	18
2.9 Registro fotográfico e medidas corporais.....	18
2.10 Paleta de cores	21
2.11 Análises Estatísticas	23
2.11.1 Biometria	23
2.11.2 Paleta de Cores	23
3. RESULTADOS	24
3.1 Biometria	24
3.2 Caracterização fenotípica	30
3.3 Paleta de cores	30
4 DISCUSSÃO.....	35
5 CONCLUSÕES	37

CAPÍTULO II: ANÁLISE CITOGENÉTICA E GENÉTICA MOLECULAR EM POSSÍVEIS HÍBRIDOS DE <i>CALLITHRIX</i> (CALLITRICHIDAE:PRIMATES)	39
1 INTRODUÇÃO	42
1.1 Aspectos citogenéticos das espécies de <i>Callithrix</i> e dos híbridos	42
1.2 Genética molecular das espécies de <i>Callithrix</i> e dos híbridos.....	45
1.3 Quimerismo em <i>Callithrix</i>	46
2 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 Análise Clínica	48
2.2 Análise Citogenética.....	48
2.3 Análise Molecular.....	49
2.3.1 Amplificação por PCR do gene <i>SRY</i> (gene da região da determinação sexual do cromossomo Y) e do gene <i>COII</i> (Citocromo Oxidase C Subunidade II)	49
3 RESULTADOS	50
3.1 Análise Clínica	50
3.2 Análise Citogenética.....	50
3.3 Análise Genética Molecular	53
4 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÕES	61
CONCLUSÕES GERAIS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	76

INTRODUÇÃO GERAL

Os principais processos responsáveis pela diminuição da Biodiversidade no Brasil são a perda e a fragmentação dos habitats, a exploração excessiva de espécies de plantas e de animais, o uso de plantas híbridas e monoculturas na agroindústria e nos programas de reflorestamento, a contaminação do solo, da água e da atmosfera e, ainda, as mudanças climáticas (MMA, 2018). Neste cenário de perda e fragmentação de habitats, as populações de animais e vegetais ficam isoladas em áreas onde há a maior competição por recursos e baixas taxas de fluxo gênico, o que ocasiona a redução da variabilidade genética e aumenta a possibilidade de extinção nesses locais (MMA, 2018).

Outro fator que contribui para a perda da biodiversidade é a introdução de espécies exóticas, que de acordo com a Convenção sobre Diversidade Biológica – CDB (2017), são espécies que se encontram fora de sua área de distribuição original. Essas espécies apresentam características competitivas e muitas vezes conseguem se estabelecer em um ecossistema novo ou similar ao seu, através da ocupação dos nichos de espécies nativas, sendo assim consideradas como exóticas e invasoras. Além disso, o homem pode facilitar o estabelecimento dessas espécies criando condições ambientais ou transportando ilegalmente as mesmas para novos habitats.

Os primatas do gênero *Callithrix*, vulgarmente denominados como saguis, podem ser de seis espécies: *Callithrix jacchus*, *C. penicillata*, *C. aurita*, *C. geoffroyi*, *C. kuhlii* e *C. flaviceps*. Em geral, são caracterizados por apresentarem um tamanho reduzido, por conterem ornamentos pilosos nas orelhas, garras nos dedos, exceto nos polegares, e por apresentarem uma mancha branca característica na testa, semelhante a uma estrela (Oliveira *et al.*, 2015). Outra característica comumente observada nesse gênero é a gestação gemelar e o quimerismo hematopoiético (Haig, 1999), o qual é decorrente da gestação de gêmeos dizigóticos heterossexuais que compartilham um único córion. Esse compartilhamento ocorre via anastomose dos vasos placentários que acontece por volta do 19º dia de gestação e se completa em torno do 29º, permitindo o intercâmbio celular entre os gêmeos. No entanto, mesmo com a troca celular entre saguis de diferentes sexos até o momento, não foram encontradas anomalias sexuais em indivíduos quiméricos (Moore *et al.*, 1985; Haig, 1999).

Callithrix penicillata, originário do Cerrado na região Centro-Oeste do Brasil e *C. jacchus*, que tem origem na Caatinga na região Nordeste, foram introduzidas no Sudeste do Brasil, principalmente por meio da ação antrópica, devido ao tráfico ilegal de animais silvestres (Ruiz-Miranda *et al.*, 2000). A presença de *Callithrix jacchus* tem sido relatada desde 1919 em áreas de fragmentos florestais de Mata Atlântica na cidade do Rio de Janeiro (Coimbra-Filho, 1983). Essas duas espécies são consideradas como exóticas invasoras, e têm expandido geograficamente a sua distribuição no Sudeste do Brasil, constituindo populações estáveis (Rocha *et al.*, 2004) que representam uma ameaça à preservação da espécie nativa desta região, *C. aurita*.

Callithrix aurita, atualmente é classificada na Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature/IUCN*, 2018) na categoria “Vulnerável”, tanto por causa da destruição de seu habitat e da sua dificuldade em se estabelecer em áreas de vegetação secundária, como pela competição por recursos e pela hibridação com as espécies congêneres exóticas e invasoras.

A hibridação em *Callithrix* já foi registrada tanto em zonas naturais de contato entre as espécies (Hershkovitz, 1975, 1977; Coimbra-Filho & Mittermeier, 1973; Coimbra-Filho, 1983; Alonso *et al.*, 1987; Coimbra-Filho *et al.*, 1993; Coimbra-Filho & Câmara, 1996; Rylands *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 2005; Ruiz-Miranda *et al.*, 2006; Morais Júnior, 2010; Nogueira *et al.*,

2011; Carvalho *et al.*, 2013; Fuzessy *et al.*, 2014; Malukiewicz *et al.*, 2014; Malukiewicz *et al.*, 2015; Cezar *et al.*, 2017), como em cativeiro (Hill, 1957, 1969; Chiarelli, 1961; Mallinson, 1971; Coimbra-Filho, 1970, 1974; Coimbra-Filho & Maia 1976; Coimbra-Filho *et al.*, 1993). Experimentos realizados em cativeiro por Coimbra-Filho *et al.* (1993), detectaram que os híbridos de *Callithrix* são férteis e que apresentam uma gama de fenótipos distintos.

A identificação dos híbridos de saguis tem sido feita por meio da análise fenotípica, citogenética e genética molecular através do sequenciamento do gene nuclear *SRY* e de alguns genes mitocondriais que auxiliam na averiguação da linhagem paterna e materna, respectivamente (Mittermeier *et al.*, 1988; Rylands, 1993; Rylands *et al.*, 2000; Ruiz-Miranda *et al.*, 2006; Iughetti, 2008; Morais Júnior, 2010; Pereira, 2010; Nogueira *et al.*, 2011; Fuzessy *et al.*, 2014; Malukiewicz *et al.*, 2014; Malukiewicz *et al.*, 2015; Cezar *et al.*, 2017).

Embora a introdução das espécies exóticas, *Callithrix penicillata* e *C. jacchus*, seja considerada uma ameaça à espécie nativa do Sudeste *C. aurita*, a extensão desta ameaça ainda carece de mais estudos (Carvalho *et al.*, 2013). Além disso, ainda são frequentes as dúvidas sobre: os aspectos fenotípicos dos híbridos de *Callithrix*, quais são as espécies envolvidas no cruzamento interespecífico e os locais em que ocorre a hibridação *in situ*.

Neste estudo, foram analisados 52 indivíduos de *Callithrix* oriundos de diferentes localidades no estado do Rio de Janeiro: Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/CETAS-RJ/IBAMA (sem procedência conhecida); Jardim Botânico do Rio de Janeiro/JBRJ; Biotério da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ (sem procedência conhecida) e do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro - CPRJ/INEA/IBAMA. Os indivíduos estudados que não apresentaram fenótipo característico de alguma das espécies do gênero, foram identificados como *Callithrix* sp. pois apresentavam uma coloração da pelagem variável.

Nossos objetivos neste trabalho foram: descrever o padrão cariotípico dos indivíduos de *Callithrix* sp. estudados e comparar os dados biométricos e o padrão da pelagem de indivíduos puros de *Callithrix jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita* com aqueles registrados para os indivíduos de *Callithrix* sp. capturados, no intuito de verificar as características fenotípicas que possam ser sugestivas de hibridação. Além disso, buscamos investigar a ocorrência de quimerismo hematopoiético e utilizar a análise genética molecular para identificar as linhagens parentais dos animais estudados.

A dissertação encontra-se dividida em dois capítulos. No primeiro capítulo apresento a análise dos aspectos fenotípicos, onde foi descrita de forma subjetiva a coloração presente na face e no dorso dos animais e analisado estatisticamente os dados biométricos coletados dos indivíduos de *Callithrix* sp. estudados e os valores numéricos de RGB (*Red/Green/Blue*) obtidos a partir da coloração da pelagem de quatro pontos selecionados na face dos animais.

A descrição dos caracteres foi baseada no registro fotográfico da face e do dorso de cada animal possivelmente híbrido e de espécies puras de *Callithrix jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*. Nas fotos da face dos animais foram selecionados quatro pontos referentes às seguintes regiões: 1- tufo auricular direito, 2- centro da estrela na testa, 3- face lateral direita e 4- topo da cabeça. Utilizando o programa *Adobe Photoshop* através da ferramenta conta-gotas, obtivemos um valor numérico de RGB (*Red/Green/Blue*) para cada um desses pontos, que foram analisados por meio da Análise Discriminante. Além disso, foi realizada também a análise estatística da Média, Desvio Padrão, Anova Fatorial e o Teste de *Tukey*, para as seguintes variáveis morfométricas: peso, comprimento da cabeça, do pé direito, da mão direita, da orelha direita, e da circunferência do pescoço e do peito, com a intenção de comparar os valores obtidos para os indivíduo de *Callithrix* sp. àqueles descritos para as espécies puras de *Callithrix* mencionadas anteriormente.

No segundo capítulo da dissertação são abordadas as análises citogenética e genética molecular realizadas a partir de amostras biológicas coletadas dos indivíduos de *Callithrix* sp. estudados. Na análise citogenética, visamos descrever o padrão cariotípico dos indivíduos e investigamos a ocorrência de quimerismo. Na análise genética molecular amplificamos por meio da Reação em Cadeia da Polimerase/PCR, segmentos do gene *SRY* e do gene Citocromo c oxidase subunidade II (COII) com o objetivo de averiguar a possibilidade de identificação das linhagens paterna e materna para verificar a ocorrência de hibridação *in situ* dentre as amostras analisadas.

CAPÍTULO I

ANÁLISE FENOTÍPICA EM INDIVÍDUOS DE *CALLITHRIX* (CALLITRICHIDAE: PRIMATES) NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

No Sudeste do Brasil, *Callithrix jacchus* e *C. penicillata* são espécies exóticas invasoras que ameaçam à espécie nativa *C. aurita*, pela competição por recursos e hibridação. Estudos tem demonstrado que os híbridos de *Callithrix* são férteis e com fenótipos distintos. Nossos objetivos foram: analisar o padrão de pelagem e a morfometria de indivíduos de *Callithrix* sp. capturados no estado do Rio de Janeiro para compará-los ao das espécies puras e averiguar a ocorrência de hibridação *in situ*. Foram amostrados 30 machos e 22 fêmeas alguns identificados como *Callithrix* sp. devido à variabilidade fenotípica. Os indivíduos foram oriundos de cativeiro [Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro/CETAS-RJ, Biotério da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ e Centro de Primatologia do Rio de Janeiro-CPRJ] e de vida livre (Jardim Botânico do Rio de Janeiro/JBRJ). Foram avaliadas a cor dos tufo auriculares e a pelagem do corpo e da face, por meio de fotografias. Os dados biométricos analisados foram: comprimento da cabeça, corpo, cauda, pé, mão e orelha direita e circunferência do peito e pescoço, tomados com fita métrica e paquímetro. As medidas morfométricas foram analisadas por Análise dos Componentes Principais, Anova Fatorial e Teste *Tukey*. Nas fotografias da face foram selecionados quatro pontos de maior variação fenotípica entre as espécies puras: tufo auriculares, centro da testa, face lateral e topo da cabeça. A Análise Discriminante foi realizada utilizando os valores de RGB obtidos no programa *Adobe Photoshop*® CS3 com a ferramenta conta-gotas, para os quatro pontos mencionados. Foram estabelecidos 4 grupos fenotípicos: Grupo 1-*Callithrix* sp.; Grupo 2-*C. jacchus*; Grupo 3-*C. penicillata* e Grupo 4-*C. aurita*. Os controles positivos usados para o estabelecimento desses grupos foram indivíduos puros comprovados de cada espécie e um indivíduo híbrido com origem conhecida. A média do peso, comprimento do corpo e da cauda dos indivíduos de *Callithrix* sp. correspondeu ao das espécies puras. Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o peso ($p=0,02$), comprimento da cabeça ($p=0,00$) e circunferência do peito ($p=0,01$) entre os locais de coleta. Pela Análise Discriminante o indivíduo de *Callithrix* sp., HB1, foi classificado no Grupo 4, no resultado mais conservador e os demais foram classificados no Grupo 1. Na análise menos conservadora, o indivíduo HB1 foi classificado no Grupo 4, outros dois (Csp038 e HB2) no Grupo 2 e o restante, no Grupo 1. A diferença no peso entre os locais de coleta pode ser explicada pelas diferentes condições de saúde dos animais de cativeiro e de vida livre. O indivíduo HB1, híbrido confirmado de *C. aurita* x *C. jacchus* apresenta fenótipo mais semelhante à *C. aurita*, e os indivíduos HB2 e Csp038 se assemelham à *C. jacchus*, ambos confirmados pela Análise Discriminante. A classificação da maioria dos indivíduos no Grupo 1 cujo padrão de pelagem é intermediário ao das espécies puras de *Callithrix* sugere a ocorrência de hibridação *in situ*. Não se descarta a possibilidade da presença de indivíduos puros entre os analisados. Análises genéticas são necessárias para confirmar a ancestralidade dos animais estudados.

Palavras-chave: Pelagem, Biometria, Fotografias.

ABSTRACT

In the Southeast of Brazil, *Callithrix jacchus* and *C. penicillata* are invasive exotic species. They threaten the native species, *C. aurita*, by competition for resources and hybridization. Studies have shown that *Callithrix* hybrids are fertile and have distinct phenotypes. Our goals were: to analyze the pelage and the morphometry of individuals of *Callithrix* sp. captured in the state of Rio de Janeiro to compare them with the pure species and to verify the occurrence of in situ hybridization. A total of 30 males and 22 females were identified as *Callithrix* sp. due to their phenotypic variability. The individuals were from captive (Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro/CETAS-RJ, Biotério da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ e Centro de Primatologia do Rio de Janeiro-CPRJ) and free-living (Jardim Botânico do Rio de Janeiro/JBRJ). The color of the ear tufts and the pelage of the body and face were evaluated by means of photographs. The biometric data analyzed were: the length of head, body, - right tail, foot, hand and ear, as well as the circumference of the chest and neck, all taken with tape measure and caliper. The morphometric measurements were analyzed by the Principal Component Analysis, Factorial Anova and Tukey Test. Four points on the face were selected based on the photos, that appeared to be the most variable among the species (auricular tufts, forehead, lateral and top of the head). The Discriminant Analysis was performed using the RGB values obtained in the *Adobe Photoshop® CS3* program with the eyedropper tool from the four selected points. Four phenotypic groups were established: Group 1-*Callithrix* sp.; Group 2-*C. jacchus*; Group 3-*C. penicillata* and Group 4-*C. aurita*. The positive controls used to establish these groups were pure individuals of each species and a hybrid individual of known origin. The average of the weight, body length and tail of *Callithrix* sp. corresponded to that described for the pure species. There was a significant difference ($p \leq 0.05$) in weight ($p=0.02$), head length ($p=0.00$) and chest circumference ($p=0.01$) among the sampled sites. By the Discriminant Analysis the individual of *Callithrix* sp., HB1, was classified in Group 4, in the most conservative result and the others were classified in Group 1. In the less conservative analysis, the HB1 individual was classified in Group 4, another two (Csp038 and HB2) in Group 2 and the remainder in Group 1. The difference in weight among the sampled sites can be explained by the different health conditions of captive and free-living animals. The hybrid HB1 of *C. aurita* x *C. jacchus* presents a phenotype most similar to *C. aurita*, and individuals HB2 and Csp038 resemble *C. jacchus*, both confirmed by Discriminant Analysis. The classification of the majority of the individuals in Group 1 whose pelage pattern is intermediate to that of the pure *Callithrix* species suggests the occurrence of in situ hybridization. The possibility that there are pure individuals among those analyzed is not ruled out. Genetic analyzes are necessary to confirm the ancestry of the animals studied.

Key words: Coat, Biometrics, Photographs.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Distribuição do gênero *Callithrix* Erlxleben, 1977

Os saguis e micos, são Primatas Neotropicais da Infraordem Platyrrhini e pertencem a família Callitrichidae, que segundo Rylands *et al.* (2012) compreende sete gêneros: *Cebuella*, *Callibella*, *Mico*, *Callithrix*, *Callimico*, *Leontopithecus* e *Saguinus*.

Em 1968, Philip Hershkovitz, com base na coloração e na disposição dos tufo de pelos ao redor das orelhas, assim como no padrão de coloração da pelagem da região dorsal, classificou os saguis em dois grupos: grupo *Callithrix argentata* e grupo *Callithrix jacchus*. O grupo *Callithrix argentata*, posteriormente designado apenas como *Argentata*, era formado por *C. argentata* e *C. humeralifer*, espécies que ocorrem na região Amazônica (Hershkovitz, 1968). Atualmente estas espécies estão incluídas no gênero *Mico* que conta com 14 espécies, sendo que apenas uma delas, *Mico melanurus*, ocorre no Noroeste e Leste do Mato Grosso e Sul e Leste de Rondônia (Oliveira *et al.*, 2015), ou seja, fora da Amazônia. O grupo *Jacchus* compreendia as espécies distribuídas na região Sudeste, Nordeste e Central do Brasil. Neste grupo, somente *Callithrix jacchus* era a espécie reconhecida por Hershkovitz (1968) e considerada pelo autor como espécie ancestral que teria originado as demais subespécies: *C. j. aurita*, *C. j. flaviceps*, *C. j. geoffroyi* e *C. j. penicillata*. *Callithrix kuhlii* só foi mencionada em 1975 por esse mesmo autor, porém não era tida como um táxon válido, considerado como híbrido entre *C. j. geoffroyi* e *C. j. penicillata*.

Coimbra-Filho e Mittermeier (1973) foram os primeiros a questionar sobre a classificação das subespécies do grupo *Jacchus* sendo seguidos por diversos autores (Rosenberger, 1984; Coimbra-Filho, 1983, 1985, 1990; Mittermeier *et al.*, 1988; Seuánez *et al.*, 1988; Rylands, 1989, 1993; Groves, 1989, 1993; Natori, 1986, 1994; Natori & Shigehara, 1992; Nagamachi, 1995; Nagamachi *et al.*, 1997). Entretanto, foi somente nos anos 2000 que o nível taxonômico destas espécies foi reconhecido. Rylands *et al.* (2000), levaram em consideração os aspectos morfológicos (Hershkovitz, 1977; Rosenberger, 1984; Coimbra-Filho *et al.*, 1993), ecológicos (Mittermeier & Coimbra-Filho, 1981; Marroig, 1995), anatômicos (Natori, 1986, 1994; Natori & Shigehara, 1992) citogenéticos (Nagamachi, 1995; Nagamachi *et al.*, 1997) e moleculares (Tagliaro *et al.*, 1997; Meireles *et al.*, 1998) e sugeriram a classificação das subespécies do grupo *Jacchus* em entidades taxonômicas distintas: *C. aurita*, *C. flaviceps*, *C. geoffroyi*, *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. kuhlii*, pertencentes ao gênero *Callithrix*.

O gênero *Callithrix* encontra-se distribuído pela Floresta Atlântica, no entanto, *C. penicillata* ocorre no Cerrado e *C. jacchus* apresenta maior distribuição na Caatinga, sendo também encontrado em áreas de Floresta Atlântica (Rylands *et al.*, 1996). A Floresta Atlântica ocupava um território de mais ou menos 1.300.000 km² e se estendia por 17 estados do território brasileiro, mas recentemente, os remanescentes de vegetação nativa foram reduzidos para aproximadamente 22% de sua cobertura original, com diferentes estágios de regeneração, sendo que 8,5% estão bem conservados em áreas fragmentadas superiores a 100 hectares (MMA, 2017). Do mesmo modo, a Caatinga apresenta um avançado estado de desmatamento que chega, segundo o IBAMA, a 46% da área do bioma (MMA, 2018) e segundo dados da WWF/ World Wide Fund for Nature (WWF, 2018) 80% do bioma Cerrado já foi modificado pelo homem por causa da expansão agropecuária, urbana e construção de estradas.

Segundo Oliveira *et al.* (2015) *Callithrix jacchus* ocorre na região Nordeste do Brasil, nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e no Norte e Oeste do estado da Bahia. *Callithrix penicillata* apresenta distribuição geográfica no Centro-Oeste brasileiro, nos estados de Tocantins, Goiás, no Nordeste do Mato Grosso do Sul

e em parte da Bahia, Minas Gerais e Norte de São Paulo. *Callithrix kuhlii*, ocorre no Nordeste de Minas Gerais e no Sudeste da Bahia, assim como *C. geoffroyi* que ocorre também no Nordeste de Minas Gerais, porém a sua distribuição se estende ao Norte do Espírito Santo. *Callithrix flaviceps* apresenta distribuição geográfica no Leste de Minas Gerais e ao Sul do Espírito Santo e *C. aurita* ocorre no Leste de São Paulo, no Sudeste de Minas Gerais e no Rio de Janeiro (Oliveira *et al.*, 2015) (Figura 1).

Callithrix penicillata e *C. jacchus* ampliaram a sua distribuição geográfica principalmente devido à intervenção humana (HersHKovitz, 1975; Coimbra-Filho, 1983; Coimbra-Filho *et al.*, 1993; Coimbra-Filho & Câmara, 1996; Ruiz-Miranda *et al.*, 2000). O estado de Sergipe, o Norte e Nordeste da Bahia, incluindo o “Recôncavo Baiano” (Alonso *et al.*, 1987), a Ilha de Santa Catarina no Sul do Brasil (Santos *et al.*, 2005) foram alguns locais em que essas espécies foram introduzidas. No Sudeste do Brasil, suspeita-se que a presença de *C. penicillata* e *C. jacchus* tenha sido originada devido ao tráfico ilegal de animais silvestres, uma vez que *C. jacchus*, tem sido relatado desde 1919 ocorrendo em áreas de fragmentos florestais de Mata Atlântica na cidade do Rio de Janeiro (Coimbra-Filho, 1983). Essas duas espécies são consideradas como espécies exóticas invasoras, cuja introdução e expansão tem ameaçado diversas espécies nativas de animais, tendo sido detectados como predadores de ninhos de aves, por exemplo de *Turdus leucomelas* (Lyra-Neves *et al.*, 2007) e de *Zenaida auriculata* (Begotti & Landesmann, 2008). Também tem sido registrada a sua influência na mudança do comportamento de forrageio em *Leontopithecus rosalia* (Ruiz-Miranda *et al.*, 2000; Affonso *et al.*, 2004; Ruiz-Miranda *et al.*, 2006). Além desses distúrbios, há relatos de hibridação entre *Callithrix penicillata* e *C. jacchus* e entre essas espécies com as espécies nativas congêneres como *C. geoffroyi*, *C. aurita*, *C. flaviceps* e *C. kuhlii* onde os descendentes híbridos apresentam características fenotípicas variáveis (Alonso *et al.*, 1987; Coimbra-Filho, 1991, 1993; Coimbra-Filho & Câmara, 1996; Passamani *et al.*, 1997; Morais Júnior, 2010; Nogueira *et al.*, 2011; Fuzessy *et al.*, 2014; Malukiewicz *et al.*, 2014; Malukiewicz *et al.*, 2015; Cezar *et al.*, 2017).

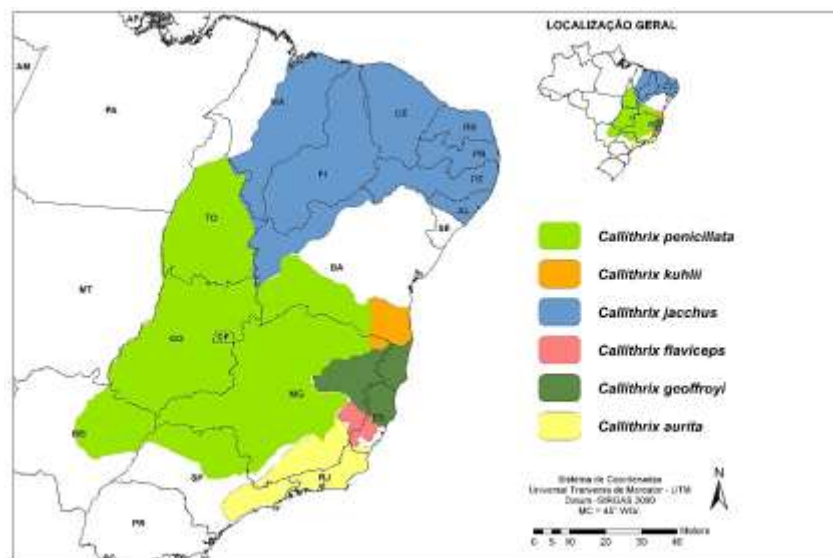


Figura 1: Mapa de distribuição das espécies de *Callithrix* no Brasil segundo dados da *International Union for Conservation of Nature List of Threatened Species/IUCN* (2017). No entanto existem zonas híbridas no limite das áreas de distribuição das espécies (Rylands *et al.*, 1996). Ilustração por: Humberto Amaral Neto. Fonte: IUCN (<http://www.iucnredlist.org/search>).

1.2 Híbridação no gênero *Callithrix*

As espécies de *Callithrix* são alopátricas, ou seja, a sua distribuição é isolada geograficamente e grandes rios como o Rio São Francisco, Rio Paraguaçu, Rio Jequitinhonha, Rio Doce, Rio Paraná, Rio Grande, Rio Paraíba e Rio Paranaíba, desempenharam papéis importantes na sua especiação (Rylands *et al.*, 1996). No entanto, esses rios parecem não ser uma barreira intransponível, pois existem registros de ocorrência de zonas de contato entre as distintas espécies do gênero, onde tem sido detectada a hibridação natural (Alonso *et al.*, 1987; Coimbra-Filho *et al.*, 1993; Rylands *et al.*, 1996; Passamani *et al.*, 1997; Malukiewicz *et al.*, 2015).

A hibridação é o resultado do cruzamento entre indivíduos de espécies diferentes. Pode ocorrer de forma natural, por meio das zonas híbridas de contato, que contribuem para o processo evolutivo das espécies, ou de forma antropogenizada, onde se tem a interferência humana, que acontece por meio da introdução de espécies exóticas ou por meio da modificação do habitat. Um exemplo de modificação do habitat é o desmatamento que pode levar à fragmentação ambiental e que pode ser benéfico ou não para algumas espécies (Rhymer & Simberloff, 1996; Allendorf *et al.*, 2001; Chamberlain *et al.*, 2009).

Evidências de hibridação natural foram detectadas no limite da área de distribuição entre *C. penicillata* x *C. geoffroyi* (Herskovitz, 1975), *C. penicillata* x *C. kuhlii*, *C. geoffroyi* x *C. flaviceps*, *C. flaviceps* x *C. aurita*, e nos locais onde uma das duas ou ambas as espécies de *C. jacchus* e *C. penicillata* foram introduzidas (Coimbra-Filho *et al.*, 1993; Ruiz-Miranda *et al.*, 2006; Morais Júnior, 2010; Nogueira *et al.*, 2011; Fuzessy *et al.*, 2014; Malukiewicz *et al.*, 2014; Malukiewicz *et al.*, 2015; Cezar *et al.*, 2017). Em cativeiro, os primeiros relatos de hibridação ocorreram entre *C. jacchus* e *C. penicillata* (Hill, 1957, 1969; Chiarelli, 1961; Mallinson, 1971) e descendentes híbridos foram gerados também a partir do cruzamento entre *C. geoffroyi* x *C. jacchus* (Coimbra-Filho, 1970, 1974) e *C. geoffroyi* x *C. flaviceps* (Ruschi, 1964). Além desses, ainda foram realizados por Coimbra-Filho *et al.* (1993), cruzamentos entre indivíduos híbridos e entre híbridos e indivíduos puros de *Callithrix*. Nesses experimentos foi possível concluir que o cruzamento interespecífico produz uma gama de fenótipos diferentes e que a hibridação não afeta a fertilidade (Coimbra-Filho *et al.*, 1993).

1.3 Aspectos morfológicos e ecológicos em *Callithrix*

Os calitriquídeos são animais de pequeno porte, caracterizados por apresentarem garras nos dedos exceto nos polegares, não possuem cauda preênsil e o seu dimorfismo sexual é pouco evidente. Sua principal característica morfológica é a presença de ornamentos pilosos nas orelhas (Haig, 1999; Oliveira *et al.*, 2015) que podem ser do tipo peri ou pré-auriculares. Os peri-auriculares são encontrados somente em *C. jacchus*, já os ornamentos pilosos pré-auriculares estão presentes em *C. aurita*, *C. flaviceps*, *C. geoffroyi*, *C. kuhlii* e *C. penicillata* (Herskovitz, 1968).

A espécie nativa da região Sudeste do Brasil, *Callithrix aurita*, tem peso médio de 425g, comprimento do corpo aproximado em 22 cm e o comprimento da cauda em 31 cm. Já as espécies exóticas invasoras como *Callithrix jacchus* tem o peso médio de 375g, o comprimento do corpo em torno de 21 cm e o comprimento da cauda de 31 cm e *C. penicillata*, tem peso médio de 220g, o comprimento do corpo aproximado em 20 cm e a cauda de 29,5 cm (Oliveira *et al.*, 2015).

Quanto aos dados reprodutivos do gênero, as fêmeas normalmente atingem a maturidade sexual ao redor de um ano e cinco meses de vida, no entanto, somente as fêmeas dominantes dos grupos são as reprodutoras e as fêmeas subordinadas sendo filhas ou não da fêmea

dominante, apresentam inibição do seu comportamento sexual e inibição neuroendócrina da ovulação, o que reduz a sua capacidade reprodutiva (Abbott *et al.*, 2003). Os machos atingem a maturidade sexual ao redor de um ano e três meses de vida estando aptos a se reproduzir (Abbott *et al.*, 2003). Assim como nas fêmeas, já foram relatados casos de machos subordinados que tiveram o seu comportamento sexual inibido e apresentaram inibição neuroendócrina testicular diante dos seus grupos sociais (Abbott, 1993). Com relação ao sistema de acasalamento, em *Callithrix aurita* foi observado o monogâmico ou poligínico, em *C. jacchus* e em *C. penicillata* além destes dois tipos, foi observado também a poliandria (Oliveira *et al.*, 2015).

1.4 Aspectos fenotípicos em *Callithrix*

Padrão de coloração da pelagem em primatas

Os primatas normalmente possuem ornamentos pilosos de cores contrastantes sobre ou perto da face e apresentam uma variação de cores na pele e na pelagem corporal (Pascalis & Bachevalier, 1998; Bradley & Mundy, 2008). A complexidade do padrão de cores faciais nos primatas do Novo Mundo (Figura 2) parece estar relacionada ao reconhecimento individual e ao reconhecimento de espécies que vivem em simpatria (Pascalis & Bachevalier, 1998; Santana *et al.*, 2012). Esse reconhecimento é importante, pois desempenha um papel crucial no estabelecimento da comunicação social entre os primatas (Chevalier-Skolnikoff, 1973).

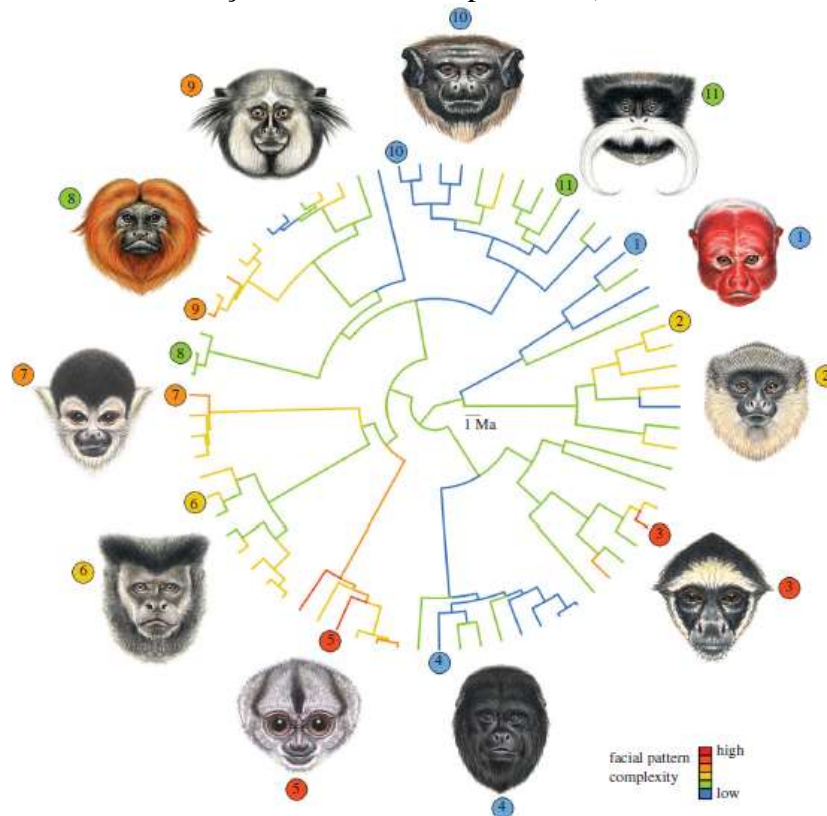


Figura 2: Padrões de complexidade de cores faciais nos primatas do Novo Mundo. As cores mais quentes indicam a maior complexidade dos padrões de cores faciais de acordo com Santana *et al.* (2012), ilustrado por Stephen Nash. (1) *Cacajao calvus*, (2) *Callicebus hoffmansi*, (3) *Ateles belzebuth*, (4) *Alouatta caraya*, (5) *Aotus trivirgatus*, (6) *Cebus nigrinus*, (7) *Saimiri boliviensis*, (8) *Leontopithecus rosalia*, (9) *Callithrix kuhlii*, (10) *Saguinus martinsi* e (11) *Saguinus imperator*. Fonte: Santana *et al.*, 2012, p. 2205.

HersHKovitz (1968) denominou de campos cromatogénéticos a variação cromática particular de uma espécie. Nos saguis, essas variações estão expressas na coloração e na disposição da pelagem, principalmente dos tufo auriculares. Durante algum tempo acreditava-se que a variação cromática em algumas espécies de saguis começava em alguma parte do corpo pela cor *agouti*, que é o padrão de bandas ao longo do pelo, e após as sucessivas variações de origem filogenética e geográfica, essa cor progrediria para o preto ou marrom podendo variar para tons de vermelho, laranja, amarelo, creme, até o branco total (HersHKovitz, 1968). No entanto, posteriormente, estudos genéticos sobre a pigmentação do pelo demonstraram que a mudança na cor é aleatória e que pode ser oriunda de mutações gênicas que interferem na atividade dos melanócitos, responsáveis por produzir a eumelanina e a feomelanina, que geram as cores marrom e/ou preta e vermelho e/ou amarelo respectivamente, na pelagem dos mamíferos (Jackson, 1997; Mundy & Kelly, 2001; Hoekstra, 2006; Bradley & Mundy, 2008).

As cores marrom, preto, vermelho e amarelo são observadas tanto na espécie nativa da região Sudeste, *Callithrix aurita*, quanto nas espécies invasoras, *C. jacchus* e *C. penicillata* (Coimbra-Filho, 1993). *Callithrix aurita* (Figura 3A) apresenta tufo auriculares curtos e de cor marrom-amarelada. A coroa na cabeça é avermelhada e a face e o queixo são beges, porém os pelos ao redor das bochechas e dos olhos são pretos. O dorso é marrom-escuro, podendo ser preto e na sua porção final podem existir pequenos pontos avermelhados. O ventre, os braços, as mãos e os pés são de cor ocre e a cauda é negra com fios de anéis brancos (Oliveira *et al.*, 2015). *Callithrix jacchus* (Figura 3B) é caracterizado pela presença de cor preta na cabeça, na coroa e no pescoço, com exceção da mancha na testa e dos tufo peri-auriculares que são brancos. A face é acinzentada e a coloração do corpo é castanho-acinzentado-claro, chegando às vezes ser castanho-avermelhado-claro. Seu dorso contém listras e a cauda, anéis brancos. *Callithrix penicillata* (Figura 3C) possui a face enegrecida, assim como a região da cabeça até as escápulas, com uma mancha branca na testa semelhante a uma estrela. Os tufo pré-auriculares são longos e pretos em formato de pincel. O dorso é levemente bandeado de coloração cinza claro, assim como os pés e as mãos; e a cauda, é castanho-acinzentada com anéis brancos (Oliveira *et al.*, 2015).



Figura 3. Espécies de saguis encontradas no Rio de Janeiro, Brasil. A- *Callithrix aurita* – espécie nativa da Mata Atlântica do Sudeste brasileiro. B- *Callithrix jacchus* – espécie originalmente da Caatinga/Nordeste brasileiro e é considerada espécie invasora do Sudeste do Brasil. C- *Callithrix penicillata* – espécie originalmente do Cerrado/ Centro-Oeste do Brasil, também invasora do Sudeste do Brasil. Figura A e B, fonte: Arquivo pessoal, fotografias retiradas no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/CPRJ/INEA/IBAMA. Figura C, fonte: José Felipe M. Pereira, fotógrafo naturalista, retirada no CPRJ/INEA/IBAMA.

1.4.1 Aspectos fenotípicos em híbridos de *Callithrix*

Populações híbridas são descritas como altamente variáveis ou polimórficas, onde os indivíduos apresentam uma gama de caracteres morfológicos que podem ser semelhantes ou não a uma das espécies parentais ou serem intermediários ao dos pais (Ackermann, 2010).

Evidências de hibridação natural em *Callithrix* nas zonas de contato foram observadas através da análise fenotípica de alguns indivíduos. Hershkovitz (1975) analisou um indivíduo suspeito de ser híbrido entre *C. jacchus* x *C. penicillata* devido a sua pelagem e do local em que foi coletado. Este indivíduo, depositado na coleção do Museu de Santo Amaro, foi coletado no município de Santo Amaro/BA, local dentro da provável zona de contato entre as espécies citadas. O animal apresentava uma intergradação de caracteres morfológicos entre as duas espécies principalmente na pelagem do dorso, que era coberto por cores misturadas entre cinza e marrom (Figura 4), e nos tufos de pelos da orelha (Figura 5).

Os experimentos realizados em cativeiro (Coimbra-Filho, 1970, 1974; Coimbra-Filho & Maia 1976; Coimbra-Filho *et al.*, 1993) com as espécies de *Callithrix*, resultaram na formação de uma descendência híbrida repleta de fenótipos distintos. Além do cruzamento interespecífico, esses autores fizeram experimentos também com cruzamento entre híbridos e as espécies puras e entre híbridos com ancestralidade híbrida tripla, quádrupla e até sêxtupla. Um exemplo de cruzamento interespecífico ocorreu entre um macho de *Callithrix flaviceps* x uma fêmea de *C. jacchus* e um macho de *C. aurita* x fêmea de *C. kuhlii*, nos quais a descendência híbrida foi do sexo feminino e fenotipicamente mais parecida com *C. flaviceps* no primeiro cruzamento e com *C. aurita*, no segundo. Já no cruzamento do duplo híbrido macho (*Callithrix. jacchus* x *C. geoffroyi*) com fêmea *C. penicillata*, a fêmea gerada foi mais semelhante a *C. penicillata* e entre o cruzamento do macho híbrido de *C. kuhlii* x *C. geoffroyi* e a fêmea triplo-híbrido de *C. jacchus* x *C. geoffroyi* x *C. penicillata*, o indivíduo macho gerado obteve características dominantes de *C. geoffroyi* (Coimbra-Filho *et al.*, 1993).

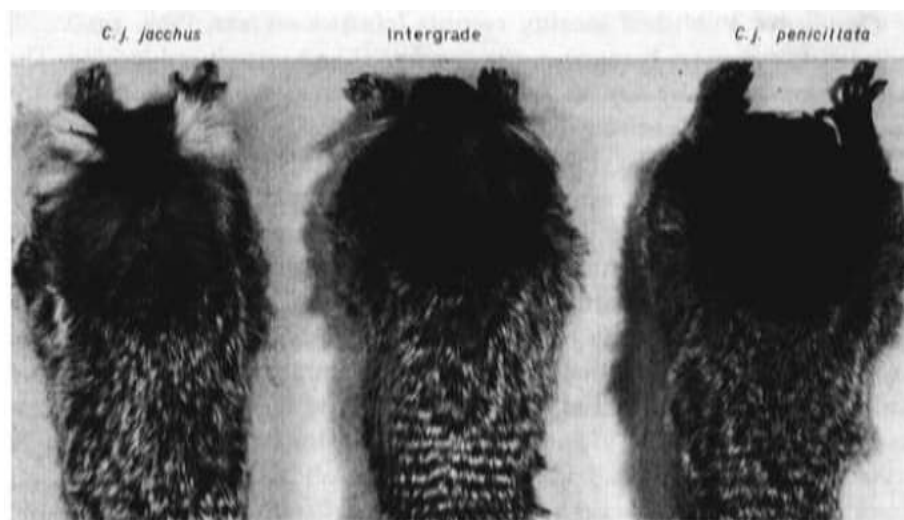


Figura 4: Espécimes da coleção do Museu de Santa Amaro/BA/BR, evidenciando a coloração do dorso do indivíduo híbrido com intergradação entre *Callithrix jacchus* (à esquerda) e *C. penicillata* (à direita). Fonte: Hershkovitz, 1975, p. 149.

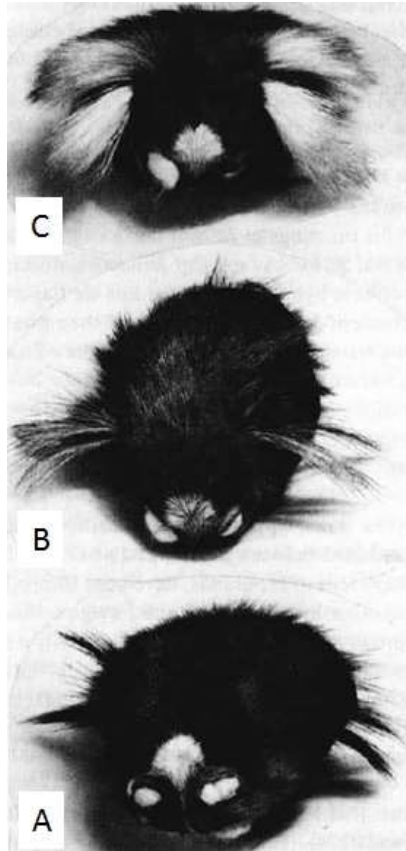


Figura 5: Espécimes da coleção do Museu de Santa Amaro/BA/BR, com ênfase para a coloração da cabeça, onde são observados os tufos auriculares no híbrido, com um fenótipo intermediário entre *Callithrix jacchus* e *C. penicillata*. A- *C. penicillata*; B- Indivíduo híbrido com intergradação entre *C. jacchus* e *C. penicillata*; C- *C. jacchus*. Fonte: Hershkovitz, 1975, p. 148.

A hibridação *in situ* tem sido relatada entre as espécies invasoras, *Callithrix jacchus* e *C. penicillata*, introduzidas no Sudeste do Brasil (Mittermeier *et al.*, 1988; Rylands, 1993; Rylands *et al.*, 2000; Ruiz-Miranda *et al.*, 2006; Iughetti, 2008; Morais Júnior, 2010; Fuzessy *et al.*, 2014; Malukiewicz *et al.*, 2014; Malukiewicz *et al.*, 2015; Cezar *et al.*, 2017), inclusive, entre estas e a espécie nativa desta região, *C. aurita* (Pereira, 2010; Nogueira *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2013).

Descendentes híbridos capturados nos municípios de Silva Jardim e Rio Bonito no estado do Rio de Janeiro, que eram provavelmente oriundos do cruzamento entre *Callithrix jacchus* e *C. penicillata*, foram descritos com padrões de pelagem intermediário ao dessas espécies e com a coloração de tufos auriculares na cor cinza (Ruiz-Miranda *et al.*, 2006; Morais Júnior, 2010). Também foram descritos indivíduos híbridos destas mesmas espécies, oriundos da cidade de Bauru em São Paulo (Valença-Silva *et al.*, 2014) e outros capturados na zona híbrida de Petrolina/Pernambuco e Juazeiro/Bahia (Malukiewicz *et al.*, 2014).

Em Viçosa no estado de Minas Gerais os híbridos entre *C. geoffroyi* x *C. penicillata* apresentaram a pelagem do corpo semelhante à descrita por Hershkovitz (1975) com intergradação de caracteres. A mancha branca na testa característica de *C. penicillata* estava presente nos 40 indivíduos de *Callithrix* sp., as faces eram polimórficas com diferentes tonalidades de coloração cinza claro e branco, a coloração do corpo variava entre cinza claro e escuro, porém a parte superior e as porções mais baixas das costas, tinham um padrão estriado nas cores laranja, cinza claro e cinza escuro (Fuzessy *et al.*, 2014).

Os objetivos deste capítulo foram: comparar o padrão da pelagem, principalmente da face, dos indivíduos de *Callithrix* sp. capturados em diferentes localidades do estado do Rio de Janeiro ao fenótipo descrito para os indivíduos puros de *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*, assim como dos híbridos naturais e de cativeiro; comparar os dados biométricos descritos na literatura para *Callithrix jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita* com os dados obtidos dos indivíduos de *Callithrix* sp. capturados em diferentes localidades do estado do Rio de Janeiro.

Foram levantadas as seguintes hipóteses em relação aos caracteres fenotípicos dos indivíduos estudados: H_0 -Os indivíduos de *Callithrix* sp. capturados em diferentes localidades no estado do Rio de Janeiro apresentam uma variação fenotípica devido a provável hibridação entre *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*. H_1 -Os indivíduos de *Callithrix* sp. capturados em diferentes localidades no estado do Rio de Janeiro não apresentam uma variação fenotípica, não corroborando com a suspeita de hibridação entre *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo e Número Amostral

Foram amostrados ao todo 52 indivíduos. Este total compreende tanto indivíduos considerados como *Callithrix* sp., assim como indivíduos puros de *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*. As amostras biológicas, os dados morfométricos e os registros fotográficos dos 41 indivíduos considerados como *Callithrix* sp. devido ao fenótipo variável, foram obtidos em três localidades no estado do Rio de Janeiro (Figura 6). Em dois destes locais, os animais se encontravam em cativeiro sem procedência conhecida: no Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/CETAS-RJ/IBAMA, onde foram amostrados nove indivíduos, e o Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ, onde foram amostrados 14 indivíduos (Tabela 1). Em vida livre foram amostrados 18 indivíduos no Jardim Botânico do Rio de Janeiro/JBRJ, na cidade do Rio de Janeiro (Tabela 1).

No Centro de Primatologia do Rio de Janeiro-CPRJ/INEA/IBAMA, localizado em Guapimirim, foi feito apenas o registro fotográfico de 11 indivíduos puros e híbridos (Tabela 1). Dentre estes, seis indivíduos eram puros sendo dois *C. jacchus* (Cj1- registro CPRJ: 2568 e Cj2- registro CPRJ: 2569) e quatro *C. aurita* (Ca1- registro CPRJ: 3211, Ca2- registro CPRJ: 3210, Ca3- registro CPRJ: 3209 e Ca4- registro CPRJ: 3212). Um indivíduo era um híbrido confirmado entre *C. aurita* x *C. jacchus* (HB1- registro CPRJ: 2521). Estas amostras foram usadas como controle positivo para análise fenotípica e comparação com o fenótipo dos 41 indivíduos amostrados no presente estudo. Já os outros quatro indivíduos restantes desse local eram híbridos identificados como: HB2- registro: 42855, HB3- registro: 2159, HB4- registro: 6581 e HB5- registro: 9316, os quais também foram fotografados para a análise fenotípica.

Tabela 1. Número de indivíduos de *Callithrix* sp. amostrado nos quatro locais de coleta:

Local	Número de indivíduos Amostrados
Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/ CETAS-RJ/IBAMA	9
Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Biotério-UFRJ	14
Jardim Botânico do Rio de Janeiro /JBRJ	18
Centro de Primatologia do Rio de Janeiro CPRJ/INEA/IBAMA	11

Como controle positivo de *C. penicillata* foi utilizada a fotografia de um indivíduo também do CPRJ/INEA/IBAMA, porém tirada pelo fotógrafo naturalista José Felipe, a qual nos foi cedida, já que no dia em que fomos neste local, não havia nenhum indivíduo comprovadamente dessa espécie.

Todos os dados dos animais amostrados estão apresentados na tabela do Anexo A e toda a coleta de dados e de material biológico foi realizada de acordo com os processos rotineiros de manejo dos animais em suas respectivas instituições. Além disso, as coletas foram autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade/SISBIO (20435-2) e aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (CEUA/ICBS) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).



Figura 6: (A) Mapa do Estado do Rio de Janeiro, o quadrado delimita a área de coleta e captura dos indivíduos de *Callithrix* sp.; (B) As setas indicam os pontos de coleta e captura dos indivíduos de *Callithrix* sp. 1. Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro/CETAS-RJ/IBAMA, em Seropédica; 2. Jardim Botânico do Rio de Janeiro/JBRJ, cidade do Rio de Janeiro; 3. Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade do Rio de Janeiro/ Biotério-UFRJ, Ilha do Fundão. Ilustração por: Diogo Pereira. Fonte: *Google Earth* (<https://www.google.com.br/maps>).

2.2 Centro de Triagem de Animais Silvestres do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, no Estado do Rio de Janeiro (CETAS-RJ/IBAMA)

Os CETAS são unidades do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) responsáveis pelo manejo de animais silvestres. Os animais encaminhados para esse local foram apreendidos de ações fiscalizatórias, resgatados nas ruas ou entregues por pessoas físicas de forma voluntária.

Os CETAS, tem pôr finalidade identificar, marcar, triar, avaliar, recuperar, reabilitar e destinar os animais para a soltura em seus devidos locais de ocorrência. Além disso, essa instituição também contribui com pesquisas de cunho científico, com o ensino nas escolas e promove a extensão com a sociedade em prol da Educação Ambiental (IBAMA, 2016). No estado do Rio de Janeiro, essa unidade está localizada na Floresta Nacional Mário Xavier, BR 465, Km 3,5 no Município de Seropédica (22°43'23.73"S e 43°42'36.28"W) e tem como

responsável pelo atendimento especializado aos animais, o Médico Veterinário Daniel Marchesi Neves.

Cada animal utilizado no presente estudo, oriundo deste local, após estar bem reabilitado e ter recebido o diagnóstico pelo veterinário de que estava saudável, foi submetido à coleta de material biológico, dos dados morfométricos e dos registros fotográficos.

2.3 Jardim Botânico do Rio de Janeiro/JBRJ

O Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) (Figura 7) está localizado na zona Sul da cidade do Rio de Janeiro (22°57' a 22°59' S e 43°13 a 43°14' W) e é contíguo ao Parque Nacional da Tijuca, onde compõe uma área de 137 hectares (ha), sendo que desses, 83 ha possuem remanescentes de Mata Atlântica preservada. Devido a essa vizinhança, várias espécies animais utilizam esse habitat para alimentação, reprodução e sobrevivência, o que motivou a criação do Núcleo de Conservação da Fauna do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. É de responsabilidade da equipe do projeto, identificar e fazer o levantamento dos animais que habitam o JBRJ, pois isso contribui para a preservação da biodiversidade, fornece dados para pesquisas científicas e ajuda na orientação dos visitantes e colaboradores que frequentam o local (Rangel, 2010; Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016).

Habituação e Captura

No JBRJ, o Núcleo de Conservação da Fauna monitorava três grupos de saguis, e havia plataformas em três locais centrais às áreas de uso desses grupos, denominadas: Região Amazônica, Orquidário e Canteiro 32 (Figura 7). Nesses locais, foram içadas plataformas feitas com bambus e nelas foram colocadas as armadilhas de arame galvanizado do tipo *Tomahawk* (18 x 18 x 60cm).

No período de habituação, as armadilhas ficavam desarmadas e nelas, frutas eram colocadas no seu interior, que funcionavam como iscas para atrair os animais. Como o monitoramento dos três grupos de saguis estava em andamento e eles já estavam pré-habitados às plataformas, foi necessário cerca de cinco dias até o dia da captura, uma vez que os animais já tinham se acostumado a entrar e sair das armadilhas. No dia da captura além da reposição das frutas, as armadilhas eram engatilhadas para prender os animais. A equipe de captura, observava de longe a aproximação dos animais na armadilha e, posteriormente à captura, a plataforma era trazida ao solo. Em seguida, as armadilhas eram cobertas com um pano escuro, para evitar o estresse dos animais e os mesmos eram transportados para uma sala de procedimentos no interior do Jardim Botânico, onde era feita a coleta de dados e de material biológico.

Os procedimentos realizados no JBRJ foram supervisionados pela Bióloga Gabriela Côrtes Heliodoro dos Santos, do Núcleo de Conservação da Fauna e pelo Médico Veterinário, Dr. Carlos Eduardo Verona. Toda a equipe de coleta utilizou os equipamentos de proteção individual (EPI): jaleco, luvas, máscaras e óculos, para fazer a contenção física e química dos animais, a coleta de material biológico e o registro fotográfico. A marcação de cada indivíduo de *Callithrix* sp. foi feita com *microchip* (*Microchip-partners*®), dimensões 12 mm x 2,1 mm e peso estimado de 0,06g (Honest & Macdonald, 2011), que foi introduzido no dorso do animal, na região interescapular, com auxílio de uma agulha e aplicador, identificado por um número de série, o qual foi anotado na ficha individual para monitoramento e identificação de recapturas.



Figura 7: Área do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ). Os pontos A, B e C representam as regiões onde ocorreram as capturas de *Callithrix* sp. (A) Canteiro 32; (B) Orquidário; (C) Região Amazônica. Imagem obtida pelo *Google Earth* (<https://www.google.com.br/maps>).

2.4 Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Biotério-UFRJ)

O Instituto é especializado em aplicar métodos Físicos à pesquisa Biológica. Seu prédio foi criado em 1945, após a institucionalização da pesquisa acadêmica na universidade pelo Dr. Carlos Chagas Filho, cujo o pai foi o descobridor da Doença de Chagas.

Os animais que estavam presentes no Biotério da UFRJ, foram removidos da natureza, porém não se tinha o conhecimento exato do local de procedência dos mesmos. A coleta de material biológico dos indivíduos de *Callithrix* sp. foi feita sob a coordenação da Professora Dr^a. Flavia Spreaficono do Instituto de Nutrição Josué de Castro na UFRJ e os registros fotográficos e dados biométricos foram realizados por nossa equipe.

O projeto coordenado pela professora contava com a aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA do Centro de Ciências de Ciências e da Saúde da UFRJ para experimentação de cunho científico com saguis do Biotério.

2.5 Contenção Física

A contenção física dos animais no CETAS-RJ/IBAMA e no JBRJ foi feita pelos veterinários responsáveis das instituições. Esses profissionais, utilizando luvas de raspa de couro, utilizavam uma das mãos para aproximar o sagui de encontro à grade no interior da armadilha e com a outra mão, aplicavam o anestésico na face externa da coxa do animal. No entanto no Biotério da UFRJ, as gaiolas em que se encontravam os animais já eram de contenção e apresentavam um mecanismo que pressionava os animais junto à grade, facilitando a aplicação do anestésico. Em todos os locais os animais permaneciam nas armadilhas ou nas gaiolas até iniciar o efeito do fármaco, para não comprometer a integridade física do animal e do veterinário.

2.6 Contenção Química

A dose de anestésico foi ajustada ao peso de cada indivíduo. Utilizamos o anestésico, Cloridrato de Ketamina (10mg/kg/via intramuscular), aplicado via intramuscular (IM), na musculatura da coxa com seringa de 1mL e agulha de calibre 24G; 0,55x20mm.

2.7 Identificação e registro individual

Os indivíduos capturados no três locais de coleta: CETAS-RJ/IBAMA, Biotério-UFRJ e JBRJ foram identificados com o código Csp (*Callithrix* sp.) + número sequencial (por exemplo 001 que representava a ordem de captura do indivíduo). Já em relação aos animais amostrados no CPRJ/INEA/IBAMA: os indivíduos de *C. jacchus* receberam o código Cj, os de *C. aurita* foram identificados como Ca e os híbridos de HB, sendo que em todos os casos as siglas eram seguidas pelo número sequencial, relativo à ordem de captura. Os dados dos animais capturados em campo e em cativeiro foram registrados em uma ficha de campo (Anexo B) elaborada de acordo com o Protocolo para coleta de dados sobre primatas em Unidades de Conservação da Amazônia (ICMBio, 2012).

2.8 Caracterização Fenotípica

De acordo com as características descritas por Oliveira, *et al.* (2015) para: *C. aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata*, foi averiguado que existem características fenotípicas particulares para cada uma das espécies em questão. Com isso, na caracterização fenotípica foram avaliados de forma subjetiva, pela autora deste trabalho, os seguintes caracteres fenotípicos dos indivíduos de *Callithrix* sp.: formato e cor dos tufos auriculares e o padrão da pelagem da região dorsal do corpo e da face. Estas características foram comparadas àquelas descritas para as espécies puras.

2.9 Registro fotográfico e medidas corporais

Todos os animais foram fotografados seguindo o Protocolo para Coleta de Dados sobre Primatas em Unidades de Conservação da Amazônia (ICMBio, 2012), onde são apresentadas as posições clássicas para a padronização das fotos, que se referem à: região ventral, dorsal e lateral do corpo, além da face e do crânio.

Enquanto os animais estavam sob efeito do anestésico, foram fotografados e coletados os dados biométricos de 41 indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA (n=9), do JBRJ (n=18) e do Biotério da UFRJ (n=14), sendo que no CPRJ/INEA/IBAMA foi realizado somente o registro fotográfico em 11 animais, os quais eram possíveis híbridos (n=4) e puros (n=6), além de um híbrido confirmado entre *C. aurita* x *C. jacchus* (HB1). Todavia, como não conseguimos coletar dados de indivíduos de *C. penicillata*, o fotógrafo naturalista José Felipe M. Pereira, nos concedeu a foto de um indivíduo desta espécie (Cp1), que foi tirada no dia 22/09/2008 no CPRJ/INEA/IBAMA.

Para análise fenotípica, cada indivíduo foi colocado dentro de uma caixa de papelão (altura: 29,5cm x comprimento 42cm: x largura: 40,5 cm) com uma fita de luz de LED adaptada à parte interior da tampa para padronizar a iluminação em todas as fotos, impedindo a interferência da luz ambiente (Figura 8). Um orifício foi feito na tampa da caixa para permitir a adaptação da lente da câmera modelo *Sony Cyber-Shot* 16.2 megapix (Figura 9: A e B). As fotografias foram tomadas com o indivíduo posicionado em decúbito dorsal, ventral e lateral no interior da caixa (Figura 10).

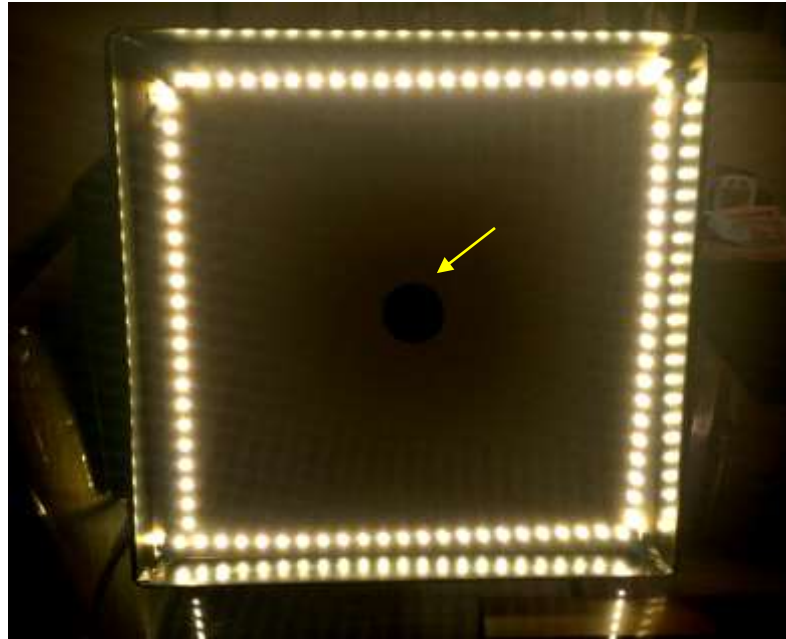


Figura 8: Superfície interna da tampa da caixa de papelão circundada por luz de LED para padronizar a luminosidade em todas as fotos tiradas dos indivíduos de *Callithrix* sp. A seta destaca o orifício em que se posiciona a câmera fotográfica modelo *Sony Cyber-Shot* 16.2 megapix.



Figura 9: (A) Manuseio da caixa para receber o indivíduo de *Callithrix* sp.; (B) Câmera modelo *Sony Cyber-Shot* 16.2 megapix, posicionada no orifício da caixa e, em destaque no círculo, a imagem do indivíduo de *Callithrix* sp. no interior da caixa.



Figura 10: Macho de *Callithrix* sp. identificado como Csp011 no interior da caixa de papelão fechada com luz de LED interna. (A) Animal em decúbito dorsal (B) Animal em decúbito ventral (C). Animal em decúbito lateral.

A obtenção dos dados morfológicos foi baseada no protocolo de processamento de primatas, publicado pelo Centro de Proteção de Primatas Brasileiros (CPB), o qual estabeleceu padrões e normas para minimizar os riscos e impactos sobre as espécies de primatas após a contenção química (Valença-Montenegro & Laroque, 2009). Desta forma, foram sugeridos os seguintes dados para a coleta da biometria, os quais nós seguimos: peso, circunferência do peito, comprimento da cabeça, do corpo e da cauda, comprimento da mão, pé e orelha direita e comprimento do pescoço.

Todas as medidas morfológicas foram retiradas pela autora e tomadas com o auxílio de uma fita métrica (precisão de 1mm) e de dois paquímetros, um com comprimento total de 118 mm e outro com 8 cm, ambos com precisão de 0,1mm (Figura 11). Com o paquímetro de 118mm, foram medidos: o comprimento da cabeça, do pé direito e da mão direita. Com o paquímetro de 8mm, foi medida a orelha direita e com a fita métrica, foi mensurada a circunferência do pescoço e do peito de cada animal. Todos os dados obtidos foram registrados em uma ficha individual (Anexo B).



Figura 11: Tomada das medidas morfológicas de um indivíduo de *Callithrix* sp. (A) Medida do comprimento do corpo com o auxílio de fita métrica (precisão de 1mm). (B) Medida do pé direito, tomada com o paquímetro de comprimento total de 118mm.

2.10 Paleta de cores

Devido à coloração característica dos tufo auriculares e o padrão de cores presente no dorso e na face dos indivíduos das espécies puras de *Callithrix jacchus*, *C. aurita*, *C. penicillata* e dos possíveis híbridos entre essas espécies, foram selecionados 4 pontos nas faces dos saguis, pois são áreas consideradas importantes na diferenciação morfológica entre as espécies (Herskovitz, 1968; Bradley & Mundy, 2008). Sendo assim, não foram analisadas as regiões do dorso nesta etapa do trabalho. Foram analisados na face, os seguintes locais: 1- tufo auricular direito; 2- centro da estrela, mancha branca na testa; 3- face lateral direita e 4- coroa da cabeça (Figura 12).

Para a obtenção de um valor numérico referente a coloração de cada ponto da face selecionado, as fotografias de cada indivíduo de *Callithrix* sp. (Figura 12) e dos indivíduos puros de *C. jacchus*, *C. aurita* e *C. penicillata*, foram analisadas no programa *Adobe Photoshop® CS3* com a área de trabalho em modo de Fotografia. Neste programa, ao selecionar na barra lateral esquerda a ferramenta conta-gotas é apresentado no menu da barra superior a opção “Tamanho da Amostra” (que define o número de *pixels* da imagem selecionada pelo conta-gotas) onde foi selecionada a opção “Amostra de Ponto”. Já ao lado na janela “Modo de Amostra” do conta-gotas, foi usada a opção “Todas as camadas”. Desta forma, ao posicionar a ferramenta conta-gotas sobre cada ponto determinado na face dos animais foi obtido o valor numérico do sistema de cores aditivas, formadas pelo vermelho (*red*), verde (*green*) e azul (*blue*)/RGB (Anexo D), que em conjunto formam uma única cor (Figura 13). Os valores de RGB gerados para os quatro pontos de cada indivíduo foram adicionados no *site* <http://www.colourlovers.com/palettes/add>, o qual originou uma paleta única composta por quatro cores e exclusiva para cada indivíduo (Figura 14).

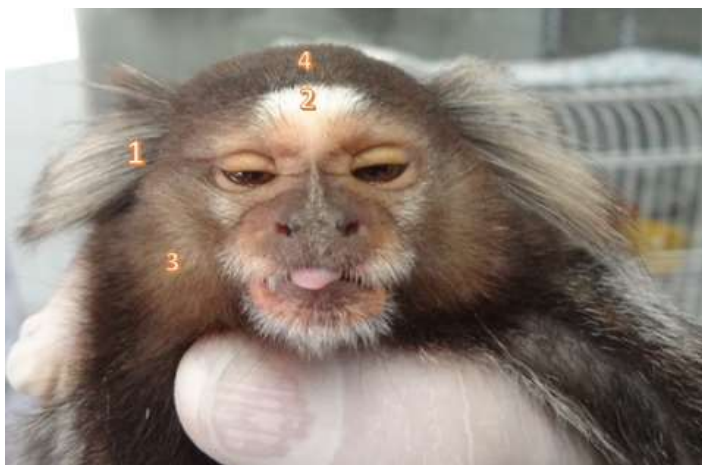


Figura 12: Indivíduo de *Callithrix* sp. identificado como Csp005. Os números 1, 2, 3 e 4 na face representam os locais usados para avaliar o fenótipo desta região nos possíveis híbridos e nos indivíduos puros de *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*. 1- Tufo auricular direito. 2- Centro da estrela na testa. 3- Face lateral direita. 4- Topo da cabeça.

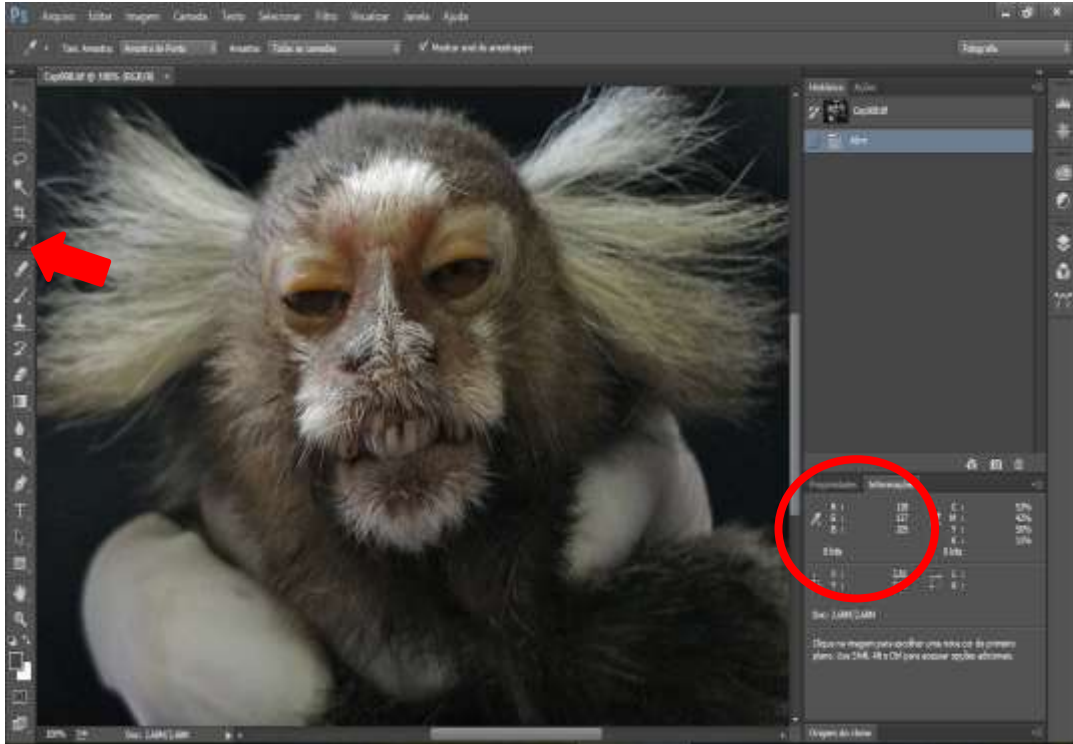


Figura 13: Fotografia de um indivíduo de *Callithrix* sp. identificado como Csp008, inserida no programa *Adobe Photoshop® CS3* em modo de Fotografia. A seta destaca a ferramenta Contagotas utilizada para se obter o valor numérico do sistema de cores aditivas, formadas pelo vermelho (*red*), verde (*green*) e azul (*blue*)/RGB, o qual de se encontra circundado.

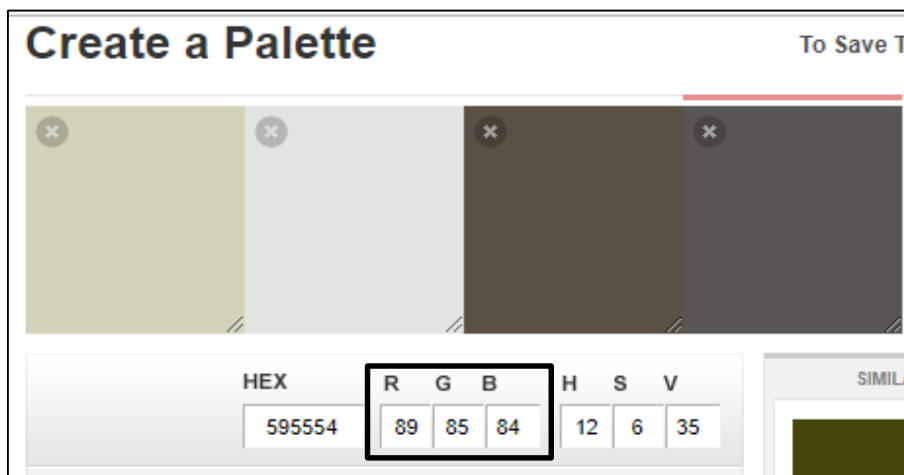


Figura 14: Imagem do *site Colour lovers* < <http://www.colourlovers.com/palettes/add> >, onde foi gerada a paleta de cores individual resultante dos valores numéricos do sistema de cores aditivas, formadas pelo vermelho (*red*), verde (*green*) e azul (*blue*)/RGB, obtidos no programa *Adobe Photoshop® CS3* (em destaque no quadrado vermelho) a partir dos quatro pontos selecionados na face dos indivíduos de *Callithrix* sp. analisados no presente estudo.

2.11 Análises Estatísticas

2.11.1 Biometria

Inicialmente foi feita uma análise exploratória dos dados biométricos de 41 indivíduos de *Callithrix* sp. provenientes do CETAS-RJ/IBAMA (6 machos e 3 fêmeas), do JBRJ (13 machos e 5 fêmeas) e do Biotério da UFRJ (6 machos e 8 fêmeas). As medidas morfológicas analisadas foram: peso (P); comprimento da cabeça (Ccab), corpo (Cc), cauda (Cca), pé direito (Cpd), mão direita (Cmd), orelha direita (Cod); circunferência do peito (Cip) e do pescoço (Cipe). Para identificar os caracteres morfológicos que mais se destacaram entre os indivíduos amostrados, foi feita uma Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis/PCA*) utilizando o programa *Paleontological statistics* (PAST®). Com essa análise, é possível saber quais são as medidas responsáveis pelas maiores variações entre as amostradas (Varela, 2008), no caso, entre as medidas morfológicas obtidas dos 41 indivíduos de *Callithrix* sp.

A ANOVA Fatorial no programa *Statistica 7*® foi utilizada para encontrar diferenças significativas, ao nível de significância $p \leq 0,05$, entre as variáveis mensuráveis no três locais de coleta e também foi feito o Teste *Post Hoc* (Tukey) para examinar as diferenças entre os níveis de significância. Além disso, as médias do peso (P), do comprimento do corpo (Cc) e da cauda (Cca) obtidas a partir dos indivíduos amostrados, foram comparadas com as médias descritas por Oliveira *et al.* (2015) para *Callithrix aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata*. Também foram analisadas as variáveis peso e sexo em relação aos animais de vida livre (JBRJ) e em cativeiro (CETAS-RJ/IBAMA e Biotério da UFRJ).

2.11.2 Paleta de Cores

Com base no valor de RGB adquirido para cada um dos pontos estabelecidos somente na face dos animais, no caso: 1- tufo auricular direito, 2- centro da estrela na testa, 3- face lateral direita e 4- topo da cabeça, foi gerada uma paleta de cores no *site Colour lovers* para cada um dos indivíduos de *Callithrix* sp., *C. jacchus*, *C. aurita* e *C. penicillata*. A partir desses valores numéricos foi feita a Análise Discriminante no *software Statical Package for the Social Sciences* (SPSS® V.17) buscando distinguir os grupos de animais.

A Análise Discriminante é uma técnica da estatística multivariada que explora os dados na busca de características que permitam classificar determinados elementos em diferentes grupos previamente definidos (Nóbrega, 2010). Com isso, foram pré-estabelecidos grupos padrões de acordo com o fenótipo das espécies puras de *Callithrix jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*, e os animais que não apresentavam o fenótipo semelhante ao dessas espécies, foram caracterizados como *Callithrix* sp.. Desta forma, os grupos estipulados de acordo com o fenótipo foram: Grupo 1- *Callithrix* sp.; Grupo 2- *C. jacchus*; Grupo 3- *C. penicillata* e Grupo 4 - *C. aurita*.

Por meio da Análise Discriminante buscamos agrupar os valores de RGB registrados para os 53 indivíduos de *Callithrix*, nos grupos mencionados acima. Dentre os animais analisados, 46 eram *Callithrix* sp. provenientes dos seguintes locais: CETAS-RJ/IBAMA (n=9), do JBRJ (n=18), do Biotério da UFRJ (n=14) e do CPRJ (n=5 – HB1, HB2, HB3, HB4 e HB5). Ainda neste último local foram analisados também os valores de RGB de dois indivíduos de *C. jacchus* (Cj1 e Cj2), de quatro indivíduos de *C. aurita* (Ca1, Ca2, Ca3 e Ca4) e a fotografia de um indivíduo de *C. penicillata* (Cp1), também oriundo deste local.

3. RESULTADOS

3.1 Biometria

A Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis/PCA*) no programa PAST®, mostrou os dados sem transformação de todos os indivíduos de *Callithrix* sp. com as suas variáveis em destaque. Além disso, no gráfico os indivíduos foram ligados por *Convex de hulls* que delimitam os respectivos locais de coleta (CETAS-RJ/IBAMA- vermelho; JBRJ-azul, e Biotério-UFRJ-verde) (Figura 15). Os componentes principais de maior importância foram agrupados no Componente principal do eixo 1 (X)/CP1 que explica em torno de 34% dos dados e inclui as variáveis morfométricas que se destacaram, no caso o peso e a circunferência do peito (Figura 16A). No Componente principal do Eixo 2 (Y)/CP2 que explica aproximadamente 16% dos dados, se destacaram o comprimento da orelha direita e o comprimento da cabeça (Figura 16B). Para tornar a interpretação dos dados do PCA mais claras, utilizou-se o critério de seleção sugerido por Kaiser (1960) onde se utiliza os CPs cujos autovalores são superiores a 1 pois, sintetiza uma variância acumulada igual ou superior a 70%, apresentando um valor significativo. Neste caso, foram utilizadas os componentes principais 1, 2, 3 e 4, devido a soma do percentual da variância corresponder a aproximadamente 73% da variância (Tabela 2) representados pelas variáveis: peso, circunferência do peito, orelha direita e comprimento da cabeça.

Tabela 2: Correlação dos Componentes Principais (CP) com as variáveis de maior importância presentes no Eixo X (CP1) e Y (CP2). No Componente Principal 1, aproximadamente 34% dos dados da variação morfométrica são explicados, com as variáveis do peso e da circunferência do peito em destaque. No Componente Principal 2, em torno de 16% da variação é explicada e as variáveis que se destacaram foram o comprimento da orelha direita e o comprimento da cabeça. A seta vermelha destaca os CP 1, 2, 3 e 4 cuja a soma dos autovalores são superiores a 1 (Kaiser, 1960), correspondendo a aproximadamente 73% da variância dos dados.

CP	Autovalores	% Variância
1	3,08102	34,234
2	1,40558	15,618
3	1,12056	12,451
4	1,01628	11,292
5	0,741729	8,2414
6	0,658095	7,3122
7	0,54355	6,0394
8	0,274382	3,0487
9	0,1588	1,7644

*CP= Componente Principal

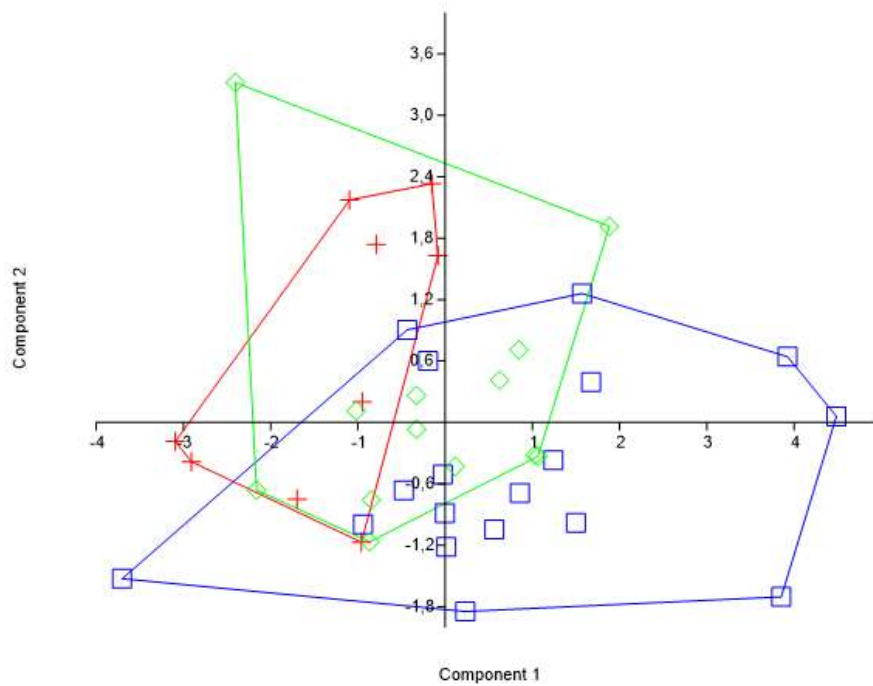


Figura 15: Gráfico gerado pela Análise de Componentes Principais (PCA) a partir dos dados biométricos dos 41 indivíduos de *Callithrix* sp. capturados em três localidades do estado do Rio de Janeiro. Estão dispersos ao longo do eixo X as variáveis em destaque do peso e da circunferência do peito de acordo com o comprimento do corpo, e ao longo do eixo Y as variáveis do comprimento da orelha direita e do comprimento da cabeça em destaque, também de acordo com o comprimento do corpo. O *Convex hulls* em vermelho representa os indivíduos do CETAS-RJ/IBAMA, em azul os do JBRJ e em verde do Biotério da UFRJ.

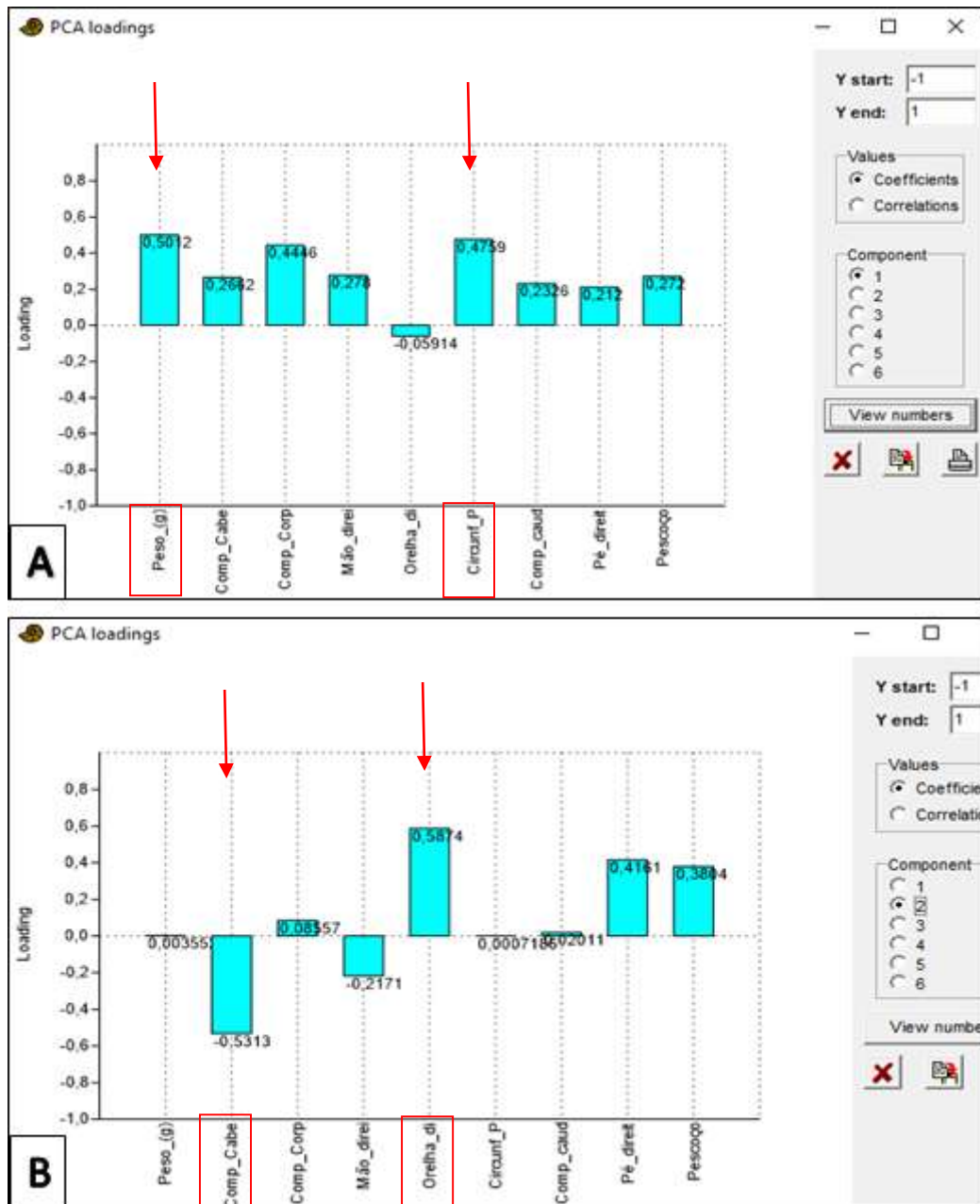


Figura 16: Variáveis mensuradas nos indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e do Biotério-UFRJ que se destacaram na Análise de Componentes Principais ao longo do eixo X e Y. (A) Eixo X, as setas indicam as variáveis do Peso (P) e da Circunferência do peito (Cip). (B) Eixo Y, as setas indicam as variáveis do Comprimento da cabeça (Ccb) e da Orelha direita (Cod).

As médias do peso, do comprimento do corpo e do comprimento da cauda descritas por Oliveira *et al.* (2015) para *Callithrix aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata*, foram comparadas às médias dos indivíduos de *Callithrix* sp. capturados somente no JBRJ (n=15) por serem animais de vida livre (Tabela 3).

Tabela 3: Média do peso (P), do comprimento do corpo (Cc) e da cauda (Cca) de *Callithrix aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata* descrita por Oliveira *et al.* (2015) e dos indivíduos de *Callithrix* sp. capturados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Variáveis	<i>Callithrix aurita</i>	<i>C. jacchus</i>	<i>C. penicillata</i>	<i>Callithrix</i> sp.	DP <i>Callithrix</i> sp.
P	425g	375g	220g	329,5g	62,2
Cc	22cm	21cm	20cm	19,5cm	1,5
Cca	31cm	31cm	29,5cm	27,8cm	8,2

DP= Desvio Padrão

Pela ANOVA Fatorial as variáveis do peso (Figura 17), do comprimento da cabeça (Figura 18) e da circunferência do peito (Figura 19) foram as que diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) entre os três locais de coleta. As demais medidas não diferiram significativamente na comparação entre os três locais de coleta ($p \geq 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4: Valores de F (ANOVA Fatorial) e teste de *Tukey* para comparações das variáveis: peso (P), comprimento da cabeça (Ccab), do corpo (Cc), da mão direita (Cmd), circunferência do peito (Cip), comprimento da cauda (Cca), comprimento do pé direito (Cpd) e circunferência do pescoço (Cipe) obtidas de indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, estado do Rio de Janeiro, ao nível de significância ($p \leq 0,05$).

Variáveis	F	P	<i>Tukey</i>
P	7,2	0,02*	JBRJ> UFRJ > CETAS-RJ/IBAMA
Ccab	14,2	0,00**	JBRJ> UFRJ, CETAS-RJ/IBAMA
Cc	1,6	0,2	Ns
Cmd	0,1	0,8	Ns
Cip	5,1	0,01*	JBRJ> CETAS-RJ/IBAMA
Cca	0,8	0,4	Ns
Cpd	1,4	0,2	Ns
Cipe	0,5	0,6	Ns

Valores de significância ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; F= Valor da Anova Fatorial; Ns= não significativo.

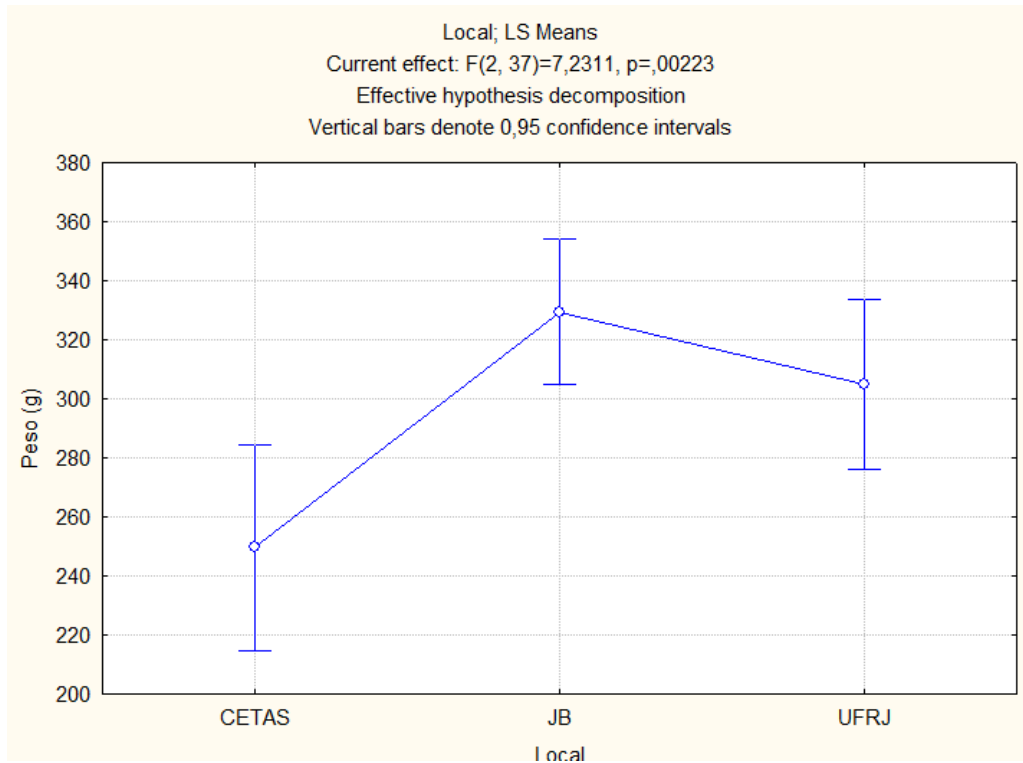


Figura 17: Gráfico Boxplot gerado pela ANOVA Fatorial, mostrando a diferença significativa da variável peso ($p=0,00223$) dos indivíduos de *Callithrix* sp. estudados em relação aos locais de coleta, CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ.

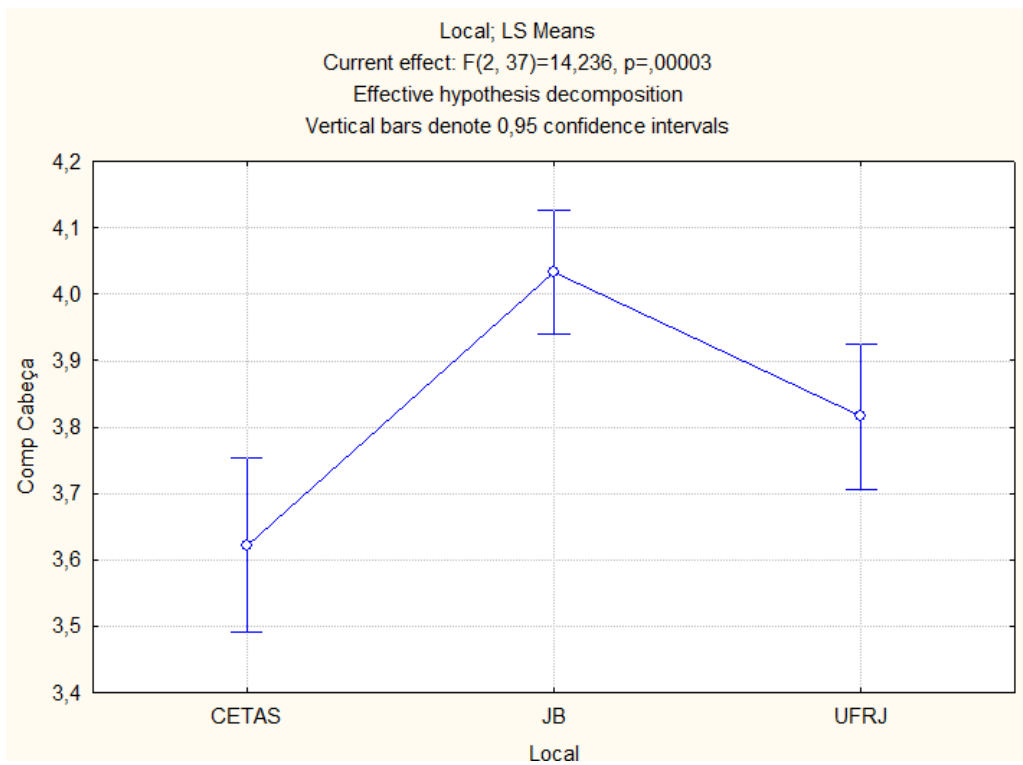


Figura 18: Gráfico Boxplot gerado pela ANOVA Fatorial, mostrando a diferença significativa da variável comprimento da cabeça ($p=0,0003$) dos indivíduos de *Callithrix* sp. estudados em relação aos locais de coleta, CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ.

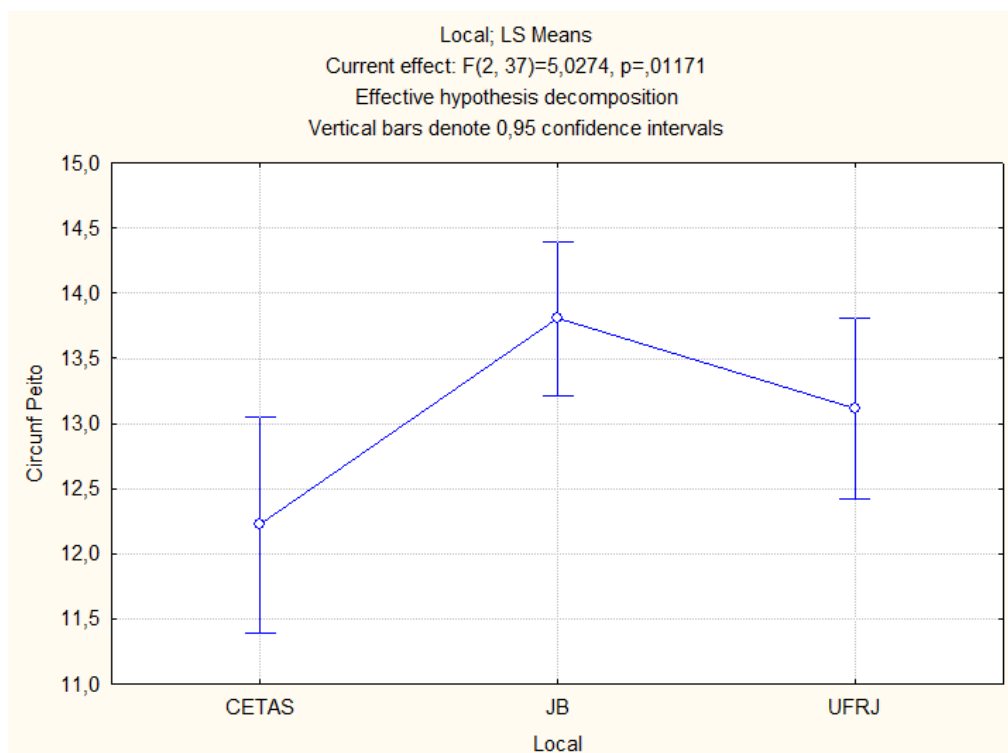


Figura 19: Gráfico Boxplot gerado pela ANOVA Fatorial, mostrando a diferença significativa da variável circunferência do peito ($p=0,1171$) dos indivíduos de *Callithrix* sp. estudados em relação aos locais de coleta, CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ.

Diferenças significativas foram observadas também na variável peso, comprimento do corpo e circunferência do peito, quando comparadas entre os sexos, machos ($n=24$) e fêmeas ($n=16$) de *Callithrix* sp. dos três locais de coleta (Tabela 5). As fêmeas tiveram o maior peso, maior comprimento do corpo e circunferência do peito quando comparadas aos machos. Além disso, houve diferença significativa também na variável peso em relação ao sexo e a localidade. Nesse caso, foi observado que os machos do JBRJ foram mais pesados do que os machos do CETAS-RJ/IBAMA e do Biotério da UFRJ, assim como as fêmeas do JBRJ foram mais pesadas do que as fêmeas do CETAS-RJ/IBAMA e do Biotério da UFRJ (Tabela 6).

Tabela 5: Variáveis biométricas do peso (P), comprimento do corpo (Cc) e circunferência do peito (Cip) que diferiram significativamente em relação ao sexo nos indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, estado do Rio de Janeiro.

Variáveis	Média dos Machos	Média das Fêmeas	F	<i>p</i>
P	282,5g	335,1g	9,2	0,00**
Cc	18,7 cm	20,2 cm	13	0,00**
Cip	12,7 cm	13,7 cm	4,3	0,04*

Valores de significância** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; F= Valor da Anova Fatorial

Tabela 6: Variável biométrica do peso (P) obtida a partir de indivíduos de *Callithrix* sp. das localidades do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, comparando ao sexo e a localidade.

N	Local	Sexo	Valor do Teste de Tukey	p1 (238,5)	p2 (306,5)	p3 (272,8)	p4 (272)	p5 (389,4)	p6 (324,8)	Teste de Tukey Machos e Fêmeas por local
1	CETAS	M	238,5		0,03*	0,77	0,88	0,00**	0,00**	F JBRJ > F UFRJ > M JBRJ > M CETAS-RJ/IBAMA
2	JBRJ	M	306,5	0,03*		0,67	0,8	0,01*	0,9	F JBRJ > M JBRJ > M CETAS-RJ/IBAMA
3	UFRJ	M	272,8	0,77	0,67		1	0,00**	0,3	F JBRJ > M UFRJ
4	CETAS	F	272	0,88	0,8	1		0,00**	0,47	F JBRJ > F CETAS-RJ/IBAMA
5	JBRJ	F	389,4	0,00**	0,01*	0,00**	0,00**		0,12	F JBRJ > M JBRJ, M UFRJ, F JBRJ, M CETAS-RJ/IBAMA
6	UFRJ	F	324,8	0,00**	0,9	0,3	0,47	0,12		F UFRJ > M CETAS-RJ/IBAMA

Valores de significância ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; F= Fêmea; M= Macho; N= número.

3.2 Caracterização fenotípica

No geral, os indivíduos de *Callithrix* sp. estudados, apresentaram a coloração dos tufos auriculares variando em relação ao tamanho e às tonalidades de cinza e marrom. No entanto, alguns indivíduos apresentaram os tufos auriculares brancos (Csp004; Csp008; Csp010; Csp014; Csp015; Csp025) semelhante à *Callithrix jacchus* e outros, negros (Csp001; Csp029; Csp033; HB3; HB4) semelhante à *C. penicillata*. O padrão da pelagem na região dorsal do corpo e da face variaram também entre cinza e marrom.

No Anexo C, a soma de todos os caracteres avaliados geraram um resultado subjetivo sobre as possíveis espécies envolvidas no cruzamento interespecífico dos indivíduos de *Callithrix* sp., com exceção dos indivíduos puros de *C. jacchus* (Cj1 e Cj2), *C. aurita* (Ca1, Ca2, Ca3 e Ca4), *C. penicillata* (Cp1) e do o indivíduo HB1, que é híbrido confirmado entre *C. jacchus* x *C. aurita*. Nesse anexo constam ainda o código de identificação individual, o sexo, o local de coleta de cada animal e a cor avaliada dos tufos auriculares.

3.3 Paleta de cores

Por meio dos valores de RGB obtidos a partir de fotografias de 53 indivíduos do gênero *Callithrix* foi realizada a Análise Discriminante para os 46 indivíduos de *Callithrix* sp., dois indivíduos de *C. jacchus* (Cj1 e Cj2), quatro indivíduos de *C. aurita* (Ca1, Ca2, Ca3 e Ca4) e um indivíduo de *C. penicillata* (Cp1). Os valores de RGB obtidos a partir da coloração presente em cada ponto da face selecionado (1- Tufo auricular direito. 2- Centro da estrela na testa. 3- Face lateral direita. 4- Topo da cabeça), geraram diferentes paletas de cores individuais, que deram origem aos grupos pré-estabelecidos de acordo com o fenótipo: Grupo 1- *Callithrix* sp., Grupo 2- *C. jacchus*, Grupo 3 - *C. penicillata* e Grupo 4- *C. aurita* (Figura 20).

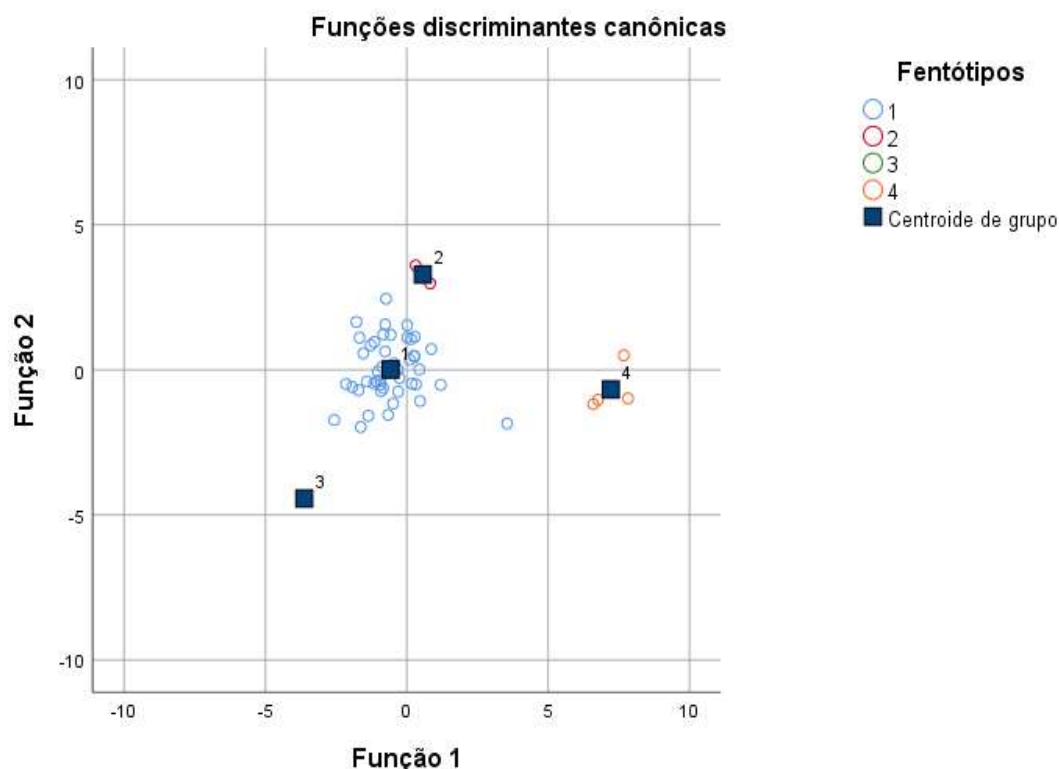


Figura 20: Gráfico de distribuição canônica gerado pela Análise Discriminante. Estão representados os 53 indivíduos analisados por meio do valor de RGB, agrupados de acordo com o fenótipo nos seguintes grupos: 1- Grupo *Callithrix* sp. (Azul); 2- Grupo *C. jacchus* (vermelho); 3- Grupo *C. penicillata* (verde), alocado grupo centróide; 4- Grupo *C. aurita* (laranja).

Através da análise em conjunto dos valores numéricos de RGB, dois resultados significativos foram gerados com a Análise Discriminante, um mais conservador, com 98,1% (Figura 21) dos casos originais agrupados corretamente e o outro, menos conservador, com 94,3% (Figura 22) dos casos originais agrupados corretamente. No primeiro caso com o resultado mais conservador, entre os 46 indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, 45 indivíduos (97,8%), foram agrupados no Grupo 1, (*Callithrix* sp.), provavelmente por apresentarem fenótipo intermediário, sugestivo de hibridação e por apresentarem o valor de RGB mais parecido entre si do que com os indivíduos considerados puros de *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*. Apenas um indivíduo híbrido (HB1 – 2,2%) foi classificado no Grupo 4- *C. aurita*. Este indivíduo é híbrido confirmado (dados do registro do CPRJ) entre *C. aurita* x *C. jacchus* (Figura 23). Nos Grupos 2 e 3 foram mantidos os indivíduos puros de *C. jacchus* (Cj1 e Cj2) (Figura 24) e *C. penicillata* (Cp1) (Figura 25), respectivamente.

No segundo caso, onde a Análise Discriminante é menos conservadora, foram mantidos os mesmos resultados do Grupo 4- *Callithrix aurita*, onde o indivíduo HB1 (2,2%) também foi incluído neste grupo (Figura 23), assim como o Grupo 3- *C. penicillata* que se manteve com o indivíduo Cp1 (Figura 25). Todavia, um diferente resultado foi observado para o Grupo 2- *C. jacchus*, onde foram mantidos os indivíduos Cj1 e Cj2 e foram incluídos dois indivíduos possíveis híbridos, Csp038 e HB2 que são respectivamente do Biotério da UFRJ e do CPRJ/INEA/IBAMA. Deste modo, no Grupo 1- *Callithrix* sp. foram agrupados 43 indivíduos de *Callithrix* sp. (Figura 24).

É possível observar que mesmo com o baixo número de indivíduos puros, a análise conseguiu diferenciar os grupos pelo valor de RGB, determinando assim o fenótipo de *Callithrix jacchus* (Cj1 e Cj2) no Grupo 2, de *C. penicillata* (Cp1) no Grupo 3 e de *C. aurita* (Ca1, Ca2, Ca3 e Ca4) no Grupo 4, quando comparados aos indivíduos do Grupo 1.

Resultados da classificação^a

Original	Contagem	Fenótipos	Associação ao grupo prevista				Total
			1,00	2,00	3,00	4,00	
		1,00	45	0	0	1	46
		2,00	0	2	0	0	2
		3,00	0	0	1	0	1
		4,00	0	0	0	4	4
	%	1,00	97,8	,0	,0	2,2	100,0
		2,00	,0	100,0	,0	,0	100,0
		3,00	,0	,0	100,0	,0	100,0
		4,00	,0	,0	,0	100,0	100,0

a. 98,1% de casos agrupados originais classificados corretamente.

Figura 21: Classificação dos grupos pela Análise Discriminante mais conservadora com 98,1% dos casos originais agrupados corretamente. Entre os 46 indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, 45 pertencem ao Grupo 1- *Callithrix* sp. e um indivíduo, o HB1 do CPRJ/INEA/IBAMA, que é híbrido confirmado entre *C. aurita* x *C. jacchus*, pertence ao Grupo 4- *C. aurita*. Dois indivíduos pertencem ao Grupo 2- *C. jacchus* (Cj1 e Cj2) e um ao Grupo 3- *C. penicillata* (Cp1).

Resultados da classificação^a

Original	Contagem	Fenótipos	Associação ao grupo prevista				Total
			1,00	2,00	3,00	4,00	
		1,00	43	2	0	1	46
		2,00	0	2	0	0	2
		3,00	0	0	1	0	1
		4,00	0	0	0	4	4
	%	1,00	93,5	4,3	,0	2,2	100,0
		2,00	,0	100,0	,0	,0	100,0
		3,00	,0	,0	100,0	,0	100,0
		4,00	,0	,0	,0	100,0	100,0

a. 94,3% de casos agrupados originais classificados corretamente.

Figura 22: Classificação dos grupos pela Análise Discriminante menos conservadora, com 94,3% dos casos originais agrupados corretamente. A associação prevista dos grupos mostrou que entre os 46 indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, 43 pertencem ao Grupo 1- *Callithrix* sp., sendo que, dois indivíduos (Csp038 do Biotério da UFRJ e HB2 do CPRJ/INEA/IBAMA) foram alocados ao Grupo 2- *C. jacchus* e um indivíduo (HB1 do CPRJ/INEA/IBAMA) que é híbrido confirmado entre *C. aurita* x *C. jacchus*, foi classificado no Grupo 4- *C. aurita*. Dois indivíduos pertencem ao Grupo 2- *C. jacchus* (Cj1 e Cj2) e um ao Grupo 3- *C. penicillata* (Cp1).





















Grupo 4 – <i>C. aurita</i>	P1	P2	P3	P4
Ca1				
Ca2				
Ca3				
Ca4				
HB1				

Figura 23: Associação dos grupos prevista na Análise Discriminante que incluiu no Grupo 4- *Callithrix aurita*, o indivíduo HB1 tanto na análise mais conservadora, quanto na menos conservadora. Esse indivíduo é oriundo do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro/CPRJ/INEA/IBAMA. À esquerda, a foto dos quatro indivíduos de *C. aurita* (Ca1; Ca2; Ca3; Ca4) e do HB1, híbrido confirmado de *C. aurita* e *C. jacchus*. À direita, imagem das respectivas paletas de cores dos indivíduos, geradas com base no valor de RGB (<http://www.colourlovers.com/palettes/add>) do ponto 1 (P1- tufo auricular direito), ponto 2 (P2- centro da estrela na testa), ponto 3 (P3- face lateral direita) e ponto 4 (P4- topo da cabeça).



Figura 24: Associação dos grupos prevista na Análise Discriminante menos conservadora que incluiu no Grupo 2- *Callithrix jacchus*, os indivíduos Csp038 (do Biotério da UFRJ) e HB2 (do CPRJ/INEA/IBAMA). À esquerda, foto dos indivíduos de *C. jacchus* (Cj1 e Cj2) oriundos do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro/CPRJ, de *Callithrix* sp. Csp038 do Biotério da UFRJ, e do HB2, também do CPRJ. À direita, imagem das respectivas paletas de cores dos indivíduos, geradas com base no valor de RGB (<http://www.colourlovers.com/palettes/add>) do ponto 1 (P1- tufo auricular direito), ponto 2 (P2- centro da estrela na testa), ponto 3 (P3- face lateral direita) e ponto 4 (P4- topo da cabeça).



Figura 25: Associação dos grupos prevista na Análise Discriminante menos conservadora e mais conversadora que incluiu o indivíduo Cp1 no Grupo 3- *Callithrix penicillata*. À esquerda, a foto do indivíduo Cp1, obtida no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro/CPRJ/INEA/IBAMA, cedida pelo fotógrafo naturalista José Felipe. À direita, a imagem da paletas de cores desse indivíduo, gerada com base no valor de RGB (<http://www.colourlovers.com/palettes/add>) do ponto 1 (P1- tufo auricular direito), ponto 2 (P2- centro da estrela na testa), ponto 3 (P3- face lateral direita) e ponto 4 (P4- topo da cabeça).

4 DISCUSSÃO

A presença de espécies exóticas invasoras tem sido considerada uma das causas da extinção de animais em todo o mundo, segundo dados da Convenção sobre Diversidade Biológica (2017). No Sudeste do Brasil os saguis das espécies *Callithrix penicillata*, originário do Cerrado/Centro-Oeste do Brasil e *C. jacchus* originário da Caatinga/Nordeste do Brasil, são considerados como exóticos invasores, tendo sido introduzidos nessa região principalmente por meio da ação antrópica (Hershkovitz, 1975; Coimbra-Filho *et al.*, 1993; Ruiz-Miranda *et al.*, 2000). Essas espécies tem se propagado e ameaçado espécies nativas por meio da competição, por exemplo com *C. aurita* (Pereira, 2010; Nogueira *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2013; Izar *et al.*, 2016) o sagui-da-serra-escuro e com *Leontopithecus rosalia*, o mico-leão-dourado, que são espécies endêmicas da Mata Atlântica (Cerqueira *et al.*, 1998; Ruiz-Miranda *et al.*, 2000; Ruiz-Miranda *et al.*, 2006). Além disso, a ameaça também tem sido comprovada para algumas espécies de aves, devido a predação dos seus ninhos (Lyra-Neves *et al.*, 2007; Begotti & Landesmann, 2008). Já com relação à saúde pública, os saguis tem despertado interesse científico pelo fato de serem transmissores de determinadas doenças como, por exemplo, a raiva (Aguiar *et al.*, 2011) e por serem hospedeiros de agentes infecciosos como, o vírus da febre amarela que pode afetar a saúde da população humana (Cavalcante & Tauil, 2017).

Casos de hibridação entre as espécies de *Callithrix* tem sido relatados a partir da década de 1970 ocorrendo inicialmente no limite das áreas de distribuição das espécies, ou seja, nas zonas naturais de hibridação. No entanto, a hibridação também tem sido observada nas áreas em que *C. jacchus* e *C. penicillata* foram introduzidas (Hershkovitz, 1975, 1977; Coimbra-Filho & Mittermeier, 1973; Coimbra-Filho *et al.*, 1984; Alonso *et al.*, 1987; Coimbra-Filho *et al.*, 1993; Coimbra-Filho & Câmara, 1996; Rylands *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 2005; Ruiz-Miranda *et al.*, 2006; Morais Júnior, 2010; Nogueira *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2013; Fuzessy *et al.*, 2014; Malukiewicz *et al.*, 2014; Malukiewicz *et al.*, 2015; Cezar *et al.*, 2017). Em cativeiro, muitos casos de hibridação foram descritos entre as décadas de 70 e 90, principalmente ocorrendo entre *Callithrix jacchus* x *C. penicillata* (Hill, 1957, 1969; Chiarelli, 1969; Mallinson, 1971), entre *C. geoffroyi* x *C. jacchus* (Coimbra-Filho, 1970, 1974; Coimbra-Filho & Maia 1976), *C. geoffroyi* x *C. flaviceps* (Ruschi, 1964). Porém, foi através dos experimentos de Coimbra-Filho *et al.*, (1993) que foi possível aferir que a descendência híbrida de *Callithrix* observada até a quarta geração, é fértil e que apresenta uma gama de fenótipos distintos.

No presente estudo, a análise exploratória das medidas morfológicas do peso, comprimento da cabeça, do corpo, da cauda, do pé direito, mão direita e orelha direita; circunferência do peito e do pescoço de 41 indivíduos identificados com *Callithrix* sp. por apresentarem fenótipos variáveis e capturados em diferentes localidades do estado do Rio de Janeiro tanto em vida livre (JBRJ) quanto de cativeiro (CETAS, BUFRJ), mostrou que as variáveis que mais diferiram entre os saguis estudados, foram o peso (PCA=0,5012), a circunferência do peito (PCA=0,4759), o comprimento da orelha direita (PCA=0,5874) e o comprimento da cabeça (PCA=0,5313). De acordo com Varela (2008), o conjunto de características que agrupa os indivíduos na análise dos Componentes Principais é responsável por sua definição. Sendo assim nesse estudo, a Análise dos Componentes Principais mostrou que as variáveis citadas anteriormente foram as grandes responsáveis pelas maiores variações morfométricas nos 41 indivíduos de *Callithrix* sp. alocados no CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e do Biotério da UFRJ. O que corroborou com esse fato, foi que essas medidas explicaram mais de 70% da variância dos dados atingindo os critérios determinados por Kaiser (1960).

A média do peso, do comprimento do corpo e da cauda para *Callithrix aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata* foi descrita por Oliveira *et al.* (2015) e segundo Araújo *et al.* (2000), não há diferenças significativas entre o peso de jovens e adultos, apenas de infantes com a relação a essas faixas etárias. A média do peso de 329,5g ($\pm 62,2$) para os indivíduos de *Callithrix* sp. estudados do JBRJ, apresentou um alto valor de DP (62,2), provavelmente devido a presença de um indivíduo juvenil (Csp021) com peso em torno de 175g, enquanto os demais indivíduos apresentavam peso entre 275g e 445g. O peso desse jovem corresponde ao peso descrito por Araújo *et al.* (2000) para um jovem macho de vida livre que é de $164.5g \pm 41.7$, por isso foi mantido na análise estatística. Apesar dessa grande variação, a média do peso está situada dentro daquela descrita para *Callithrix aurita* (425g), *C. jacchus* (375g) e *C. penicillata* (220g). Do mesmo modo, a média do comprimento do corpo de 19,5cm ($\pm 1,5$) foi próxima àquela encontrada para *Callithrix aurita* (22cm), *C. jacchus* (21cm) e *C. penicillata* (20cm). Já a média do comprimento da cauda de 27,8cm ($\pm 8,2$) apresentou uma variação maior, quando comparada a de *C. aurita* (31cm), *C. jacchus* (31cm) e *C. penicillata* (29,5cm). Essas variações entre as médias das variáveis morfométricas analisadas, podem estar relacionadas com o fato dos animais serem possíveis híbridos, cujas características apresentam uma gama de fenótipos distintos conforme já foi observado por Coimbra-Filho *et al.* (1993).

Dentre as três variáveis morfométricas aqui analisadas (peso, comprimento do corpo e da cauda), o peso tem sido a mais estudada em indivíduos de *Callithrix jacchus* mantidos em cativeiro, provavelmente por ser uma espécie mundialmente utilizada em pesquisas biomédicas (Worley *et al.*, 2014). Segundo Araújo *et al.* (2000), os animais de cativeiro apresentam maior peso do que os animais de vida livre, embora no presente estudo, tenha sido observado o oposto. Isso pode ser explicado pela oferta de alimento que o indivíduos de vida livre situados no JBRJ tiveram. Outro fator importante que pode fazer com que o animais de cativeiro do presente estudo tenham apresentado menor peso, é o histórico de vida desses animais. No caso do CETAS-RJ/IBAMA, alguns animais tinham sido entregues à essa instituição em más condições de saúde após terem sido resgatados do tráfico de animais e estavam em processo de reabilitação. Já no Biotério da UFRJ os animais eram utilizados em pesquisas biomédicas e se encontravam em restrição alimentar para atender aos objetivos específicos da pesquisa.

Com relação à caracterização fenotípica subjetiva, no que se refere à coloração dos pelos da face, identificamos animais com fenótipo intermediário entre as espécies puras, principalmente entre *C. jacchus* e *C. penicillata* o que pode ser sugestivo de hibridação. Além disso, observamos indivíduos no caso do Csp004, Csp008, Csp010, Csp014, Csp015 e Csp025 com predominância da cor branca nos tufos auriculares, cuja característica é encontrada em *Callithrix jacchus*. Já os indivíduos Csp001, Csp029, Csp033 e HB4 apresentaram tufos auriculares com predominância da cor negra semelhante à *Callithrix penicillata*. Os demais indivíduos de *Callithrix* sp. apresentaram tufos auriculares em diferentes tonalidades de cinza e marrom.

A avaliação feita por meio do registro fotográfico permitiu na Análise Discriminante pré-estabelecer grupos de acordo com o fenótipo, os quais foram nomeados por *Callithrix* sp. (Grupo 1), *C. jacchus* (Grupo 2), *C. penicillata* (Grupo 3) e *C. aurita* (Grupo 4). Embora alguns indivíduos apresentassem fenótipo mais semelhante ao de uma determinada espécie, o resultado da Análise Discriminante mostrou que a maioria, 85% e 81% (na análise mais conservadora e menos conservadora, respectivamente) dos indivíduos possíveis híbridos amostrados fosse classificado no Grupo *Callithrix* sp. (Grupo 1), ou seja, sem espécie definida, como já observado na análise subjetiva do fenótipo. Desta forma, os valores de RGB se mostraram intermediários quando comparado ao das três espécies puras, e apenas 1 indivíduo (HB1) comprovadamente híbrido entre *Callithrix aurita* x *C. jacchus* registrado no CPRJ/INEA/IBAMA sob número 2521, mostrou ter os valores mais próximos ao de *C. aurita*,

uma vez que foi classificado neste grupo tanto na análise menos conservadora quanto na mais conservadora.

Segundo Ackermann (2010) os híbridos de primatas da primeira geração (F1) apresentam fenótipo tipicamente intermediário ao das espécies parentais e ocorrendo o retrocruzamento com uma das espécies parentais, o fenótipo restante teria 75% dos caracteres desta espécie. Entretanto, nos experimentos de Coimbra-Filho *et al.* (1993), no cruzamento interespecífico entre um macho de *Callithrix flaviceps* x uma fêmea de *C. jacchus* e entre um macho de *C. aurita* x uma fêmea de *C. kuhlii*, os descendentes híbridos de primeira geração, foram mais semelhantes ao fenótipo da espécie paterna. Já no cruzamento entre híbridos na qual se conhece as espécies progenitoras, o fenótipo apenas de uma espécie é o que mais prevalece nos descendentes (Coimbra-Filho *et al.*, 1993).

Em relação aos indivíduos possíveis híbridos alocados nos grupos pré-estabelecidos de acordo com o fenótipo, o indivíduo HB1 classificado no Grupo 4 de *Callithrix aurita* apresenta o fenótipo mais semelhante ao dessa espécie o que pode sugerir que esta seja a espécie paterna. O mesmo pode ser sugerido pelo agrupamento dos indivíduos Csp038 e HB2 no Grupo 2 de *C. jacchus* na análise menos conservadora, que um macho desta espécie, tenha gerado esses animais. Análises genéticas são necessárias para confirmar estas hipóteses.

Nenhum indivíduo foi classificado no Grupo 3 de *Callithrix penicillata* (onde foi incluído somente o indivíduo Cp1) na Análise Discriminante. O não agrupamento provavelmente deve ter ocorrido por causa da obtenção de um valor de RGB a partir de uma foto que é diferente do padrão em que foi obtido para os demais indivíduos. Esta variação pode ter causado divergência nos valores não encontrando similaridades na Análise Discriminante.

O agrupamento de mais de 80% dos indivíduos no Grupo 1 – *Callithrix* sp., com base na Análise Discriminante foi realizado por meio dos valores de RGB a partir dos quatro pontos da face: 1- tufo auricular direito, 2- centro da estrela na testa, 3- face lateral direita e 4- topo da cabeça. Este resultado indica que estes caracteres fenotípicos são úteis para a elaboração de um manual de identificação dos possíveis híbridos em campo. No entanto, análises genéticas são necessárias para se confirmar as espécies parentais, inclusive para saber a qual geração pertencem os híbridos. Essas análises, permitirão uma melhor compreensão da variação dos caracteres fenotípicos nos casos de hibridação em *Callithrix*.

5 CONCLUSÕES

Com relação ao caracteres fenotípicos analisados aceita-se H_0 . Os indivíduos de *Callithrix* sp. capturados em diferentes localidades no estado do Rio de Janeiro apresentaram fenótipos variáveis devido à provável hibridação entre *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*.

A análise exploratória das variáveis morfométricas pela Análise dos Componentes Principais revelou que o peso, a circunferência do peito, o comprimento da orelha direita e o comprimento da cabeça são responsáveis pelas maiores variações morfométricas nos 41 indivíduos de *Callithrix* sp. amostrados no CETAS-RJ/IBAMA, no JBRJ e no Biotério da UFRJ.

A média de peso, do comprimento do corpo e da cauda dos indivíduos de *Callithrix* sp. capturados no JBRJ está de acordo com a descrita na literatura para *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*.

Os indivíduos de vida livre do Jardim Botânico foram mais pesados do que indivíduos de cativeiro do CETAS-RJ/IBAMA e do Biotério da UFRJ.

As fêmeas foram significativamente mais pesadas do que os machos dentre as amostras de *Callithrix* sp. nos três locais estudados.

A Análise Discriminante por meio dos valores de RBG obtidos de quatro regiões da face a partir das fotos dos 41 saguis amostrados em três localidades no estado do Rio de Janeiro, permitiu a classificação tanto dos indivíduos de *Callithrix* sp. como das espécies puras de *C. jacchus*, *C. penicillata* e de *C. aurita* nos grupos pré-estabelecidos de acordo com o fenótipo.

Mais de 80% dos indivíduos de *Callithrix* sp. na Análise Discriminante foram classificados no Grupo 1 de *Callithrix* sp. e apresentaram fenótipo intermediário ao das espécies puras.

Um indivíduo comprovadamente híbrido (HB1) entre *Callithrix aurita* x *C. jacchus* foi incluído no Grupo 4 de *C. aurita* e apresentou fenótipo mais semelhante ao desta espécie.

Dois indivíduos de *Callithrix* sp. (Csp038 e HB2) foram classificados no Grupo 2 de *C. jacchus*, sugerindo uma possível hibridação por um macho desta espécie.

A coloração dos tufos auriculares pode ser determinante na identificação das espécies puras e das espécies envolvidas no cruzamento interespecífico.

Não se descarta a possibilidade de haverem indivíduos puros dentre os estudados.

Análises genéticas são necessárias para confirmar a hibridação sugerida pelo fenótipo intermediário de mais de 80% dos indivíduos de *Callithrix* sp. estudados.

Posteriormente às análises genéticas para avaliar a ocorrência de hibridação, poderemos propor um manual de identificação referentes aos aspectos fenotípicos dos híbridos entre *Callithrix jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*, com base no fenótipo do tufo auricular, do centro da estrela na testa, da face lateral e do topo da cabeça.

CAPÍTULO II

ANÁLISE CITOGENÉTICA E GENÉTICA MOLECULAR EM POSSÍVEIS HÍBRIDOS DE *CALLITHRIX* (CALLITRICHIDAE: PRIMATES)

RESUMO

A análise citogenética e a genética molecular são importantes ferramentas para estudos taxonômicos em primatas. No gênero *Callithrix* é observado o cariótipo $2n=46,XX$ ou XY , onde 14 autossomos possuem um braço e 30, dois braços. Há grande similaridade quanto aos padrões de Banda C, G e Ag-NOR entre as seis espécies existentes, sendo a principal diferença relacionada ao cromossomo Y. Em *C. aurita*, espécie nativa do Sudeste brasileiro, a morfologia do cromossomo Y é acrocêntrica e nas espécies exóticas invasoras dessa região, pode ser submetacêntrico ou metacêntrico em *C. penicillata* e apresenta as três morfologias em *C. jacchus*. Outra característica cromossômica comumente encontrada nos saguis é o quimerismo hematopoiético, $2n=46,XX/46,XY$, resultante da anastomose placentária entre gêmeos dizigóticos heterossexuais, sem ocasionar alterações fenotípicas neste grupo. Quanto a análise genética molecular, uma variação na sequência de bases nitrogenadas do gene *SRY*, responsável por desencadear a diferenciação gonadal nos machos, é observada em *C. aurita* que apresenta uma deleção de nove pares de base (pb) em relação às demais espécies (com exceção de *C. flaviceps*, ainda não estudada). Este polimorfismo genético pode ser útil na identificação da linhagem paterna, nos casos de hibridação entre as espécies exóticas invasoras e *C. aurita*. Do mesmo modo, os polimorfismos dos haplótipos do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade II (COII) das três espécies citadas podem permitir a identificação da linhagem materna. A hibridação entre *C. aurita* e as espécies exóticas invasoras é citada como uma das principais ameaças à espécie nativa no Sudeste do Brasil, porém até o momento, sem nenhuma confirmação genética. Nossos objetivos foram: analisar o cariótipo de um grupo de indivíduos de *Callithrix* sp. de vida livre e de cativeiro provenientes de três diferentes localidades do Estado do Rio de Janeiro; verificar a ocorrência de quimerismo na amostra estudada e utilizar marcadores moleculares dos genes *SRY* e COII para identificar possíveis híbridos. Foram analisados 38 indivíduos de *Callithrix* sp.. A análise citogenética foi bem sucedida em 20 indivíduos (15 machos e cinco fêmeas). O cariótipo correspondeu ao descrito para as espécies deste gênero. O quimerismo hematopoiético, foi detectado através da análise citogenética em 13,5% dos indivíduos (três machos e duas fêmeas) e o gene *SRY* foi amplificado por PCR em cinco fêmeas a mais do que pela citogenética, totalizando 32% de quimerismo na amostra. A associação das duas técnicas permitiu uma aferição mais precisa do quimerismo. O *amplicon* do gene *SRY* detectado em duas fêmeas quimeras apresentou um padrão similar ao obtido para o controle positivo de *C. aurita*, com 198pb. Este achado pode representar a paternidade destas fêmeas por um macho de *C. aurita* ou um híbrido macho descendente desta espécie. Os demais 18 indivíduos apresentaram o padrão de bandas semelhante à *C. jacchus* e *C. penicillata*, com 207pb. A amplificação dos fragmentos do gene mitocondrial COII com tamanho entre 500 e 600pb ocorreu em 14 machos e 9 fêmeas. Posteriormente o sequenciamento deste *amplicon* juntamente com o do *SRY*, poderá se confirmar a provável hibridação na amostra estudada.

Palavras-chave: Quimerismo, Citogenética, Marcadores Moleculares.

ABSTRACT

Cytogenetic and molecular genetic analyzes are important tools for taxonomic studies in primates. In the *Callithrix* genus the karyotype is $2n=46,XX$ or XY , with 14 acrocentric and 30 bi-armed autosome pairs. There is great similarity in the C, G and Ag-NOR banding pattern among six *Callithrix* species being the main difference related to the Y chromosome morphology. In *C. aurita*, the native species of Southeastern Brazil, the Y chromosome is acrocentric and in the exotic and invasive species of this region, it can be submetacentric or metacentric in *C. penicillata* or may present the three morphologies in *C. jacchus*. Another chromosomal feature commonly found in the marmosets is the hematopoietic chimerism, $2n=46,XX/46,XY$ which results from the placental anastomosis of the heterosexual dizygotic twins without phenotypic changes in this group. Regarding to molecular genetic analysis, in the *SRY* gene sequence, responsible for triggering gonadal differentiation in males, there is a deletion of nine base pairs (bp) detected only *C. aurita* (except *C. flaviceps*, not studied yet), differing of the other species. This genetic polymorphism may be useful in identifying the paternal lineage in cases of hybridization between the alien species and *C. aurita*. Likewise, the polymorphisms of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II (COII) gene haplotypes of the three species mentioned, may allow identification of the maternal lineage. The hybridization between *C. aurita* and the invasive and exotic species is cited as one of the main threats to the native species in Southeastern Brazil, although without genetic confirmation so far. Our goals were: to analyze the karyotype of *Callithrix* sp. individuals of free-living and captivity from three different locations in the State of Rio de Janeiro; to verify the occurrence of chimerism in this group and to use molecular markers, *SRY* and COII gene, to identify possible hybrids. Thirty-eight individuals from *Callithrix* sp. were analyzed. Cytogenetic analysis was successful in 20 individuals (15 males and five females). The karyotype corresponded to that described for the genus. The hematopoietic chimerism was detected by cytogenetic analysis in 13.5% of the individuals (three males and two females) and the *SRY* gene was amplified by PCR in more five females than by cytogenetic, totalizing 32% of chimerism in the sample. The association of the two techniques allowed more accurate assessment of chimerism. The amplicon of the *SRY* gene detected in two female chimeras presented a similar pattern to that obtained for the positive control of *C. aurita*, with 198bp. This finding may represent the paternity of these females by a *C. aurita* male or a hybrid male descendant of this species. The other 18 individuals presented an amplicon similar to *C. jacchus* and *C. penicillata*, with 207bp. The amplification of a fragment between 500 and 600bp of the mitochondrial COII gene occurred in 14 males and nine females. Subsequently the sequencing of this amplicon together with that of the *SRY* can confirm the probable hybridization in the studied sample.

Key words: Chimerism, Cytogenetics, Molecular Markers.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos citogenéticos das espécies de *Callithrix* e dos híbridos

A análise citogenética tem sido considerada uma importante ferramenta para estudos de sistemática visando a classificação taxonômica das espécies de primatas. Além da análise convencional do cariótipo, onde os cromossomos são corados por igual ao longo de sua estrutura, as técnicas de bandeamento são essenciais para identificar os rearranjos cromossômicos envolvidos durante a evolução das diferentes espécies (Hershkovitz, 1983; Nagamachi *et al.*, 1992; Nagamachi, 1995; Nagamachi *et al.*, 1997; Neusser *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2014).

Dentre as técnicas de coloração que promovem um padrão alternado de bandas claras ou escuras ao longo dos cromossomos, o bandeamento de Giemsa ou Banda G é utilizado para o pareamento correto dos homólogos e para a identificação de rearranjos cromossômicos com implicações em anomalias fenotípicas ou nos processos evolutivos de especiação. Na técnica de Banda G as proteínas presentes nos cromossomos são digeridas pela ação da tripsina (Seabright, 1971). Posteriormente a essa etapa, os mesmos são corados com Giemsa e o padrão formado ao longo dos cromossomos com bandas claras e escuras está relacionado à riqueza de bases nitrogenadas guanina/citosina, que caracteriza as regiões mais claras, onde há muita atividade gênica e às regiões mais escuras, que são ricas em adenina/timina, onde há pouca atividade gênica. Esse tipo de padrão de bandeamento é importante na detecção de deleções, inversões e duplicações nos cromossomos (Kasahara, 2009).

Com relação à marcação de regiões específicas dos cromossomos, podemos destacar o bandeamento de heterocromatina constitutiva ou Banda C e a Banda Ag-NOR na qual são coradas por nitrato de prata as Regiões Organizadoras de Nucléolo (Gersen & Keagle, 2005).

Na coloração de Banda C (Sumner, 1972), a marcação específica de regiões ricas em heterocromatina constitutiva é composta por sequências de DNA altamente repetitivo. Essa marcação é evidenciada pela ação de uma solução de hidróxido de Bário corada por Giemsa. Através dessa metodologia é possível evidenciar regiões de banda C em coloração mais escura, que geralmente estão localizadas nas regiões dos centrômeros e nos braços de alguns cromossomos, de acordo com a espécie (Gersen & Keagle, 2005).

No bandamento Ag-NOR o tratamento dos cromossomos é feito com solução de nitrato de prata que cora a Região Organizadora de Nucléolo, a qual contém genes do RNA ribossômico e que está localizada, em geral, nos satélites dos cromossomos acrocêntricos. Com esta técnica é possível identificar rearranjos ou polimorfismos nos cromossomos acrocêntricos (Gersen & Keagle, 2005).

Atualmente a hibridação *in situ* por Fluorescência (*FISH*) revolucionou o campo da citogenética comparativa e tem contribuído também para muitos estudos taxonômicos por possibilitar a comparação a respeito da evolução do genoma de primatas e dos humanos. Nessa técnica se utilizam sondas formadas por sequências de 15 a 30 bases nitrogenadas do DNA que são marcadas com fluoróforo e que hibridizam com o DNA-alvo presente nos cromossomos fixados sobre a superfície de uma lâmina. Desta forma, são detectadas sequências homólogas e anomalias como microdeleções e rearranjos cromossômicos com implicações evolutivas (Wienberg, 2005; De Oliveira *et al.*, 2002; Neves & Guedes, 2012).

Na Família Callitrichidae, os estudos citogenéticos foram importantes na diferenciação do anteriormente considerado Grupo *Argentata* e Grupo *Jacchus*, onde o primeiro apresenta um número diplóide de $2n=44$, e o segundo, $2n=46$ (Canavez *et al.*, 1996). Nagamachi (1995)

e Nagamachi *et al.*, (1997) estudaram o cariótipo das espécies do Grupo *Jacchus* pertencentes ao gênero *Callithrix*, com exceção de *C. flaviceps*, empregando as técnicas especiais de coloração de Banda-G, C e Ag-NOR e observaram uma grande similaridade cariotípica. Neste gênero, dos 46 cromossomos observados, 30 são autossômicos com dois braços e 14 são acrocêntricos. Com relação ao par sexual, o X é submetacêntrico e o Y apresenta morfologia variada, podendo ser submetacêntrico e metacêntrico em *Callithrix penicillata*, acrocêntrico em *C. aurita* e podendo apresentar as três morfologias (submetacêntrico, metacêntrico e acrocêntrico) em *C. jacchus* (Nagamachi *et al.*, 1997) (Figura 26).

Com relação ao padrão de Banda C dos cromossomos, em *Callithrix* a heterocromatina constitutiva ocorre nas regiões centroméricas de todos os pares cromossômicos e distalmente no braço curto do par 6 e no braço longo do par 22. Além disso, as Bandas C em todos os pares correspondem às regiões negativas de Bandas G, exceto para a região do centrômero no par 5, em que a Banda G é positiva. O cromossomo Y é o único que apresenta Banda C polimorficamente variável (Figura 26). Também nesse cromossomo, *C. jacchus* é a única espécie que apresenta marcação de Banda Ag-NOR; já as demais espécies apresentam essa marcação no braço curto de todos os cromossomos acrocêntricos (Nagamachi *et al.*, 1997).

Nos primatas, a análise citogenética tem contribuído na identificação dos híbridos de espécies que possuem polimorfismos de distribuição e coloração da pelagem, como no caso de uma fêmea de *Cebus* sp. descrita por Nieves *et al.* (2008). Esta fêmea se encontrava alojada no Centro de Primatologia da Universidade Católica do Chile e foi identificada como pertencente a *Cebus apella*, embora Nieves *et al.* em 2008 tenha classificado como *C. nigrinus* com base no fenótipo. A análise citogenética desta fêmea foi realizada utilizando a técnica de Banda G e a técnica de *FISH* com dois tipos de sondas. Uma específica para o par cromossômico 21 humano e que hibridiza com a região de eucromatina do par 11 de *Cebus*, e a outra que marca as regiões de heterocromatina constitutiva e que foi desenvolvida a partir de um grande bloco de heterocromatina presente no par 11 distal à região de eucromatina, observado em algumas espécies deste gênero (Nieves *et al.*, 2005), porém ausente em *C. nigrinus* da Argentina. Neste caso, ocorreu uma deleção do grande bloco heterocromático e estes cromossomos foram convertidos em um pequeno par acrocêntrico (Mudry, 1990; Mudry *et al.*, 1991; Nieves *et al.*, 2010; Nieves *et al.*, 2011). As análises citogenéticas revelaram um cariótipo correspondente ao gênero *Cebus* com $2n=54$, XX, e a técnica de *FISH* identificou que o par 11 era heteromórfico, pois apenas um dos homólogos apresentava o grande bloco de heterocromatina, já o outro era um pequeno cromossomo acrocêntrico. Além desses, também houve marcação em heterozigose nos braços longos dos pares 12 e 13 e em homozigose nos braços longos dos pares 4, 6 e 19, porém foi padrão de Banda G que confirmou que a fêmea era híbrida, oriunda do cruzamento entre *Cebus paraguayanus* x *C. nigrinus*.

Em *Callithrix*, através da técnica de Banda G (Iughetti, 2008) numa amostra de um indivíduo macho de *Callithrix* sp. foram detectadas inversões pericêntricas em um dos cromossomos dos pares 5, 7, 8, 10 e 14; e também foram evidenciadas inversões paracêntricas nos braços longos dos cromossomos 9 e 22. No entanto, a identificação de animais híbridos nesse gênero tem sido possível através da análise da morfologia do cromossomo Y e do emprego das técnicas de Banda C, Banda G (Novaes, 2014) e Ag-NOR (Nogueira *et al.*, 2011; Novaes, 2014).

Indivíduos de *Callithrix* sp. considerados possíveis híbridos entre *C. penicillata* e *C. jacchus* oriundos da região Sudeste do Rio de Janeiro e com fenótipo intermediário entre ambas as espécies, foram analisados cariotipicamente por Novaes (2014). Nesta análise foram empregadas as técnicas de Banda C, Ag-NOR e *FISH* para avaliar as possíveis alterações cromossômicas, comparar o padrão de bandas dos híbridos aos das espécies puras e para descrever o mapeamento cromossômico de repetições de microssatélites. A análise do cariótipo

revelou um número diplóide de $2n=46,XX$ para as fêmeas e $2n=46,XY$ para os machos, onde neste último caso o cromossomo Y era acrocêntrico, assim como descrito para *Callithrix jacchus* e *C. aurita*. Porém a banda Ag-NOR, que evidencia a região de constrição secundária, foi observada em 2 a 3 pares de cromossomos autossômicos não tendo sido observada no cromossomo Y, que é característico de *C. jacchus* (Nagamachi *et al.*, 1997). Foi desta forma que o autor concluiu que os indivíduos machos de *Callithrix* sp. tinham a linhagem paterna de *C. aurita*. Já com relação ao padrão de Banda C, a heterocromatina centromérica foi observada em todos os cromossomos e na técnica de *FISH*, as marcações fluorescentes da sonda GA (desenvolvida pelo autor), que é de DNA repetitivo (Novaes, 2014) marcou os telômeros dos pares 16, 17, 20 e 21, e apenas um dos cromossomos homólogos no par 8 e no par 15, o que reforçou a suspeita de hibridação. No entanto, segundo Novaes (2014) mais estudos com esse tipo de sonda precisam ser feitos principalmente nas espécies consideradas “puras”, para se estabelecer um padrão de marcação dessa sonda em cada cromossomo.

Nogueira *et al.* (2011) analisando três indivíduos machos de *Callithrix* sp. capturados em Guapimirim no Rio de Janeiro, local onde ocorrem animais da espécie de *Callithrix aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata*, identificaram no cariótipo destes indivíduos um cromossomo Y acrocêntrico diminuto sem marcação Ag-NOR, o que sugeriu que a linhagem paterna fosse oriunda de *C. aurita* e a linhagem materna de *C. jacchus* ou *C. penicillata* por causa do fenótipo. No entanto segundo esses autores, análises genéticas precisam ser feitas para confirmar a identificação das espécies e verificar a magnitude do envolvimento interespecífico.



Figura 26: Comparação do padrão de Banda G dos cromossomos de 5 espécies do gênero *Callithrix*, descritas por Nagamachi *et al.*, 1997, onde cada par está representado por um dos homólogos. O retângulo vermelho destaca a morfologia do cromossomo Y que difere entre as espécies. CGE - *Callithrix geoffroyi*; CAU- *C. aurita*; CPE - *C. penicillata*; CKU- *C. kuhlii*; CJA- *C. jacchus*. Fonte: Nagamachi *et al.* (1997), p. 158.

1.2 Genética molecular das espécies de *Callithrix* e dos híbridos

A Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction/PCR*) é uma técnica altamente sensível que permite amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de um DNA molde (Mullis *et al.*, 1986). Cada ensaio de PCR requer a presença de DNA, que será o alvo da análise, de oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* - sequências curtas de DNA complementares à região de interesse,- de desoxinucleotídeos trifosfatados, os quais serão adicionados às novas cadeias de DNA, e da enzima *Taq* DNA polimerase termoestável. A enzima *Taq* DNA polimerase foi identificada pela primeira vez na bactéria *Thermus aquaticus*, a qual lhe valeu a denominação e é a principal enzima polimerizadora das novas fitas de DNA para gerar as diversas cópias do fragmento desejado (Garibyan & Avashia, 2013). A amplificação por PCR ocorre em um termociclador, onde os ciclos de diferentes temperaturas acontecem por um período de tempo e as repetições pré-determinadas são fundamentais para que se obtenha o número de fragmentos adequado a sua visualização posteriormente, em gel.

As etapas para a amplificação de um novo fragmento de DNA, consistem primeiramente no aquecimento da solução de PCR entre 94° e 96° C, até que se chegue no ponto de fusão das moléculas, permitindo a separação, ou seja, a desnaturação da dupla-fita do DNA. Posteriormente, se tem o processo denominado de anelamento ou pareamento, que ocorre após a redução da temperatura por volta de 50° a 60°C, para que os oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* se liguem por complementaridade de bases ao segmento de DNA flanqueando a região alvo. Em seguida ao anelamento dos *primers*, a temperatura é elevada em torno de 72°C, para que a *Taq* DNA polimerase sintetize novas fitas. Desta forma, a cada repetição desses três passos, o número de cópias do fragmento específico da molécula de DNA se multiplica exponencialmente (Garibyan & Avashia, 2013).

Utilizando a metodologia de PCR, um fragmento de 1.8kb do gene epsilon-globina, que tem origem embrionária e que normalmente é expresso no saco vitelino, foi amplificado e posteriormente sequenciado por Schneider *et al.* (1993) para analisar a filogenia molecular dos primatas do Novo Mundo. O resultado desta análise suportou fortemente o clado do gênero *Callithrix* e de mais outros 15 gêneros de primatas também do Novo Mundo. O alinhamento das sequências geradas a partir do DNA das diferentes espécies analisadas, permitiu gerar uma árvore de consenso com a máxima parcimônia para 27 sequências desse gene, nas quais as espécies de *Callithrix* apresentavam similaridades (Schneider *et al.*, 1993).

Em decorrência das observações de possíveis híbridos de *Callithrix*, marcadores moleculares tem sido buscados na tentativa de identificar as espécies envolvidas nos cruzamentos interespecíficos. A análise do gene *SRY*, por exemplo, pode trazer informação acerca da linhagem paterna e a análise dos genes mitocondriais, sobre a linhagem materna.

O gene *SRY*, pertence a região da determinação sexual do cromossomo Y, *Sex-determining region of the Y chromosome*, foi descrito por Sinclair *et al.*, (1990) e está localizado no braço curto do cromossomo Y de todos os mamíferos. Ele é composto por um único *éxon*, responsável por codificar uma proteína com 204 aminoácidos, que ao se expressar estimula uma cascata de eventos que induzem à diferenciação gonadal. Essa proteína, nos machos, desencadeia a formação de testículos, e a diferenciação da genitália externa masculina ocorre devido à ação subsequente da produção de andrógenos secretados por esses mesmos órgãos (Jost *et al.*, 1972).

Moreira (2002) estudou a evolução dos primatas do Novo Mundo analisando o gene *SRY*. Em *Callithrix*, o sequenciamento revelou que o gene *SRY* possui 838pb (pares de base) para todas as espécies deste gênero e que inclusive as sequências de bases nitrogenadas do DNA são idênticas, exceto para *C. flaviceps* (não estudada) e para *C. aurita* que apresenta uma deleção de 9pb nessa região. A similaridade na sequência desse gene em *C. jacchus*, *C.*

penicillata, *C. geoffroyi* e *C. kuhlii*, indica que estas espécies divergiram recentemente, mas que juntas com *C. aurita* formam um grupo monofilético (Moreira, 2002).

Oliveira *et al.* (2010) desenvolveram um conjunto de *primers* para amplificar a região do gene *SRY* que continha a deleção descrita acima, para averiguar a ocorrência de hibridação, suspeitada pela análise citogenética nos três indivíduos machos de *Callithrix* sp., capturados em Guapimirim no estado do Rio de Janeiro (Nogueira *et al.*, 2011). Com esses *primers*, foi amplificado por PCR um fragmento de 207pb nos controles positivos de *Callithrix penicillata* e *C. jacchus*, e um fragmento de 198pb nos controles positivos de *C. aurita*, assim como para os três machos prováveis híbridos analisados. Após o sequenciamento foi possível observar que o fragmento de DNA amplificado nos machos estudados, continha a mesma deleção de 9pb, que é característica de *C. aurita* e com isso foi possível afirmar que a linhagem paterna dos indivíduos pertencia a essa espécie ou que pelo menos eram oriundos do acasalamento de um híbrido descendente de um macho de *C. aurita*.

Para identificação da linhagem materna destes mesmos indivíduos, Nogueira *et al.* (2010) desenvolveram um conjunto de *primers* que amplifica uma região de aproximadamente 600 pb do gene mitocondrial Citocromo Oxidase c (COII). O gene mitocondrial COII, é responsável por codificar uma subunidade do complexo enzimático citocromo c oxidase, que é essencial na respiração aeróbica e como é herdado apenas pela linhagem materna, não sofre recombinação quando passado para as próximas gerações (Ruiter, 2004). Esse gene, já foi utilizado por Sena *et al.* (2002) para investigar as relações taxonômicas em *Callithrix*, onde forneceu informações acerca da posição de *C. aurita* como um táxon inicial da radiação nesse gênero. O gene COII, apresenta um polimorfismo na sequência de bases que difere entre *Callithrix jacchus* e *C. penicillata* com relação à *C. aurita*, sendo assim possível identificar as linhagens maternas dos híbridos de *Callithrix*. Desta forma, no estudo de Nogueira *et al.* (2010), os *amplicons* foram submetidos à técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism*/Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP) utilizando a enzima *AluI* que reconheceu os sítios de restrição em 43pb e 429pb para as espécies *Callithrix jacchus* e *C. penicillata*, já para *C. aurita* identificou nas posições 43pb, 259pb, 381pb e 429pb. Assim, nos três indivíduos machos onde havia sido detectada a deleção de 9pb no gene *SRY* específica de *Callithrix aurita*, apresentaram o padrão de RFLP do fragmento amplificado do gene COII característico de *C. jacchus* e *C. penicillata*, o que confirmou a hibridação embora não tenha sido possível distinguir entre as prováveis espécies maternas (Nogueira *et al.*, 2010).

1.3 Quimerismo em *Callithrix*

A maioria das gestações em *Callithrix* são de aproximadamente 145 dias, ocorrendo partos duas vezes ao ano (Hill, 1926; Oliveira *et al.*, 2015). Além de gêmeos, há relatos do nascimento de filhos únicos, triplos e até quádruplos, sendo os dois últimos mais comuns em cativeiro e com as menores taxas de sobrevivência entre os animais (Tardif *et al.*, 1984; Sweeney *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2014).

Sobre o cuidado parental, até a quarta semana de vida o filhote é cuidado pela mãe e pelo pai. Após esse período, o cuidado maior passa a ser de responsabilidade paterna. No entanto, é comum também nos caliquitrídeos o cuidado comunitário dos filhotes por outros membros do grupo (Rylands, 1989; Tardiff *et al.*, 1984; Auricchio, 2011; Yamamoto *et al.*, 1996; Santos & Martins, 2000).

Em 1926, Hill investigando a gestação gemelar nos saguis, encontrou gêmeos provenientes de dois oócitos que compartilhavam um único córion. Mais tarde, Wislocki (1932;1939) analisando as placentas de várias fêmeas de saguis com gestação gemelar, confirmou que o compartilhamento do córion ocorria devido a anastomose placentária dos

vasos sanguíneos. Esse tipo de anastomose é uma das principais causas da formação de indivíduos quimeras os quais apresentam linhagens celulares cromossomicamente diferentes e derivadas de embriões de sexos diferentes (Tarkowski, 1970).

Nos seres humanos, é rara a ocorrência de quimerismo entre os gêmeos dizigóticos monocoriônicos (Dunsford *et al.*, 1953; Nicholas *et al.*, 1957; Redline, 2003; Assaf *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013). Porém nos bovinos, isso ocorre frequentemente (Lillie, 1916; 1917; Owen, 1945; Dunn *et al.*, 1968; Padula, 2005), assim como nos saguis e nos micos (Wislocki, 1932; 1939; Abbott, 1984; Haig, 1999; Wedi *et al.*, 2011).

Em bovinos, a gestação é de aproximadamente 290 dias e a anastomose dos vasos sanguíneos da placenta ocorre em torno do 30° ao 40° dia de gestação (Almeida & Resende, 2012) que permite a troca de células entre os embriões. Neste caso, o nascimento de fêmeas quiméricas resulta na síndrome de freemartinismo (Lillie 1916; Padula, 2005), que é considerada uma desordem do desenvolvimento sexual (DSD) (Meyers-Wallen, 2012), responsável pela intersexualidade da fêmea co-gêmea de um macho e que causa consequências, como a masculinização do seu trato reprodutivo. A maioria dos *freemartin* são hermafroditas, possuem a gônada e genitália ambígua, em geral, estéreis (Herschler & Fechheimer, 1967; Mcfeely *et al.*, 1967; Dunn *et al.*, 1968; Padula, 2005).

Os bovinos quimeras analisados citogeneticamente apresentam cariótipo $2n=60,XX/60,XY$. Esses dois tipos de linhagens celulares já foram detectadas em culturas de tecido testicular, da medula óssea e dos linfócitos do sangue periférico (Ohno *et al.*, 1962; Herschler & Fechheimer, 1967; Eldridge & Blazak, 1976). Já pela genética molecular, o quimerismo foi detectado através da amplificação por PCR de sequências do gene *SRY* (Padula, 2005).

Nos caliquitrídeos, a anastomose placentária ocorre por volta do 19° dia e se completa em torno do 29° (Moore *et al.*, 1985; Haig, 1999), sendo os casos de quimerismo sempre provenientes de dois ou mais conceitos (Haig, 1999). Filhotes únicos quimeras já foram encontrados nos saguis, porém esse resultado possivelmente provém da anastomose placentária com um co-gêmeo que veio a óbito e que conseqüentemente teve as suas estruturas fetais absorvidas pelo organismo materno (Jaquish *et al.*, 1996). Essa característica é citada como sendo comum nas fêmeas de sagui e funciona como um *feedback* positivo do organismo em resposta a biologia reprodutiva da espécie para garantir a sobrevivência do outro gêmeo (Tardif *et al.*, 1984).

A presença do quimerismo de origem hematopoiético nos saguis foi comprovada primeiramente por estudos citogenéticos através da cultura de linfócitos do sangue periférico e da cultura de tecidos da medula óssea, baço e timo, onde foi constatado que machos e fêmeas normais apresentam duas linhagens celulares, $2n=46,XX/46,XY$ (Benirschke *et al.*, 1962; Benirschke & Brownhill, 1963; Gengozian, *et al.*, 1964; 1969). Já as análises moleculares para verificar a presença do gene *SRY* no cromossomo Y dos machos e das fêmeas quimeras de saguis foram realizadas por meio da PCR. Nesta técnica, os fragmentos do gene *SRY* amplificados foram sequenciados e essas sequências mostraram ser idênticas nos machos e nas fêmeas (Moreira, 2002; Sanchez-Morgado *et al.*, 2003; Takabayashi & Katoh, 2011).

Os objetivos deste capítulo foram: descrever o cariótipo de indivíduos de *Callithrix* sp. de vida livre e de cativeiro, provenientes de três diferentes localidades do Estado do Rio de Janeiro e compará-los ao de *Callithrix aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata*; Verificar a ocorrência de quimerismo em um grupo de indivíduos de *Callithrix* sp. de vida livre e em cativeiro do estado do Rio de Janeiro, Brasil utilizando a análise citogenética convencional e a genética molecular por meio da amplificação de um fragmento do gene *SRY*; Amplificar por PCR um fragmento do gene *SRY* do genoma nuclear e do gene mitocondrial citocromo oxidase II (COII) para investigar a ocorrência de hibridação dentre os indivíduos de *Callithrix* sp. estudados.

Foram levantadas as seguintes hipóteses em relação ao cariótipo dos indivíduos de *Callithrix* sp. H₀- O cariótipo corresponde ao descrito para as espécies de *Callithrix* e H₁- O cariótipo não corresponde ao descrito para as espécies de *Callithrix*. Já com relação ao quimerismo e a investigação a respeito da provável hibridação nos indivíduos de *Callithrix* sp.: H₀- As análises genéticas permitem a identificação do quimerismo e a investigação de hibridação dentre os indivíduos de *Callithrix* sp. H₁- As análises genéticas não são suficientes para a identificação do quimerismo e nem da hibridação nos indivíduos de *Callithrix* sp.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Análise Clínica

Os veterinários responsáveis das instituições do CETAS-RJ/IBAMA, do JBRJ e do Biotério da UFRJ realizaram a análise clínica na genitália externa dos machos e das fêmeas de *Callithrix* sp.

2.2 Análise Citogenética

Foi realizado o método de cultura dos linfócitos a partir do cultivo de sangue periférico (Moorhead *et al.*, 1960) para a obtenção dos cromossomos metafásicos, que é a fase da divisão celular em que os cromossomos apresentam seu grau máximo de condensação, permitindo o estudo cariotípico.

O método de cultura dos linfócitos de sangue periférico consiste em adicionar oito gotas de sangue em um tubo plástico do tipo *Falcon* de 15ml, acrescido de 4ml de meio de cultura RPMI – 1640 (*Vitrocell Embriolife*®), 1ml de soro fetal (*Vitrocell Embriolife*®), que é responsável pela nutrição celular e 10U de Fitohemaglutina M, (*Gibco by Life technologies*®), que é o agente mitogênico que estimula a divisão celular. Em seguida, o sangue com os reagentes são mantidos em banho-maria à 37°C durante 72h.

Após 71h, são adicionados 25U de colchicina 10⁻⁵M. Esta solução inibe a formação do fuso mitótico e interrompe a divisão celular, fazendo com que a célula permaneça em estágio de metáfase.

Passado o tempo total de incubação, a cultura de células é centrifugada a 209G durante 5 min. Desta forma, descarta-se o sobrenadante e posteriormente adiciona-se ao precipitado, no agitador Vortex, 5ml de solução hipotônica a 0,075M de Cloreto de potássio (KCl) a 37°C.

Os tubos com a cultura de células em solução hipotônica são colocados em banho-maria novamente por 20min. Nesta etapa a célula absorve líquido por osmose expandindo a membrana celular permitindo o espalhamento dos cromossomos metafásicos (Hsu, 1952).

Em seguida, os tubos são centrifugados novamente por 5 min. a 209G, descarta-se o sobrenadante e é adicionado, também sobre a agitação no Vortex, 5ml da solução fixadora de Carnoy (metanol e ácido acético, 3:1) gelada. Os tubos permanecem em temperatura ambiente durante 15 min. A centrifugação e adição da solução fixadora, são repetidas por mais duas vezes, porém acrescentando 3 ml e 2ml, respectivamente, de solução.

Na última etapa de centrifugação, o sobrenadante é mais uma vez descartado e posteriormente é adicionado um volume de solução fixadora proporcional ao precipitado ou *pellet* em cada tubo. O *pellet* desta forma é ressuspensionado na solução e duas gotas são pingadas

com auxílio da pipeta Pasteur em uma certa distância nas lâminas de microscópio, que foram previamente limpas com álcool 70% e umedecidas (bafeadas).

Coloração Convencional

As lâminas após estarem completamente secas à temperatura ambiente, foram coradas com solução de Giemsa 3% (Merck®) por 10 min. e a análise foi feita em microscópio Olympus® modelo CH30RF100 com objetiva de 40x para rastreamento e análise das metáfases com objetiva de imersão (100x).

As melhores metáfases foram selecionadas e posteriormente fotografadas para montagem do cariótipo de cada indivíduo no programa *Adobe Photoshop® CS3*, seguindo a organização estabelecida por Nagamachi *et al.* (1997).

2.3 Análise Molecular

A extração de DNA a partir do sangue total foi feita seguindo o protocolo de extração por precipitação salina (Miller, 1988). Após a obtenção do DNA genômico, as amostras foram quantificadas no aparelho *Nanodrop* modelo 2000 (*Thermo Scientific®*).

De acordo com a concentração de DNA por microlitro (μl) algumas amostras tiveram que ser diluídas para atingir a concentração ideal de 20ng/ μl , para se preparar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2.3.1 Amplificação por PCR do gene *SRY* (gene da região da determinação sexual do cromossomo Y) e do gene *COII* (Citocromo Oxidase C Subunidade II)

Foram utilizados o conjunto de *primers* desenvolvidos por Oliveira *et al.*, (2010) para a amplificação de uma região do gene *SRY* onde é observada uma deleção de 9pb em *Callithrix aurita*. A sequência dos *primers Forward* (F) (5'-TAC AGG CCA TGC ACA GAG AG- 3') e *Reverse* (R) (5'- CTA GCG GGT GTT CCA TTG TT-3') amplificaram fragmentos de aproximadamente 207pb (para *Callithrix jacchus* e *C. penicillata*) e 198pb (para *C. aurita*).

As reações para amplificação do fragmento do gene *SRY* foram preparadas em um volume final de 10 μl e continham os seguintes reagentes com as suas respectivas concentrações na reação e na solução estoque (entre parênteses): solução Tampão (10X- Ludwig Biotec®) 1x; 3mM de MgCl_2 (50mM- Ludwig Biotec®); 0,2mM do *mix* de dNTPs (10mM -Promega®), 1 μM de cada *primer* F e R (10 μM); 1,25U de *Taq* DNA polimerase (5U/ μl - Ludwig Biotec®); DNA genômico com concentração variando de 10-20ng e água livre de nucleases (Promega®) para completar o volume final da reação.

As amplificações foram realizadas em um termociclador (*ProFlex™ PCR System—Applied Biosystems® ThermoFisher Inc*) com os seguintes ciclos de temperatura: primeira etapa- desnaturação da fita de DNA a 94°C por 5 min; segunda etapa- 30 ciclos de temperatura à 94°C por 1min., 55° por 1 min. para ocorrer o pareamento dos *primers* com a região flanqueadora a sequência alvo, 72°C durante 1 min. para amplificação da região desejada; terceira etapa- extensão da fita de DNA a 72°C por 10min.

Para amplificação dos fragmentos de *COII* foram utilizados os *primers*: *COII Forward* (F) (5' - CAA AAC GCC GCA TCY CCA ATC -3') e *Reverse* (R) (5' - GG CCT GGT CGT ATG GAA G - 3'), que amplificam um fragmento de aproximadamente 600 pb. (Nogueira *et al.*, 2010). As reações de PCR foram preparadas também em um volume de 10 μl , com as seguintes concentrações de reagentes: Tampão (10X- Ludwig Biotec®) em concentração final 1x; MgCl_2 (50mM- Ludwig Biotec®) em concentração final de 1,5mM; *mix* de dNTPs (10mM -Promega®) em concentração final de 0,2mM; conjunto de *primers* (10 μM) em concentração

final de 2µM para cada; *Taq* DNA polimerase (5U/µl - Ludwig Biotec®) em concentração final de 1U; concentração de DNA variando de 10-20ng; água livre de nucleases (Promega®) para completar o volume final da reação. Já no termociclador os ciclos de temperatura seguiram o primeiro passo para a desnaturação com temperatura de 94°C por 3 min., seguido por 35 ciclos de 92°C por 1min.; 45° por 1min.; 72°C por 1 min e o terceiro passo a 72°C por 10 min.

Para verificar o resultado da amplificação por PCR do gene *SRY*, dois géis de poliacrilamida foram preparados com concentração de 5% e 12%. Na concentração de 5% foi avaliada a amplificação do fragmento de aproximadamente 200pb do gene *SRY*. Já no gel a 12%, foram analisadas as diferenças no tamanho dos fragmentos amplificados do gene *SRY*, cujo *Callithrix aurita* apresenta uma deleção de 9pb, ou seja, seu fragmento corresponde a 198pb, diferentemente de *C. jacchus* e *C. penicillata* que apresentam 207 pb. Para a avaliação dos produtos de PCR do gene *COII* foi realizada somente a eletroforese em gel de poliacrilamida de 5%, para verificar a ocorrência de amplificação.

Em todos os géis de poliacrilamida, foram acrescentados 3µl de amostra com 1µl de tampão de carregamento (6x, *Loading Buffer*-Promega®), além disso, para comparar o tamanho dos fragmentos amplificados, um DNA padrão de peso molecular (*DNA ladder* 100pb- Ludwig Biotec®) foi adicionado ao gel. Para todas as reações de amplificação foram incluídos controles positivos, ou seja, reações com DNA de indivíduos puros comprovados, sendo dois deles do CPRJ/IBAMA, no caso de *Callithrix jacchus* (CJ2- registro CPRJ/IBAMA: 2449) e *C. aurita* (Ca1- registro//IBAMA CPRJ:2573) e um do Zoológico de João Pessoa, *C. penicillata*. Também foi incluído um controle negativo, com água ao invés de DNA para verificar se houve contaminação dos reagentes.

A migração dos produtos de PCR do gene *SRY* e do gene *COII* por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% ocorreu durante o período de 1h e na concentração de 12%, somente para os produtos de PCR do gene *SRY*, durante 12h. O resultado para todos os géis foi observado após o mesmo ter sido fixado em solução de etanol a 10% e 0,5% de ácido acético, posteriormente corado com solução a 0,2% de AgNO₃ e revelado com solução de NaOH a 3% acrescida de 0,6% de formol. Por conseguinte, a imagem dos fragmentos de DNA foram capturadas utilizando um *software* do aparelho transiluminador *L.Pix Loccus* (Biotecnologia©) para armazenamento e posteriores comparações.

3 RESULTADOS

3.1 Análise Clínica

Pela análise dos órgãos genitais externos foi verificada a presença de lábios e vulvas normais para as fêmeas, enquanto que os machos exibiram bolsa escrotal e pênis normais para o sexo.

3.2 Análise Citogenética

A análise citogenética foi bem sucedida em 20 indivíduos de *Callithrix* sp., representados por oito animais do CETAS-RJ/IBAMA (cinco machos e três fêmeas) e 12 animais do JBRJ (dez machos e duas fêmeas) (Tabela 7). Nos demais 18 animais, não foi possível obter resultado com a análise citogenética.

A análise dos cariótipos por coloração convencional revelou um número diplóide $2n=46,XX$ ou XY , característico do gênero. Dentre os pares de cromossomos autossomos observados, 30 apresentaram dois braços e 14 cromossomos um braço, sendo o número fundamental correspondente a 74. Com relação ao par sexual, o cromossomo X apresentou tamanho normal e morfologia submetacêntrica, já o cromossomo Y apresentou um tamanho reduzido e morfologia, metacêntrica (Figura 27 e 28). O quimerismo hematopoiético, $2n=46,XX/46,XY$ foi observado em três machos (Csp009, Csp013 e Csp016) e em duas fêmeas (Csp002 e Csp006) (Figura 29 A e B), correspondendo à 13,5% dos indivíduos amostrados.

Tabela 7: Cariótipos dos 20 indivíduos de *Callithrix* sp. do CETAS-RJ/IBAMA, JBRJ e Biotério da UFRJ, estado do Rio de Janeiro, com o código de identificação, sexo, local e linhagens celulares observadas para cada indivíduo. [] número de metáfases encontrado para cada linhagem celular (Continuação).

.Indivíduo	Sexo	Idade	Local	Linhagem Celular	% Quimerismo
Csp001	M	Juvenil	CETAS-RJ/IBAMA	$2n=46,XY[19]$	0
Csp002	F	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	$2n=46,XX[5]/46,XY[2]$	28%
Csp003	M	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	$2n=46,XY[10]$	0
Csp004	M	Juvenil	CETAS-RJ/IBAMA	s/m	0
Csp005	F	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	$2n=46,XX[14]$	0
Csp006	F	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	$2n=46,XX[5]/46,XY[5]$	50%
Csp007	M	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	$2n=46,XY[5]$	0
Csp008	M	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	$2n=46,XY[7]$	0
Csp009	M	Juvenil	CETAS-RJ/IBAMA	$2n=46,XX[20]/46,XY[5]$	80%
Csp010	M	Adulto	JBRJ	$2n=46,XY[50]$	0
Csp011	M	Adulto	JBRJ	$2n=46,XY[30]$	0
Csp012	M	Adulto	JBRJ	$2n=46,XY[15]$	0
Csp013	M	Adulto	JBRJ	$2n=46,XX[5]/46,XY[6]$	45%
Csp014	F	Adulto	JBRJ	$2n=46,XX[30]$	0
Csp015	F	Adulto	JBRJ	s/m	0
Csp016	M	Juvenil	JBRJ	$2n=46,XX[3]/46,XY[1]$	75%
Csp017	F	Adulto	JBRJ	$2n=46,XX[11]$	0
Csp018	M	Adulto	JBRJ	s/m	0
Csp019	M	Adulto	JBRJ	s/m	0
Csp020	F	Adulto	JBRJ	s/m	0
Csp021	M	Juvenil	JBRJ	$2n=46,XY[6]$	0
Csp022	M	Adulto	JBRJ	$2n=46,XY[10]$	0
Csp023	F	Adulto	JBRJ	s/m	0
Csp024	M	Juvenil	JBRJ	$2n=46,XY[6]$	0
Csp025	M	Adulto	JBRJ	$2n=46,XY[10]$	0
Csp026	M	Adulto	UFRJ	s/s	0
Csp027	F	Adulto	UFRJ	s/s	0
Csp028	M	Adulto	UFRJ	s/m	0
Csp029	F	Adulto	UFRJ	s/m	0
Csp030	F	Adulto	UFRJ	s/m	0

Tabela 7: Continuação.

Csp031	M	Adulto	UFRJ	s/m	0
Csp032	F	Adulto	UFRJ	s/s	0
Csp033	M	Adulto	UFRJ	s/m	0
Csp034	F	Adulto	UFRJ	s/m	0
Csp035	M	Adulto	UFRJ	s/m	0
Csp036	F	Adulto	UFRJ	s/m	0
Csp037	F	Adulto	UFRJ	s/m	0
Csp038	F	Adulto	UFRJ	s/m	0
Csp039	M	Adulto	UFRJ	s/m	0
Csp040	M	Adulto	JBRJ	2n=46,XY[6]	0
Csp041	M	Adulto	JBRJ	s/m	0

Csp= *Callithrix* sp.; M= Macho; F=Fêmea; s/m= sem metafase; s/s= sem amostra de sangue.

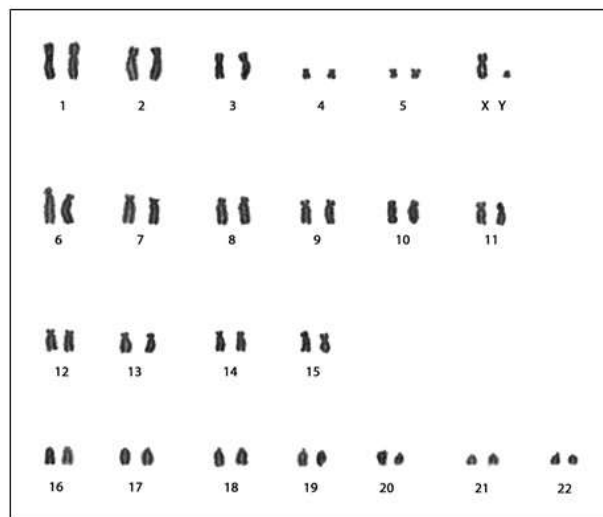


Figura 27: Cariótipo em coloração convencional de um macho de *Callithrix* sp. 2n=46,XY.

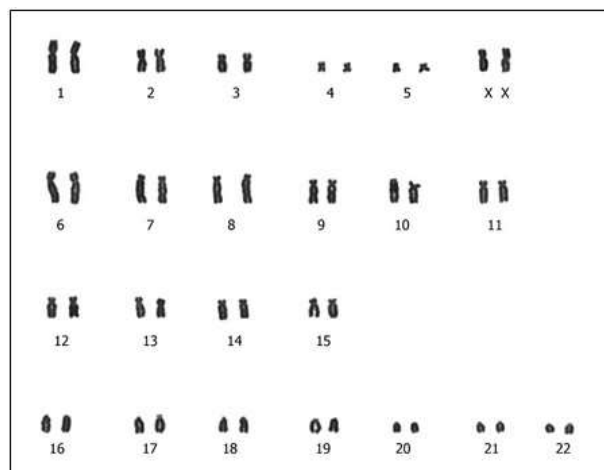


Figura 28: Cariótipo em coloração convencional de uma fêmea de *Callithrix* sp. 2n=46,XX.

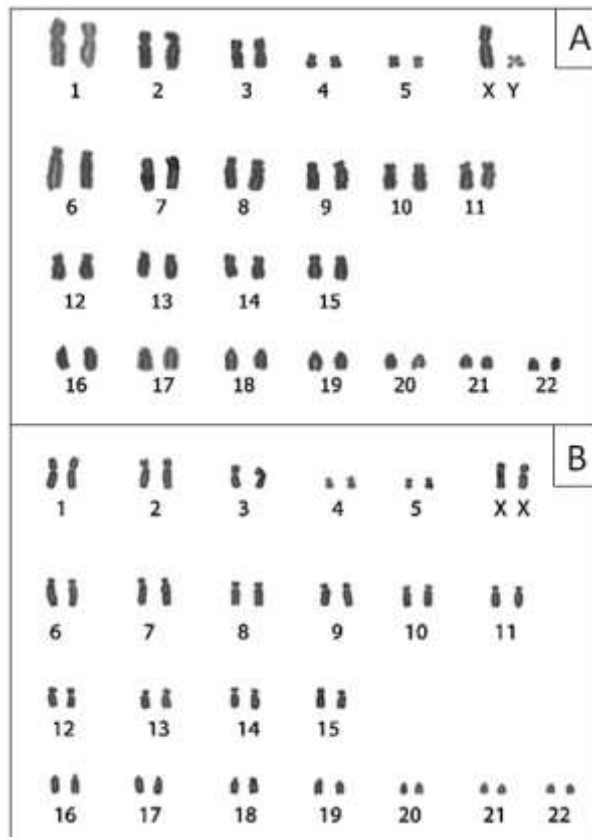


Figura 29: Cariótipo com coloração convencional de um indivíduo macho de *Callithrix* sp. (Csp009) com quimerismo hematopoiético. A e B, apresentam respectivamente a linhagem celular, $2n=46,XX[20]/46,XY[5]$. [] número de metáfases encontrado para cada linhagem celular.

3.3 Análise Genética Molecular

Amplificação do gene *SRY* por PCR

A análise dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida a 5% revelou um fragmento do gene *SRY* com aproximadamente 200pb em 30 amostras (23 machos e 7 fêmeas) de *Callithrix* sp. (Tabela 8). No entanto os mesmos produtos de PCR analisados no gel de poliacrilamida a 12%, mostraram que no caso da amostra de duas fêmeas (Csp015 e Csp029), o padrão de bandas do fragmento amplificado foi semelhante ao observado para a amostra controle de *C. aurita*, com 198pb. Já para os demais indivíduos, o padrão de bandas foi semelhante ao observado para os controles positivos de *C. jacchus* e *C. penicillata* de 207pb (Figura 30). As amostras das duas fêmeas quiméricas onde foi observado o padrão de bandas semelhante à deleção de 9pb descrita para *C. aurita*, foram provenientes respectivamente do JBRJ e do Biotério da UFRJ.

Tabela 8: Relação dos indivíduos de *Callithrix* sp. (23 machos e 7 fêmeas), onde a partir de amostras de DNA, foi amplificado por PCR um fragmento de aproximadamente 200pb do gene *SRY*, incluindo código de identificação, sexo, idade e local (Continuação).

Indivíduo	Sexo	Idade	Local	Gene <i>SRY</i>
Csp001	M	Juvenil	CETAS-RJ/IBAMA	+
Csp002	F	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	-
Csp003	M	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	+
Csp004	M	Juvenil	CETAS-RJ/IBAMA	+
Csp005	F	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	-
Csp006	F	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	+
Csp007	M	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	+
Csp008	M	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	+
Csp009	M	Juvenil	CETAS-RJ/IBAMA	+
Csp010	M	Adulto	JBRJ	+
Csp011	M	Adulto	JBRJ	-
Csp012	M	Adulto	JBRJ	+
Csp013	M	Adulto	JBRJ	+
Csp014	F	Adulto	JBRJ	-
Csp015	F	Adulto	JBRJ	+
Csp016	M	Juvenil	JBRJ	+
Csp017	F	Adulto	JBRJ	+
Csp018	M	Adulto	JBRJ	+
Csp019	M	Adulto	JBRJ	+
Csp020	F	Adulto	JBRJ	-
Csp021	M	Juvenil	JBRJ	+
Csp022	M	Adulto	JBRJ	+
Csp023	F	Adulto	JBRJ	-
Csp024	M	Juvenil	JBRJ	-
Csp025	M	Adulto	JBRJ	-
Csp026	M	Adulto	UFRJ	s/s
Csp027	F	Adulto	UFRJ	s/s
Csp028	M	Adulto	UFRJ	+
Csp029	F	Adulto	UFRJ	+
Csp030	F	Adulto	UFRJ	+
Csp031	M	Adulto	UFRJ	+
Csp032	F	Adulto	UFRJ	s/s
Csp033	M	Adulto	UFRJ	+
Csp034	F	Adulto	UFRJ	-
Csp035	M	Adulto	UFRJ	+
Csp036	F	Adulto	UFRJ	+
Csp037	F	Adulto	UFRJ	+

Tabela 8. Continuação

Csp038	F	Adulto	UFRJ	-
Csp039	M	Adulto	UFRJ	+
Csp040	M	Adulto	JBRJ	+
Csp041	M	Adulto	JBRJ	+

Csp=*Callithrix* sp.; M= Macho; F=Fêmea;

+ = amplificação do gene *SRY*; - = ausência de amplificação do gene *SRY*;

s/s = sem amostra de sangue

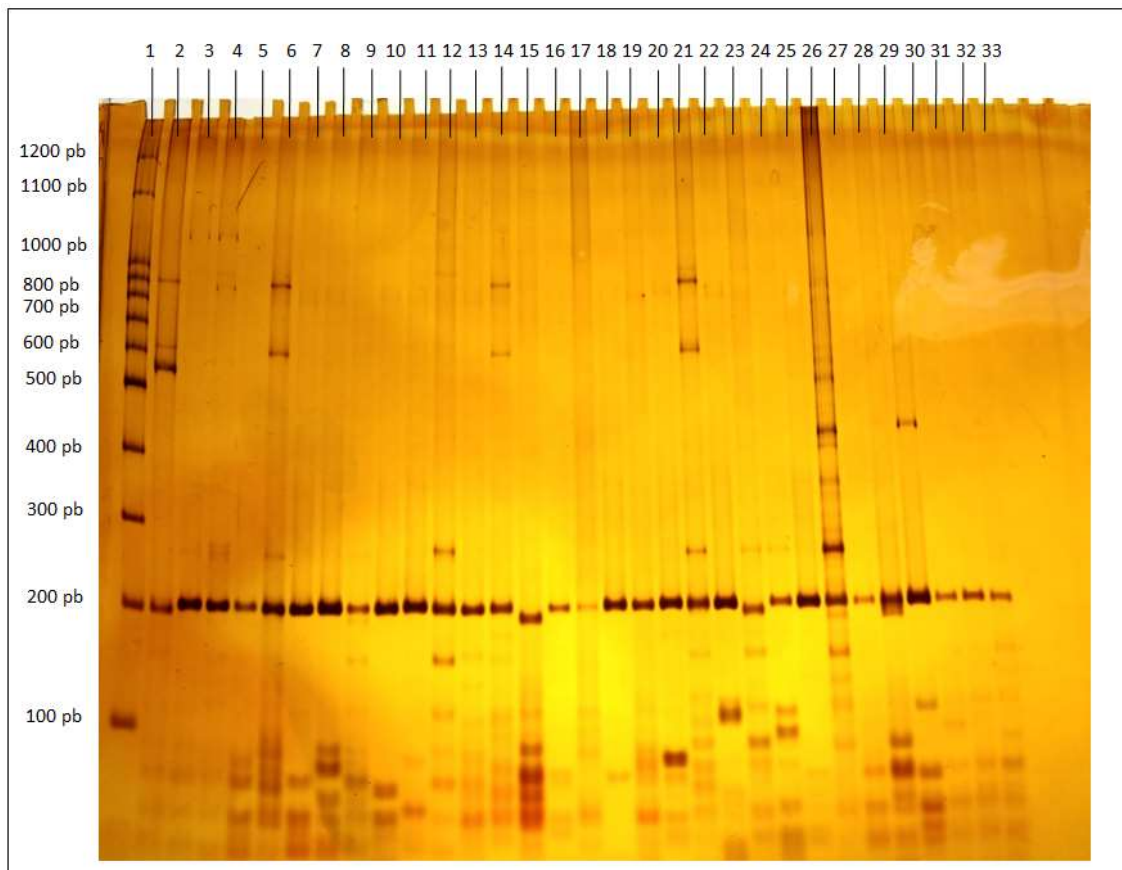


Figura 30: Gel de poliacrilamida a 12% (dimensões: 30x23cm) com produtos do gene *SRY* amplificados por PCR a partir de amostras biológicas de 27 indivíduos de *Callithrix* sp. amostrados em três localidades do estado do Rio de Janeiro. 1-DNA ladder 100pb; 2- Controle positivo macho de *C. aurita*, 198pb (Ca); 3- Controle positivo macho de *C. jacchus* (Cj1), 207pb; 4-Controle positivo macho de *C. penicillata* (Cp1), 207pb; 5- Macho Csp001; 6- Macho Csp003; 7- Macho Csp004; 8- Fêmea Csp006; 9- Macho Csp007; 10- Macho Csp008; 11- Macho Csp009; 12- Macho Csp010; 13- Macho Csp012; 14- Macho Csp013; 15- Fêmea Csp015 (possível *C. aurita*); 16- Fêmea Csp016; 17- Macho Csp017; 18- Macho Csp018; 19- Macho Csp019; 20- Macho Csp021; 21- Macho Csp028; 22- Macho Csp022; 23- Fêmea Csp029 (possível *C. aurita*); 24- Fêmea Csp030; 25- Macho Csp031; 26- Macho Csp033; 27- Macho Csp035; 28- Fêmea Csp036; 29- Fêmea Csp037; 30- Macho Csp039; 31- Macho Csp040; 32- Macho Csp041; 33- Negativo.

Amplificação do gene Citocromo c oxidase subunidade II (COII)

A amplificação do gene COII, gerou um fragmento com tamanho entre 500pb e 600pb para 23 amostras de *Callithrix* sp. (14 machos e 9 fêmeas) das três localidades amostradas (Tabela 9) (Figura 31). Não foi possível obter a amplificação em 10 amostras (Csp001; Csp004; Csp012; Csp016; Csp019; Csp021; Csp022; Csp030; Csp040), que já tinham sido amplificadas para o gene *SRY*, mesmo após diversas variações metodológicas. Acredita-se que com o tempo, tenha ocorrido a degradação do DNA dessas amostras.

Estimamos o tamanho do fragmento amplificado do gene COII, comparando ao DNA *ladder* de 100pb, uma vez que não foi possível realizar o sequenciamento dos fragmentos amplificados.

Tabela 9: Relação dos indivíduos de *Callithrix* sp. (14 machos e 9 fêmeas) onde a partir de amostras de DNA, foi amplificado por PCR um fragmento aproximado de 500pb do gene mitocondrial COII, incluindo código de identificação, sexo, idade e local (Continuação).

Indivíduo	Sexo	Idade	Local	Gene COII
Csp001	M	Juvenil	CETAS-RJ/IBAMA	-
Csp002	F	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	-
Csp003	M	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	+
Csp004	M	Juvenil	CETAS-RJ/IBAMA	-
Csp005	F	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	-
Csp006	F	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	+
Csp007	M	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	+
Csp008	M	Adulto	CETAS-RJ/IBAMA	+
Csp009	M	Juvenil	CETAS-RJ/IBAMA	+
Csp010	M	Adulto	JBRJ	+
Csp011	M	Adulto	JBRJ	+
Csp012	M	Adulto	JBRJ	-
Csp013	M	Adulto	JBRJ	+
Csp014	F	Adulto	JBRJ	+
Csp015	F	Adulto	JBRJ	+
Csp016	M	Juvenil	JBRJ	-
Csp017	F	Adulto	JBRJ	+
Csp018	M	Adulto	JBRJ	+
Csp019	M	Adulto	JBRJ	-
Csp020	F	Adulto	JBRJ	-
Csp021	M	Juvenil	JBRJ	-
Csp022	M	Adulto	JBRJ	-
Csp023	F	Adulto	JBRJ	-
Csp024	M	Juvenil	JBRJ	-
Csp025	M	Adulto	JBRJ	-
Csp026	M	Adulto	UFRJ	s/s
Csp027	F	Adulto	UFRJ	s/s
Csp028	M	Adulto	UFRJ	+

Tabela 9. Continuação

Csp029	F	Adulto	UFRJ	+
Csp030	F	Adulto	UFRJ	-
Csp031	M	Adulto	UFRJ	+
Csp032	F	Adulto	UFRJ	s/s
Csp033	M	Adulto	UFRJ	+
Csp034	F	Adulto	UFRJ	+
Csp035	M	Adulto	UFRJ	+
Csp036	F	Adulto	UFRJ	+
Csp037	F	Adulto	UFRJ	+
Csp038	F	Adulto	UFRJ	+
Csp039	M	Adulto	UFRJ	+
Csp040	M	Adulto	JBRJ	-
Csp041	M	Adulto	JBRJ	+

Csp= *Callithrix* sp.; M= Macho; F=Fêmea;

+ = amplificação do gene COII; - = ausência de amplificação do gene COII;

s/s = sem amostra de sangue

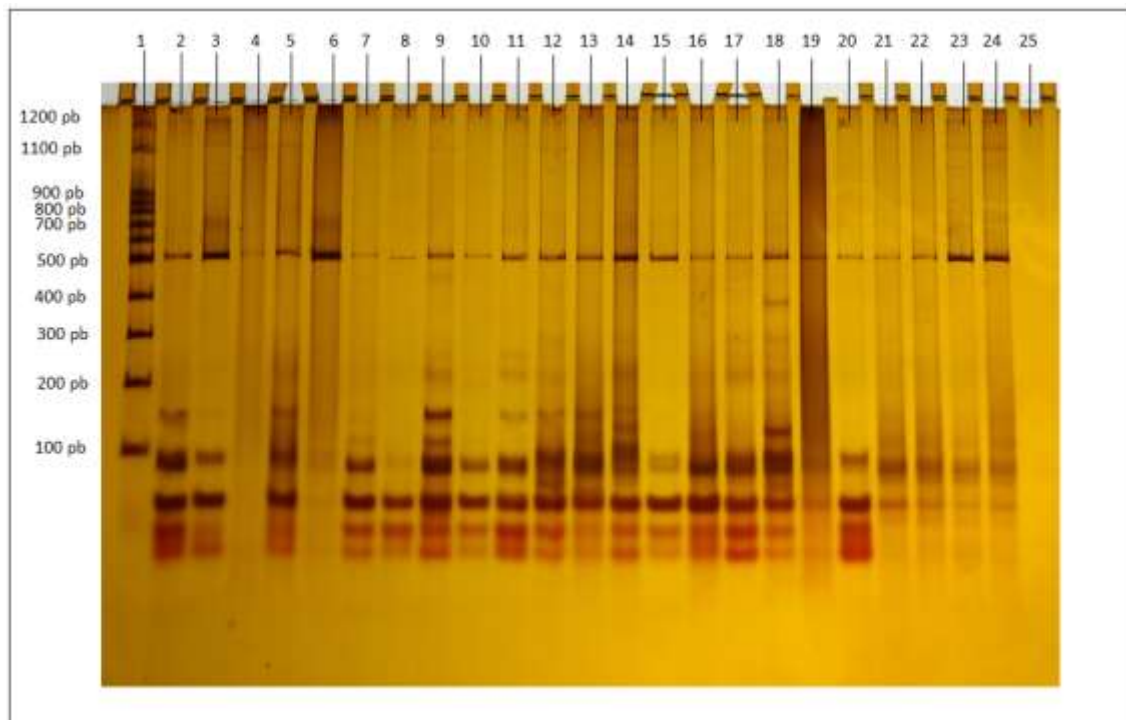


Figura 31: Gel de poli-acrilamida de concentração 5%, com os fragmentos amplificados do gene COII apresentando tamanho entre 500 e 600 pb, nas amostras de 23 indivíduos de *Callithrix* sp. provenientes de três localidades do estado do Rio de Janeiro. 1- DNA padrão de peso molecular conhecido (DNA ladder 100pb); 2- Csp003; 3- Csp006; 4- Csp007; 5- Csp008; 6- Csp009; 6- Csp009; 7- Csp010; 8- Csp011; 9- Csp013; 10- Csp014; 11- Csp015; 12- Csp017; 13- Csp018; 14- Csp028; 15- Csp029; 16- Csp031; 17- Csp033; 18- Csp034; 19- Csp35; 20- Csp036; 21- Csp037; 22- Csp038; 23- Csp39; 24- Csp041; 25- Negativo.

4 DISCUSSÃO

O cariótipo encontrado para 20 indivíduos de *Callithrix* sp. amostrados em três diferentes localidades do estado do Rio de Janeiro foi $2n=46,XX$ para as fêmeas e $2n=46,XY$ para os machos, correspondendo ao descrito para o gênero *Callithrix*. Estes indivíduos não apresentavam fenótipo característicos de nenhuma das espécies puras e por este motivo foram identificados como *Callithrix* sp.

A morfologia metacêntrica encontrada no cromossomo Y dos indivíduos machos de *Callithrix* sp. foi semelhante à descrita para *Callithrix jacchus* e *C. penicillata* segundo Nagamachi *et al.* (1997).

A presença de duas linhagens celulares $2n=46,XX/46,XY$ em *Callithrix*, provém do intercâmbio celular que acontece entre gêmeos heterossexuais através da anastomose placentária (Benirschke *et al.*, 1962; Gengozian *et al.*, 1964). Como casos de quimerismo são comuns em saguis (Ardito *et al.*, 1995; Gengozian *et al.*, 1980), isso pode estar relacionado com os aspectos evolutivos e sociais desses animais (Haig, 1999).

Em *Callithrix*, o cuidado parental na maior parte do tempo é realizado pelo pai e por outros membros do grupo sem ser a mãe, o que sustenta esse fato são os altos custos energéticos que a fêmea teria para a criação de gêmeos, inclusive por ter partos duas vezes ao ano (Santos & Martins, 2000). Segundo Ross *et al.* (2007), as linhagens celulares quiméricas poderiam gerar sinais de reconhecimento de parentesco entre os membros do grupo através da homogeneidade genômica e fenotípica entre os indivíduos, sugerindo que talvez este seja o motivo que explicaria a atração incomum do pai pelos filhotes, o que favoreceria o cuidado paterno e aloparental nos calitriquídeos.

Anomalias na genitália externa dos indivíduos quimeras de *Callithrix*, não foram relatadas até o momento. No entanto, uma fêmea quimera de *Leontopithecus chrysomelas* ($2n=46,XX/46,XY$) que é da mesma família dos saguis, Callitrichidae, mas são micos, foi descrita com um clitóris maior do que o normal e com constrição da abertura da vulva (Goldschmidt *et al.*, 2005). Todavia, no presente estudo, a análise clínica da genitália externa revelou ser normal mesmo nos machos e nas fêmeas detectados com quimerismo, e isso corrobora com estudos de que os indivíduos quimeras de *Callithrix* são normais e férteis (Benirschke *et al.*, 1962; Ardito, 1995).

Por meio da análise da citogenética foi possível detectar o quimerismo em cinco indivíduos (três machos e duas fêmeas) e a análise da genética molecular permitiu detectar o fragmento do gene *SRY* através da técnica de PCR em sete fêmeas, das quais em uma delas (Csp006) já havia sido observado duas linhagens celulares ($2n=46,XX/46,XY$). Com essas duas análises conseguimos identificar o quimerismo em 32% dos 41 indivíduos amostrados de *Callithrix* sp. que se encontravam em vida livre e em cativeiro no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Ao comparar essas duas análises, a técnica de PCR possibilitou detectar o gene *SRY*, presente no cromossomo Y, em um número maior de fêmeas (em cinco indivíduos a mais) do que com a análise citogenética (ver Silva *et al.*, 2017, Anexo E).

Na análise citogenética foi possível identificar o quimerismo em 13,5% dos indivíduos amostrados. A baixa porcentagem de sucesso na cultura celular por essa metodologia pode estar relacionado a diversos fatores dentre eles, o estado de saúde de alguns animais, principalmente os do Biotério da UFRJ que correspondem a 34% do total dos animais estudados. Além disso, o tempo de viagem entre os locais de coleta para o Laboratório de Genética/ICBS/UFRRJ, pode ter alterado as propriedades físicas, químicas e biológicas do sangue, fazendo com que não

fossem obtidas células em metáfase em número suficiente para a análise do cariótipo. Outro fator importante que colabora para o baixo sucesso da análise citogenética, está relacionado ao baixo peso corpóreo dos saguis, que pesam em média 350 g (Oliveira *et al.*, 2015). Isso reduz o volume total de sangue que pode ser coletado o que contribui para a menor quantidade de obtenção de cromossomos metafásicos, uma vez que se utiliza os linfócitos na cultura celular e eles representam 30% do volume de células brancas que estão na corrente sanguínea (Mescher, 2013). Deste modo, o baixo número de metáfases analisadas neste estudo pode estar ligado aos fatores mencionados e ao pequeno volume de sangue coletado de cada indivíduo, o qual ainda foi compartilhado para a extração de DNA na análise molecular.

Em relação a análise genética molecular, à amplificação de um fragmento com aproximadamente de 200 pb do gene *SRY* pela técnica da PCR, foi bem sucedida em torno de 78% do total de indivíduos amostrados (23 machos e 7 fêmeas). Em seis fêmeas (46,15%) onde a linhagem celular $2n=46,XY$ não havia sido detectada pela citogenética, a técnica de PCR provou ser eficaz na demonstração da presença do gene *SRY* no cromossomo Y, o qual provavelmente foi oriundo da troca celular de fêmeas com os seus co-gêmeos machos, uma vez que eram fenotipicamente normais e não apresentavam anomalias sexuais.

A causa da não alteração fenotípica em saguis tem sido relacionada à provável existência de mecanismos de proteção para minimizar os efeitos da masculinização em fêmeas quimeras. Alguns desses mecanismos foram supostos por French *et al.* (2016) os quais comparam o potencial reprodutivo e de sobrevivência nos calitriquídeos de fêmeas co-gêmeas de pelo menos um macho durante a gestação, com as fêmeas não co-gêmeas de machos. Além disso, analisaram também regiões codificantes de genes ligados à diferenciação sexual. No primeiro caso, não foram observadas diferenças significativas entre as fêmeas co-gêmeas de machos e as não co-gêmeas, o que mostra que a presença dos machos na gestação não interfere no comportamento reprodutivo e nem influencia as taxas de sobrevivência dessas fêmeas. Já no segundo caso, foram encontradas substituições de bases nitrogenadas que ocasionam a alteração da sequência de aminoácidos das proteínas que são expressas por genes candidatos a regulação dos efeitos endócrinos, como dos hormônios anti-Mülleriano (AMH) e esteroides, que estão associados a diferenciação sexual nos mamíferos. Essas substituições analisadas em programas que preveem o impacto da função biológica das proteínas, apresentaram um resultado significativo principalmente para o sistema AMH, e isso permitiu aos autores inferirem que as substituições podem ser as causas pela redução da canalização do desenvolvimento reprodutivo precoce em direção ao fenótipo masculino.

No presente estudo, embora tenha havido maior sucesso na amplificação do gene *SRY* por PCR, o uso desta metodologia não foi suficiente por si só, para comprovar a ocorrência de quimerismo em machos normais, uma vez que já possuem esse gene em seu cromossomo Y.

Nas fêmeas, a presença do gene *SRY* também pode ser oriunda da translocação ou *crossing-over* desigual durante a Meiose. Um semelhante caso deste tipo foi analisado por Sanchez-Morgado *et al.* (2003), que estudaram uma fêmea de *Callithrix jacchus*, com uma genitália externa atípica, possuindo somente uma abertura para a uretra, sem a presença de vulva ou testículos. Nela foi confirmado por PCR, a presença do gene *SRY* sem mutações ou deleções, o que levou aos autores a considerarem como uma fêmea XY, devido a anomalia da genitália externa, por mais que fosse esperado que o indivíduo apresentasse testículos no lugar de ovários. Os autores não realizaram a análise cariotípica para confirmar se existia somente uma linhagem celular, $2n=46,XY$, ou se apresentava a linhagem celular quimérica $2n=46,XX/46,XY$. No entanto, no caso das fêmeas do atual estudo consideramos que a presença do gene *SRY* seja decorrente do quimerismo, uma vez que não foram observadas alterações fenotípicas.

Uma metodologia desenvolvida por Wedi *et al.* (2016) parece ser a mais adequada até o momento para a identificação da linhagem celular quimérica. Os autores desenvolveram sondas para hibridação *in situ* por fluorescência (*FISH*) que são específicas do cromossomos X e Y dos saguis. Essas sondas podem ser usadas em qualquer tipo de célula nucleada e permitem identificar precisamente em que tipos celulares ocorre o quimerismo. Inclusive, na ausência de metáfases oriundas da cultura de linfócitos do sangue periférico, podem ser analisadas também células em intérfase da medula óssea, do fígado e do baço. Assim, como a técnica de sexagem citológica é baseada em células, dúvidas sobre a contaminação de vários tipos de amostras biológicas com sangue seriam evitadas, e isso difere de outras técnicas que poderiam produzir falsos positivos quanto a contaminação sanguínea.

Desse modo, ressaltamos a importância de se realizar as análises citogenética e genética molecular para diagnosticar o quimerismo nos mamíferos, pois levamos em conta as limitações de ambas as técnicas e ainda a possibilidade de erros na interpretação do resultado obtido somente pela amplificação por PCR do gene *SRY* ou com base nas características da genitália externa.

Com relação à detecção de híbridos dentre as amostras de *Callithrix* sp. analisadas, à amplificação do gene *SRY* gerou um fragmento com aproximadamente 200pb, semelhante ao que foi descrito por Oliveira *et al.* (2010). No entanto, na eletroforese do fragmento amplificado em gel de poliacrilamida à 12%, foi possível observar uma sutil diferença com relação à altura dos fragmentos amplificados do controle positivo de *Callithrix aurita* em comparação aos controles positivos de *C. jacchus* e *C. penicillata*. Essa diferença pode estar relacionada à deleção de 9pb na região amplificada do gene *SRY* característica de *C. aurita*.

A ocorrência de duas fêmeas quimeras, Csp015 e Csp029, que apresentaram em gel de poliacrilamida a 12% um tamanho de fragmento do gene *SRY* que aparentemente correspondente ao controle positivo de *Callithrix aurita*, sugere que essas fêmeas apresentem a linhagem paterna dessa espécie. Considerando a origem aleatória dessas amostras é surpreendente encontrar indivíduos provavelmente híbridos entre *C. aurita* com uma das espécies invasoras do Sudeste do Brasil. Com isso, suspeita-se que um macho puro de *Callithrix aurita* ou um macho híbrido cuja linhagem paterna era de *C. aurita*, deu origem a estas fêmeas provavelmente híbridas, embora esta suspeita só possa ser confirmada por sequenciamento dos fragmentos amplificados

A fêmea Csp029 do Biotério da UFRJ, apresentava tufo auricular negro semelhante aos de *C. penicillata* e, caso seja confirmada a hibridação por meio do sequenciamento dos fragmentos gerados pela amplificação de ambos os genes, esta pode ser a espécie materna deste animal. Já a fêmea Csp015 do JBRJ apresentava tufo auricular branco característicos de *C. jacchus* o que pode indicar que esta seja a espécie materna. Ambas as fêmeas foram classificadas na Análise Discriminante como pertencentes ao Grupo 1 de *Callithrix* sp., ou seja, dentre os indivíduos que apresentavam características intermediárias entre as três espécies puras, *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*, sugestivo, portanto, de serem oriundos de hibridação.

A amplificação do fragmento do gene *COII* com aproximadamente 500pb nos 23 indivíduos de *Callithrix* sp. (14 machos e 9 fêmeas), foi um dos primeiros passos para se identificar a linhagem materna desses animais. No entanto, assim como o fragmento do gene *SRY* gerado na amplificação por PCR, o fragmento do gene *COII* necessita ser sequenciado pois, somente desta forma será possível identificar as linhagens parentais responsáveis pela geração desses indivíduos confirmando ou não a ocorrência de hibridação.

5 CONCLUSÕES

Em relação ao cariótipo $2n=46,XX$ ou XY , em fêmeas e machos respectivamente, dos indivíduos de *Callithrix* sp. estudados provenientes do estado do Rio de Janeiro, aceita-se H_0 , pois corresponde ao descrito para o gênero.

No par sexual, o cromossomo X apresentou tamanho normal e morfologia submetacêntrica, e o cromossomo Y apresentou um tamanho reduzido, com morfologia metacêntrica. A morfologia deste último cromossomo é comumente encontrada em *Callithrix jacchus* e *C. penicillata*.

A análise citogenética permitiu detectar o quimerismo, $2n=46,XX/46,XY$, em 13,5% dos animais amostrados.

Com a análise citogenética e a análise genética molecular através da amplificação dos fragmentos do gene *SRY*, identificamos o quimerismo em 32% dos 38 indivíduos de *Callithrix* sp. amostrados, portanto, aceita-se H_0 .

A análise genética molecular foi mais eficaz na identificação do quimerismo nas fêmeas.

Por meio da amplificação por PCR do gene *SRY* a partir de amostras de duas fêmeas quimeras, foi gerado um fragmento de 198pb semelhante ao observado em *C. aurita*. Quanto ao fenótipo, um animal apresenta tufo de pelos auriculares brancos característicos de *C. jacchus* e o outro negro, característicos de *C. penicillata*. Ambas as fêmeas foram agrupadas no Grupo 1 de *Callithrix* sp. e apresentam o fenótipo intermediário ao das espécies puras. Estes dados sugestivos de hibridação precisam ser confirmados pelo sequenciamento do fragmento amplificado do gene *SRY* e COII.

A análise fenotípica associada à amplificação do gene *SRY* sugere que este marcador seja adequado para a detecção de hibridação em *Callithrix*. Neste caso, a confirmação da hipótese nula depende do sequenciamento do fragmento amplificado dos genes *SRY* e COII.

CONCLUSÕES GERAIS

Esse trabalho gerou informações acerca dos aspectos fenotípicos e genéticos de *Callithrix jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita* e sobre os possíveis híbridos dessas espécies presentes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Além disso, esse estudo foi o primeiro a identificar o quimerismo numa amostra de possíveis híbridos de *Callithrix*, o que sugere que a hibridação não afeta o nascimento de gêmeos dizigóticos.

Em relação aos aspectos fenotípicos foi observado que a maioria dos indivíduos analisados de *Callithrix* sp. apresentaram uma variação na coloração da pelagem da face e do corpo. Os tufo auriculares variaram entre as cores branco, cinza, marrom e negro, já a pelagem da face e do corpo, principalmente da região dorsal, variaram entre cinza e marrom. Pela Análise Discriminante o padrão de coloração analisado da pelagem da face foi intermediário ao das espécies puras.

A média de peso, do comprimento do corpo e da cauda dos indivíduos de *Callithrix* sp. capturados em vida livre apresentaram valor médio de acordo com o descrito para *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*.

Diferenças significativas foram encontradas entre os indivíduos de *Callithrix* sp. com relação ao peso em relação ao sexo e ao local de captura. Os animais de vida livre apresentaram maior peso do que os animais de cativeiro e as fêmeas foram mais pesadas do que os machos em todos os ambientes.

O cariótipo encontrado para os indivíduos amostrados foi condizente ao descrito para o gênero *Callithrix*, com $2n=46,XX$ ou XY para fêmeas e machos normais, respectivamente. Já o cariótipo $2n=46,XX/46,XY$ evidenciou a presença do quimerismo nos animais amostrados.

Com a amplificação por PCR dos fragmentos do gene *SRY* a partir das amostras dos indivíduos estudados foi possível detectar um maior número de fêmeas quimeras.

Dentre as fêmeas quimeras, em duas foi amplificado um fragmento do gene *SRY* com aproximadamente 198pb, semelhante ao observado para *C. aurita*. Este resultado, sugestivo de ancestralidade paterna por um macho desta espécie ou um híbrido descendente de um macho *C. aurita*, carece de confirmação através do sequenciamento do fragmento amplificado. Para os demais indivíduos o tamanho do fragmento amplificado foi semelhante ao observado para *C. jacchus* e *C. penicillata*.

Para todos os casos aqui estudados o sequenciamento dos *amplicons* dos genes *SRY* e *COII* poderá confirmar as espécies progenitoras e, se de fato, ocorreu a hibridação.

Mais pesquisas sobre dados fenotípicos, morfológicos, citogenéticos e genéticos moleculares que visem a avaliação e a identificação dos híbridos de *Callithrix* principalmente *in situ* contribuirão para a compreensão da extensão das interações ecológicas entre as espécies exóticas invasoras com a espécie nativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, D.H. 1984. Differentiation of sexual behavior in female marmoset monkeys: effects of neonatal testosterone or a male co-twin. *Progress in Brain Research* 61:349-358.
- Abbott, D.H. 1993. Social conflict and reproductive suppression in marmoset and tamarin monkeys. In: W.A. Mason, S. P. Mendoza (ed.), *Primate social conflict*. SUNY Press, Albany, N.Y. p. 331-372.
- Abbott, D.H., Barnett, D.K., Colman, R.J., Yamamoto, M.E. & Schultz-Darken, N.J. 2003. Aspects of Common Marmoset Basic Biology and Life History Important for Biomedical Research. *Comparative Medicine* 53(4):339-350.
- Ackermann, R.R. 2010. Phenotypic Traits of Primate Hybrids: Recognizing Admixture in the Fossil Record. *Evolutionary Anthropology* 19:258-270.
- Affonso, A.G., Ruiz-Miranda, C.R. & Beck, B.B. 2004. Interações ecológicas entre mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1758) reintroduzido e mico estrela (*Callithrix jacchus* Linnaeus, 1758) introduzido em fragmentos de mata atlântica, RJ. In: Mendes, S. L. & Chiarello A. G. *A Primatologia no Brasil*. Santa Teresa, RJ 8.
- Aguiar, T.D.F., Costa, E.C., Rolim, B.N., Romijn, P.C., Morais, N.B. & Teixeira, M.F.S. 2011. Risco de transmissão do vírus da raiva oriundo de sagui (*Callithrix jacchus*), domiciliado e semidomiciliado, para o homem na região metropolitana de Fortaleza, Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(3):356-363.
- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P. & Wenburg, J.K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *TRENDS in Ecology & Evolution* 16(11):613-622.
- Almeida, J. & Resende, A.O. 2012. Freemartinismo em bovinos: revisão de literatura. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 107 (583-584):133-141.
- Alonso, C., de Faria, D.S., Langguth, A. & Santee, D.F. 1987. Variação da pelagem na área de intergradação entre *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*. *Revista Brasileira de Biologia* 47(4):465-470.
- Araújo, A., Arruda, M.F., Alencar, A.I., Albuquerque, F., Nascimento, M.C. & Yamamoto, M.E. 2000. Body Weight of Wild and Captive Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). *International Journal of Primatology* 1(2):317-324.
- Ardito, G., Lamberti, L., Bigatti, E., Crovella, S. & Oberto, G. 1995. No correlation between chimerism and fertility in *Callithrix jacchus* (Callitrichidae, Primates). *International Journal of Anthropology* 10(1):15-19.
- Assaf, S.A., Randolph, L.M., Benirschke, K., Wu, S., Samadi, R. & Chmait, R.H. 2010. Discordant blood chimerism in dizygotic monozygotic laser-treated twin-twin transfusion syndrome. *Obstetrics & Gynecology* 2:483-485.

- Auricchio, P. 2011. Primatas do Brasil. São Paulo: *Terra Brasilis*, p.168.
- Begotti, R.A. & Landesmann, L.F. 2008. Predação de Ninhos por um Grupo Híbrido de Sagüis (*Callithrix jacchus/penicillata*) Introduzidos em Área Urbana: Implicações para a Estrutura da Comunidade. *Neotropical Primates* 15(1):28-29.
- Benirschke, K., Anderson, J.M. & Brownhill, L.E. 1962. Marrow chimerism in marmosets. *Science* 138:513-515.
- Benirschke, K. & Brownhill, L.E. 1963. Heterosexual cells in testes of chimeric marmoset monkey. *Cytogenetics* 2:331-341.
- Bradley, B.J. & Mundy, N. I. 2008. The Primate Palette: The Evolution of Primate Coloration. *Evolutionary Anthropology* 17:97-111.
- Canavez, F., Alves, G., Fanning, T.G. & Seuánez, H. 1996. Comparative karyology and evolution of the Amazonian *Callithrix* (Platyrrhini, Primates). *Chromosoma* 104:348-357.
- Carvalho, R.S., Silva, D.A., Loiola, S., Pereira, D.G., Carvalho, E.F. & Bergallo, H.G. 2013. Molecular identification of a Buffy tufted- ear marmoset (*Callithrix aurita*) incorporated in a group of invasive marmosets in the Serra dos Órgãos National Park, Rio de Janeiro–Brazil. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 4(1):230-231.
- Cavalcante, K.R.L.J & Tauil, P.L. 2017. Risk of re-emergence of urban yellow fever in Brazil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 26(3):1-3.
- Cerqueira, R., Marroig, G. & Finder, L. 1998. Marmosets and Lion-tamarins distribution (Callitrichidae, Primates) in Rio de Janeiro State, South-eastern Brazil. *Mammalia* 62(2):213-226.
- Cezar, A.M., Pessoa, L.M. & Bonvicino, C.R. 2017. Morphological and genetic diversity in *Callithrix* hybrids in an anthropogenic area in southeastern Brazil (Primates: Cebidae: Callitrichinae). *Zoologia* 34:1-9.
- Chamberlain, D.E., Cannon, A.R., Toms, M.P., Leech, D.I., Hatchwell, B.J. & Gaston, K.J. 2009. Avian productivity in urban landscapes: a review and meta-analysis. *International Journal of Avian Science* 151:1-18.
- Chen, K., Chmait, R.H., Vanderbilt, D., Wu, S. & Randolph, L. 2013. Chimerism in monozygotic dizygotic twins: Case study and review. *American Journal of Medical Genetics* 161A:1817-1824.
- Chevalier-Skolnikoff, S. 1973. Facial expressions of emotions in nonhuman primates. In: Darwin and Facial Expression. Ekman, P. New York : *Academic Press* p. 11-89.
- Chiarelli, B. 1961. Ibridologia e sistematica in Primati. Raccolta di dati. *Atti Ass. Genetical* 6:213-220.

Coimbra-Filho, A.F. 1970. Acerca de um caso de hibridismo entre *C. jacchus* (L., 1758) x *Callithrix geoffroy* (Humboldt, 1812) (Callitrichidae, Primates). *Revista Brasileira de Biologia* 30(4):507-517.

Coimbra-Filho, A.F. & Mittermeier, R.A. 1973. New data on the taxonomy of the Brazilian Marmosets of the Genus *Callithrix* Exrleben, 1777. *Folia Primatologica* 20:241-264.

Coimbra-Filho, A.F. 1974. Triplo-hibridismo em *Callithrix* (Callitrichidae, Primates). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 46:708.

Coimbra-Filho, A.F. 1983. Situação atual dos calitriquídeos que ocorrem no Brasil (Callitrichidae-Primates). In: *A Primatologia no Brasil*. De Mello, M.T. Brasília: Sociedade Brasileira de Primatologia p. 15-33.

Coimbra-Filho, A.F. 1985. Sagui-de-Wied *Callithrix kuhlii* (Wied 1826). *FBCN/INF*. Rio de Janeiro 9(4):5.

Coimbra-Filho, A.F. 1990. Sistemática, distribuição geográfica e situação atual dos símios brasileiros (Platyrrhini – Primates). *Revista Brasileira de Biologia* 50:1063-1079.

Coimbra-Filho, A.F. 1991. Apontamentos sobre *Callithrix aurita* (É. Geoffroy, 1812) um sagui pouco conhecido. In: Rylands AB, Bernardes AT (eds) *A primatologia no Brasil*. Sociedade Brasileira de Primatologia e Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, p. 145-158.

Coimbra-Filho, A.F. & Maia, A.A. 1976. Hibridismo de *Callithrix geoffroyi* (Humboldt, 1812) X *C. jacchus* (Linneaus, 1758), e criação artificial de filhote híbrido (Callitrichidae, Primates). *Revista Brasileira de Biologia* 36(3):665-673.

Coimbra-Filho, A.F., Rocha, N.C., Pissinatti, A. 1984. Heterose em fêmea híbrida de *Callithrix* (Callitrichidae, Primates). In: *A primatologia no Brasil*. De Melo, M.T. Sociedade Brasileira de Primatologia. Brasília p.213-215.

Coimbra-Filho, A.F., Pissinatti, A. & Rylands, A.B. 1993. Experimental multiple hybridism and natural hybrids among *Callithrix* species from eastern Brazil. In: *Marmosets and Tamarins: Systematics, Behavior, and Ecology*. Rylands A.B. New York: *Oxford University Press* p. 94-120.

Coimbra-Filho, A.F. & Câmara I. de G. 1996. Os limites originais do bioma mata atlântica na região Nordeste do Brasil. *Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza*, Rio de Janeiro p.79-86.

CDB. Convenção sobre Diversidade Biológica. 2017. Disponível em < <http://www.mma.gov.br/informma/item/7513-conven%C3%A7%C3%A3o-sobre-diversidade-biol%C3%B3gica-cdb> > Acesso dia: 07.02.2017.

De Oliveira, E.H., Neusser, M., Figueiredo, W.B., Nagamachi, C., Pieczarka, J.C., Sbalqueiro, I.J., Wienberg, J. & Müller, S. 2002. The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. *Chromosome research* 10(8):669-83.

- Dunn, H.O., Kenney, R.M. & Lein, D.H. 1968. XX/XY chimerism in a bovine true hermaphrodite: na insight into the understanding of freemartinismo. *Cytogenetics* 7:390-402.
- Dunsford, I., Bowley, C.C., Hutchison, A.M., Thompson, J.S., Sanger, R. & Race, R.R. 1953. A Human Blood-Group Chimera. *British Medical Journal* 2:81.
- Eldridge, F.E. & Blazak, W.F. 1976. Chromosomal Analysis of Fertile Female Heterosexual Twins in Cattle. *Journal of Dairy Science* 60(3):458-463.
- French, J. A., Frye, B., Cavanaugh, J., Ren, D., Mustoe, A.C., Rapaport, L. & Mickelberg, J. 2016. Gene changes may minimize masculinizing and defeminizing influences of exposure to male cotwins in female callitrichine primates. *Biology of Sex Differences* 7:28 1-11.
- Fuzessy, L.F., Silva, I.O., Malukiewicz, J., Silva, F.F.R., Pônzio, M. do C., Boere, V. & Ackermann, R.R. 2014. Morphological Variation in Wild Marmosets (*Callithrix penicillata* and *C. geoffroyi*) and Their Hybrids. *Evolutionary Biology* 41(3):480-493.
- Garibyan, L. & Avashia, N. 2013. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology* 133(3):1-8.
- Gengozian, N., Batson, J.S. & Eide, P. 1964. Hematologic and cytogenetic evidence for hematopoietic chimerism in the marmoset, *Tamarinus nigricollis*. *Cytogenetics* 3:384-393.
- Gengozian, N., Batson, J.S., Greene, C.T. & Gosslee, D.G. 1969. Hemopoietic chimerism in imported and laboratory-bred marmosets. *Transplantation* 8:633-652.
- Gengozian, N., Brewen, J.G., Preston, R.J. & Batson, J.S. 1980. Presumptive evidence for the absence of functional germ cell chimerism in the marmoset. *Journal of Medical Primatology* 9:9-27.
- Gersen, S.L & Keagle, M.B. 2005. The principles of clinical cytogenetics. *Humana Press Inc.* Totowa, New Jersey p.612.
- Goldschmidt, B, Moraes, I.A., Souza, L.M., Paulino, F.S., Pissinatti, A., Mársico, F.F., Ferreira, A.M.R. & Pinho, T.G. 2005. Occurrence of virilization signals in a female marmoset *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichidae: Primates) with 46,XX/46,XY chimerism. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 60(3):86-88.
- Groves, C.P. 1989. A Theory of Human and Primate Evolution. New York: *Oxford University Press*.
- Groves, C.P. 1993. Order Primates. In: *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geografic Reference*. Wilson, D.E. and Reeder, D. M. Washington: Smithsonian Institution Press 2:243-277.
- Haig, D. 1999. What is a marmoset? *American Journal of Primatology* 49:285-296.
- Herschler, M.S. & Fechheimer, N.S. 1967. The Role of Sex Chromosome Chimerism in Altering Sexual Development of Mammals. *Cytogenetics* 6:204-212.

- Hershkovitz, P. 1968. Metachromism or the Principle of Evolutionary Change in Mammalian Tegumentary Colors. *Society for the Study of Evolution* 22(3):556-575.
- Hershkovitz P. 1975. Comments on the Taxonomy of Brazilian Marmosets (*Callithrix*, Callitrichidae). *Folia Primatologica* 24:137-172.
- Hershkovitz P. 1977. *Living NewWorld monkeys (Platyrrhini) with an introduction to Primates*. Vol. 1. Chicago: Chicago University Press.
- Hershkovitz P. 1983. Two new species of night monkeys, genus *Aotus* (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary report on *Aotus* taxonomy. *American Journal of Primatology* 4:209-243.
- Hill, J.P. 1926. Demonstration of the Embryologia varia (development of *Hapale jacchus*). *Journal of Anatomy* 60:486-487.
- Hill, W.C.O. 1957. Primates, comparative anatomy and taxonomy Pithecoidea, Platyrrhini. *Endinburgh University Press* 3.
- Hill, W.C.O. 1969. Obstetric mishaps in marmosets. *Acta Zoologica* 48:149-164.
- Hoekstra, H.E. 2006. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97:222-234.
- Honess, P.E & Macdonald, D.W. 2011. Marking and radio-tracking primates. Setcchell, J.M. & Curtis, D. In: *Field and Laboratory Methods in Primatology: A Practical Guide*. Cambridge: *Cambridge University Press* 189-205.
- Hsu, T.C. 1952. Mammalian chromosome in vitro. *Journal of Heredity* 43(4):167-172.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis. Disponível em < <http://www.ibama.gov.br/fauna-silvestre/cetas/o-que-sao-os-cetas>> Acesso dia: 15/07/2016.
- ICMBio, 2012. Protocolo para coleta de dados sobre primatas em Unidades de Conservação da Amazônia / Marcelo Derzi Vidal (organizador). Brasília. p.38.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature List of Threatened Species Disponível em < <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=3570>> Acesso dia: 04/01/2018.
- Iughetti, C.G. 2008. Evolução Cromossômica: Estudo da Variabilidade Cariotípica em *Platyrrhini* e das Homeologias e Sintenias com Cromossomos Humanos. 273f. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Izar, A., Soares, H.M., Pissinatti, A. & Bueno, C. 2016. Registros de *Callithrix aurita* (Primates, Callitrichidae) e seus híbridos no Parque Nacional do Itatiaia. *Oecologia Australis* 20(4):520-525.

- Jackson, I.J. 1977. Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. *Human Molecular Genetics* 6(10):1613-1624.
- Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://www.jbrj.gov.br/jardim/animais>> Acesso dia: 23/07/2016.
- Jaquish, C.E., Tardif, S.D., Toal, R.L & Carson R.L. 1996. Patterns of prenatal survival in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Journal Medical of Primatology* 25:57-63.
- Jost, A., Vigier, B. & Prepin, J. 1972. Freemartins in cattle: The first steps of sexual organogenesis. *Journal of Reproduction and Fertility* 29:349.
- Kaiser, H.F. 1960. The application of electronic computers to factor analysis. *Educational and Psychological Measurement* 20:141-151.
- Lillie, F.R. 1916. The theory of the freemartin. *Science* 43:611-613.
- Lillie, F.R. 1917. The freemartin: a study of the action of sex hormones in the fetal life of cattle. *Journal of Experimental Zoology* 23:371-452.
- Lyra-Neves, R.M., Oliveira, M.A.B., Telino-Júnior, W.R. & Santos, E.M.dos. 2007. Comportamentos interespecíficos entre *Callithrix jacchus* (Linnaeus) (Primates, Callitrichidae) e algumas aves de Mata Atlântica, Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 24(3):709-716.
- Kasahara, S. 2009. Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. 1ª ed. Ribeirão Preto: *Sociedade Brasileira de Genética* p.160.
- Mallinson, J.J.C. 1971. The breeding and maintenance of marmosets at Jersey Zoo. *International Zoo Yearbook* 11(1):9-83.
- Malukiewicz, J., Boere, V., Fuzessy, L.F., Grativol, A.D., French, J.A., Silva, I.O., Pereira, L.C.M., Ruiz-Miranda, R., Valença, Y.M. & Stone, A.C. 2014. Hybridization Effects and Genetic Diversity of the Common and Black-Tufted Marmoset (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*) Mitochondrial Control Region. *American Journal of Physical Anthropology* 155(4):522-36.
- Malukiewicz, J., Boere, V., Fuzessy, L.F., Grativol, A.D., de Oliveira e Silva, I., Pereira, L.C.M., Ruiz-Miranda, R., Valença, Y.M. & Stone, A.C. 2015. Natural and Anthropogenic Hybridization in Two Species of Eastern Brazilian Marmosets (*Callithrix jacchus* and *C. penicillata*). *Plos ONE* 106:1-22.
- Mcfely, R.A., Hare, W.C.D. & Biggers, J.D. 1967. Chromosome Studies in 14 Cases of Intersex in Domestic Mammals. *Cytogenetics* 6:242-253.
- Mapa Topográfico do Rio de Janeiro. Disponível em < <http://pt-br.topographic-map.com/places/Rio-de-Janeiro-7883764/>> Acesso dia: 07/12/2017.
- Marroig, G. 1995. Espécies ou subespécies em *Callithrix*? *Neotropical Primates* 3(1):10-13.

Meireles, C.M.M., Czelusniak, J., Sampaio, I., Schneider, H., Ferrari, S.F., Coimbra-Filho, A.F., Pissinatti, A., Muniz, J.A.P.C., Ferrari, H.S. & Schneider, M.P.C. 1998. Electrophoretic polymorphisms and their taxonomic implications in Callitrichini (Primates, Platyrrhini). *Biochemical Genetics* 36(7-8):229-244.

Mescher A.L. 2013. Junqueira's Basic Histology: Text 6 Atlas, 13th ed. New York: *McGraw-Hill* p.480.

Meyers-Wallen, V.N. 2012. Gonadal and Sex Differentiation Abnormalities of Dogs and Cats. *Sexual Development* 6:46-60.

Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:1215.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. 2017. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso dia 06/11/2017.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. 2018. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-global/impactos>>. Acesso dia 04/01/2018.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. 2018. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Acesso dia 10/05/2018.

Mittermeier, R.A. & Coimbra-Filho, A.F. 1981. Systematics: species and subspecies. In: *Ecology and Behavior of Neotropical Primates*. Vol.1. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. p. 29-109.

Mittermeier, R.A., Rylands, A.B. & Coimbra-Filho, A.F. 1988. Systematics: species and subspecies – an update. In: *Ecology and behavior of Neotropical Primates* Mittermeier. R.A., Rylands A.B., Coimbra- Filho A.F. & da Fonseca G.A.B. Washington DC: World Wildlife Fund p. 13-75.

Moorhead, P.S., Norwell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M. & Hungerford, D.A. 1960. Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood. *Experimental Cell Research* 20:613-615.

Moore, H.D.M., Gems, S. & Hearn, J.P. 1985. Early Implantation stages in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *The American Journal of Anatomy* 172:265-278.

Morais Junior, M.M.de. 2010. Os Saguís (*Callithrix* Spp., Erxleben, 1777) Exóticos Invasores na Bacia do Rio São João, Rio de Janeiro: Biologia Populacional e Padrão de Distribuição em uma Paisagem Fragmentada. 89f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Moreira, M.A.M. 2002. *SRY* evolution in Cebidae (Platyrrhini: Primates). *Journal of Molecular Evolution* 55:92-103.

- Mudry, M.D. 1990. Cytogenetic variability within and across population of *Cebus apella* in Argentina. *Folia Primatologica* 54(3):206-216.
- Mudry, M.D., Slavutsky, I., Zunino, G., Delprat, A. & Brown, A. 1991. A new karyotype of *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini) from Argentina. *Revista Brasileira de Genética* 14(3):729-738.
- Mullis, K.B. & Faloona, E.A. 1986. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350.
- Mundy, N.I. & Kelly, J. 2003. Evolution of a Pigmentation Gene, the Melanocortin-1 Receptor, in Primates. *American Journal of Physical Anthropology* 121:67-80.
- Nagamachi, C.Y., Pieczarka, J.C. & Barros, R.M.S. 1992. Karyotypic comparison among *Cebuella pygmaea*, *Callithrix jacchus* and *C. emiliae* (Callitrichidae, Primates) and its taxonomic implications. *Genética* 85:249-257.
- Nagamachi, C.Y. 1995. Chromosomal relations and phylogenetic and phonetic analyses in the Callitrichidae. *Neotropical Primates* 3:88-89.
- Nagamachi, C.Y., Pieczarka, J.C., Schwarz M., Barros, R.M.S. & Mattevi, M.S. 1997. Comparative chromosomal study of five taxa of genus *Callithrix*, group jacchus (Platyrrhini, Primates). *American Journal of Primatology* 41:53-60.
- Neusser, M., Stanyon, R., Bigoni, F., Wienberg, J., & Muller, S. 2001. Molecular cytotaxonomy of 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. *Cytogenetics and Cell Genetics* 94:206–215.
- Neves, S.M.N. & Guedes, R.M.C. 2012. Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. *Arquivos do Instituto Biológico* 79 (4):627-632.
- Nicholas, J.W., Jenkins, W.J. & Marsh, W.L. 1957. Human Blood Chimeras A study of surviving twins. *British Medical Association* 1:1458.
- Nieves, M., Mühlmann, M. & Mudry, M.D. 2005. Heterochromatin and chromosome evolution: a FISH probe of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) developed by chromosome microdissection. *Genetics and Molecular Research* 4(4):675-683.
- Nieves, M., Mendez, G., Ortiz, A., Mühlmann, M. & Mudry, M.D. 2008. Karyological diagnosis of *Cebus* (Primates, Platyrrhini) in captivity: Detection of hybrids and management program applications. *Animal Reproduction Science* 108(1-2):66-78.
- Nieves, M., Mühlmann, M. & Mudry, M.D. 2010. *Cebus paraguayanus* and *Cebus nigritus* (Primates, Platyrrhini): A Comparative Genomic Hybridization Analysis. *Cytogenetic and Genome Research* 128(4):214-220.

- Nieves, M., De Oliveira, E.H.C., Amaral, P.J.S., Nagamachi, C.Y., Pieczarka, J.C., Mühlmann, M.C. & Mudry, M.D. 2011. Analysis of the heterochromatin of *Cebus* (Primates, Platyrrhini) by micro-FISH and banding pattern comparisons. *Journal of Genetics* 90(1):111-117.
- Natori, M. 1986. Interspecific Relationships of *Callithrix* Based on the Dental Characters. *Primates* 27(3): 321-336.
- Natori, M. & N. Shigehara. 1992. Interspecific differences in lower dentition among eastern Brazilian marmosets. *Journal of Mammalogy* 73:668- 671.
- Natori, M. 1994. Craniometrical Variations Among Eastern Brazilian Marmosets and Their Systematic Relationships. *Primates* 35(2):167-176.
- Nóbrega, D.M. 2010. Análise Discriminante utilizando o software SPSS. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual da Bahia 54f.
- Nogueira, D.M., Oliveira, A.M., Pereira, D.G., Bergallo, H.G., de Paula, T.S., Lôbo-Hajdu, G., Pissinatti, A., Loiola, S.A. & Carvalho, E.F. 2010. The search for molecular markers to elucidate natural hybridization between native and invasive brazilian marmoset species: the mitochondrial Cytochrome c Oxidase II gene. II Jornada de Espécies Invasoras. p.81-85.
- Nogueira, D.M., Ferreira, A.M.R., Goldschmidt, B., Pissinatti, A., Carelli, J.B. & Verona, C.E. 2011. Cytogenetic study in natural hybrids of *Callithrix* (Callitrichidae: Primates) in the Atlantic forest of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia* 101(3):156-160.
- Novaes, C.M. 2014. Análise cariotípica de saguis híbridos do gênero *Callithrix* no Sudeste brasileiro. 63f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.
- Ohno, S., Trujillo, J.M., Stenius, C., Christian, L.C. & Teplitz, R.L. 1962. Possible Germ Cell Chimeras Among Newborn Dizygotic Twin Calves (*Bos taurus*). *Cytogenetics* 1:258-265.
- Oliveira, A.M.D., Nogueira, D.M., Ferreira, A.M.D.R., Pissinatti, A. & Carvalho, E.F.D. 2010. *SRY* Gene Polymorphism: A Tool To Evaluate Natural Hybridization In South American Primates. *Haploid DNA markers in forensic genetics*. p.64.
- Oliveira, G.R., Amora, T.D., Reis, N.L., Peracchi, A.L. & Rosa, G.L.M. 2015. Gênero *Callithrix* (Erxleben, 1777). In: *Primates do Brasil: guia de campo*. Reis, N.R., Peracchi, A.L., Batista, C.B., Rosa, G.L.M., p. 64-77.
- Owen, R.D. 1945. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* 102:400-401.
- Padula, A.M. 2005. The freemartin syndrome: an update. *Animal Reproduction Science* 87:93-109.
- Pascalis, O. & Bachevalier, J. 1998. Face recognition in primates: a cross-species study. *Behavioural Processes* 43:87-96.

Passamani, M., Aguiar, L.M.S., Machado, R. & Figueiredo, E. 1997. Hybridization between *Callithrix geoffroyi* and *C. penicillata* in southeastern Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Primates* 5(1):9-10.

Pereira, D.G. 2010. Densidade, genética e saúde populacional como ferramentas para propor um plano de controle e erradicação de invasão biológica: o caso de *Callithrix aurita* (Primates) no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ, Brasil. 158f. Tese de Doutorado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Rangel, C.H. 2010. Ecologia e Comportamento de Callitrichidae (Primates) no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia Roberto Alcântera Gomes.

Redline, R.W. 2003. Nonidentical twins with a single placenta-disproving dogma in perinatal pathology. *New England Journal of Medicine* 349:111-114.

Rhymer, J.M. & Simberloff, D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematic* 27:83-109.

Rocha, C.F.D., Bergallo, H., Pombal Jr, J.P., Geise, L., Van Sluys, M., Fernandes, R. & Caramaschi, U. 2004. Fauna de anfíbios, répteis e mamíferos do Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil. *Publicações Avulsas do Museu Nacional do Rio de Janeiro* 104:3-23.

Rosenberger, A.L., & Coimbra-Filho, A.F. 1984. Morphology, taxonomic status and affinities of the lion tamarins, *Leontopithecus* (Callitrichinae, Cebidae). *Folia Primatologica* 42:149-179.

Ross, C.N., French, J.A., & Ortí, G. 2007. Germ-line chimerism and paternal care in marmosets (*Callithrix kuhlii*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(15):6278-6282.

Ruiter, J.R. 2004. Genetic Markers in Primate Studies: Elucidating Behavior and Its Evolution. *International Journal of Primatology* 25(5):1173-1189.

Ruiz-Miranda, C.R., Affonso, A.G. Martins, A. & Beck, B. 2000. Distribuição do sagüi (*Callithrix jacchus*) nas áreas de ocorrência do mico leão dourado no Estado de Rio de Janeiro. *Neotropical Primates* 8(3):98-101.

Ruiz-Miranda, C.R., Affonso, A.G., Morais, M.M de. Verona, C.E., Martins, A. & Beck, B. 2006. Behavioral and Ecological Interactions between Reintroduced Golden Lion Tamarins (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1766) and Introduced Marmosets (*Callithrix spp*, Linnaeus, 1758) in Brazil's Atlantic Coast Forest Fragments. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(1):99-109.

Ruschi, A. 1964. Macacos do Espírito Santo. *Boletim do Museu de Biologia. Mello Leitão* 23A 1-23.

Rylands, A.B. 1989. Sympatric Brazilian callitrichids: the black-tufted-ear marmoset, *Callithrix kuhlii*, and the golden-headed lion tamarin *Leontopithecus chrysomelas*. *Journal of Human Evolution* 18(7):679-695.

- Rylands, A.B. 1993. Marmosets and Tamarins: Systematics, Behaviour, and Ecology. Oxford: *Oxford University Press* p. 396.
- Rylands A.B. 1996. Habitat and the Evolution of Social and Reproductive Behavior in Callitrichidae. *American Journal of Primatology* 38:5-18.
- Rylands A.B., Schneider H., Langguth A., Mittermeier R.A., Groves C.P. & Rodriguez-Luna E. 2000. An assessment of the diversity of new world primatas. *Neotropical Primates* 8 (2):61-93.
- Rylands A.B., Mittermeier, R.A. & Silva Jr., J.S. 2012. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. *International Zoo Yearbook* 46:11-24.
- Santana, S.E., Alfaro, J.L. & Alfaro, M.E. 2012. Adaptive evolution of facial colour patterns in Neotropical primates. *Proceedings of the Royal Society B* 279:2204-2211.
- Santos, C.V. & Martins, M.M. 2000. Parental care in the buffy-tufted-ear marmoset (*Callithrix aurita*) in wild and captive groups. *Revista Brasileira de Biologia* 60(4):667-672.
- Santos C.V., Luz, K.P. & Sant'anna, F.S. 2005. As três espécies de primatas do gênero *Callithrix* (*C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. geoffroyi*) introduzidos na Ilha de Santa Catarina – SC: a importância de pesquisa na implantação do manejo. In: *Sociedade Brasileira de Primatologia* (ed) Programa e livro de resumos: XI Congresso Brasileiro de Primatologia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Sul, Porto Alegre, 13–18 p 59.
- Sanchez-Morgado, J.M., Haworth, R. & Morris, T.H. 2003. XY female marmoset (*Callithrix jacchus*). *Comparative Medicine* 53:539-544.
- Schneider, H., Schneider, M.P., Sampaio, I., Harada, M.L., Stanhope, M., Czelusniak, J. & Goodman, M., 1993. Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2:225-242.
- Seabright, M. 1971. A rapid technique for human chromosomes. *Lancet* 298(7731):971-972.
- Sena, L., Vallinoto, M., Sampaio, I., Schneider, H., Ferrari, S.F. & Schneider, M.P. 2002. Mitochondrial COII gene sequences provide new insights into the phylogeny of marmoset species groups (Callitrichidae, Primates). *Folia Primatologica* 73(5):240-51.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R. & Goodfellow, P.N. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.
- Seuánez, H.N., Forman, L. & Alves, G. 1988. Comparative chromosome morphology in three callitrichid genera: *Cebuella*, *Callithrix* and *Leontopithecus*. *The Journal of Heredity* 70:418-424.
- Steinberg, E.R., Nieves, M., Fantini, L. & Mudry, M.D. 2014. Primates karyological diagnosis and management programs applications. *Journal of Medical Primatology* 43(6):455-467.

Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75(1):304-6.

Sweeney, C.G., Ward, J.M. & Vallender, E.J. 2012. Naturally occurring, physiologically normal, primate chimeras. *Chimerism* 3(2):43-44.

Takabayashi, S. & Katoh, H. 2011. Sex Identification Using the *ZFX* and *ZFY* Genes in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). *Experimental Animals* 60(4):417-420.

Tagliaro, C.H., Schneider, M.P. C., Schneider, H., Sampaio, I.C. & Stanhope, M.J. 1997. Marmoset Phylogenetics, Conservation Perspectives, and Evolution of the mtDNA Control Region. *Molecular Biology and Evolution* 14(6):674-684.

Tardif, S.D., Richter, C.B. & Carson, R.L. 1984. Reproductive performance of three species of Callitrichidae. *Laboratory Animal Science* 34(3):272-275.

Tarkowski, A.K. 1970. Germ cells in natural and experimental chimaeras in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 259:107-111.

Valença-Montenegro, M.M. & Laroque, P.O. 2009. Protocolo de exame clínico e coleta de dados morfométricos para primatas neotropicais. 2º Congresso Internacional de Medicina da Conservação. Recife.

Valença-Silva, G., Maciel, F.G., Zaganini, R.L., Lucindo, A.S., Caramaschi, S. & Paula, H.M.G. *de (in memoriam)*. 2014. Reporting social behaviours of mixed-species troops formed by *Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata* (Primate, Callitrichidae). *Brazilian Journal of Biology* 74(3):607-611.

WWF, World Wide Fund for Nature 2018. Disponível em: www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biomas/bioma_cerrado/bioma_cerrado_ameacas/. Acesso dia: 19/05/2018.

Ward, J.M., Buslov, A.M., & Vallender, E.J. 2014. Twinning and Survivorship of Captive Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) and Cotton-Top Tamarins (*Saguinus oedipus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 53(1):7-11.

Wedi, E., Nayudu, P.L. & Michelmann, H.W. 2011. A case report of spontaneous opening of congenitally fused labia in a female common marmoset (*Callithrix jacchus*) followed by pregnancy and birth of twins. *Journal of Medical Primatology* 40:351-353.

Wedi, E., Müller, S., Neusser, M., Vogt, P.H., Tkachenko, O.Y., Zimmer, C.J., Smeets, D., Michelmann, G.H.W. & Nayudu, A.P.L. 2016. Detection of cross-sex chimerism in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) in interphase cells using fluorescence in situ hybridization probes specific for the marmoset X and Y chromosomes. *Reproduction, Fertility and Development* 29(5):913-920.

Wienberg, J. 2005. Fluorescence in situ hybridization to chromosomes as a tool to understand human and primate genome evolution. *Cytogenetics and genome research* 108(1-3):139-60.

Wislocki, G.B. 1932. Placentation in the marmoset (*Oedipomidas geoffroyi*) with remarks on twinning in monkeys. *The Anatomical Record* 52:381-399.

Wislocki, G.B. 1939. Observations on twinning in marmosets. *The American Journal of Anatomy* 64:445-483.

Worley, K.C. et al. 2014. The common marmoset genome provides insight into primate biology and evolution. Marmoset Genome Sequencing and Analysis Consortium. *Nature Genetics* 46(8):850-857.

Yamamoto, M.E., Box, H.O., Albuquerque, F.S., & Arruda, M. de F., 1996. Carrying behavior in captive and wild marmosets (*Callithrix jacchus*): a comparison between two colonies and a field site. *Primates* 37(3):297-304.

ANEXOS

Anexo A: Relação dos 52 saguis em que foram feitos os registros fotográficos e coletados os dados biométricos. Sendo que 46 são indivíduos dos *Callithrix* sp. (Callitrichidae: Primates) capturados em três localidades no estado do Rio de Janeiro: CETAS/RJ/Ibama, Jardim Botânico do Rio de Janeiro/JBRJ, Biotério da UFRJ e Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ/INEA/IBAMA) e seis são indivíduos das espécies puras de *C. jacchus* (n=2) e *C. aurita* (n=4), coletados no CPRJ. Constatam para cada indivíduo: código de identificação individual; data da coleta dos dados e amostras biológicas; sexo; idade; local de coleta e número do *microchip* quando marcados (Continuação).

Identificação	Data	Local	Sexo	Idade	Microchip
Csp001	23/06/2015	CETAS/RJ/Ibama	M	Juvenil	Sem marcação
Csp002	23/06/2015	CETAS/RJ/Ibama	F	Adulto	Sem marcação
Csp003	18/12/2015	CETAS/RJ/Ibama	M	Adulto	Sem marcação
Csp004	18/12/2015	CETAS/RJ/Ibama	M	Juvenil	Sem marcação
Csp005	18/12/2015	CETAS/RJ/Ibama	F	Adulto	Sem marcação
Csp006	14/03/2016	CETAS/RJ/Ibama	F	Adulto	Sem marcação
Csp007	14/03/2016	CETAS/RJ/Ibama	M	Adulto	Sem marcação
Csp008	14/03/2016	CETAS/RJ/Ibama	M	Adulto	Sem marcação
Csp009	14/03/2016	CETAS/RJ/Ibama	M	Juvenil	Sem marcação
Csp010	28/04/2016	JBRJ	M	Adulto	900164000716929
Csp011	28/04/2016	JBRJ	M	Adulto	9390000411017
Csp012	28/04/2016	JBRJ	M	Adulto	900164000716930
Csp013	28/04/2016	JBRJ	M	Adulto	939000004110085
Csp014	28/04/2016	JBRJ	F	Adulto	93900004110082
Csp015	31/05/2016	JBRJ	F	Adulto	939000004110216
Csp016	31/05/2016	JBRJ	M	Juvenil	939000004110225
Csp017	31/05/2016	JBRJ	F	Adulto	939000004110232
Csp018	31/05/2016	JBRJ	M	Adulto	939000004110235
Csp019	27/06/2016	JBRJ	M	Adulto	939000004110282
Csp020	27/06/2016	JBRJ	F	Adulto	939000004110314
Csp021	27/06/2016	JBRJ	M	Juvenil	939000004110024
Csp022	27/06/2016	JBRJ	M	Adulto	939000004110286
Csp023	27/06/2016	JBRJ	F	Adulto	939000004110303
Csp024	27/06/2016	JBRJ	M	Juvenil	939000004110309
Csp025	27/06/2016	JBRJ	M	Adulto	900164000716934
Csp026	05/07/2016	UFRJ	M	Adulto	Sem marcação
Csp027	05/07/2016	UFRJ	F	Adulto	Sem marcação
Csp028	06/07/2016	UFRJ	M	Adulto	Sem marcação
Csp029	06/07/2016	UFRJ	F	Adulto	Sem marcação
Csp030	06/07/2016	UFRJ	F	Adulto	Sem marcação
Csp031	06/07/2016	UFRJ	M	Adulto	Sem marcação
Csp032	12/07/2016	UFRJ	F	Adulto	Sem marcação
Csp033	12/07/2016	UFRJ	M	Adulto	Sem marcação
Csp034	12/07/2016	UFRJ	F	Adulto	Sem marcação
Csp035	12/07/2016	UFRJ	M	Adulto	Sem marcação
Csp036	12/07/2016	UFRJ	F	Adulto	Sem marcação
Csp037	12/07/2016	UFRJ	F	Adulto	Sem marcação

Anexo A: Continuação

Csp038	12/07/2016	UFRJ	F	Adulto	Sem marcação
Csp039	12/07/2016	UFRJ	M	Adulto	Sem marcação
Csp040	20/09/2016	JBRJ	M	Adulto	939000004110390
Csp041	20/09/2016	JBRJ	M	Adulto	939000004110398
Cj1	07/07/2017	CPRJ	F	Adulto	Sem marcação
Cj2	07/07/2017	CPRJ	F	Adulto	Sem marcação
Ca 1	07/07/2017	CPRJ	F	Adulto	Sem marcação
Ca 2	07/07/2017	CPRJ	M	Adulto	Sem marcação
Ca 3	07/07/2017	CPRJ	M	Adulto	Sem marcação
Ca 4	07/07/2017	CPRJ	F	Adulto	Sem marcação
HB 1	07/07/2017	CPRJ	M	Adulto	Sem marcação
HB 2	07/07/2017	CPRJ	M	Adulto	Sem marcação
HB 3	07/07/2017	CPRJ	F	Adulto	Sem marcação
HB 4	07/07/2017	CPRJ	F	Adulto	Sem marcação
HB 5	07/07/2017	CPRJ	M	Juvenil	Sem marcação

Csp= *Callithrix* sp.; M= Macho; F=Fêmea; Cj= *C. jacchus*; Ca= *C. aurita*; HB= Híbrido

Anexo B: Ficha utilizada em campo:



FICHA DE PROCESSAMENTO DE PRIMATAS

PPGBA/UFRRJ/MESTRADO/RESPONSÁVEL: Monique Oliveira de Macedo Silva

Identificação: _____ Data: ____/____/____

Local: _____ Coletor: _____

Equipe de coleta: _____

Informações sobre o animal

Espécie: _____

Procedência: _____ Data de coleta ____/____/____

Sacrifício Sim () Não () Data: _____ Sexo: _____ Faixa etária: Infante / Juvenil / Adulto

Anestésico utilizado: _____

Dosagem: _____ Hora da anestesia/ Hora de término: _____ Preciou de mais? Sim / Não

Quanto? _____ Hora da reanimação/ Hora de término: _____

Observações: _____

Biometrias

Peso: _____ g

Circunf. do peito: _____ mm

Comp. da cabeça e corpo: _____ mm

Comp. da cauda: _____ mm

Mão direita: _____ mm

Pé direito: _____ mm

Orelha direita: _____ mm

Pescoço: _____ mm

Observações: _____

Fêmea

Grávida? Sim/ Não Lactando? Sim/ Não Mamilos: não-estendidos/estendidos/muito estendidos

Intumescimento da genitália: normal / pouco / grande

Macho

Testículo esquerdo: comprimento _____ mm

largura: _____ mm

Testículo direito: comprimento _____ mm

largura: _____ mm

Anexo C: Resultado da avaliação subjetiva do fenótipo dos indivíduos de *Callithrix* sp. estudados, com as possíveis espécies de *Callithrix* que ocorrem na região Sudeste do Brasil e que podem estar envolvidas na hibridação. Constam para cada indivíduo: código de identificação individual, o sexo, o local de coleta, o fenótipo das possíveis espécies envolvidas na hibridação e a cor dos tufos auriculares para cada animal (Continuação).

Indivíduo	Sexo	Local	Fenótipo	Cor dos tufos auriculares
Csp001	M	CETAS/RJ/Ibama	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Negra
Csp002	F	CETAS/RJ/Ibama	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza
Csp003	M	CETAS/RJ/Ibama	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza
Csp004	M	CETAS/RJ/Ibama	<i>C. jacchus</i>	Branco
Csp005	F	CETAS/RJ/Ibama	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Csp006	F	CETAS/RJ/Ibama	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza escuro
Csp007	M	CETAS/RJ/Ibama	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Csp008	M	CETAS/RJ/Ibama	<i>C. jacchus</i>	Branco
Csp009	M	CETAS/RJ/Ibama	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Csp010	M	JBRJ	<i>C. jacchus</i>	Branco
Csp011	M	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza
Csp012	M	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Csp013	M	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Csp014	F	JBRJ	<i>C. jacchus</i>	Branco
Csp015	F	JBRJ	<i>C. jacchus</i>	Branco
Csp016	M	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Csp017	F	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Csp018	M	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Csp019	M	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Escuro
Csp020	F	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Csp021	M	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Escuro
Csp022	M	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Escuro
Csp023	F	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Csp024	M	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Csp025	M	JBRJ	<i>C. jacchus</i>	Branco
Csp026	M	UFRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. aurita</i>	Marrom amarelada
Csp027	F	UFRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Escuro
Csp028	M	UFRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. aurita</i>	Marrom amarelada
Csp029	F	UFRJ	<i>C. penicillata</i>	Negra
Csp030	F	UFRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Escuro
Csp031	M	UFRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. aurita</i>	Marrom amarelada
Csp032	F	UFRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. aurita</i>	Cinza Médio
Csp033	M	UFRJ	Híbrido de <i>C. aurita</i> e <i>C. penicillata</i>	Negra
Csp034	F	UFRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Escuro
Csp035	M	UFRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. aurita</i>	Marrom amarelado

Anexo C. Continuação

Csp036	F	UFRJ	Híbrido de <i>C. aurita</i> e <i>C. penicillata</i>	Marrom
Csp037	F	UFRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Csp038	F	UFRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. aurita</i>	Marrom
Csp039	M	UFRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. aurita</i>	Marrom
Csp040	M	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza
Csp041	M	JBRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
Cj1	F	CPRJ	<i>C. jacchus</i>	Branco
Cj2	F	CPRJ	<i>C. jacchus</i>	Branco
Ca 1	F	CPRJ	<i>C. aurita</i>	Marrom amarelada
Ca 2	M	CPRJ	<i>C. aurita</i>	Marrom amarelada
Ca 3	M	CPRJ	<i>C. aurita</i>	Marrom amarelada
Ca 4	F	CPRJ	<i>C. aurita</i>	Marrom amarelado
Cp1	M	CPRJ	<i>C. penicillata</i>	Negra
HB 1	M	CPRJ	Híbrido de <i>C. aurita</i> e <i>C. jacchus</i>	Marrom amarelada
HB2	M	CPRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza Claro
HB 3	F	CPRJ	Híbrido de <i>C. penicillata</i> e <i>C. geoffroyi</i>	Negra
HB 4	F	CPRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Negra
HB 5	M	CPRJ	Híbrido de <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i>	Cinza

Csp= *Callithrix* sp.; M= Macho; F=Fêmea; Cj= *C. jacchus*; Ca= *C. aurita*; HB= Híbrido

Anexo D: Valor de RGB dos indivíduos de *Callithrix* sp. pertencente aos quatro pontos da face (1- Tufo auricular direito. 2- Centro da estrela na testa. 3- Face lateral direita. 4- Topo da cabeça) de cada animal (Continuação).

Indivíduo	Ponto 1			Ponto 2			Ponto 3			Ponto 4		
	R	G	B	R	G	B	R	G	B	R	G	B
Csp001	46	44	45	168	164	129	57	50	40	42	41	39
Csp002	85	76	69	123	110	91	118	101	85	32	26	26
Csp003	50	50	50	157	155	143	43	36	30	56	58	55
Csp004	144	142	129	187	187	177	63	49	38	119	107	91
Csp005	160	156	145	255	255	250	164	136	114	129	113	98
Csp006	81	80	75	199	184	153	48	39	32	47	42	38
Csp007	229	228	208	255	255	245	105	95	85	134	138	139
Csp008	128	127	105	226	228	225	90	80	68	89	85	84
Csp009	97	94	89	232	229	212	124	120	117	65	61	58
Csp010	147	147	135	185	183	168	83	79	67	33	32	28
Csp011	126	125	121	172	168	167	73	70	53	125	126	121
Csp012	156	158	144	244	245	239	75	73	60	56	55	50
Csp013	166	167	151	239	240	234	75	66	48	52	48	39
Csp014	185	186	168	192	186	170	81	70	52	73	69	60
Csp015	187	185	164	207	205	184	118	110	89	77	72	53
Csp016	164	162	141	234	230	203	87	76	56	69	57	31
Csp017	182	182	180	212	212	202	39	34	28	61	58	53
Csp018	157	158	144	176	175	157	79	70	53	47	40	32
Csp019	121	115	99	223	222	204	82	76	54	75	62	46
Csp020	159	154	134	188	185	166	22	19	14	64	57	49
Csp021	44	41	34	195	193	168	35	31	22	51	44	34
Csp022	49	46	41	198	193	171	73	64	47	76	67	50
Csp023	127	124	109	194	193	175	97	80	60	70	58	42
Csp024	150	147	130	212	209	192	91	82	67	61	53	42
Csp025	129	128	108	200	197	178	91	84	66	75	66	48
Csp026	160	154	122	217	195	138	75	57	35	62	58	46
Csp027	118	115	100	220	197	147	79	57	36	85	80	76
Csp028	162	156	124	234	226	190	122	100	51	91	83	62
Csp029	32	32	30	255	251	222	108	91	65	68	64	52
Csp030	128	127	109	253	239	190	106	86	61	133	122	102
Csp031	211	208	175	230	218	160	93	80	45	99	94	75
Csp032	128	116	92	255	246	229	77	55	32	139	124	105
Csp033	44	42	43	255	254	255	112	94	58	115	107	96
Csp034	121	115	91	255	254	255	73	55	41	120	113	96
Csp035	169	160	127	255	249	223	99	80	48	140	131	113
Csp036	124	123	105	255	255	248	140	127	93	109	94	73

Anexo D. Continuação

Csp037	186	185	181	248	244	233	130	115	94	91	86	83
Csp038	176	159	141	255	245	239	119	91	70	117	100	90
Csp039	152	145	129	255	254	274	117	99	79	92	82	73
Csp040	160	157	148	222	222	210	69	59	47	104	94	84
Csp041	176	173	154	247	244	229	149	133	100	119	106	89
Ca 2	72	54	30	242	225	197	21	19	20	171	130	76
Ca 3	116	77	46	246	223	191	18	12	12	91	69	58
Ca 4	125	95	69	249	232	214	45	36	37	227	181	129
HB 1	100	71	37	249	223	164	56	34	20	159	118	62
HB2	199	184	161	241	234	224	61	41	30	73	62	58
HB 3	111	108	101	255	253	231	164	151	135	154	151	142
HB 4	70	61	56	255	255	247	135	111	87	115	99	83
HB 5	225	221	196	194	192	171	141	118	87	98	85	69

Anexo E: Artigo sobre quimerismo em *Callithrix* sp. publicado no periódico Anais da Academia Brasileira de Ciências (Silva *et al.*,2017).



Anais da Academia Brasileira de Ciências (2017) 89(4): 2793-2804
(Annals of the Brazilian Academy of Sciences)
Printed version ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690
<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720170484>
www.scielo.br/anabc | www.abcjournal.org

Cytogenetics and Molecular Genetic Analysis of Chimerism in Marmosets (*Callithrix*: Primates)

MONIQUE O.M. SILVA¹, JORGE LUÍS A. DE ARMADA², CARLOS EDUARDO S.
VERONA³, GABRIELA HELIODORO⁴ and DENISE M. NOGUEIRA⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ, Rodovia BR 465, Km 7, 23890-000 Seropédica, RJ, Brazil

²Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ, Rodovia BR 465, Km 7, 23890-000 Seropédica, RJ, Brazil

³Instituto Brasileiro para Medicina da Conservação/Instituto Triade, Rua Sálveira Lobo, 32, Caixa Postal 48, Casa Forte, 52061-030 Recife, PE, Brazil

⁴Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/IBRJ, Rua Jardim Botânico, 1008, 22470-180 Jardim Botânico, RJ, Brazil

Manuscript received on June 29, 2017; accepted for publication on September 11, 2017

ABSTRACT

The birth of fraternal twins is a characteristic frequently observed in callitrichids. Cytogenetic studies have demonstrated hematopoietic chimerism in marmosets with the occurrence of two cell lines: $2n=46,XX/46,XY$ in females and males co-twins, without phenotypic changes. Amplification by PCR have also been used to verify the presence of the *SRY* gene in female chimeras. Our aim was to verify the occurrence of chimerism in *Callithrix* sp. individuals considered as hybrids according to their intermediate phenotypes between *C. jacchus* and *C. penicillata*. Blood samples from 37 *Callithrix* sp. individuals were collected. Hematopoietic chimerism $2n=46,XX/46,XY$ was detected by cytogenetic analysis in five individuals, three males and two females. A fragment of approximately 200bp of the *SRY* gene was amplified in seven females with normal external genitalia. The percentage of 32% of chimeric individuals detected in the present study is similar to that observed for pure specimens of *Callithrix*. These data suggests that hybridization probably does not interfere with the occurrence of twin gestation, nor of chimerism. Although cytogenetics is the main tool to identify the two cell lineages present in cases of chimerism, the amplification of the *SRY* gene by PCR has proved to be more efficient to identify the Y chromosome in cases of chimeric female marmoset.

Key words: karyotype, *SRY*, chimeras, hybridization.

INTRODUCTION

The callitrichids are primates of the New World, from the order Primates, Platyrrhini infraorder and Callitrichidae family, which has seven genera:

Leontopithecus, *Saguinus*, *Cebuella*, *Mico*, *Callithrix*, *Callimico* and *Callibella* (Rylands et al. 2000), being the first two commonly called Tamarins and the others, Marmosets. They are characterized by their small size and by twin pregnancy, except in the genus *Callimico* (Miranda Ribeiro 1912) and *Callibella* (Van Roosmalen and

Correspondence to: Denise Moneira Nogueira
E-mail: deniserm@ufrj.br

Van Roozmalen 2003) that have only a cub by pregnancy (Hershkovitz 1977, Haig 1999, Reis et al. 2015).

The species that comprise the genus *Callithrix* (Erxleben 1777), namely: *C. jacchus*, *C. penicillata*, *C. aurita*, *C. geoffroyi*, *C. flaviceps* and *C. kuhlii* have pregnancy in an average of 145 days, with deliveries twice a year (Hill 1926, Oliveira et al. 2015). In addition to twins, there have been reports of birth of single, triple and even quadruple cubs, being the last two more common in captivity and with lower rates of individual survival (Tardif et al. 1984, Sweeney et al. 2012, Ward et al. 2014). When investigating the twin pregnancy in Marmosets, Hill (1926) found that the twins were from two oocytes and that they shared a single chorion. Later, Wislocki (1932, 1939) analyzing the placentas of several female marmosets with twin pregnancy, confirmed the anastomosis of the blood vessels. This anastomosis is responsible for the formation of chimaera individuals, which have chromosomally different cell lines derived from embryos of different sexes (Tarkowski 1970).

In humans, the occurrence of chimerism among monozygotic dizygotic twins is rare (Dunsford et al. 1953, Nicholas et al. 1957, Redline 2003, Assaf et al. 2010, Chen et al. 2013). It is found more often in cattle (Lillie 1916, 1917, Owen 1945, Dunn et al. 1968, Padula 2005), as well as in marmosets and tamarins (Wislocki 1932, 1939, Abbott 1984, Haig 1999, Wedi et al. 2011). In cattle, the whole gestation taken is approximately 290 days and the anastomosis of the placenta blood vessels occurs around the 30th to 40th day of gestation (Almeida and Resende 2012). In this case, the birth of chimeric females results in the freemartinism syndrome, (Lillie 1916, Padula 2005) classified as a disorder of sexual development (DSD) (Meyers-Wallen 2012) responsible for intersexuality of the female co-twin with a male with consequent masculinization of her reproductive tract. Most of freemartin are hermaphrodites, having ambiguous

genitalia being sterile or infertile (Herschler and Fehbeimer 1967, Mcfeely et al. 1967, Dunn et al. 1968, Padula 2005). This is because, in addition to the cellular exchange via anastomosis, the passage of androgenic hormones also occurs (Dominguez et al. 1990).

Bovine chimaera: presents the karyotype $2n=60,XX/60,XY$. These two cell lines can be detected by culture of the testicular tissue, bone marrow and peripheral blood lymphocytes (Ohno et al. 1962, Herschler and Fehbeimer 1967, Eldridge and Blazak 1976). Furthermore, it is also possible to amplify *SRY* gene sequences by Polymerase Chain Reaction (PCR) (Mullis et al. 1986) to confirm the chimerism (Padula 2005).

In mammals, the *SRY* gene is located on the short arm of the Y chromosome, and it is responsible for encoding a protein that, when expressed, initiates a cascade of events that lead to gonadal differentiation. This protein induces the formation of testes that are responsible for releasing androgenic hormones that lead to phenotypic sexual differentiation in males (Sinclair et al. 1990).

In callitrichids, the placental anastomosis initiates around the 19th day and it is complete around the 29th (Moore et al. 1985, Haig 1999), with cases of chimerism always coming from two or more concepts (Haig 1999). Chimaera unique cubs have been found, but this result possibly comes from the placental anastomosis with a co-twin that came to death followed by reabsorption of their fetal structures by the maternal organism (Jaquish et al. 1996). This characteristic is common in female marmosets and acts as a positive feedback in response to reproductive biology of the species to ensure the survival of the other twin (Tardif et al. 1984).

The hematopoietic chimerism in marmosets was firstly detected by conventional cytogenetic studies through the lymphocyte culture from peripheral blood and tissue culture of bone marrow, spleen and thymus. Two cell lines: $2n=46,XX/46,XY$

were found in marmosets (Benirschke et al. 1962, Benirschke and Brownhill 1963, Gengozian et al. 1964, 1969).

According to the karyotype, chromosome homogeneity is observed in five species of *Callithrix*, except for the size and morphology of the Y chromosome (Nagamachi et al. 1997). In the White-tufted-ear marmoset, *C. jacchus*, this chromosome can be metacentric, submetacentric or acrocentric, but in the Black-tufted-ear marmoset, *C. penicillata* it is metacentric or submetacentric (Nagamachi et al. 1997).

By PCR analyzes the *SRY* gene on the Y chromosome of males and females marmosets were amplified followed by DNA sequencing that proved to be identical for both males and females (Moreira 2002, Sanchez-Morgado et al. 2003, Takabayashi and Katoh 2011). Most cases of marmoset chimerism were studied in *C. jacchus*, a world-wide species used in biomedical research, being the first primate of the New World to have its genome sequenced (Worley et al. 2014). Specific XY chromosome probes have been developed as specific markers of chimerism in marmosets, allowing the precise identification of the cell type involved (Wedi et al. 2016).

In Brazil, *C. jacchus* is original from the Caatinga and Atlantic Forest biomes of Northeast and *C. penicillata* is native from the Cerrado in the Brazilian Central-Western (Hershkovitz 1977). According to the phenotype, *C. jacchus* exhibit white auricular tufts, gray coats in face, black crown and a white spot in the forehead. The back is light gray with dark streaks and a grayish brown tail with white rings around it. In *C. penicillata*, the auricular tufts are black with blackened face with a shiny white spot in the forehead. The back is light gray with dark streaks and a black tail with white rings around it (Oliveira et al. 2015). Both species were introduced in the Southeastern Brazil where they settled and have been mating, generating hybrid descendants (Mittermeier et

al. 1988, Rylands 1993, 2000, Mahkiewicz et al. 2015) including with the native marmoset species of the Southeast, *C. aurita* (Nogueira et al. 2011).

Our goal was to use the cytogenetic and the molecular genetic analyzes by means of PCR technique to verify the occurrence of hematopoietic chimerism in captive and free-living individuals of *Callithrix* sp. in the State of Rio de Janeiro, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Blood samples were collected by puncture of the femoral vein of 37 *Callithrix* sp. individuals (24 males and 13 females). The species to which the individuals belong could not be confirmed due to the occurrence of intermediate phenotypes between *C. jacchus* and *C. penicillata*, probably resulting from hybridization. For this reason, we used the nomenclature *Callithrix* sp.

The individuals were from three localities in the State of Rio de Janeiro. Eighteen free-living individuals were captured at the Botanical Garden of Rio de Janeiro/JBRJ (22°57' 22"59" S and 43°13.43'14" W); nine were from The Wild Animals Screening Center/CETAS-RJ/IBAMA (22°43'73"S and 43°42'28"W) and ten from the municipality of Campos dos Goytacazes, kept in the vivarium of the Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro/UFRJ.

In each animal, the coloration of the coat of the back and the head was examined, with an emphasis on the ear tufts and the characteristics of the external genitalia.

The free-living individuals were captured with Tomahawk trap (18 x 18 x 60 cm) and subsequently sedated with Ketamine and Midazolam (10 mg/kg, intramuscular) for biological sample collection, identification and microchip marking (Microchip-partners®; 12 mm x 2.1 mm; 0.06g) which was inserted into the interscapular region. After the full

were found in marmosets (Benirschke et al. 1962, Benirschke and Brownhill 1963, Gengozian et al. 1964, 1969).

According to the karyotype, chromosome homogeneity is observed in five species of *Callithrix*, except for the size and morphology of the Y chromosome (Nagamachi et al. 1997). In the White-tufted-ear marmoset, *C. jacchus*, this chromosome can be metacentric, submetacentric or acrocentric, but in the Black-tufted-ear marmoset, *C. penicillata* it is metacentric or submetacentric (Nagamachi et al. 1997).

By PCR analyzes the *SRY* gene on the Y chromosome of males and females marmosets were amplified followed by DNA sequencing that proved to be identical for both males and females (Moreira 2002, Sanchez-Morgado et al. 2003, Takabayashi and Katoh 2011). Most cases of marmoset chimerism were studied in *C. jacchus*, a world-wide species used in biomedical research, being the first primate of the New World to have its genome sequenced (Worley et al. 2014). Specific XY chromosome probes have been developed as specific markers of chimerism in marmosets, allowing the precise identification of the cell type involved (Wedi et al. 2016).

In Brazil, *C. jacchus* is original from the Caatinga and Atlantic Forest biomes of Northeast and *C. penicillata* is native from the Cerrado in the Brazilian Central-Western (Hershkovitz 1977). According to the phenotype, *C. jacchus* exhibit white auricular tufts, gray coats in face, black crown and a white spot in the forehead. The back is light gray with dark streaks and a grayish brown tail with white rings around it. In *C. penicillata*, the auricular tufts are black with blackened face with a shiny white spot in the forehead. The back is light gray with dark streaks and a black tail with white rings around it (Oliveira et al. 2015). Both species were introduced in the Southeastern Brazil where they settled and have been mating, generating hybrid descendants (Mittermeier et

al. 1988, Rylands 1993, 2000, Malnkiewicz et al. 2015) including with the native marmoset species of the Southeast, *C. aurita* (Nogueira et al. 2011).

Our goal was to use the cytogenetic and the molecular genetic analyzes by means of PCR technique to verify the occurrence of hematopoietic chimerism in captive and free-living individuals of *Callithrix* sp. in the State of Rio de Janeiro, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Blood samples were collected by puncture of the femoral vein of 37 *Callithrix* sp. individuals (24 males and 13 females). The species to which the individuals belong could not be confirmed due to the occurrence of intermediate phenotypes between *C. jacchus* and *C. penicillata*, probably resulting from hybridization. For this reason, we used the nomenclature *Callithrix* sp.

The individuals were from three localities in the State of Rio de Janeiro. Eighteen free-living individuals were captured at the Botanical Garden of Rio de Janeiro/JBRJ (22°57' 22"59" S and 43°13.43'14" W); nine were from The Wild Animals Screening Center/CETAS-RJ/IBAMA (22°43'73"S and 43°42'28"W) and ten from the municipality of Campos dos Goytacazes, kept in the vivarium of the Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro/UFRJ.

In each animal, the coloration of the coat of the back and the head was examined, with an emphasis on the ear tufts and the characteristics of the external genitalia.

The free-living individuals were captured with Tomahawk trap (18 x 18 x 60 cm) and subsequently sedated with Ketamine and Midazolam (10 mg/kg, intramuscular) for biological sample collection, identification and microchip marking (Microchip-partners®; 12 mm x 2.1 mm; 0.06g) which was inserted into the interscapular region. After the full

recovery, the free-living individuals were returned to their proper habitat.

All the procedures performed are in accordance with the System of Authorization and Information on Biodiversity/SISBIO (Number: 20435-2) and in the case of the animals of the UFRJ Vivarium, they were all registered in the National Council of Control of Animal Experimentation/CONCEA (Number: 01200.001568/2013-87).

CYTOGENETIC ANALYZES

To obtain metaphasic chromosomes, peripheral blood lymphocyte culture was performed (Moorhead et al. 1960). The chromosomes were stained with 3% Giemsa solution and the metaphases were analyzed under an Olympus® model CH30RF100 optical microscope, with a 100x objective.

The best metaphases were selected, photographed and the karyotype of each individual was assembled in the *Adobe Photoshop® CS3* program, following the organization according to Nagamachi et al. (1997).

MOLECULAR ANALYZES

To DNA extraction from the whole blood samples we used the saline precipitation method (Miller 1988). Genomic DNA was quantified in spectrophotometry (NanoDrop ND-2000, Thermo Scientific®).

For PCR, Forward (5'-TAC AGG CCA TGC ACA GAG AG-3') and Reverse (5'-CTA GCG GGT GTT CCA TTG TT-3') primers were used for amplification of a fragment of approximately 200bp of the *SRY* gene (Oliveira et al. 2010). The primer set was designed based in the *SRY* gene sequence of 838 bp generated by Moreira (2002) to amplify the region which includes the deletion of 9 bp in *C. murina*. The PCR product was sequenced and then aligned with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST- blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) to

confirm the *SRY* origin of the amplified fragment considering that there are other genes as *Sox 3* found on the X-chromosome of eutherian mammals (Graves 1998) that can present 50% of aminoacid similarity with the HMG box in *SRY*. With at least 100 sequences aligned there were significant similarity only with *SRY* gene sequence in many Primate species, confirming the *SRY* origin of the sequences amplified from the samples analyzed here. Each PCR reaction of 10 µL consisted of: 1X Buffer solution; 3 mM MgCl₂; 0.2 mM dNTPs; 1 µM of each primer; 1.25U of *Taq* DNA Polymerase and 10 to 20 ng/µl of genomic DNA. The reactions were amplified in the thermocycler (*ProFlex™ PCR System - Applied Biosystems® ThermoFisher Inc*), with the following temperature cycles: initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C during 1 min, ending with a period of extension at 72°C for 10 min.

PCR products were separated by electrophoresis in 5% polyacrylamide gel at 100V / 1h. In each gel besides the PCR product of the samples analyzed we also included a molecular weight marker (100 pb DNA ladder), a male and female positive control and a negative control reaction with ultra-pure water instead of DNA to verify occurrence of contamination of the reagents. The gel result was evaluated after staining with 0.2% silver nitrate solution and the gel image was captured using the transilluminator apparatus software (*J.Pix Loccus Biotechnology C.*).

RESULTS

The analyzes of morphological traits such as the presence of the white spot on the forehead characteristic of *C. jacchus* and *C. penicillata*, was present in all individuals analyzed. The coloration of the head coat and auricular tufts presented a gradation from black to white. On the back of the individuals a variation in color from light gray to

deep brown with transverse streaks were observed. On the tail, lighter colored rings around it was present. These characteristics contributed to classify as hybrids, *Callithrix* sp., the individuals studied. The analyzes of the external genitalia showed to be normal for both females, with the normal labia and vulva, as for the males, with scrotum and penis.

From the 37 individuals of *Callithrix* sp. studied cytogenetic analyzes was successful in 20 individuals, being 5 females and 15 males (Table I). In the remaining 17, it was not possible to obtain a result by this methodology. The analyzes of the karyotypes revealed a diploid number $2n=46,XX$ or XY , $NF=74$, being the X chromosome submetacentric and the Y metacentric, corresponding to the morphology described for *C. jacchus* and *C. penicillata*. The hematopoietic chimerism $2n=46,XX/46,XY$ was detected in five of the 20 analyzed individuals of *Callithrix* sp., being three males and two females (Figure 1).

Amplification of the 200 bp *SRY* gene fragment occurred in samples from 22 males of *Callithrix* sp. In only one sample, there was no amplification, probably due to the poor DNA quality (Table II). In the females, from the 13 studied, amplification of *SRY* gene fragment occurred in seven, including a female in which hematopoietic chimerism had already been detected in the cytogenetic analyzes. With respect to the other chimeric female detected by cytogenetics, we suppose that there was no amplification of the *SRY* gene, because of the low quality of the DNA extracted (Table II).

DISCUSSION

Hybridization in *Callithrix* was primarily investigated in captivity (Coimbra-Filho 1970, Coimbra-Filho and Maia 1976, Coimbra-Filho et al. 1976, Rylands 1993) being also reported in hybridization zones where *Callithrix* species originally occurs (Herzhkovitz 1975, Rylands et al. 2000, Arnold and Meyer 2006). Since the 1950's,

human intervention has been associated with the range expansion of both species (Vieira 1995, Avila-Pires 1969) and recently interbreeding of *C. jacchus* and *C. penicillata* in Southeastern Brazil, have been also confirmed in anthropogenic hybrid zones (Mahkiewicz et al. 2015, Cezar et al. 2017).

The presence of two cell lineages $2n=46,XX/46,XY$ in *Callithrix*, comes from the cellular exchange via placental anastomosis between heterosexual twins (Benirschke et al. 1962, Gengozian et al. 1964). The frequent occurrence of chimerism (Ardito et al. 1995, Gengozian et al. 1980) in callitrichids may be related to evolutionary aspects about their social systems (Haig 1999). In these animals, parental care depends on the father and other members of the group other than the mother, explained by the high-energy costs that the female would have for the creation of twins with two births per year (Santos and Martins 2000). According to Ross et al. (2007), the chimeric lineages could generate signs of recognition of kinship between the members of the group through the genomic and phenotypic homogeneity between the individuals. This may be one of the reasons that could explain the unusual attraction of the father by the cubs, which would favor the paternal and alloparental care in the callitrichids.

Anomalies in the external genitalia of chimaera individuals have not been reported in the cases studied so far in *Callithrix*. However, in a female chimaera of *Leontopithecus chrysomelas* ($2n=46,XX/46,XY$) clitoris enlargement and constriction of the vulvar opening were described (Goldschmidt et al. 2005). In the present study, the phenotype of the external genitalia was normal in males and females with chimerism, which corroborates previous studies that described that *Callithrix* chimaeras are normal and fertile (Benirschke et al. 1962, Ardito et al. 1995).

The detection of the chimerism occurred in 32% of the total number of sampled individuals of *Callithrix* sp., free-living and captive in the State of

TABLE I
Cellular lineages of the 20 individuals of *Callithrix* sp., with the diploid number, the identification code, sex, site and percentage of the chimerism observed for each individual. | | Number of metaphases found for each cell lineage.

Individual	Sex	Age	Site	Cellular Lineages	% Chimerism
Cap001	M	Juvenile	CETAS-RJ/BAMA	2n=46,XY[19]	0
Cap002	F	Adult	CETAS-RJ/BAMA	2n=46,XX[5]46,XY[2]	28%
Cap003	M	Adult	CETAS-RJ/BAMA	2n=46,XY[10]	0
Cap005	F	Adult	CETAS-RJ/BAMA	2n=26,XX[14]	0
Cap006	F	Adult	CETAS-RJ/BAMA	2n=46,XX[5]46,XY[5]	50%
Cap007	M	Adult	CETAS-RJ/BAMA	2n=46,XX[5]	0
Cap008	M	Adult	CETAS-RJ/BAMA	2n=46,XY[7]	0
Cap009	M	Juvenile	CETAS-RJ/BAMA	2n=46,XX[20]46,XY[5]	80%
Cap010	M	Adult	JBRJ	2n=46,XY[50]	0
Cap011	M	Adult	JBRJ	2n=46,XY[30]	0
Cap012	M	Adult	JBRJ	2n=46,XY[15]	0
Cap013	M	Adult	JBRJ	2n=46,XX[5]46,XY[6]	45%
Cap014	F	Adult	JBRJ	2n=26,XX[30]	0
Cap016	M	Juvenile	JBRJ	2n=46,XX[3]46,XY[1]	75%
Cap017	F	Adult	JBRJ	2n=26,XX[11]	0
Cap021	M	Juvenile	JBRJ	2n=46,XY[6]	0
Cap022	M	Adult	JBRJ	2n=46,XY[10]	0
Cap024	M	Juvenile	JBRJ	2n=46,XY[6]	0
Cap025	M	Adult	JBRJ	2n=46,XY[10]	0
Cap040	M	Adult	JBRJ	2n=46,XY[6]	0

Cap= *Callithrix* sp., M= Male, F= Female.

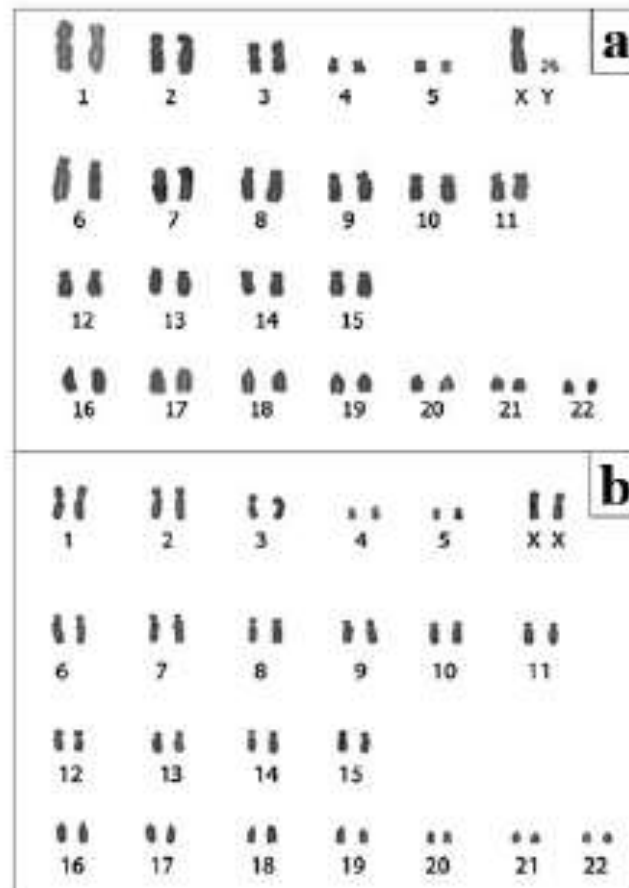


Figure 1 - Conventionally stained karyotype of a male *Callithrix* sp. with hematoepoietic chimerism, evidencing the two cell lines (a and b) $2n = 46,XX[5]/46,XY[25]$ [] Number of metaphases found for each cell lineage.

Rio de Janeiro, Brazil, by means of the cytogenetic analyzes and molecular amplification of the *SRY* gene by PCR. The PCR technique made it possible to detect the presence of the *SRY* gene in a larger number of females compared to cytogenetic analyzes.

Through cytogenetic analyzes, it was possible to identify chimerism in 13.5% of *Callithrix* sp. sampled. The low percentage of success in cell culture by this technique may be related to the

fact that the marmosets are animals weighing on average 350g (Oliveira et al. 2015), which reduces the total blood volume that can be collected. In addition, considering that obtaining metaphase chromosomes depends on approximately 30% of circulating nucleated white cells, the low number of metaphases analyzed in this study may have come from the small volume of blood collected from each individual also shared with molecular analyzes.

TABLE II
Callitrich sp. (23 males and 7 females) samples where a 200 bp fragment of the *SRY* gene was amplified by PCR, including identification code, sex, age and site.

Indivíduo	Sexo	Idade	Local	Gene <i>SRY</i>
Cap003	M	Adulto	CETAS-RJ/ IBAMA	+
Cap004	M	Juvenil	CETAS-RJ/ IBAMA	+
Cap006	F	Adulto	CETAS-RJ/ IBAMA	+
Cap007	M	Adulto	CETAS-RJ/ IBAMA	+
Cap008	M	Adulto	CETAS-RJ/ IBAMA	+
Cap009	M	Juvenil	CETAS-RJ/ IBAMA	+
Cap010	M	Adulto	JBRJ	+
Cap011	M	Adulto	JBRJ	+
Cap012	M	Adulto	JBRJ	+
Cap013	M	Adulto	JBRJ	+
Cap015	F	Adulto	JBRJ	+
Cap016	M	Juvenil	JBRJ	+
Cap017	F	Adulto	JBRJ	+
Cap018	M	Adulto	JBRJ	+
Cap019	M	Adulto	JBRJ	+
Cap021	M	Juvenil	JBRJ	+
Cap022	M	Adulto	JBRJ	+
Cap024	M	Adulto	UFRJ	+
Cap025	M	Adulto	UFRJ	+
Cap028	M	Adulto	UFRJ	+
Cap029	F	Adulto	UFRJ	+
Cap030	F	Adulto	UFRJ	+
Cap031	M	Adulto	UFRJ	+
Cap033	M	Adulto	UFRJ	+
Cap035	M	Adulto	UFRJ	+
Cap036	F	Adulto	UFRJ	+
Cap037	F	Adulto	UFRJ	+
Cap039	M	Adulto	UFRJ	+
Cap040	M	Adulto	JBRJ	+
Cap041	M	Adulto	JBRJ	+

Cap= *Callitrich* sp.; M= Male; F= Female; ++ presence *SRY* gene

In molecular genetic analyzes, the amplification of 200 bp of the *SRY* gene by the PCR technique was successful in approximately 78% of the total sampled (23 males and 7 females). In six females (46.15%) where the 2n=46,XY cell lineage had not been detected by cytogenetic analyzes, the PCR technique proved to be effective in demonstrating the presence of the *SRY* gene that is probably a consequence of the exchange of cells in these phenotypically normal individuals without sexual anomalies.

The causes of non-phenotypic alteration may be related to the existence of protection mechanisms that minimize the effects of the male twinning of the co-twin. Some of these mechanisms were assumed by French et al. (2016), which compare the reproductive and survival potential of at least one male co-twin callitrichids females with non-co-twin males and also analyzed the coding regions of genes linked to sexual differentiation. In the first case, no significant differences were observed between male and non-female co-twin females, showing that the presence of males in gestation does not alter the reproductive behavior nor influence on the survival of these females. Already in the second case, amino acid substitutions of the proteins expressed from the candidate genes have been observed to be responsible for the effects of endocrine regulation of the anti-Müllerian (AMH) hormones and steroids that are associated with sexual differentiation in mammals. These substitutions predicted in programs that assess the impact on the biological function of proteins, were mainly significant for the AMH system which, according to the authors reduce the channeling of early reproductive development toward the male phenotype.

Although there has been more success in *SRY* gene amplification by PCR, the use of this methodology alone is not enough to prove the occurrence of chimerism. In normal males, this gene is normally located on their Y chromosome,

and in the females, the presence of the *SRY* gene may also be from translocation or unequal crossing-over during Meiosis. A similar case was analyzed by Sanchez-Morgado et al. (2003), who studied a female *Callithrix jacchus*, with atypical external genitalia exhibiting only one opening to the urethra, without the presence of vulva or testicles. By PCR, the *SRY* gene were amplified and the sequencing did not reveal mutation leading the authors to diagnose as an XY female, probably considering the abnormalities of the external genitalia. Nevertheless, in our view, due to the presence of a normal *SRY* gene, it was expected that the individual presented testes instead of ovaries. However, the karyotype analyzes was not performed to ascertain whether there was only one cell line, $2n=46,XY$, or the chimeric line $2n=46,XX/46,XY$.

A methodology developed by Wedi et al. (2016) seems to be a suitable identification of the cell line with chimerism. The authors developed probes for Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) of the X and Y chromosomes of marmosets that can be used for any nucleated cell, allowing to identify precisely in which cellular types the chimerism occurs. In the absence of cells in metaphases originated from peripheral blood lymphocyte culture, interphase and metaphase cells obtained from other cultures such as the medulla, liver and spleen may be used. In addition, as a single cell-based cytological sexing technique it would not be questioned about contamination of various types of biological sample with blood, differently from other techniques that could produce false positives in relation to blood nucleated cell contamination.

Thus, we emphasize the importance of performing cytogenetic and molecular analyzes to diagnose chimerism in mammals, taking into account the limitations of both techniques and the possibility of errors in the interpretation of the result obtained only by PCR amplification of the *SRY* gene or based on the characteristics of the external genitalia.

The percentage of 32% of chimeric individuals detected in the present study is close to that observed by other authors in marmosets who analyzed a sample number similar to that reported here (Ardito et al. 1995, Gengozian et al. 1964) in the callitrichids. These data demonstrate that hybridization probably does not interfere with the occurrence of twin gestation, nor of chimerism. This is corroborated by the studies with *Callithrix* sp. (*C. jacchus* x *C. penicillata*) fertile hybrids in captivity (Coimbra-Filho and Maia 1976, Coimbra-Filho et al. 1976) and free-living in hybridization zones (Herzhkovitz 1975). High levels of fertility in chimeric individuals was demonstrated by Ardito et al. (1995), where females $2n=46,XX/46,XY$ generated more concepts than females $2n=46,XX$.

Although cytogenetics is the main tool to identify the two cell lineages present in cases of chimerism, the amplification of the *SRY* gene by PCR must be used to identify the Y chromosome mainly in females. A multidisciplinary approach using the confirmation of chimerism by cytogenetics and molecular genetics together with the clinical examination, histological analyzes of gonads, hormonal dosage, and behavioral assessment with a focus on paternal and alloparental care can provide a more comprehensive framework of the implications of chimerism in marmosets.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for providing a Master scholarship to Monique O.M. Silva and the Prof. Dr. Flavia Spreaficomo of the Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio Janeiro (UFRJ) for providing blood samples from the individuals of *Callithrix* sp. in captivity. We also thank the undergraduate student in Biological Sciences, Jessica Andrade, for helping in collecting and in the cytogenetic analyzes and the JBRJ Trainees for assisting in the captures.

REFERENCES

- ABBOTT DH. 1984. Differentiation of sexual behaviour in female marmoset monkeys: effects of neonatal testosterone or a male co-twin. *Prog Brain Res* 61: 349-358.
- ALMEIDA J AND RESENDE AO. 2012. Freemartinismo em bovinos: revisão de literatura. *RPCV* 107(583-584): 133-141.
- ARDITO G, LAMBERTI L, BIGATTI E, CROVELLA S AND OBERTO G. 1995. No correlation between chimerism and fertility in *Callithrix jacchus* (Callitrichidae, Primates). *Int J Anthropol* 10(1): 15-19.
- ARNOLD ML AND MEYER A. 2006. Natural hybridization in primates: One evolutionary mechanism. *Zoology* 109: 261-276.
- ASSAF SA, RANDOLPH LM, BENIRSCHKE K, WU S, SAMADI R AND CHMAIT RH. 2010. Discordant blood chimerism in dizygotic monozygotic laser-treated twin-twin transfusion syndrome. *Obstet Gynecol* 2: 483-485.
- AVILA-PIRES FD. 1969. Taxonomia e zoogeografia do gênero *Callithrix* (Erdmann, 1777) (Primates: Callitrichidae). *Rev Brasil Biol* 29: 49-64.
- BENIRSCHKE K AND ERNSTER JM AND BROWNELL LE. 1962. Marrow chimerism in marmosets. *Science* 138: 513-515.
- BENIRSCHKE K AND BROWNELL LE. 1963. Heterosexual cells in testes of chimeric marmoset monkey. *Cytogenetics* 2: 331-341.
- CEZAR AM, PESSOA LM AND BONVICINO CR. 2017. Morphological and genetic diversity in *Callithrix* hybrids in an anthropogenic area in Southeastern Brazil (Primates: Cebidae: Callitrichinae). *Zoologia* 34: 1-9.
- CHEN K, CHMAIT RH, VANDERBILT D, WU S AND RANDOLPH LM. 2013. Chimerism in monozygotic dizygotic twins: Case study and review. *Am J Med Genet* 161A: 1817-1824.
- COIMBRA-FILHO AF. 1970. Acerca de um caso de hibridismo entre *Callithrix jacchus* (L., 1758) x *C. geoffroy* (Humboldt, 1812) (Callitrichidae, Primates). *Rev Brasil Biol* 30(4): 507-517.
- COIMBRA-FILHO AF, ROCHA NC AND PIZZINATTI A. 1976. Gestação quadupla de triplo-híbridos em *Callithrix duplo-híbrida* (Callitrichidae, Primates). *Rev Brasil Biol* 36(3): 675-681.
- COIMBRA-FILHO AF AND MAIA AA. 1976. Hibridismo de *Callithrix geoffroy* (Humboldt, 1812) x *C. jacchus* (Linnaeus, 1758), e criação artificial de filhote híbrido (Callitrichidae, Primates). *Rev Brasil Biol* 36(3): 665-673.
- DOMINGUEZ MM, LIPTRAP RM, CROY BA AND BASRUR PK. 1990. Correlates of Ovarian Alterations in Bovine Freemartin Fetuses. *Anim Reprod Sci* 22: 181-201.
- DUNN HO, KENNEY RM AND LEIN DH. 1968. XXXY chimerism in a bovine true hermaphrodite: an insight into the understanding of freemartinism. *Cytogenetics* 7: 390-402.
- DUNSFORD I, BOWLEY CC, HUTCHISON AM, THOMPSON JS, SANGER R AND RACE RR. 1953. A Human Blood-Group Chimera. *Brit Med J* 2: 81.
- ELDRIDGE FE AND BLAZAK WF. 1976. Chromosomal Analysis of Fertile Female Heterosexual Twins in Cattle. *J Dairy Sci* 60(3): 458-463.
- FRENCH JA, FRYE B, CAVANAUGH J, REND, MUSTOE AC, RAPAPORT I AND MICKELBERG J. 2016. Gene changes may minimize masculinizing and feminizing influences of exposure to male co-twins in female callitrichine primates. *Biol Sex Differ* 7(28): 1-11.
- GENGOZIAN N, BATSON JS AND EIDE P. 1964. Hematologic and cytogenetic evidence for hematopoietic chimerism in the marmoset, *Tamarinus nigricollis*. *Cytogenetics* 3: 384-393.
- GENGOZIAN N, BATSON JS, GREENE CT AND GOSSLEE DG. 1969. Hemopoietic chimerism in imported and laboratory-bred marmosets. *Transplantation* 8: 633-652.
- GENGOZIAN N, BREWEN JG, PRESTON RJ AND BATSON JS. 1980. Presumptive evidence for the absence of functional germ cell chimerism in the marmoset. *J Med Primatol* 9: 9-27.
- GOLDSCHMIDT B, MORAES IA, SOUZA LM, PAULINO FS, PIZZINATTI A, MARSICO FF, FERREIRA AMR AND PINHO TG. 2005. Occurrence of vitellization signals in a female marmoset *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichidae, Primates) with 46,XX/46,XY chimerism. *Int J Vet Med* 60(3): 86-88.
- GRAVES JM. 1998. Evolution of the Mammalian Y Chromosome and Sex-Determining Genes. *J Exp Zool* 281: 472-481.
- HAIJ D. 1999. What is a marmoset? *Am J Primatol* 49: 285-296.
- HERSCHLER MS AND FECHHEIMER NS. 1967. The Role of Sex Chromosome Chimerism in Altering Sexual Development of Mammals. *Cytogenetics* 6: 204-212.
- HERSHEKOVITZ P. 1975. Comments on the Taxonomy of Brazilian Marmosets (Callithrix, Callitrichidae). *Folia primatol* 24: 137-172.
- HERSHEKOVITZ P. 1977. Living New World monkeys (Platyrrhini) with an introduction to Primates. Vol. 1. Chicago: Chicago University Press, 1,132 p.
- HILL JP. 1926. Demonstration of the Embryologia varia (development of *Haplorhina jacchus*). *J Anat* 60: 486-487.
- JAQUISH CE, TARDIF SD, TOAL RL AND CARSON RL. 1996. Patterns of prenatal survival in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Med Primatol* 25: 57-63.
- LILLIE FR. 1916. The theory of the freemartin. *Science* 43: 611-613.

- LILLIE FL. 1917. The freemartin: a study of the action of sex hormones in the foetal life of cattle. *J Exp Zool* 23: 371-452.
- MALUKIEWICZ J, BOERE V, FUZESEY LF, GRATVOL AD, DE OLIVEIRA E SILVA I, FERREIRA LCM, RUIZ-MIRANDA R, VALENÇA YM AND STONE AC. 2015. Natural and Anthropogenic Hybridization in Two Species of Eastern Brazilian Marmosets (*Callithrix jacchus* and *C. penicillata*). *PLoS ONE* 10(6): 1-22.
- MCFEELY RA, HARE WCD AND BIGGERS JD. 1967. Chromosome Studies in 14 Cases of Intersex in Domestic Mammals. *Cytogenetics* 6: 242-253.
- MEYERS-WALLEN VN. 2012. Gonadal and Sex Differentiation Abnormalities of Dogs and Cats. *Sex Dev* 6: 46-60.
- MILLER SA, DYKES DD AND POLESKY HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
- MIRANDA RIBEIRO A. 1912. Dois novos símios da nossa fauna. *Brazil. Ranschea* 2(1): 21-23.
- MITTERMEIER RA, RYLANDS AB AND COMBRA FILHO AF. 1988. Systematics: species and subspecies – an update. In: Mittermeier RA, Rylands AB, Coimbra-Filho AF and da Fonseca GAB (Eds), p. 13-75.
- MOORE HDM, GEMS S AND HEARN JP. 1985. Early Implantation stages in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Am J Anat* 172: 265-278.
- MOORHEAD PS, NORWELL PC, MELLMAN WJ, BATTIPS DM AND HUNGERFORD DA. 1960. Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood. *Exp Cell Res* 20: 613-615.
- MOREIRA MA. 2002. *SRF* evolution in Cebidae (Platyrrhini Primates). *J Mol Evol* 55: 92-103.
- MULLIS KB AND FALOONA EA. 1986. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* 155: 335-350.
- NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, SCHWARZ M, BARROS RMS AND MATTEVI MS. 1997. Comparative chromosomal study of five taxa of genus *Callithrix*, group *jacchus* (Platyrrhini, Primates). *Am J Primatol* 41: 53-60.
- NICHOLAS JW, JENKINS WJ AND MARSH WL. 1957. Human Blood Chimeras: A study of surviving twins. *Brit Med J* 1: 1458-1460.
- NOGUEIRA DM, FERREIRA AMR, GOLDSCHMIDT B, PISSINATTI A, CARELLI JB AND VERONA CE. 2011. Cytogenetic study in natural hybrids of *Callithrix* (Callitrichidae: Primates) in the Atlantic forest of the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Heredia* 101(3): 156-160.
- OHNO S, TRUJILLO JM, STENIUS C, CHRISTIAN LC AND TEPLITZ RL. 1962. Possible Germ Cell Chimeras Among Newborn Dizygotic Twin Calves (*Bos taurus*). *Cytogenetics* 1: 258-265.
- OLIVEIRA AMD, NOGUEIRA DM, FERREIRA AMR, PISSINATTI A AND CARVALHO EFD. 2010. *SRF* Gene Polymorphism: A Tool To Evaluate Natural Hybridization In South American Primates: Haploid DNA markers in forensic genetics, 64 p.
- OLIVEIRA GR, AMORA TD, REIS NR, PERACCHI AL AND ROSA GLM. 2015. Gênero *Callithrix* (Erxleben, 1777). *Primates do Brasil: guia de campo*. In: Reis NR, Peracchi AL, Batista CB and Rosa GLM (Eds), p. 64-77.
- OWEN RD. 1945. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* 102: 400-401.
- PADULA AM. 2005. The freemartin syndrome: an update. *Anim Reprod Sci* 87: 93-109.
- REDLINE RW. 2003. Nonidentical twins with a single placenta-disproving dogma in perinatal pathology. *N Engl J Med* 349: 111-114.
- REIS NR, PERACCHI AL, BATISTA CB AND ROSA GLM. 2015. *Primates do Brasil: Guia de campo*. Rio de Janeiro: Technical Books, 328 p.
- ROSS CN, FRENCH JA AND ORTI G. 2007. Germ-line chimerism and paternal care in marmosets (*Callithrix jacchus*). *PNAS* 104(15): 6278-6282.
- RYLANDS AB. 1991. Marmosets and Tamarins: Systematics, Behaviour, and Ecology. Oxford: Oxford University Press, 396 p.
- RYLANDS AB, SCHNEIDER H, LANGGUTH A, MITTERMEIER RA, GROVES CP AND RODRIGUEZ-LUNA E. 2000. An assessment of the diversity of new world primates. *Neotrop Primates* 8: 61-93.
- SANCHEZ-MORGADO JM, HAWORTH R AND MORRIS TH. 2003. XY female marmoset (*Callithrix jacchus*). *Comp Med* 53: 539-544.
- SANTOS CV AND MARTINS MM. 2000. Parental care in the buffy-tufted-ear marmoset (*Callithrix aurita*) in wild and captive groups. *Rev Brasil Biol* 60(4): 667-672.
- SINCLAIR AH, BERTA P, PALMER MS, HAWKINS JR, GRIFFITHS BL, SMITH MJ, FOSTER JW, FRISCHAUF AM, LOVELL-BADGE R AND GOODFELLOW PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
- SWEENEY CG, WARD JM AND VALLENDER EJ. 2012. Naturally occurring, physiologically normal, primate chimeras. *Landes Bioscience Chimerism* 3(2): 43-44.
- TAKABAYASHI S AND KATO H. 2011. Sex Identification Using the *ZFX* and *ZFY* Genes in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). *Exp Anim* 60(4): 417-420.
- TARDIF SD, RICHTER CB AND CARSON RL. 1984. Reproductive performance of three species of Callitrichidae. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 34(3): 272-275.
- TARKOWSKI AK. 1970. Germ cells in natural and experimental chimeras in mammals. *Phil Trans R Soc Lond B* 259: 107-111.

- VAN ROOSMALEN MGM AND VAN ROOSMALEN T. 2003. The description of a new marmoset genus, *Callithrix* (Callitrichinae, Primates), including its molecular phylogenetic status. *Neotrop Primates* 11(1): 1-10.
- VIEIRA CC. 1955. Lista remissiva dos mamíferos do Brasil. *Archiv Zool Foc S Paulo* 8: 341-474.
- WARD JM, BUSLOV AM AND VALLENDER EJ. 2014. Twinning and Survivorship of Captive Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) and Cotton-Top Tamarins (*Sapajus oedipus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 53(1): 7-11.
- WEDI E, MÜLLER S, NEUSSER M, VOGT PH, TKACHENKO OY, ZIMMER CJ, SMEETS D, MICHELMANN GHW AND NAYUDU APL. 2016. Detection of cross-sex chimerism in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) in interphase cells using fluorescence in situ hybridization probes specific for the marmoset X and Y chromosomes. *Reprod Fertil Dev* 29(5): 913-920.
- WEDI E, NAYUDU PL AND MICHELMANN HW. 2011. A case report of spontaneous opening of congenitally fused labia in a female common marmoset (*Callithrix jacchus*) followed by pregnancy and birth of twins. *J Med Primatol* 40: 351-353.
- WISLOCKI GB. 1932. Placentation in the marmoset (*Callithrix jacchus*) with remarks on twinning in monkeys. *Anat Rec* 52: 381-399.
- WISLOCKI GB. 1939. Observations on twinning marmosets. *Am J Anat* 64: 445-483.
- WORLEY KC ET AL. 2014. The common marmoset genome provides insight into primate biology and evolution. Marmoset Genome Sequencing and Analysis Consortium. *Nat Genet* 46(8): 850-857.