



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB



Departamento de Ciências Biológicas - DCB

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação - PPGGBC

**Identificação molecular de macacos-prego (gênero *Sapajus*) de cativeiro no estado da Bahia revela erros na classificação taxonômica das espécies e indícios de hibridação**

NÁDIA AMORIM PEREIRA

JEQUIÉ-BA  
2013

NÁDIA AMORIM PEREIRA

**Identificação molecular de macacos-prego (gênero *Sapajus*) de cativeiro no estado da Bahia revela erros na classificação taxonômica das espécies e indícios de hibridação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação (PPGGBC), da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Maria Iracilda C. Sampaio

Co-orientador: Paulo Roberto A. M. Affonso

JEQUIÉ-BA  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

PPGGGBC

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

Campus de Jequié-BA

**DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

Título: Identificação molecular de macacos-prego (gênero *Sapajus*) de cativeiros no estado da Bahia revela erros na classificação taxonômica das espécies e indícios de hibridação.

Autora: Nádia Amorim Pereira

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO pela Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Paulo Roberto A. de Mello Affonso.

Presidente

---

Prof. Dr. Marcelo Cervini – UESB/ Jequié

---

Profa. Dra. Olívia Maria Pereira Duarte – UNIVASF/Senhor do Bonfim

Data de realização: 29 de abril de 2013.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Maria Iracilda Sampaio pela orientação e que desde o primeiro contato, antes da seleção, contribuiu para meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Professor Paulo Roberto A. de Mello Affonso pela atenção e incentivo durante toda construção desse trabalho.

Aos responsáveis pelos CETAS de Vitória da Conquista, Salvador e Porto Seguro, bem como ao responsável pelo Parque Municipal da Matinha em Itapetinga, por permitir que este trabalho fosse realizado com os espécimes cativos de cada local.

Aos veterinários Aderbal e Rosana do CETAS de Vitória da Conquista, pela contribuição na coleta do sangue dos espécimes cativos.

Ao veterinário Robert Lemos do Parque Municipal da Matinha por todo tempo dedicado a colaboração desse trabalho, coletando sangue dos espécimes do Parque e do CETAS de Salvador.

Aos tratadores pela disponibilidade em capturar os animais, sempre com cuidados necessários, evitando que os animais se machucassem no momento da captura.

Aos Professores Caroline Garcia e Marcelo Cervini, pela participação na banca da qualificação e pelas instruções iniciais para desenvolvimento das técnicas de citogenética e extração de DNA.

Ao Jeferson Carneiro do Laboratório de Genética da Universidade Federal do Pará, por todo aprendizado adquirido quanto as técnica de biologia molecular e pelas sugestões sempre pertinentes.

Às colegas Naiana Matos e Milena Ferreira, pelo companheirismo e transmissão das técnicas de Banda C e AG NOR no laboratório de Citogenética.

Aos sempre amigos e companheiros de estrada e morada em Jequié, Lilian Moreira, Matheus Salões, Eva Clícia e Daniel Moreira. Sem vocês os dias teriam sido monótonos e longos.

A todos os colegas dos Laboratórios de Citogenética e Biologia Molecular do *Campus* de Jequié, que sempre contribuíram tirando dúvidas e evitando equívocos.

À Jamille Bitencourt e Lídia Nogueira por transmitir o “passo-a-passo” dos programas utilizados na análise de dados.

A todos os colegas da turma, em especial a Silene e Isac, pela amizade construída.

Aos professores do Programa de Genética, Biodiversidade e Conservação, pela contribuição na construção do conhecimento.

A minha família e amigos, pelo apoio e cumplicidade permanente.

PPGGGBC

## **BIOGRAFIA**

Nádia Amorim Pereira, filha de Maria Auta Amorim e José Martins Pereira, nasceu em Itapetinga, Bahia, em 11 de janeiro de 1977.

Terminou o ensino básico em 1994. Trabalhou na Educação Básica, em escolas particulares de 1995 até 1997.

Em 1998, passou no Concurso Público para Professores da Rede Municipal de Ensino.

Em 2001, ingressou na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Vitória da Conquista, no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

No final de 2005, foi aprovada no Concurso Público para Professores do Estado da Bahia.

Em agosto de 2006, concluiu o curso de graduação.

Em 2007, foi convocada pelo Governo do Estado da Bahia, como professora do Ensino Médio.

Em 2008, ingressou no curso de Especialização em Meio Ambiente e Desenvolvimento da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Itapetinga, concluído em 2009.

Em fevereiro de 2011, iniciou o curso de Mestrado em Genética, Biodiversidade e Conservação na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Jequié, nas área Biodiversidade e Conservação.

## RESUMO

O alto polimorfismo intra e interpopulacional dos macacos-prego tem gerado controvérsias na taxonomia desses primatas por décadas. Recentemente, análises moleculares separaram esse grupo em dois gêneros: *Cebus*, e *Sapajus*, englobando quatro e oito espécies, respectivamente. Seis dessas espécies, *S. xanthosternos*, *S. flavius*, *S. robustus*, *S. nigritus* e *C. kaapori* estão na Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN. A conservação *ex situ* é uma estratégia para conservação do grupo, porém, a incerteza taxonômica e a hibridação prejudicam a elaboração de planos de manejo efetivos. O presente trabalho foi realizado a fim de identificar a identidade genética das espécies de macacos-pregos em cativeiros da Bahia e verificar a existência de híbridos, utilizando abordagem molecular. Amostras de sangue de 51 espécimes dos CETAS de Salvador, Vitória da Conquista, Porto Seguro e do Parque Municipal da Matinha em Itapetinga foram utilizadas para extração do DNA (licença SISBIO número 31132-2). Sequências de DNA mitocondrial (D-loop e Cytb) e nuclear (CeSa 1 e Cebidae 5) foram alinhadas e comparadas com sequências disponíveis no GenBank. As análises por Neighbor-Joining e máxima parcimônia usando distância de Kimura 2-parâmetros mostraram que os haplótipos se distribuem aleatoriamente, independentemente da localização das coletas. Todas as sequências dos exemplares da Bahia agruparam com o gênero *Sapajus*. Devido à baixa distância genética nos marcadores mitocondriais em relação aos dados do GenBank, foi possível indicar a classificação taxonômica dos indivíduos, com divergência da nomenclatura usada no registro dos animais em certos casos. Por exemplo, os 14 espécimes do Parque Municipal da Matinha classificados como *S. apella*, nove foram identificados como *S. libidinosus* e cinco como *S. xanthosternos*. A análise dos marcadores nucleares mostrou que alguns indivíduos formaram agrupamentos diferentes daqueles observados nos marcadores de mtDNA. A diferença entre marcadores mitocondriais e nucleares pode ser um indício de hibridação. Assim, a correta identificação das espécies e dos possíveis híbridos pode auxiliar na elaboração de planos de manejo adequados, garantindo a reprodução de espécies “puras” no cativeiro e auxiliando na escolha correta do possível local para soltura.

Palavras-chave: Macaco-prego, taxonomia, hibridação, marcadores moleculares.



## ABSTRACT

The high levels of inter and intrapopulation polymorphism of capuchin monkeys has been responsible for the controversy in taxonomy of these animals for decades. Recently, studies based on molecular analyses separated capuchins into two genera: *Cebus* and *Sapajus*, comprising four and eight species, respectively. Six of these species, *S. xanthosternos*, *S. flavius*, *S. robustus*, *S. nigritus* and *C. kaapori* are in the IUCN Red List of Threatened Species. The *ex situ* conservation is one of the strategies available to their conservation, although taxonomic uncertainties and hybridization jeopardize effective management plans. The present work was carried out in order to identify the genetic identity and the putative hybridization of captive robust capuchins in Bahia using a molecular approach. Blood samples of 51 specimens from CETAS in Salvador, Vitória da Conquista, Porto Seguro and Matinha Park in Itapetinga were used to DNA extraction (SISBIO license number 31132-2). Sequences from mitochondrial DNA (D-loop and Cytb) and nuclear DNA (CeSa 1 e Cebidae 5) were aligned and compared to other sequences in GenBank. Neighbor-Joining and Maximum Parsimony analyses based on Kimura 2-parameter distances revealed that haplotypes are randomly spread, independently on collection sites. All sequences from Bahia state clustered within *Sapajus*. Since the genetic distance in mitochondrial DNA (mtDNA) was low in relation to GenBank data, it was possible to provide a taxonomic identification of individuals, which diverged from the classification used in the animal record in some cases. For instance, out of the 14 specimens from Matinha Park classified as *S. apella*, nine were identified as *S. libidinosus* and five as *S. xanthosternos*. Analyses based on nuclear sequences of some individuals showed different clusters than those obtained by mtDNA. Such divergence between nuclear and mtDNA might indicate hybridization events. Therefore, the proper identification of species and hybrids is helpful to management programs once it assures the reproductions of pure species in captivity and definition of correct areas for reintroduction.

Keywords: capuchins monkey, taxonomy, hybridization, molecular markers.

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 01:** Classificação taxonômica do gênero *Cebus* de acordo com cada autor. Termos em negrito indicam espécies, os demais subespécies.....23

**Tabela 02:** Classificação taxonômica do gênero *Sapajus* de acordo com cada autor. Termos em negrito indicam espécies, os demais indicam subespécies.....24

**Tabela 03:** Condições de amplificação de cada *primer* usado no trabalho. Em F, sequência forward; Em R, sequência reverse.....38

**Tabela 04:** Identificação dos indivíduos usados no estudo, localização das coletas, haplótipos formados nos marcadores usados no estudo e código de identificação do GenBank. No local de coleta as letras A, B, C e D correspondem respectivamente a Parque Municipal da Matinha, CETAS de Salvador, CETAS de Vitória da Conquista e CETAS de Porto Seguro.....41

**Tabela 05:** Classificação sugerida, após análise das árvores de Neighbor-Joining (NJ) e comparação das distâncias genéticas entre amostras coletas e as retiradas do GenBank, tendo como região analisada o Cytb. Os números representam as amostras e as letras A, B, C e D correspondem respectivamente aos locais de coleta: Parque Municipal da Matinha, CETAS de Salvador, CETAS de Vitória da Conquista e CETAS de Porto Seguro.....51

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 01.** Diferenças morfológicas em crânios adultos de machos. 1 *Cebus* sem tufo. 2 *Cebus* com tufo (arcada dentária robusta, mandíbulas maiores e a presença de uma crista sagital no crânio) (Fonte: Lynch Alfaro *et al*, 2012) .....22
- Figura 02.** (a) distribuição geográfica do gênero *Cebus* e (B) distribuição geográfica do gênero *Sapajus*.....26
- Figura. 03:** Agrupamento de Neigbor-joining (NJ) baseado no sequenciamento do Cytb. Os números nos nós indicam o valor do *bootstrap*. As letras A, B, C e D indicam a localidade do espécime. Em destaque os haplótipos. Localidade e haplótipos são indicados na tabela 4.....43
- Figura 04:** Agrupamento Máxima Parcimônia (MP) baseado no sequenciamento do Cytb. Os números nos nós indicam o valor do *bootstrap* .....44
- Figura 05:** Haplótipo 14 (a, b, c), juvenil, sem as características marcantes dos machos adultos, mas com a coloração amarelada de *S. flavius*. Haplótipo 3 (c, d, e f) com coloração amarelada e saco grande na garganta (d), típico de machos adultos de *S. flavius*.....46
- Figura 06:** Distribuição geográfica dos gêneros *Cebus* e *Sapajus*. (Fonte: Pesquisa FAPESP, junho de 2012).....47
- Figura 07:** Amostras do haplótipo 4 com destaque para a morfologia do capuz das amostras 48 (c), 50 (d) e 52 (e). Em b, morfologia cronológica de 1 a 5 do capuz em *S. robustus* proposta por Silva (2001) e em a, ilustração em faixas etárias (3 a 12 anos) proposta por Torres de Assumpção.....48
- Figura 8:** Figura Haplótipo 5 com morfologia característica de *S. robustus* com dois tufos convergentes no alto da cabeça (a), pêlos ventrais (b) e dorsais (c) marrons avermelhados e extremidade dos membros marrom-enegrecida.....49
- Figura 9:** Agrupamento por Neigbor-joining (NJ) baseado no sequenciamento do D-loop. Os números nos nós indicam o valor do *bootstrap*. As letras A, B, C e D indicam a localidade do espécime descrito tabela 4.....52
- Figura 10:** Agrupamento (NJ) baseados na região CeSa do DNA nuclear. Os números nos nós indicam o valor do *bootstrap*. Haplótipos são indicados na tabela 4.....55
- Figura 11:** Agrupamento (NJ) baseados na região Cebidae5 do DNA nuclear. Os números nos nós indicam o valor do *bootstrap*. Haplótipos são indicados na tabela 4.....56

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 Conceito de Espécie.....	15
2.2 Características gerais dos gêneros <i>Cebus</i> e <i>Sapajus</i> .....	17
2.3 História Taxonômica dos macacos-pregos .....	18
2.4 Análises moleculares na filogenia e evolução de Primatas .....	27
2.4.1 Elementos de Transposição do DNA nuclear.....	27
2.5 Hibridação de espécies e conservação <i>ex situ</i> .....	31
3. OBJETIVOS .....	35
3.1 Objetivo Geral .....	35
3.2 Objetivos Específicos .....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Amostragem .....	36
4.2 Extração e Quantificação.....	36
4.3 PCR e Sequenciamento .....	37
4.4 Análises Moleculares.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
5.1 Marcadores Mitocondriais.....	40
5.1.1 COI .....	40
5.1.2 Cytb .....	42
5.1.3 D-loop.....	50
5.2 Marcadores nucleares .....	53
5.3 Verificação de híbridos.....	53
6. CONCLUSÕES .....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

Os gêneros *Cebus* e *Sapajus* compreendem primatas neotropicais comumente chamados de macacos-prego. Possuem ampla distribuição geográfica, com o gênero *Cebus* habitando o norte da América do Sul e América Central e o gênero *Sapajus* se distribuindo pela região central, litorânea e sul da América do Sul. Com uma dieta bem variada, esses primatas são importantes na renovação de florestas, uma vez que as sementes por eles ingeridas são dispersas através das fezes.

Os macacos-prego possuem alto grau de polimorfismo, com ampla variação na coloração do pêlo, mesmo em indivíduos de uma mesma população, dificultando a identificação precisa das espécies baseada apenas em caracteres cromáticos. Como consequência de toda essa variação, a taxonomia do grupo passou por diversas mudanças desde que o primeiro indivíduo foi descrito no século XVIII. A divisão em dois gêneros, resultado de trabalho que reuniu dados morfológicos, de distribuição geográfica e análises moleculares, é recente e ainda contestada por alguns autores.

Os macacos-prego são altamente adaptáveis a diferentes ambientes. Por exemplo, grupos que habitam regiões mais secas, como cerrado e caatinga, exibem comportamento diferenciado, utilizando pedras como ferramentas para quebrar alimentos duros. Porém, mesmo com ampla distribuição geográfica e boa adaptação aos diferentes ambientes, cinco espécies estão na Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN (2012.2).

A destruição de habitats naturais dessas espécies, como a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica, além da caça e comércio ilegal são fatores que contribuem para redução e desaparecimento de suas populações. Diante deste cenário, muitas estratégias têm sido traçadas visando à conservação de espécies ameaçadas. Ações como a implantação de leis de proteção à flora e à fauna, a criação de áreas de proteção e estabelecimento de áreas de conservação *ex situ*, que garantem a criação de ambientes artificiais para manutenção e reprodução de espécies ameaçadas, principalmente de vertebrados, são estratégias importantes para evitar a extinção.

Os macacos-prego são comumente encontrados em áreas de proteção ou em cativeiro. Esses locais oferecem certa proteção aos animais, que chegam a apresentar níveis de reprodução comparáveis aos de vida livre. Contudo, a elaboração de planos de manejo necessita de informações detalhadas sobre as espécies para que tenham efeitos positivos na conservação. A determinação do status taxonômico e a indicação de hibridação são

informações relevantes quando se trata de conservar uma espécie. A classificação taxonômica incorreta pode levar ao manejo ineficaz e ao desperdício de recursos financeiros direcionados a espécies que não estão em perigo, deixando espécies vulneráveis sem proteção.

Nas últimas décadas, os avanços na genética e biologia molecular têm gerado marcadores importantes na identificação e caracterização das espécies. Esses marcadores moleculares permitem uma identificação taxonômica confiável, assim como traz informações de caráter evolutivo e de parentesco, permitindo uma melhor caracterização de espécies e/ou populações vulneráveis.

Vários estudos moleculares foram realizados com os gêneros *Cebus* e *Sapajus* visando delimitar espécies e respectivas áreas de distribuição e contribuindo para sua conservação. Entretanto, muitas populações, principalmente as cativas continuam recebendo classificações equivocadas. Como consequência, o cruzamento entre espécies distintas pode ocorrer. Dessa forma espécies em perigo de extinção podem sofrer depressão exogâmica com a formação de híbridos. Adicionalmente, indivíduos com status taxonômico incorreto podem ser reintroduzidos em ambientes não habitados originalmente pela espécie, competindo com espécies locais ou levando à introgressão.

Portanto, pesquisas como esta, envolvendo marcadores moleculares em macacos-prego mantidos em cativeiro são de extrema importância para que as espécies possam ser devidamente classificadas, facilitando a elaboração de planos de manejo adequados para animais cativos que venham manter a integridade genética das espécies. O conhecimento da espécie, pode ainda propiciar a criação de projetos de soltura, sendo os espécimes cativos reintroduzidos na natureza.

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Conceito de Espécie

A definição e caracterização de uma população ou populações como uma espécie é tarefa complexa e, muitas vezes, gera controvérsias entre pesquisadores. A complexidade começa na definição do termo espécie, que inclui uma diversidade de conceitos variados de acordo como o critério utilizado.

Segundo Frankham e colaboradores (2008), não existe uma definição universalmente aceita de espécie. Atualmente, pelo menos 22 definições estão disponíveis e envolvem a morfologia, ecologia, genética, história evolutiva ou filogenia. Em geral, as definições de “espécie” são baseadas em formação de agrupamentos através de comparações entre semelhanças dos indivíduos que representam a menor unidade evolutiva independente (Ridley, 2006; Freeman e Herron, 2009).

Algumas classificações levam em consideração apenas as semelhanças morfológicas, o que pode gerar definições equivocadas, principalmente em espécies crípticas (Freeman e Herron, 2009). Muitas espécies são definidas e reconhecidas por suas características fenéticas, que são todos os caracteres observáveis ou mensuráveis de um organismo, que incluem desde caracteres microscópicos e fisiológicos até os comportamentais (Ridley, 2006). Porém, em alguns grupos como bactérias e fungos, tanto a caracterização morfológica quanto a fenética podem não ser eficazes, uma vez que os indivíduos desses grupos possuem poucas características que possam ser mensuradas.

Por outro lado, o conceito biológico de espécie tem sido amplamente aceito, sendo usado como definição legal no *Endangered Species Act* (lei das espécies ameaçadas) nos Estados Unidos (Freeman e Herron, 2009). Este define espécie como um grupo de indivíduos e populações naturais que se inter cruzam, produzindo indivíduos férteis e isolados reprodutivamente de outros grupos (Ridley, 2006; Frankham *et al.*, 2008). Para Freeman e Herron (2009), esse conceito é difícil de ser aplicado, uma vez que algumas populações não se sobrepõem na natureza. Dessa forma, os pesquisadores não teriam meios de saber se elas são reprodutivamente incompatíveis ou se estão isoladas somente por mecanismos pré-zigóticos tais como barreiras geográficas.

Atualmente, a informação genética vem sendo amplamente utilizada na determinação de muitas espécies, o que permite uma maior confiança na resolução de

incertezas taxonômicas (Frankham *et al.*, 2008). Com os dados genéticos, as espécies podem ser separadas com a vantagem de permitir estimar o relacionamento filogenético entre elas (Freeman e Herron, 2009).

Com base nesses dados, novas espécies vêm sendo constantemente identificadas. Exemplificando, a revisão da Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil (Paglia *et al.*, 2012) indica a ocorrência de 701 espécies enquanto a edição anterior, publicada em 1996, registrava 524 espécies. Para os autores, o aumento de 177 espécies é explicado parcialmente pela descrição de novas espécies uma vez que 73 mamíferos foram descritos pela primeira vez entre 1994 e 2011. O restante da diferença é resultado de uma reorganização dos táxons já existentes, em consequência de avanços da compreensão taxonômica, filogenia e biogeografia das espécies com a aplicação de técnicas citogenéticas e moleculares.

A utilização dos métodos moleculares para construção de filogenias tem auxiliado na resolução de questões onde os métodos morfológicos, fenéticos e biológicos não alcançam resultados confiáveis, como no caso dos elefantes africanos (gênero *Loxodonta*). Embora uma única espécie fosse descrita para o continente, algumas características morfológicas distinguem as populações de elefantes de florestas daquelas das savanas. Como suas populações não interagem e não tem oportunidade de inter cruzar, é difícil aplicar o conceito biológico de espécie como critério para distingui-los. Para resolver essa questão, Roca (2001) coletou amostras de DNA de 195 elefantes e realizou uma análise filogenética, comprovando que os elefantes das savanas e florestas são espécies filogeneticamente distintas. Foi proposta então a nomenclatura *Loxodonta cyclotis* para o grupo de florestas enquanto *Loxodonta africana* permaneceu para os grupos da savana. Esse resultado auxilia no planejamento de ações de conservação uma vez que populações de elefantes africanos estão declinando por conta da destruição de habitats e caça ilegal (Freeman e Herron, 2009).

De fato, a definição taxonômica de uma espécie é importante para determinação de planos de manejo adequados, principalmente para espécies ameaçadas. A definição incorreta pode resultar em decisões de conservação inapropriadas para as espécies. Como consequência, podemos ter: (1) extinção de espécies não reconhecidas; (2) espécies comuns e híbridas podem receber proteção enquanto espécies em perigo de extinção ficam sem proteção; (3) espécies erroneamente descritas como distintas podem se cruzar gerando



híbridos, e (4) recursos financeiros, usualmente escassos, podem ser destinados a espécies abundantes (Frankham *et al.*, 2008).

Dessa forma, cada método empregado para classificação das espécies se torna importante, devendo ser analisado e escolhido de acordo com a situação da espécie estudada. Quando necessário, métodos diferentes devem ser combinados em análises visando uma maior certeza quanto à definição de agrupamentos.

## 2.2 Características gerais dos gêneros *Cebus* e *Sapajus*

Os macacos-prego e caiararas se distribuem por toda a região Neotropical, desde a Nicarágua, na América Central, até o norte da Argentina, na América do Sul (Santos, 1984; Silva, 2001). Essa distribuição abrange uma diversidade de ambientes que inclui desde os mais secos como florestas da costa da Colômbia e da Venezuela, cerrado e caatinga no Brasil, até os mais úmidos, como Amazônia e Mata Atlântica (Miranda, 2008).

Ao longo dessa ampla distribuição geográfica, esses primatas, formalmente agrupados em um único gênero (*Cebus*), apresenta alto grau de polimorfismo morfológico e comportamental. Recentemente, estudos moleculares confirmaram a separação do grupo em dois gêneros distintos, *Cebus* e *Sapajus*. *Cebus* ocupa o norte da Floresta Amazônica e *Sapajus* ocupa a parte sul da Amazônia, a região central e litorânea do Brasil, Argentina e Paraguai (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a). Mesmo não sendo um consenso no meio científico, a separação dos macacos-pregos e caiararas em dois gêneros distintos foi descrita na 2ª edição da Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil (Paglia *et al.*, 2012).

De fato, a morfologia corporal separa bem os dois grupos, uma vez que *Cebus* apresenta o corpo mais esguio e as pernas mais longas enquanto *Sapajus* tem membros mais curtos e robustos. As mandíbulas das espécies do gênero *Sapajus* também são mais robustas, o que lhes confere especializações para exploração de alimentos duros e resistentes (Silva, 2001; Lynch Alfaro *et al.*, 2012b). Esses animais apresentam dimorfismo sexual, sendo os machos adultos maiores que as fêmeas (Bicca-Marques *et al.* 2006) e costumam viver em bandos com machos e fêmeas. O grupo apresenta um número variado de indivíduos (seis a 30), sempre liderados por um macho dominante (Rocha, 2005; Bicca-Marques *et al.* 2006).

As espécies do gênero *Sapajus* são onívoras, apresentando uma dieta bem variada, alimentando-se de estratos arbóreos de florestas chuvosas, frutos, sementes, castanhas,

flores, gomas, néctar, fungos, insetos e vertebrados de pequeno porte. A variação na sua dieta alimentar faz dos macacos-pregos grandes dispersores de sementes. Izar (2008) encontrou 88 espécies de plantas nas 93 amostras de fezes de *Sapajus nigritus* no Parque Estadual Intervales (PEI), município de Sete Barras (SP).

A utilização de ferramentas como pedra e varinhas para quebrar alimentos duros, como cocos, sempre foi relacionada aos macacos-pregos de uma forma geral, porém parece estar presente apenas em algumas espécies do gênero *Sapajus* (Lynch Alfaro *et al.*, 2012b). Trabalhos recentes mostram que esse comportamento parece ser uma tradição comportamental, que é socialmente aprendido e está principalmente associado as espécies de habitats mais secos e que possuem hábitos mais terrestres, como *S. libidinosus*, *S. xanthosternos* e *S. flavius* (Ottoni e Izar, 2008).

Macacos-prego e caiararas possuem alta capacidade reprodutiva, aumentando consideravelmente sua densidade populacional a cada ano, tanto no ambiente selvagem como em cativeiro (Albertos, 2009). Porém, o desmatamento vem reduzindo seus habitats, provocando fragmentação e decréscimo das populações selvagens. Em decorrência disso, a Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN (2012.2) traz as espécies *Sapajus xanthosternos*, *Sapajus flavius* e *Cebus kaapori* como criticamente em perigo, *Sapajus robustus* como espécie em perigo e *Sapajus nigritus* como quase ameaçada.

### **2.3 História Taxonômica dos macacos-pregos**

O estudo taxonômico dos gêneros *Cebus* e *Sapajus* foi acompanhado através dos tempos por histórias de incertezas, controvérsias e complexidade taxonômica. Toda essa confusão se deve ao grande polimorfismo do grupo, acompanhado de diferenças entre classe etárias e sexuais, da falta de observações precisas de espécimes selvagens e dados pouco concisos sobre distribuição geográfica dos grupos. Segundo Silva 2001, a confusão relacionada à identificação dos táxons dos macacos-prego começou desde sua primeira referência como nomenclatura binominal, aplicada por Linnaeus em 1754, onde ele descreve duas espécies distintas nomeadas de *Simia capucina* e *Simia apela*.

O gênero *Cebus* (Erxleben, 1777) foi criado para acomodar várias espécies de primatas neotropicais. Em 1913, Elliot dividiu as espécies em dois grupos: machos com cabeça sem tufos de pelo (grupo A) e machos com cabeças com tufos de pelo (grupo B). Desde então esta separação é usada para designar macaco-prego “sem tufo” e “com tufo”

(Silva, 2001; Rylands, *et al.* 2005; Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; ). Essa divisão vem sendo aceita e foi ponto de concordância da maioria dos estudos posteriores a Elliot. Um consenso maior foi alcançado após a publicação do trabalho de Hershkovitz em 1949, que concluiu que o grupo com tufo seria monoespecífico, sugerindo a denominação *Cebus apella* (Linnaeus, 1758). Essa espécie seria amplamente distribuída pela Amazônia, sul da Venezuela, norte da Argentina, leste do Paraguai e a região de Yungas no sul da Bolívia. O grupo sem tufo seria composto por três espécies: *Cebus capucinus* (Linnaeus, 1758) da Colômbia e da América Central; *Cebus albifrons* (Humboldt, 1812) das regiões amazônicas da Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Brasil; e *Cebus nigrivittatus* (=olivaceus) (Wagner, 1848) do norte da Amazônia. Hershkovitz nomeou ainda cinco subespécies de *C. capucinus*, cinco de *C. nigrivittatus* e 13 de *C. albifrons*. Trabalhos subsequentes seguiram o arranjo de Hershkovitz para as espécies com e sem tufo, porém com diferenças no número de subespécies (Rylands 2000; Silva 2001).

Em 1960, WC Osman Hill, publicou uma revisão do grupo *Cebus apella*, nomeando 16 subespécies. A taxonomia de Hill foi baseada no trabalho de Remington Kellogg, que estudava macacos-prego, mas faleceu antes de publicar o resultado (Rylands *et al.*, 2000; Silva, 2001; Rylands *et al.*, 2005; Lynch Alfaro *et al.*, 2012a).

O alto polimorfismo dos macacos-prego e consequente incerteza taxonômica do grupo podem ser ainda agravadas pela hibridação entre populações que apresentam sobreposição de habitats (Rylands, 2000; Silva 2001; Casado, 2010). Para Rylands (2000), a hibridação pode ainda ser agravada pelo transporte desses macacos como animais de estimação que, posteriormente, podem ser soltos longe da sua localidade natural.

Em 1983, Cecília Torres de Assumpção fez uma revisão do grupo “com tufo”, utilizando uma amostragem de 750 espécimes de 160 localidades. Torres de Assumpção observou 15 caracteres morfológicos, tais como crânio, cor e padrão de pelagem. Sua análise constatou diferenças etárias e sexuais. A autora identificou cinco áreas com consistência nos caracteres observados, sendo: Amazônia Ocidental, Médio e Baixo Rio Amazonas das Guianas, Leste da Bahia, Leste de Minas e Espírito Santo e áreas litorâneas de São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Em seu resumo, ela indicou que esses resultados sugerem a existência de subespécies. Na região central do Brasil e no nordeste, Torres de Assumpção não conseguiu clareza nos seus resultados. Uma nova revisão, utilizando 1250 exemplares, seria publicada pela autora, mas esta também faleceu antes de publicá-los (Silva, 2001; Rylands *et al.*, 2005).

Rylands *et al.* (2005) fizeram uma revisão da taxonomia apresentada por Colin P. Groves em 2001. Neste trabalho, baseado em exames de peles e crânios de museus dos Estados Unidos, Groves (2001) analisou a diversidade de macacos-prego com tufo, dividindo-os em quatro espécies e 13 subespécies. Várias colocações de Groves foram questionadas por Rylands *et al.* (2005), como, por exemplo, a indefinição dos limites de distribuição de algumas subespécies como *Cebus libidinosus libidinosus*. Os autores chamam a atenção para a necessidade de maior levantamento de campo, com observação cuidadosa de populações selvagens em áreas-chave, buscando aprimorar a classificação e distribuição geográfica, para então definir quais nomes poderão ser usados para distinguir as espécies.

No mesmo ano em que Groves publicou sua taxonomia para as espécies de *Cebus* com tufo, Silva (2001) concluiu sua tese de doutorado, que objetivava avaliar e hierarquizar os padrões de diferenciação dentro do gênero, reconhecendo táxons válidos. Na referida tese, o autor estudou o dimorfismo sexual, a validade de táxons supra-específicos, investigou a diversidade de cada grupo, dando ênfase ao grupo com tufo, definiu área de distribuição geográfica do gênero e táxons infra-genéricos, investigou a história evolutiva do grupo através de padrões geográficos de diferenciação e revisou os dados genéticos descritos àquela época. Para seus estudos, Silva (2001) examinou 2369 espécies de museus de 412 localidades e estima ter observado 1000 animais vivos no campo e em cativeiro. Somando os dados registrados por ele com os de revisão literária, o autor afirma ter analisado 1558 localidades de registro de *Cebus*. Um total de 52 caracteres foi avaliado, entre eles, caracteres cromáticos e dados morfológicos e morfométricos do crânio. Os problemas de amostragem e distribuição geográfica, que inviabilizavam definições seguras para classificação do gênero, parecem ter sido minimizados pelo estudo, assim como a quantidade de caracteres examinados foi ampliada. Porém, Silva (2001) nunca publicou os seus resultados em forma de artigo científico. Mas o reconhecimento da sua tese é demonstrado por diversos pesquisadores, que desde então vem compartilhando e discutindo os dados e conclusões do autor.

Um diferencial do trabalho de Silva (2001) em relação aos seus antecessores é a não utilização do termo subespécie. Segundo o autor, este termo é vago e traz problemas de ordem teórica e prática quanto a sua demonstração. Assim, ele considerou apenas as espécies como unidades evolutivas básicas.

Utilizando análise de variância e análise discriminante para os padrões morfológicos, morfométricos e de distribuição geográfica, Silva (2001) encontrou alto grau de divergência entre os *Cebus* com e sem tufo. Para ele, os dois grupos seriam unidades evolutivas distintas e simpátricas, sugerindo que o gênero *Cebus* fosse subdividido em dois grupos.

Diferenças cranianas como a maior estrutura de inserção muscular relacionada à potência da mordida, arcada dentária mais robusta e mandíbulas maiores foram relacionadas pelo autor com a alta capacidade de aproveitamento de frutos de palmeiras pelos *Cebus* com tufo (Figura. 01). Já os macacos sem tufo, por possuírem arcadas e mandíbulas mais delicadas, teriam uma dieta menos variada. A presença de cristas sagitais no crânio de *Cebus* com tufo, também foi observada nos machos desse grupo e ausente no grupo sem tufo (Figura 01).

Os dados genéticos apresentados àquela época geralmente não traziam informações sobre a origem geográfica e alguns cariótipos descritos eram de animais de cativeiro. Isso fez Silva (2001) utilizar apenas dados de alguns táxons. As análises mostraram evolução cromossômica independente e número diploide constante ( $2n=54$ ) para *Cebus* com tufo e número diploide variável ( $2n= 52$  ou  $54$ ) para *Cebus* sem tufo. Estudos com a subunidade II do gene mitocondrial citocromo c oxidase (COII) foram concordantes com as análises morfológicas e morfométricas do estudo e coerentes com a hipótese de diferenciação entre *Cebus* com e sem tufo, com tempo de divergência estimado em cerca de 7,7 milhões de anos.

Com base nesses dados, Silva (2001) sugeriu a divisão do grupo em dois subgêneros, nomeando *Cebus* como subgênero para as espécies sem tufo e *Sapajus* Kerr, 1792 para as espécies com tufo. Para o subgênero *Cebus*, o autor empregou os nomes específicos reconhecidos por Hershkovitz (1949), além do táxon *kaapori* descrito por Queiroz (1992), reconhecendo quatro espécies. Para o subgênero *Sapajus* foram utilizados os nomes das espécies das áreas reconhecidas como de distribuição do grupo com tufo. O autor nomeou quatro espécies para o subgênero *Cebus* e sete para o subgênero *Sapajus* (Tabela 01 e 02).

A escassez de resultados de análise molecular com espécimes bem definidos quanto sua distribuição, talvez tenha feito Silva (2001) não considerar as diferenças entre os grupos *Cebus* e *Sapajus* como determinantes para considerá-los gêneros diferentes. Porém,

o trabalho publicado por Lynch Alfaro *et al.* (2012) atribui o status de gênero para os dois grupos.

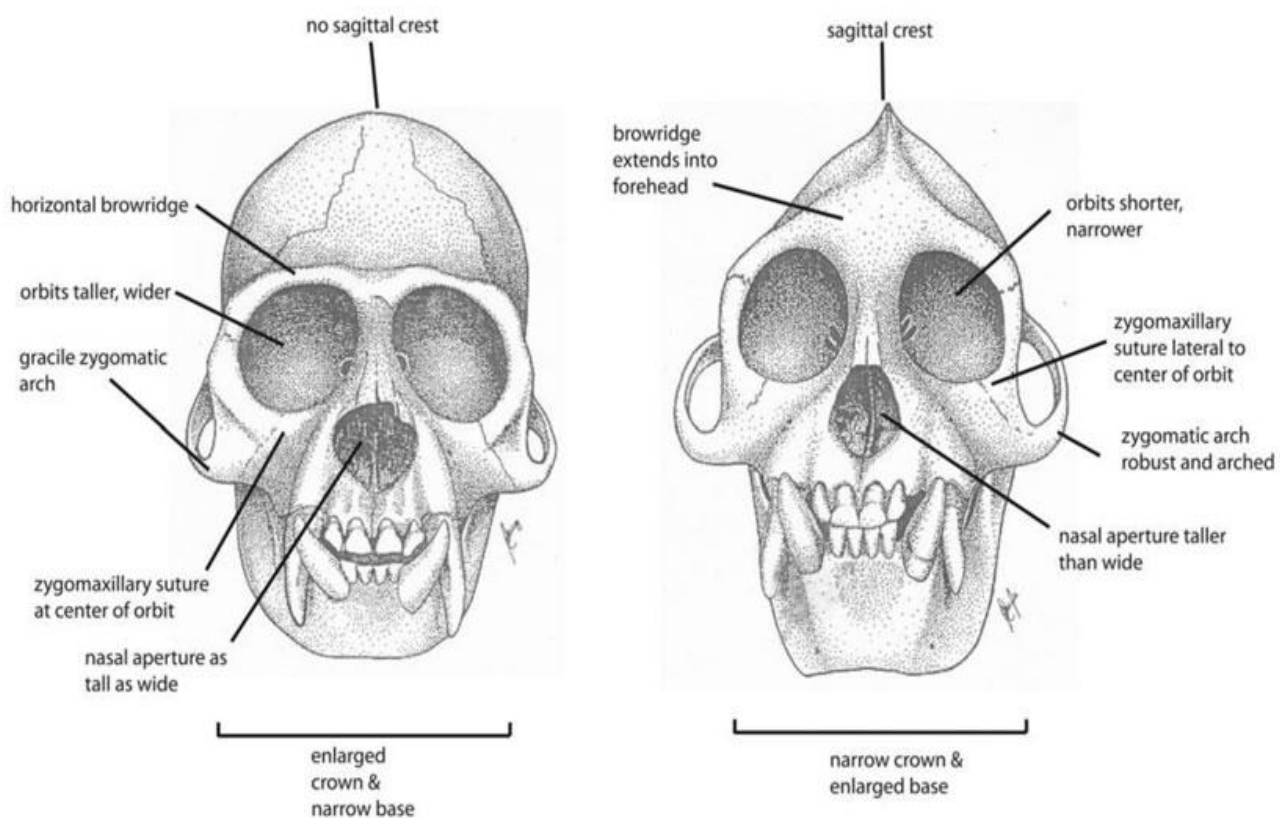


Figura 01. Diferenças morfológicas em crânios adultos de machos. 1 - *Cebus* sem tufo. 2 - *Cebus* com tufo (arcada dentária robusta, mandíbulas maiores e a presença de uma crista sagital no crânio) (Fonte: Lynch Alfaro *et al.*, 2012).

Tabela 01: Classificação taxonômica do gênero *Cebus* de acordo com cada autor. Termos em negrito indicam espécies, os demais subespécies.

Elliot, 1913	Herskovitz, 1949	Hill, 1960	Silva, 2001	Alfaro <i>et al.</i> , 2012
<b><i>Cebus capucinus</i></b>	<b><i>Cebus capucinus</i></b>	<b><i>Cebus capucinus</i></b>	<b><i>Cebus (Cebus) capucinus</i></b>	<b><i>Cebus capucinus</i></b>
<b><i>Cebus frontacus</i></b>	<i>C.c limitaneus</i>	<i>C.c limitaneus</i>	<b><i>Cebus (Cebus) albifrons</i></b>	<b><i>Cebus albifrons</i></b>
<b><i>Cebus albifrons</i></b>	<i>C.c imitador</i>	<i>C.c imitador</i>	<b><i>Cebus (Cebus) olivaceus</i></b>	<b><i>Cebus olivaceus</i></b>
<b><i>Cebus unicolor</i></b>	<i>C.c capucinus</i>	<i>C.c capucinus</i>	<b><i>Cebus (Cebus) kaapori</i></b>	<b><i>Cebus kaapori</i></b>
<i>C.u. unicolor</i>	<i>C.c nigripectus</i>	<i>C.c nigripectus</i>		
<i>C.u cuscinus</i>	<i>C.c curtus</i>	<i>C.c curtus</i>		
<b><i>Cebus flavus</i></b>	<b><i>Cebus nigrivittatus</i></b>	<b><i>Cebus griseus</i></b>		
<b><i>Cebus castaneus</i></b>	<i>C.n.nigrivittatus</i>	<i>C.g. griseus</i>		
<b><i>Cebus variegatus</i></b>	<i>C.n. castaneus</i>	<i>C.g. castaneus</i>		
<b><i>Cebus malitiosus</i></b>	<i>C.n. brunneus</i>	<i>C.g. brunneus</i>		
<b><i>Cebus chrysopus</i></b>	<i>C.n apiculatus</i>	<i>C.g. leporinus</i>		
<b><i>Cebus apiculatus</i></b>	<i>C.n olivaceus</i>	<b><i>Cebus albifrons</i></b>		
<b><i>Cebus libidinosus</i></b>	<b><i>Cebus albifrons</i></b>	<i>C.a hypoleucus</i>		
<b><i>Cebus fatuellus</i></b>	<i>C.a hypoleucus</i>	<i>C.a malitiosus</i>		
<i>C.f. fatuellus</i>	<i>C.a malitiosus</i>	<i>C.a cesarae</i>		
<i>C.f. peruanus</i>	<i>C.a cesarae</i>	<i>C.a pleei</i>		
<b><i>Cebus</i></b>	<i>C.a pleei</i>	<i>C.a versicolor</i>		
<b><i>macrocephalus</i></b>	<i>C.a versicolor</i>	<i>C.a</i>		
<b><i>Cebus versuta</i></b>	<i>C.a leucocephalus</i>	<i>leucocephalus</i>		
<b><i>Cebus azarae</i></b>	<i>C.a adutus</i>	<i>C.a adutus</i>		
<i>C.a azarae</i>	<i>C.a albifrons</i>	<i>C.a albifrons</i>		
<i>C.a. pallidus</i>	<i>C.a unicolor</i>	<i>C.a unicolor</i>		
<b><i>Cebus cirrifer</i></b>	<i>C.a yuracus</i>	<i>C.a yuracus</i>		
<b><i>Cebus crassiceps</i></b>	<i>C.a cuscinus</i>	<i>C.a cuscinus</i>		
<b><i>Cebus caliginosus</i></b>	<i>C.a aequatorialis</i>	<i>C.a aequatorialis</i>		
<b><i>Cebus vellerosus</i></b>	<i>C.a trinitatis</i>	<i>C.a trinitatis</i>		

Tabela 02: Classificação taxonômica do gênero *Sapajus* de acordo com cada autor. Termos em negrito indicam espécies, os demais indicam subespécies.

Herskovitz, 1949	Hill, 1960	Torres de Assumpção, 1983	Groves, 2001	Silva, 2001	Alfaro <i>et al.</i> , 2012
<b><i>Cebus apella</i></b>	<b><i>Cebus apella</i></b>	<b><i>Cebus apella</i></b>	<b><i>Cebus libidinosus</i></b>	<b><i>Cebus (Sapajus) apella</i></b>	<b><i>Sapajus apella/Sapajus macrocephalus</i></b>
	<i>C.a. apella</i>	<i>C.a. apella</i>	<i>C.l. libidinosus</i>	<b><i>Cebus (Sapajus) macrocephalus</i></b>	<b><i>Sapajus libidinosus</i></b>
	<i>C.a. margaritae</i>	<i>C.a. macrocephalus</i>	<i>C.l. palidus</i>	<b><i>Cebus (Sapajus) libidinosus</i></b>	<b><i>Sapajus cay</i></b>
	<i>C.a. fatuellus</i>	<i>C.a. cay</i>	<i>C.l. paraguayanus</i>	<b><i>Cebus (Sapajus) cay</i></b>	<b><i>Sapajus xanthosternos</i></b>
	<i>C.a. tocantinus</i>	<i>C.a. xanthosternos</i>	<i>C.l. juruanus</i>	<b><i>Cebus (Sapajus) xanthosternos</i></b>	<b><i>Sapajus robustus</i></b>
	<i>C.a. macrocephalus</i>	<i>C.a. robustus</i>	<b><i>Cebus nigrinus</i></b>	<b><i>Cebus (Sapajus) robustus</i></b>	<b><i>Sapajus nigrinus</i></b>
	<i>C.a. magnus</i>		<i>C.n. robustus</i>	<b><i>Cebus (Sapajus) nigrinus</i></b>	<b><i>Sapajus flavius</i></b>
	<i>C.a. juruanus</i>		<i>C.n. calculates</i>		
	<i>C.a. maranonis</i>		<i>C.n. nigrinus</i>		
	<i>C.a. peruanus</i>		<b><i>Cebus xanthosternos</i></b>		
	<i>C.a. palidus</i>		<b><i>Cebus apella</i></b>		
	<i>C.a. cay</i>		<i>C.a. fatuellus</i>		
	<i>C.a. libidinosus</i>		<i>C.a. apella</i>		
	<i>C.a. xanthosternos</i>		<i>C.a. macrocephalus</i>		
	<i>C.a. robustus</i>		<i>C.a. peruanus</i>		
	<i>C.a. frontatus</i>		<i>C.a. tocantinus</i>		
	<i>C.a. nigrinus</i>		<i>C.a. margaritae</i>		



Lynch Alfaro *et al.* (2012) buscou compreender a atual distribuição geográfica dos macacos-prego. Os autores utilizaram amostras de sangue e fezes coletadas de espécimes na natureza e amostras de tecidos e pele coletadas de animais de museus com localização geográfica conhecida, totalizando 57 amostras. Coordenadas geográficas foram obtidas de bancos de dados de museus ou de dados de GPS nos locais de campo. Foram analisadas amostras de três espécies de *Cebus* (*C. capucinus*, *C. olivaceus*, *C. albifrons*) e sete de *Sapajus* (*S. apella*, *S. macrocephalus*, *S. cay*, *S. libidinosus*, *S. xanthorhinos*, *S. robustus* e *S. nigritus*). *C. kaapori* e *S. flavius* não foram amostrados. Sequências dos genes 12S e citocromo b de DNA mitocondrial foram utilizadas para construção de uma filogenia molecular. O estudo usou uma abordagem estatística comparativa utilizando filogeografia bayesiana com base em um modelo discreto de difusão/estado para inferir a história biogeográfica dos macacos-prego e testar modelos de simpatria entre *Cebus* e *Sapajus*.

Para explicar a distribuição geográfica das amostras estudadas, os autores utilizaram variáveis bayesianas estocásticas de busca, na tentativa de inferir vias de migração mais prováveis para a dispersão entre nove localidades de *Cebus* e *Sapajus*.

Lynch Alfaro *et al.* (2012a) concluíram que *Cebus* e *Sapajus* são dois clados reciprocamente monofiléticos e com tempo de divergência no final do Mioceno, a cerca de 6,2 milhões de anos, caracterizando dois clados distintos, como sugerido por Silva (2001). A separação pelos autores em gêneros e não subgêneros é justificada pelos autores com base na separação de outros clados de primatas neotropicais como o *Lagothrix* e *Brachyteles* em gêneros diferentes com tempo de divergência similar a *Cebus* e *Sapajus*.

Dados obtidos por Lynch Alfaro *et al.* (2012a) mostram que a divisão entre *Cebus* e *Sapajus* ocorreu na Amazônia Ocidental (6,2 Mi). O grupo dos macacos-prego gráteis (nome usado por Lynch Alfaro *et al.*, 2012a para se referir ao gênero *Cebus*, até então chamados de macacos-prego sem tufo) começou sua radiação ao norte da Amazônia (2,1 Mi), dispersando para a costa da Venezuela, América Central e região norte dos Andes, respectivamente. Já o grupo robusto (nome usado por Lynch Alfaro *et al.*, 2012a, para se referir ao gênero *Sapajus* até então chamados de macacos-prego com tufo) começou sua radiação na região da Mata Atlântica, expandindo-se para o sul, chegando ao Paraguai/Argentina e no Cerrado, tendo uma re-invasão recente (0,125 Mi) na Amazônia Ocidental, seguindo para o norte da Amazônia (figura 02).

Além das diferenças moleculares, de divergência, migração e distribuição geográfica, Lynch Alfaro *et al.* (2012) citam ainda diferenças comportamentais entre os grupos, a

exemplo da utilização de ferramentas para quebrar cocos por *Sapajus* em ambientes secos, como o cerrado. Esse comportamento não é verificado em nenhum outro primata da região neotropical. Para os autores, o uso de ferramenta pode ter auxiliado na sobrevivência de *Sapajus* em ambientes hostis, o que lhes conferiu a capacidade de atravessar regiões secas e expandir sua distribuição.

Mesmo não tendo amostras de *Cebus kaapori* no seu estudo, os autores, baseados em Barroso *et al.* (1997), estimam a divergência entre *C. kaapori* e *C. olivaceus* em 0,7 Mi, designando a espécie como pertencente ao gênero *Cebus*. Quanto à *Sapajus flavius*, que até a publicação do trabalho não havia sido objeto de estudos genéticos, foi mantido o gênero *Sapajus* por conta das características da mandíbula, musculatura robusta e sua localização no norte da Mata Atlântica, área de distribuição dos macacos-prego robustos. Esses autores também não encontraram distinção significativa entre as espécies da Amazônia, *S. apella* e *S. macrocephalus*, sugerindo que os dois sejam agrupados como uma só espécie.

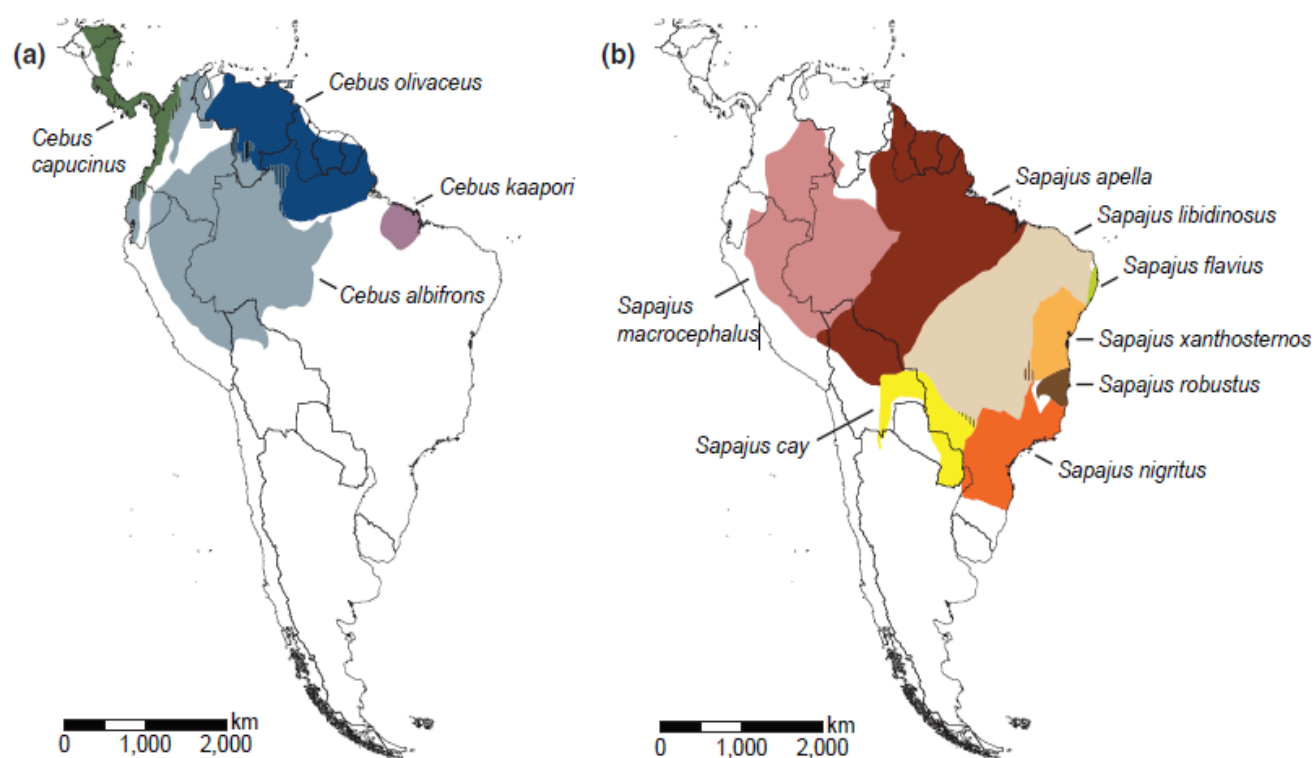


Figura 02. (a) distribuição geográfica do gênero *Cebus* e (B) distribuição geográfica do gênero *Sapajus* (Fonte: Lynch Alfaro *et al.*, 2012a).

## 2.4 Análises moleculares na filogenia e evolução de Primatas

Nos últimos anos, as técnicas da genética molecular vêm sendo difundidas como ferramenta para detectar variações no genoma, aumentando o poder de resolução da análise genética. Essas técnicas podem ser aplicadas tanto na área comercial quanto de conservação das espécies, pois fornecem informações que podem ser arquivadas em bancos de germoplasma. Estudos de evolução e de diversidade genética intra e interespecíficas tornaram-se mais completos e tiveram lacunas preenchidas com a inserção da ferramenta molecular em suas pesquisas (Faleiro, 2007; Caixeta *et al.*, 2009).

Jacques (2005) destaca que a identificação molecular tem a vantagem da utilização de apenas fragmentos do tecido, como sangue, pêlos, chifres, penas, carne, ossos, cabelo e outros e a preparação de profissionais que desenvolvam as metodologias empregadas é mais simples que a de um profissional que trabalhe com a identificação morfológica. Além disso, os marcadores moleculares oferecem um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, identifica genótipos sem influência do meio ambiente e tem a possibilidade de detecção de polimorfismos em qualquer estágio de desenvolvimento das espécies estudadas (Faleiro, 2007).

A utilização de dados moleculares no estudo taxonômico de primatas permeou a década de 1990, com o trabalho de Schneider e colaboradores em 1993, que reuniu 16 gêneros de platirrinos utilizando genes nucleares (Schneider, 2000). Posteriormente, vieram outros trabalhos científicos empregando metodologias moleculares, como Tagliaro *et al.* (1997), que usaram sequências de DNA mitocondrial para descrever a diversidade de espécies dentro do grupo *Callithrix* (sagüis). Mais recentemente, Casado *et al.* (2010) analisaram divergências moleculares em *Cebus cay* na América do Sul, também utilizando DNA mitocondrial, enquanto Lynch Alfaro *et al.* (2012) separou os macacos-prego em dois gêneros diferentes (*Cebus* e *Sapajus*), utilizando Citocromo b oxidase (Cyt b) e o gene ribossomal 12S.

### 2.4.1 DNA Mitocondrial (DNAmt)

O DNA mitocondrial (DNAmt) tem sido bastante aplicado na identificação taxonômica, apresentando vantagens em relação ao DNA nuclear, como a abundância de cópias, visto que uma célula possui várias mitocôndrias, facilitando a amplificação do

DNAmt. Adicionalmente, o DNAmt apresenta elevadas taxas de mutação, sendo altamente variável, o que pode gerar algum sinal sobre a história da população mesmo em curtos espaços de tempo (Jacques, 2005; Galtier *et al.*, 2009). Por ser de origem materna, o DNAmt se comporta como um locus não recombinado. Seu tamanho é reduzido, compreendendo um genoma de 15 a 20 kb em animais com 37 genes. Desses, 13 codificam proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa, dois codificam RNAs ribossomais e 22 RNAs transportadores (Arias *et al.*, 2003; Galtier *et al.*, 2009).

O DNA mitocondrial possui uma porção não codificante que é bastante variável. Por exercer controle sobre a replicação e transcrição do DNAmt, essa porção é chamada de região controle ou ainda de D-loop ou alça D. Devido a sua alta taxa de evolução, podendo acumular 10 vezes mais mutações pontuais que o DNA nuclear, essa região é mais utilizada para estudos intraespecíficos (Boore, 1999; Saunders e Edwards, 2000).

Apesar do alto grau de polimorfismo do D-loop, Saunders e Edwards (2000) propõem sua utilização em estudos interespecíficos, devido a região de domínio central do D-loop ser relativamente conservada. Para esses autores, um aumento nas pesquisas utilizando esse marcador direcionado para estudos filogenéticos de diferentes táxons, poderia elucidar dúvidas quanto a essas questões.

Contudo, a região mitocondrial reconhecida como de maior eficiência no estabelecimento de relações interespecíficas é a subunidade I do gene citocromo c oxidase (COI). Proposto como um código de barras da vida animal ou “DNA *barcoding*”, a parte do COI utilizada para este fim possui 648 pb e poucas regiões invariáveis (Hebert *et al.*, 2003). Por exemplo, Hebert *et al.* (2005) analisaram 9.715 seqüências de 2.215 espécies e 1.047 gêneros de lepidópteros e encontraram variação de 512 dos 648 pb.

A proposta do DNA *barcoding* é usar a variação das seqüências do COI para determinar divergências entre táxons, mesmo daqueles com isolamento reprodutivo recente. Para Hebert *et al.* (2005), essa ferramenta facilitará o trabalho de taxonomistas, por sua rápida capacidade em revelar divergências entre espécies distintas. Dessa forma, grupos que apresentam taxonomia confusa e que absorvem tempo demasiado para sua classificação, podem ter o DNA *barcoding* como peça fundamental para resolução das suas incertezas taxonômicas.

Hebert *et al.* (2005) destacam ainda que o DNA *barcoding* não garante resolução taxonômica completa, mas chega próximo. Nos estudos realizados por esses autores, a

resolução no nível de espécie variou de 95% a 97%. Um ponto a refletir é que o DNA *barcoding* não deve ser uma ferramenta única a ser usada para distinção e determinação de espécies. Dados morfológicos, diferenças sexuais, comportamentais e de distribuição geográfica também são fundamentais na caracterização e conclusão dos estudos sobre uma determinada espécie.

Além do COI, o gene Citocromo b oxidase (Cyt b) tem sido utilizado em vários estudos, gerando um grande banco de dados com sequências de diversos táxons sendo depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Dessa forma, sequências de táxons já pesquisados se tornam acessíveis, podendo comparar as sequências estudadas com as depositadas no GenBank através do programa BLAST (Branicki *et al.*, 2003). Johns e Avise (1998) destacam que a dinâmica evolutiva e a bioquímica do produto protéico do Cyt b são bem caracterizados, o que lhe confere vantagem como marcador molecular.

Por ser um gene que apresenta regiões mais conservadas e outras mais variáveis, o Cyt b é utilizado tanto para estudos filogenéticos com níveis de divergência mais antigos, quanto para estudos com populações com níveis de divergência recente (Meyer, 1994 e Farias *et al.*, 2001). Porém, problemas como saturação precoce na terceira posição do códon, variação limitada no primeiro e no segundo códon, fazem o Cyt b ser pouco informativo para elucidar questões evolutivas mais amplas (Meyer, 1994).

Por outro lado, estudos envolvendo espécies com divergência filogenética recente mostram que o Cyt b pode ser altamente resolutivo (Farias *et al.*, 2001). Castresana (2001) analisou esse gene em 688 espécies de mamíferos, distribuídos em 310 gêneros e 52 famílias, mostrando a utilidade desse marcador na comparação de espécies do mesmo gênero ou da mesma família.

#### 2.4.2 Elementos de Transposição do DNA nuclear

Genes nucleares são geralmente mais conservados que genes mitocondriais e, portanto, são mais indicados para análises da diversidade e relacionamentos acima do nível de espécie. Entre estes, os Elementos de Transposição (TE) são caracterizados pela capacidade de catalisar seu próprio movimento e inserir-se em novas regiões do genoma. Como consequência, os TEs podem causar alterações funcionais nos genes nos quais se inserem (Manetti, 2007; Sluys *et al.*, 2012). Por estarem presentes em todos os seres vivos,

os TEs são considerados elementos ancestrais do genoma e, por esse motivo, têm importância evolutiva (Sluys *et al.*, 2012).

Os TEs são a também classe mais abundante de material genético em eucariotos superiores. Exemplificando, eles compreendem 46% do genoma humano (Wong e Choo, 2004). A forma como esses elementos se transpõem dentro do genoma os dividem em duas Classes (I e II). Os elementos de Classe I se movem no genoma por meio de intermediários de RNA. Esses elementos são também chamados de retrotransposons. Os elementos da Classe II envolvem um intermediário de DNA (Primrose, 2003; Wong e Choo, 2004; Sluys *et al.*, 2012).

Os retrotransposons podem ser ainda divididos em dois tipos, considerando a presença ou ausência de longas repetições terminais (LTR). Os retrotransposons sem LTR são subdivididos em dois grupos: os LINEs (elementos nucleares intercalados longos) e os SINEs (elementos nucleares intercalados curtos) (Sluys *et al.*, 2012).

O genoma humano contém cerca de 100.000 LINEs, mas a maior parte, assim como os SINEs, é inativa e apenas 1% a 2% são capazes de transposição. Os SINEs não codificam proteínas que possuem função de transposição. Os SINEs mais bem conhecidos são os pertencentes à família Alu, específicas dos primatas. Os elementos Alu são encontrados em quase um milhão por cópia de genoma. Junto com o TE L1, os Alu perfazem 25% do genoma humano (Primrose, 2003; Herke *et al.*, 2007 e Sluys *et al.*, 2012).

Em primatas, a maioria das sequências Alu possui cerca de 300 pb de comprimento (Schmid e Jelinek, 1982; Pray, 2008). Acredita-se que os TEs da família Alu tenham surgido no genoma de primatas há cerca de 65 milhões de anos. A grande quantidade desses elementos nos organismos e o seu contínuo aumento sugerem que essas sequências tenham exercido papel importante na evolução dos primatas. Essa hipótese é também apoiada pelo fato da inserção desses TEs participarem da geração de novas proteínas (Pray, 2008).

Para a biologia evolutiva e sistemática, os TEs Alu são uma ferramenta molecular importante, pois apresentam locos polimórficos (Herke *et al.*, 2006). Além disso, uma vez inseridas no genoma, essas sequências são raramente removidas. Dessa forma, dois indivíduos que compartilham a mesma sequência Alu no mesmo ponto, provavelmente, tiveram um ancestral comum, ao passo que a ausência da inserção representa o estado ancestral. Diversos estudos têm utilizado os elementos Alu para elucidar questões

filogenéticas. Estudo com mais de 100 desses elementos sugere que seres humanos e chimpanzés formam um clado irmão, enquanto gorilas formam um grupo externo (Pray, 2008 e Osterholz *et al.*, 2009).

Estudos recentes utilizando os ETs Alu, ajudaram a elucidar questões referentes as relações entre as famílias e gênero dos Macacos do Novo Mundo (Platyrrhine). Estudos diversos trazem padrões de ramificação variados para esse grupo.

Ray e colaboradores (2005) utilizaram 183 inserções Alu para investigar a ordem de ramificação entre os Macacos do Novo Mundo. O estudo concluiu que a família Pitheciidae é grupo irmão de Atelidae e Cebidae. Esse resultado já havia sido apresentado por genes mitocondriais, porém o apoio para a ramificação não era forte.

Um estudo envolvendo todos os gêneros de Macacos do Novo Mundo foi realizado por Osterholz e colaboradores 2009. Este, confirmou a monofilia das famílias Cebidae, Atelidae e Pitheciidae, e as relações já descritas por Ray, *et al.*, 2005 para essas famílias, apoiando então a diversificação do grupo em três grandes linhagens. Os resultados esclareceram algumas questões entre os gêneros de cada uma das famílias. Em Atelidae, confirmou-se *Alouata* como grupo basal, porém as relações dos outros gêneros do grupo não foram elucidadas. Em Pitheciidae, *Calicebus* foi claramente agrupado com *Pithecia*, *Chiropotes* e *Cacajao*, porém a ordem de ramificação entre os quatro gêneros não foi detectada. Por final, na família Cebidae a origem monofilética foi confirmada, incluindo a Callithirichinae e os gêneros *Cebus*, *Saimiri* e *Aotus*. Assim como em Pitheciidae as relações entre os gêneros não foram resolvidas.

Os elementos Alu's forneceram evidências, como a posição basal de alguns clados, assim como resolveu questões em relação a origem das famílias de Macacos do Novo Mundo, se confirmando como ferramenta molecular importante para estudos desse grupo de primatas.

## **2.5 Hibridação de espécies e conservação *ex situ***

Organismos de espécies diferentes podem se cruzar, causando um fluxo gênico interespecífico que resultará na produção de indivíduos híbridos (Frankham *et al.*, 2008; Rocha, 2010). Esse evento, chamado de introgressão, ocorre tipicamente quando o homem introduz espécies exóticas nas áreas de ocorrência de espécies raras aparentadas ou altera o habitat de forma que espécies isoladas entrem em contato (Frankham *et al.*, 2008).

Indivíduos híbridos possuem número cromossômico intermediário entre os parentais com conjuntos cromossômicos ligeiramente diferentes. Os híbridos com números ímpares de cromossomos são normalmente inférteis, pois seus cromossomos serão incapazes de formar pares homólogos durante os estágios avançados da gametogênese (Rocha, 2010). Caso os híbridos sejam férteis, eles podem se acasalar e produzir híbridos de primeira-geração (F1) e híbridos de segunda-geração (F2), cruzando com os parentais ou gerações de híbridos (Cantanhede, 2008).

De fato, a hibridação acidental pode ser uma ameaça à integridade genética de várias populações silvestres, podendo resultar em depressão exogâmica com indivíduos com baixa taxa reprodutiva e adaptação reduzida às alterações nas condições ambientais. Alternativamente, esses híbridos podem ser aptos e alcançar o sucesso parental, passando a competir com as espécies originais (Cantanhede, 2008; Frankham *et al.*, 2008). Por exemplo, estudos de mtDNA apoiaram a existência de, pelo menos, duas espécies de orangotango (*Pongo pygmaeus* em Bornéu, e *Pongo abelii*, em Sumatra) previamente indicada por dados citogenéticos (Warren *et al.*, 2001). Como agravante, os autores ainda identificaram vários animais híbridos em cativeiro (Ryder & Chemnick, 1993; Warren *et al.*, 2001). Similarmente, análises citogenéticas de 228 espécimes de 21 espécies de antílopes, gazelas e búfalos (família Bovidae) mantidos em cativeiro mostraram que 13% dos indivíduos eram portadores de fusões cêntricas polimórficas (Pagacova *et al.*, 2011), consideradas um dos fatores para a depressão exogâmica (Frankham *et al.*, 2011).

Trabalhos recentes também diagnosticaram hibridação interespecífica com geração de híbridos férteis em mamíferos, a exemplo do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) e o peixe-boi amazônico (*Trichechus inunguis*) (Viana *et al.*, 2006; Cantanhede, 2008). Em roedores, o cruzamento experimental entre *Akodon molinae* e *Akodon dolores* espécies encontradas apenas na Argentina, levou à produção de híbridos com fertilidade normal (Rocha, 2010).

Alguns indivíduos híbridos são de valor comercial, pois apresentam crescimento rápido e precocidade reprodutiva, resistência e aumento da qualidade nutricional (Borém, 2005; Rocha, 2010). Entretanto, alguns híbridos interespecíficos podem representar sérios riscos biológicos ao meio ambiente, "contaminando geneticamente" estoques naturais ou cultivados e competindo de diversas formas com as linhagens parentais (Brunes *et al.*, 2007; Rocha, 2010).



Espécies raras, como alguns salmões, são ameaçadas por hibridação. Algumas opções para solucionar o problema seria o deslocamento de indivíduos puros para regiões isoladas ou para cativeiros (Frankham *et al.*, 2008).

Primack e Rodrigues (2001) destacam a grande quantidade de espécies existentes em cativeiros ao redor mundo, estimada em cerca de 700 mil indivíduos representando 3.000 espécies de mamíferos, aves, anfíbios e répteis. Os estoques de cativeiro podem ser úteis para resgate da diversidade genética perdida a partir da mistura de alelos de duas ou mais populações geneticamente diferentes (Frankham *et al.*, 2008). Porém, a translocação de populações precisa ser bem planejada para que o resultado não seja ainda mais prejudicial, determinando a depressão exogâmica, reduzindo a adaptabilidade dos indivíduos. Assim, cada população genética (caracterizada por diferenças na frequência de alelos ou presença de alelos únicos) deve ser considerada uma unidade evolutiva independente ou uma unidade evolutivamente significativa - UES (Moritz, 1994).

A partir da proposta de Moritz (1994), a quantidade de variabilidade genética entre as UES deve compor um aspecto essencial nas estratégias de manejo e conservação, uma vez que os esforços devem ser direcionados para manter tanto os produtos como os processos evolutivos. Em outras palavras, é importante garantir que as espécies e populações possam evoluir mantendo a variação genética e as distintas adaptações locais e conexões populacionais (DeWeerd, 2002). Dessa forma, é essencial que as populações em cativeiro conservem a integridade taxonômica e o máximo da diversidade genética original das espécies (Frankham *et al.*, 2008). Ainda assim, a própria seleção em cativeiro de animais para reintrodução também pode ser responsável pela redução do valor adaptativo no ambiente natural, mesmo com a contínua incorporação de indivíduos do meio selvagem nas populações cativas (Ford, 2002).

Os jardins zoológicos, legalizados pela Lei nº 7.173 de dezembro de 1983 (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, IBAMA, 1983), e os Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), legalizados pela Instrução Normativa IBAMA 169, de 20 de fevereiro de 2008, são formas de conservação *ex situ* amplamente difundidas no Brasil.

Os CETAS têm a finalidade de recepcionar, triar e tratar os animais silvestres resgatados ou apreendidos pelos órgãos fiscalizadores, identificando a espécie, o habitat e o sexo (quando possível). A reintrodução, sempre que plausível, deve ser feita com programas específicos de manejo para cada espécie (MMA, 1967). Caso contrário, o

destino desses animais pode ser os zoológicos. Estes deverão atender os requisitos mínimos de habitabilidade, sanidade e segurança de cada espécie, reduzindo ao máximo o nível de estresse do animal a fim de evitar prejuízos para a reprodução e a saúde do animal (IBAMA, 2002). A eficácia do trabalho desenvolvido por CETAS ou zoológicos, entre vários problemas, esbarra na identificação precisa de algumas espécies.

Os macacos-prego são comumente encontrados em cativeiros, seja em CETAS ou zoológicos. São animais que se habitam muito bem ao ambiente cativo, chegando a níveis de reprodução comparáveis ao selvagem. Porém, sua confusa taxonomia, impede que as espécies sejam identificadas e agrupadas de forma correta. O resultado disso pode ser a introgressão, ou seja, formação de indivíduos híbridos que podem, acidentalmente ou por falhas no manejo, ser introduzidos nos ambientes naturais. Isso é especialmente preocupante entre os macacos do gênero *Sapajus* porque os híbridos parecem ter fertilidade normal. No Parque Municipal da Matinha (Itapetinga-BA), por exemplo, o veterinário responsável comunicou que há 15 anos o parque recebeu um casal identificado como *S. xanthosternos*. Nessa época, o parque já havia outros espécimes morfológicamente distintos e o veterinário acredita que houve reprodução cruzada, pois comumente os macacos-pregos transitam entre os cativeiros semi-abertos, no formato de ilhas. Hoje é difícil caracterizar os animais nascidos no parque usando apenas dados morfológicos. No entanto, as placas informativas nos cativeiros os classificam como *S. apella*.

Na Bahia, são encontradas três espécies do gênero *Sapajus*. *S. xanthosternos* é encontrada ao sul do estado na região de Mata Atlântica (Oliveira *et al.*, 2011), enquanto *S. robustus* distribui-se no oeste do estado e *S. libidinosus* habita áreas de caatinga (Silva, 2001). Como mencionado anteriormente, as espécies *S. xanthosternos* e *S. robustus* estão na Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN (2012.2). Em decorrência disso, uma Comissão Internacional para Gestão e Conservação de *S. xanthosternos* e *S. robustus* foi criada em 1992, sendo responsável pela conservação *in situ* e *ex situ* dessas espécies, incluindo o manejo em cativeiro (Oliveira *et al.*, 2011).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Identificar espécies de macacos-pregos do gênero *Sapajus* em cativeiros da Bahia, utilizando uma abordagem molecular, e verificar a possível existência de híbridos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Analisar sequências de DNA mitocondrial e nuclear de espécimes do gênero *Sapajus* mantidos em cativeiro na Bahia;
- Comparar as sequências obtidas com os dados disponíveis no GenBank para identificação das espécies;
- Detectar a existência ou não de híbridos entre os espécimes amostrados, a partir da comparação entre sequências mitocondriais e nucleares.
- Fornecer uma melhor caracterização das espécies cativas de modo a contribuir com um melhor plano de manejo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostragem

As amostras de sangue dos 51 espécimes analisadas nesse trabalho foram coletadas em quatro locais de cativeiro no Estado da Bahia. Foram 14 espécimes no Parque Municipal da Matinha no município de Itapetinga (PMM), 09 espécimes no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) de Salvador, 26 espécimes no CETAS de Vitória da Conquista e 02 espécimes do CETAS de Porto Seguro, os quais, no período da coleta, estavam no CETAS de Vitória da Conquista. Dados de origem geográfica não constam no presente trabalho, pois as informações geradas nos locais de coleta não eram precisas, uma vez que muitos haviam sido apreendidos de comerciantes ilegais e compradores. Dessa forma alguns espécimes, em que a distância genética foi similar entre duas ou três espécies e o padrão morfológico foi confuso, não pode ter sua classificação definida, uma vez que a origem geográfica também é desconhecida.

As coletas foram realizadas com licença emitida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) número 31132-2 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). O sangue foi coletado por veterinários do PMM e do CETAS de Vitória da Conquista, ambos com licença do ICMBio. Os espécimes foram sedados com o anestésico Zoletil<sup>®</sup> 50 (1 ml para cada kg de peso), já utilizado pelos CETAS e PMM. A quantidade de sangue retirada, da veia femural, jugular ou cefálica foi determinada pelo peso do animal, sendo 1 ml para cada 1kg. Porém, para indivíduos acima de 3 kg, o volume de sangue retirado não ultrapassou os 3 ml.

### 4.2 Extração e Quantificação

As amostras de sangue mantida em tubos de coleta a vácuo com EDTA foram levadas para o Laboratório de Citogenética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), onde foram armazenadas a  $-20^{\circ}$  C. O DNA foi extraído usando o Kit Wizard Genomic da Promega, com volume final de 25  $\mu$ L. Para cada extração foi utilizado 300  $\mu$ L

de sangue, como determina o protocolo do fabricante. O volume de sangue restante está armazenado no Laboratório de Citogenética da UESB, e será usado em pesquisas futuras.

A quantificação foi realizada em gel de agarose. Esse procedimento foi adotado apenas para verificar a existência de DNA, após a extração.

### 4.3 PCR e Sequenciamento

O DNA extraído foi levado para o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará (UFPA), campus de Bragança, onde foi feita a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com amplificação da alça-D (D-loop), citocromo b (Cytb) e Citocromo oxidase I (COI) do mtDNA, além de regiões Alu (Cebidae 5 e CeSa 1) do genoma nuclear.

O protocolo da PCR foi padronizado para o volume final de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 4  $\mu\text{L}$  de dNTPs (1,25 mM), 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10x (Invitrogen – Tris-HCl e KCl, pH 7,8), 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 1  $\mu\text{L}$  de DNA (~150 ng do DNA total), 1  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (50ng/ $\mu\text{L}$ ), 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq (5 U/ $\mu\text{L}$ ) polimerase (Invitrogen) e água destilada para completar o volume final da reação. As condições durante as reações com os cinco *primers* utilizados estão descritos na tabela 03.

O produto de cada PCR foi purificado usando polietileno glicol (PEG), seguido de duas lavagens com álcool 80%, secagem e reidratação com solução de reidratação do DNA do Kit Wizard Genomic da Promega.

Após a purificação, os produtos da PCR foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de dideoxinucleotídeos terminais (Sanger *et al.*, 1977) com o kit de reagentes Big Dye (ABI Prism TMDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction — Applied Biosystems, USA). A reação foi realizada para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , adicionando 2  $\mu\text{L}$  de um dos iniciadores concentrados a 0,8 pmol, 1  $\mu\text{L}$  de produtos da PCR, 1  $\mu\text{L}$  de mix Big Dye, 2  $\mu\text{L}$  de Tampão e 4  $\mu\text{L}$  de água destilada. Os reagentes não incorporados durante a reação foram eliminados através da precipitação com álcool.

O sequenciamento dos produtos amplificados e marcados foi obtido por meio do sequenciador automático ABI 3500 XL (Applied Biosystems).

Tabela 03: Condições de amplificação de cada *primer* usado no trabalho. Em F, sequência forward; Em R, sequência reverse.

<b>Marcador</b>	<b>Sequências 5' - 3' F/R</b>	<b>Condições/Amplificação</b>
<b><i>Cebus D-loop</i></b> (697 pb)	F: GGCCTTGTAACCGGAAAAGG R: GAAAGGCTAGGACCAAACCTG	Desnaturação inicial a 94°C por 4 min.; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s., anelamento a 60°C por 30 s. e extensão a 72°C por 40 s. Extensão final a 72° C por 5 min.
<b>COI</b> (não amplificado)	F:TGGACTAATCATAAAGATATCGGCAC R:TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	Desnaturação inicial a 95°C por 5 min., 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s., anelamento a 45°C por 30 s. e extensão a 72°C por 45seg. Extensão final a 72° C por 5 min.
<b><i>CytB – Cebus</i></b> (519 pb)	F: TGATATGAAAAGCCATCGTTGT R: CGTGTGAGGGTGGSTTRTC	Desnaturação inicial a 95°C por 5 min., 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 s., a 63°C por 40 s. e extensão a 72°C por 01 min. Extensão final a 72° C por 5 min.
<b><i>Cebidae5</i></b> (548 pb)	F: GGTACTGACCAATTACTIONTGGAG R: ACAGTGTGTACTIONTCTGACTTG	Desnaturação inicial a 95°C por 5 min., 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s., anelamento a 60°C por 30 s. e extensão a 72°C por 40 s. Extensão final a 72° C por 5 min.
<b><i>CeSa 1</i></b> (300)	F: CAGCTCYRGAAACTAGAGCACA R: GCTCAGAGGAGGGCTAYAAA	

#### 4.4 Análises Moleculares

O programa BIOEDIT 7.0 (Hall, 1999) foi usado para editar as sequências e o aplicativo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994 ) para alinhá-las. Sequências do GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) das regiões D-loop, Cytb e CeSa 1 de espécies selvagens de *Sapajus* e *Cebus* (tabela 04) foram alinhadas juntamente com as amostras coletadas para comparação e possível identificação das espécies. Foram escolhidas amostras com distribuição geográfica conhecida. Não foram encontradas no GenBank amostras da Região *Alu* (Cebidae 5) para espécies de *Sapajus* ou *Cebus*.

As amostras extraídas do GenBank ainda são classificadas como um único gênero (*Cebus*), porém aqui concordaremos com os últimos trabalhos publicados tratando o grupo de macacos-prego como dois gêneros distintos (Lynch Alfaro *et al.*, 2012).

Árvores filogenéticas de Máxima Parcimônia (MP) e Neighbor-Joining (NJ) a partir de matrizes de distância genética utilizando o modelo de Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980) foram obtidas no MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2007). A consistência dos nós foi estimada em 1000 repetições de *bootstrap*, usando o mesmo programa.

Os haplótipos foram determinados pelo programa DnaSP 5.10 (Rozas *et al.*, 2010). As análises foram realizadas com haplótipos individuais. Os agrupamentos encontrados foram utilizados para reforçar as análises da matriz de distância e das árvores filogenéticas. Como os marcadores genéticos usados possuem padrões de herança distintos, materna no caso do DNA mitocondrial e duplo-parental no caso do nuclear, discrepâncias entre as topologias das árvores filogenéticas foram interpretadas cuidadosamente para se encontrar indícios de hibridação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Marcadores Mitocondriais

Em todos os marcadores utilizados a formação dos haplótipos se mostrou independente da localização dos indivíduos amostrados, como mostra a tabela 04. Esse fator já era esperado, visto que são animais de cativeiro com origem geográfica diversificada, geralmente resgatados do tráfico e comércio ilegal de animais silvestres.

Todos os indivíduos amostrados nesse trabalho agruparam com sequências de indivíduos do gênero *Sapajus* depositadas no GenBank (figuras 03 e 04). Esse resultado já era esperado visto que *Sapajos* é o único gênero de macaco-prego presente na Bahia e em toda região de Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga. Dessa forma, podemos supor que os indivíduos amostrados são originários do próprio estado ou de áreas circunvizinhas.

O grupo tem história evolutiva muito recente, e como consequência a distância genética entre as espécies foi muito baixa. Esse fator junto com a proximidade do ambiente de distribuição de cada espécie dificulta uma descrição exata de sua taxonomia, quando não se analisa fatores como distribuição geográfica e dados moleculares em conjunto com os critérios morfológicos e fenéticos (Casado, 2010; Lynch Alfaro *et al.*, 2012).

#### 5.1.1 COI

Não conseguimos obter fragmentos do COI com qualidade, que pudessem ser analisados. Fizemos três ampliações das mesmas amostras para verificar uma possível contaminação, porém o resultado foi sempre o mesmo. Estudos com esse marcador, referente a esses gêneros, precisam ser explorados, com novos primers sendo testados, uma vez que o COI é considerado o “código de barra” para as espécies e os gêneros *Cebus* e *Sapajus*, precisam ser melhor caracterizados.



Tabela 04: Identificação dos indivíduos usados no estudo, localização das coletas, haplótipos de cada marcador e código de identificação do GenBank. As letras A, B, C e D correspondem respectivamente a Parque Municipal da Matinha, CETAS de Salvador, CETAS de Vitória da Conquista e CETAS de Porto Seguro.

Identificação	Local da coleta	Haplótipo Cytb	Haplótipo D-loop	Haplótipo CeSa	Haplótipo Alu5	Código GenBank
1	A	17	---	5	1	
2	A	8	1	1	1	
3	A	8	10	3	1	
4	A	1	17	5	2	
5	A	17	18	6	3	
6	A	9	6	5	3	
7	A	13	3	5	1	
8	A	1	17	3	3	
9	A	1	17	3	1	
10	A	1	17	5	3	
11	A	9	9	5	1	
12	A	10	16	7	3	
13	A	10	16	5	1	
14	A	10	16	5		
15	B	14	30	5	1	
16	B	2	32	5	1	
17	B	8	11	3	1	
18	B	1	19	5	1	
19	B	1	20	5	1	
20	B	1	21	5	1	
22	B	8	12	5	1	
23	B	11	29	5	1	
24	B	15	22	5	1	
25	C	1	23	5	1	
26	C	4	34	5	1	
27	C	12	26	3	1	
28	C	7	24	3	5	
29	C	4	33	5	1	
30	C	9	4	3	6	
31	C	8	10	8	1	
32	C	9	5	4	1	
33	C	8	13	3	1	
34	C	9	7	3	1	
35	C	1	25	5	1	
36	C	9	8	1	1	
37	C	7	27	5	1	
38	C	17	28	5	1	
39	C	4	34	5	1	
40	C	6	35	5	1	
41	C	5	36	2	1	
42	C	8	14	5	1	
43	C	8	15	8	4	
44	C	3	31	5	1	
45	C	9	5	3	1	
46	C	1	23	5	1	
47	C	8	34	5	1	
48	C	4	34	5	1	
49	C	16	37	1	1	
50	C	4	34	5	1	
51	D	9	2	5	1	
52	D	4	38	2	1	
<i>S.libidinosus</i>		1				JN409299.1
<i>S. apella</i>		18				JQ317665.1
<i>S. xanthosternus</i>		19				FJ529105.1
<i>S.cay</i>		20				JN409298.1
<i>C. nigrítus robustus</i>		21				JN409301.1
<i>S. nigrítus</i>		22				Jn409304.1
<i>C. albifrons</i>		23				JQ317662.1
<i>C. capucinus</i>		24				JQ317658
<i>C. olivaceus</i>		25				JQ317661.1
<i>S. apella</i>			39			JN380205.1
<i>C. albifrons</i>			40			AJ309866.1
<i>S. apella</i>				4		FJ440468.1
<i>S. flavius</i>		14				JN835286.1

### 5.1.2 Cytb

Foram analisadas 51 sequências de Cytb de animais de cativeiro, que por sua localização no estado da Bahia, presumimos que fossem do gênero *Sapajus*. Utilizamos sete sequências do Genbank do gênero *Sapajus* e três do gênero *Cebus* de animais selvagens com taxonomia definida, para comparar com as amostras coletadas no intuito de melhor definir as espécies. Todas as sequências apresentaram 519 pares de bases com 89 sítios variados, resultando em 25 haplótipos, sendo que oito destes foram identificados em mais de um indivíduo.

A matriz de distância genética variou nas sequências entre 0 e 9%. As árvores de Neigbor-Joining (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) formaram dois grupos bem definidos, separando os gêneros *Cebus* e *Sapajus*, com consistência entre nós de 100% para a MP. A distância genética entre os dois grupos ficou em torno de 7 a 9%.

O ramo constituído pelo gênero *Sapajus* formou dois grupos distintos na árvore de NJ e MP. A árvore de NJ recuperou três grupos. *Sapajus nigrinus* aparece como uma linhagem basal, seguida de dois ramos. Um desses ramos, com *bootstrap* de 96%, reuniu 39 das amostras coletadas para este estudo e as espécies *Sapajus apella*, *S. cay*, *S. libidinosus*, *S. flavius* e *S. nigrinus robustus*, cujas sequências foram obtidas no Genbank. O outro ramo, com suporte de 98% de *bootstrap* é composto por *Sapajus xanthosternos* e mais 21 amostras do presente estudo para Cytb (figuras 03 e 04). Alguns ramos apresentaram baixo valor de *bootstrap*.

As divergências nucleotídicas entre *S. nigrinus* e os demais chega a 5%, enquanto que entre os dois grupos adicionais são de 3 a 5%. Dentro de cada grupo, as distâncias são bem mais baixas. No grupo de *Sapajus apella*, *S. cay*, *S. libidinosus*, *S. flavius* e *S. nigrinus robustus* e as amostras deste estudo as divergências são inferiores a 1,5%, enquanto no grupo que reúne *S. xanthosternos* são inferiores a 2%.

Este resultado concorda com o encontrado por Lynch Alfaro *et al.* (2012a), indicando que *S. nigrinus* divergiu anteriormente aos demais *Sapajus* do norte da Mata Atlântica, Cerrados, Caatinga e Amazônia. Para Lynch Alfaro *et al.* (2012a), *S. nigrinus* é provavelmente o ancestral do grupo *Sapajus*. Nossos resultados mostram que *Sapajus apella*, *S. cay*, *S. libidinosus*, *S. flavius* e *S. nigrinus robustus* são estreitamente

relacionadas, e constituem um grupo de espécies com período de divergência mais recente, enquanto *S. xanthosternos* constitui um grupo diferenciado.

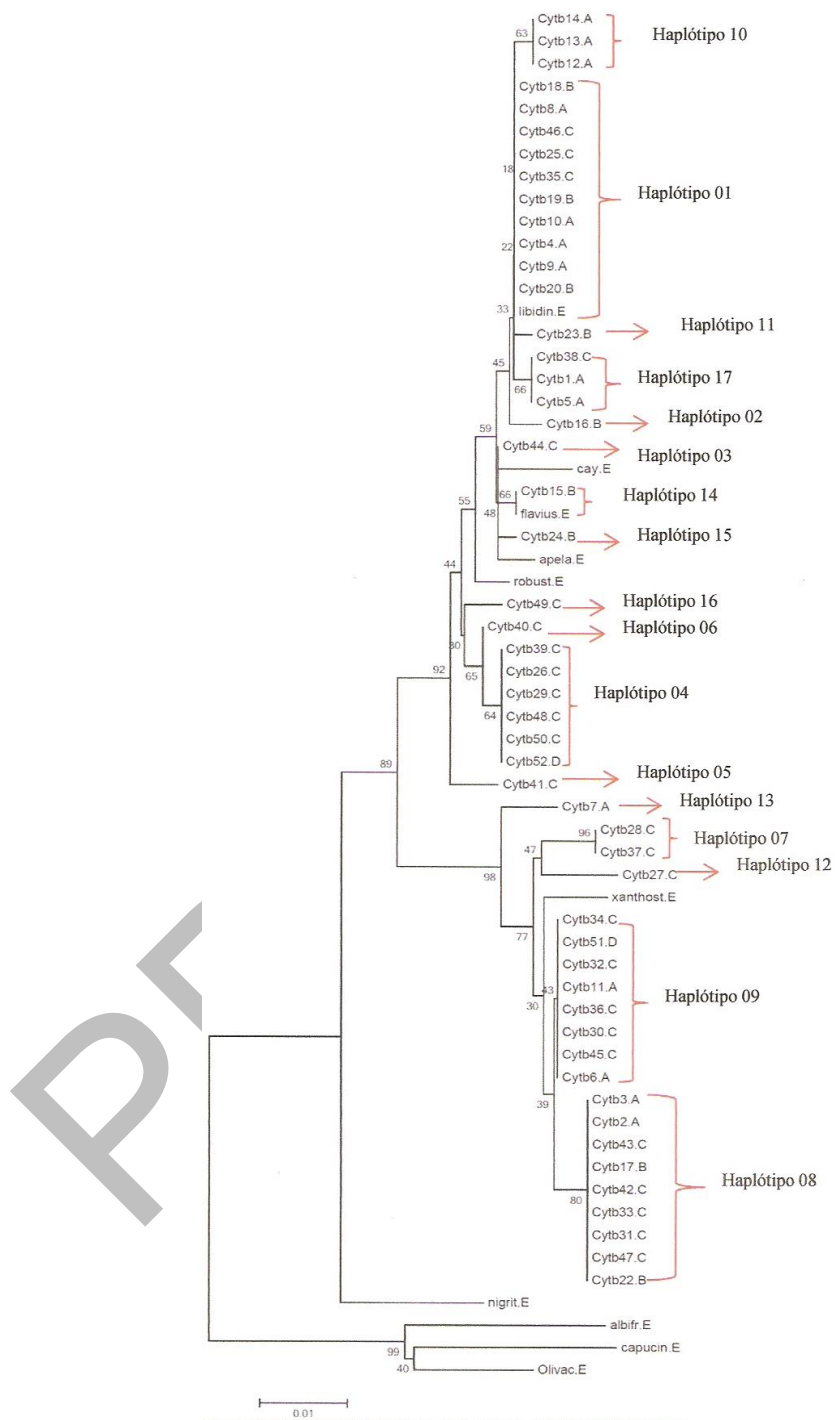


Figura 03: Agrupamento de Neigbor-joining (NJ) baseado no sequenciamento do Cytb. Os números nos nós indicam o valor do *bootstrap*. As letras A, B, C e D indicam a localidade do espécime. Em destaque os haplótipos. Localidade e haplótipos são indicados na tabela 4.

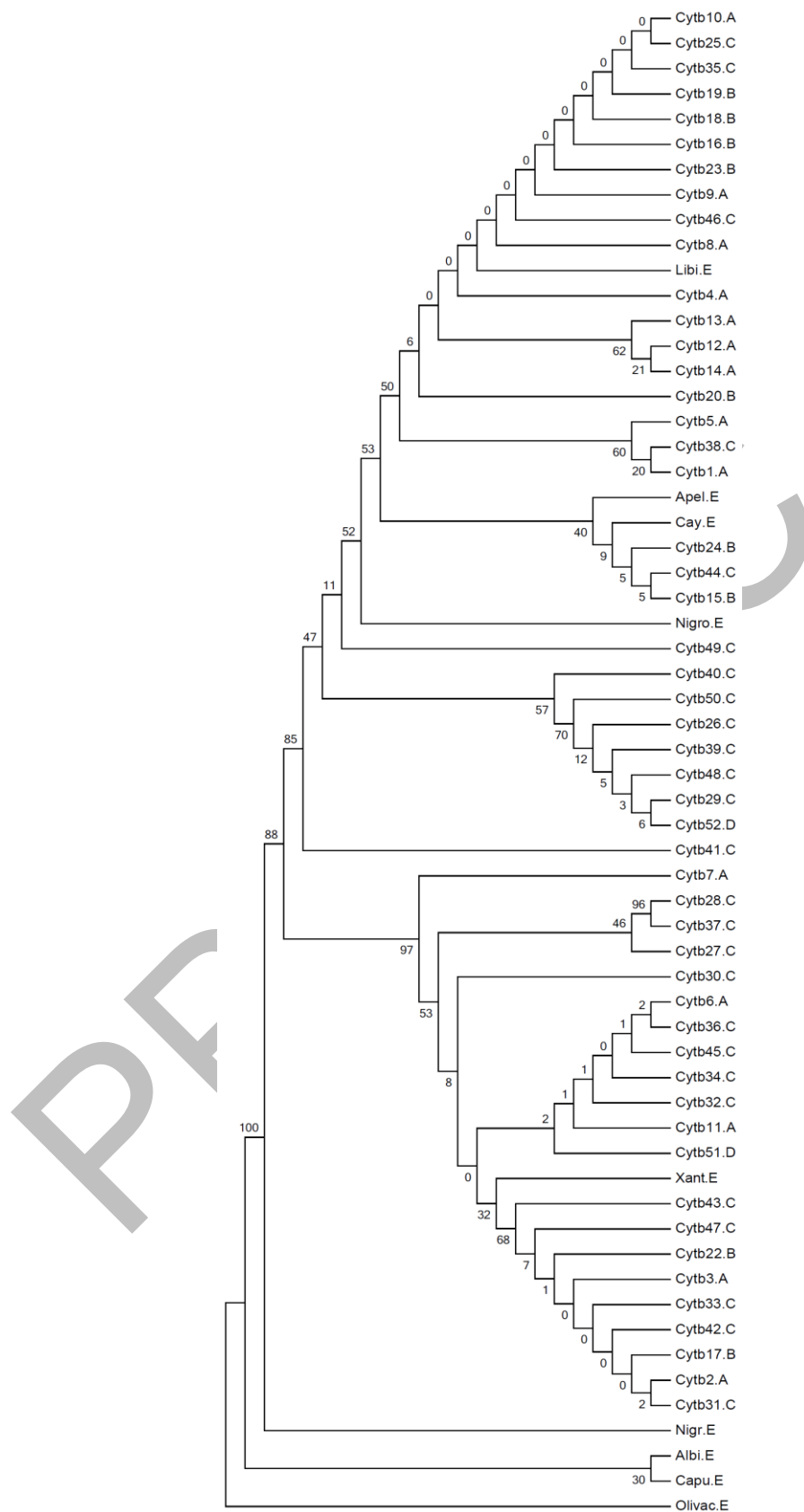


Figura 04: Agrupamento Máxima Parcimônia (MP) baseado no sequenciamento do Cytb. Os números nos nós indicam o valor do *bootstrap*

A sequência de *S. libidinosus* do GenBank apresentou distância genética muito baixa com os indivíduos do haplótipo 1. Esses indivíduos se agruparam em um único ramo na árvore de NJ (figura 03). O resultado observado na árvore de MP foi similar, pois apesar de formarem ramos separados, o valor de *bootstrap* foi zero, não sendo considerados ramos verdadeiros. Outros três haplótipos (10, 11 e 17) formaram ramos próximos de *S. libidinosus*, com distância genética de 0,2%, porém com baixo valor de *bootstrap*. Dessa forma, também não consideramos um ramo verdadeiro. Esse fator e a baixa divergência reforçam que tais amostras pertençam de fato a *S. libidinosus*.

As sequências de *S. apella*, *S. cay* e *S. flavius* do GenBank se agruparam com os haplótipos 3, 14 e 15 amostrados. A amostra de *S. flavius* compartilhou o mesmo haplótipo com o indivíduo 15 (haplótipo 14). Os valores de consistência de nós foram de 48% para NJ e 53% para MP (figuras 03 e 04). Para alguns autores (p.ex., Freeman e Herron, 2009), valores acima de 50% podem ser estimados como ramos verdadeiros. Porém, consideramos confiáveis apenas valores acima de 80%, uma vez que a divergência recente entre as espécies pode produzir um padrão de ramificação incerto. A incerteza dessa ramificação se reforça quando são comparados os valores da distância genética dos haplótipos 3, 14 e 15 com as amostras dos GenBank. Apesar de agruparem com *S. apella*, *S. flavius* e *S. cay* do GenBank, a distância genética foi menor para *S. flavius* (0,2% para o haplótipo 3; 0,4% para o haplótipo 15). A mesma distância genética de 0,2% foi encontrada entre o haplótipo 3 e a amostra de *S. libidinosus* do Genbank. Entre os indivíduos amostrados e a sequência depositada de *S. apella* no GenBank, a distância genética também foi baixa, com 0,4% entre *S. apella* e o haplótipo 3 e mais alta (0,6%) entre *S. apella* e os haplótipos 14 e 15. Essa baixa diferença entre as distâncias das amostras e as sequências de *S. libidinosus* e *S. apella* pode ser consequência de uma divergência recente. Segundo Lynch Alfaro e colaboradores (2012a), a divergência entre *S. libidinosus* do Cerrado e *S. apella* da Amazônia é de cerca de 200 mil anos. Dessa forma, o tempo curto de separação entre as espécies permitiu o acúmulo de poucas diferenças genéticas.

Uma vez que o haplótipo 3 foi muito similar às sequências de *S. flavius* e *S. libidinosus* (0,2% de divergência para ambas as amostras), a morfologia externa do indivíduo portador do haplótipo 3 foi analisada para auxiliar na sua identificação. A morfologia externa desse indivíduo, assim como do indivíduo do haplótipo 14, é muito

similar a *S. flavius* (figura 05). Essa espécie foi redescoberta em 2006 e apresenta algumas características morfológicas distintas das demais, como pelo amarelado e um saco grande na garganta de machos adultos (Oliveira e Langguth, 2006; Lynch Alfaro *et al.*, 2012a).

Adicionalmente, a proximidade da distribuição geográfica entre *S. flavius* e *S. libidinosus* (figura 06) pode influenciar na baixa divergência entre ambas e as características morfológicas indicam que essas amostras correspondem a *S. flavius*. Nesse caso, a baixa divergência com a amostra de *S. libidinosus* do GenBank talvez tenha sido provocada pelo tempo de divergência muito recente entre ambas e possibilidades de introgressão nas áreas de ocorrência. De fato, a distância genética entre *S. libidinosus* e *S. apella* (espécie amazônica) foi de 0,6%, maior que a encontrada entre os haplótipos 3 e 14 com *S. libidinosus* do GenBank.

Lynch Alfaro *et al.* (2012a) levantam a questão sobre a provável linhagem formada por *S. flavius*. As hipóteses seriam de uma possível linhagem com *S. libidinosus*, geograficamente mais próximo, ou com *S. xanthosternos*. Nossos resultados indicam uma possibilidade maior para *S. libidinosus* devido à baixa divergência genética comentada anteriormente. Com *S. xanthosternos* (GenBank), a divergência foi de 3,6% e 3,8% com os haplótipos 3 e 14, respectivamente. Porém, trabalhos com espécimes de *S. flavius* da natureza são necessários para elucidar essa questão.



Figura 05: Haplótipo 14 (a, b, c), juvenil, sem as características marcantes dos machos adultos, mas com a coloração amarelada de *S. flavius*. Haplótipo 3 (c, d, e f) com coloração amarelada e saco grande na garganta (d), típico de machos adultos de *S. flavius*.

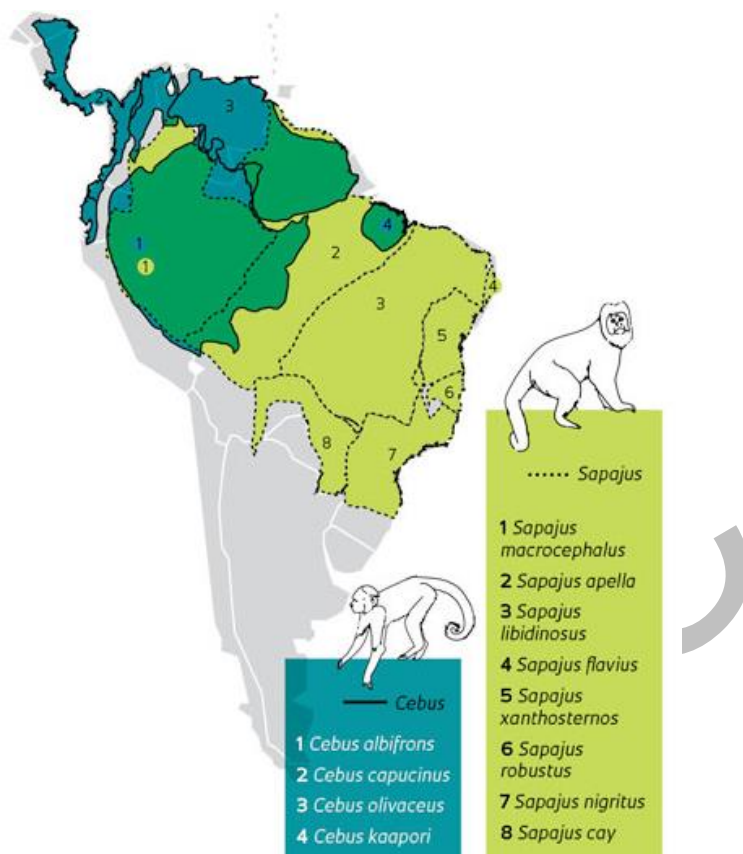


Figura 06: Distribuição geográfica dos gêneros *Cebus* e *Sapajus*. (Fonte: Pesquisa FAPESP, junho de 2012).

Ainda no grupo formado por amostras coletadas e as de *S. libidinosus*, *S. apella*, *S. cay*, *S. flavius* e *S. robustus* do GenBank, houve agrupamento dos haplótipos 4, 6 e 16, porém com valor de *bootstrap* de 30%. A distância genética entre os haplótipos 4 e 16 foi igual a 1% em relação a *S. libidinosus* e *S. robustus*. O haplótipo 6 e as mesmas amostras divergiram em 0,8%. Assim, os baixos valores do *bootstrap* e de distância genética dificultam a classificação para os espécimes amostrados.

Para resolver essa problemática, a observação dos padrões morfológicos pode ser útil como demonstrado em *S. flavius*. No caso de *S. robustus*, Silva (2001) destacou a morfologia do capuz como a característica mais variável e ligada à faixa etária. Essa variação do capuz por idade havia sido descrita anteriormente por Torres de Assumpção (figura 7a) e confirmada por Silva (2001), que a organizou em cinco fases cronológicas (figura 7b). As fases numeradas por esse autor de 1 a 5 correspondem, respectivamente, às

idades de 3, 7, 8, 11,5 e 12 anos (indivíduos adultos). Assim, as três amostras (48, 50 e 52) do haplótipo 4 apresentam formação do capuz, própria de *S. robustus* (figura 7c, d, e).

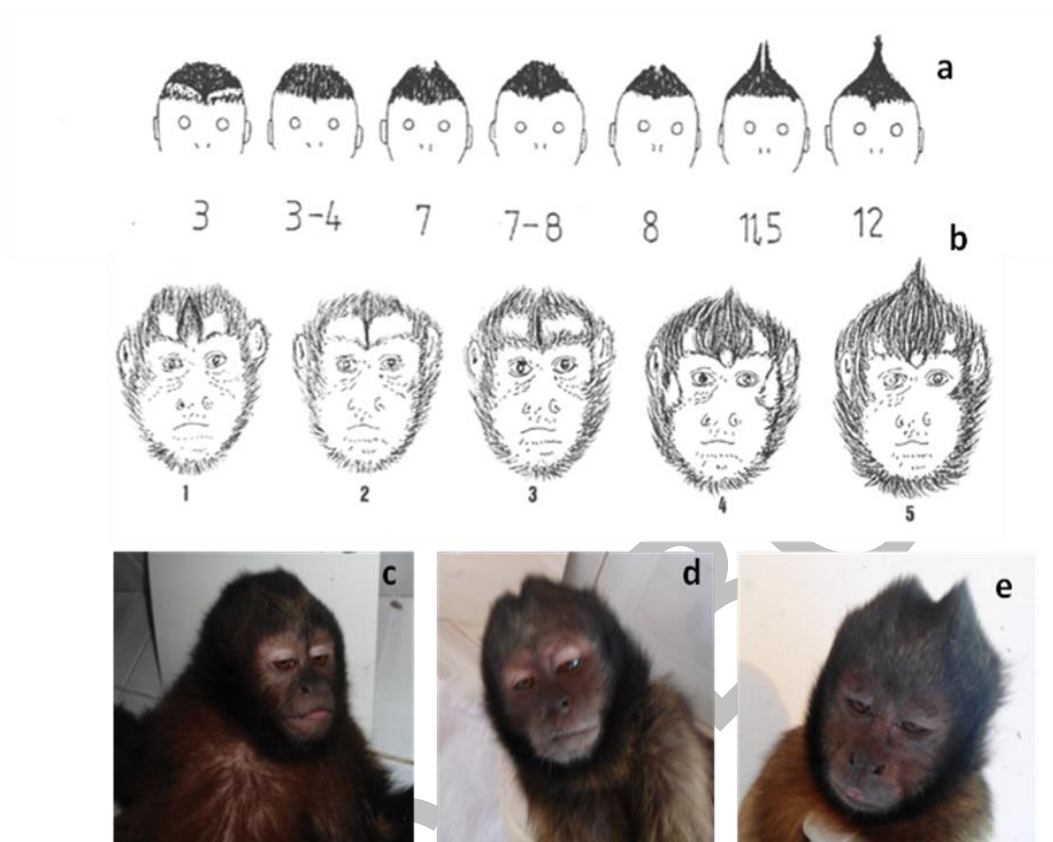


Figura 07: Amostras do haplótipo 4 com destaque para a morfologia do capuz das amostras 48 (c), 50 (d) e 52 (e). Em b, morfologia cronológica de 1 a 5 do capuz em *S. robustus* proposta por Silva (2001) e em a, ilustração em faixas etárias (3 a 12 anos) proposta por Torres de Assumpção.

A amostra 48 (figura 7c) condiz com o padrão de indivíduos mais jovens, enquanto as amostras 50 (figura 7d) e 52 (figura 7e) têm padrão similar a indivíduos mais velhos. Além da morfologia do capuz, a coloração marrom-avermelhada dos pelos ventrais e dorsais com extremidade dos membros em marrom enegrecido (Silva, 2001) ainda é observada nas três amostras do haplótipo 4, sugerindo que essas sejam *S. robustus*.

Por outro lado, o haplótipo 5 formou um ramo separado das amostras anteriormente citadas com consistência de nó de 92% de *bootstrap*. A comparação entre as distâncias genéticas foi similar para as amostras de *S. flavius*, *S. robustus* e *S. libidinosus* com 1,3% de divergência, não permitindo sugerir a qual dessas espécies esse haplótipo seria mais relacionado. Observando a morfologia do espécime do haplótipo 5, assim como o 4, há uma similaridade maior com a descrição morfológica de *S. robustus* feita por Silva (2001).



Características como capuz marrom enegrecido, com dois tufos convergentes no alto da cabeça, aparentando um único tufo mediano; testa dividida por uma faixa em forma de diadema, deixando apenas duas pequenas manchas mais claras de cada lado; pelos ventrais e dorsais marrons avermelhados e extremidade dos membros em marrom enegrecido foram descritas pelo autor como pertencentes a *S. robustus* e são observáveis no espécime do haplótipo 5 (figura 8).



Figura 08: Haplótipo 5 com morfologia característica de *S. robustus* com dois tufos convergentes no alto da cabeça (a), pêlos ventrais (b) e dorsais (c) marrons avermelhados e extremidade dos membros marrom-enegrecida.

Os haplótipos 4, 5, 6 e 16 são formados por nove indivíduos, dos quais 8 são do CETAS de Vitória da Conquista e um do CETAS de Porto Seguro. Assim, a provável classificação desses como *S. robustus* (tabela 05), espécie em perigo de extinção pela Lista Vermelha da IUCN, deve ser considerada e planos de conservação devem ser elaborados na tentativa de proteger as espécies cativas, especialmente em estratégias de reintrodução na natureza. Os responsáveis pelo CETAS de Vitória da Conquista informaram que a identificação dos indivíduos é feita apenas por análise morfológica, tendo como característica mais observada, o padrão cromático do pelo. Porém, os próprios responsáveis sabem que essa é uma característica que pode gerar incertezas, com isso alguns indivíduos não são classificados. Dessa forma não fomos informados sobre a classificação feita pelo CETAS.

O segundo grupo formado por *Sapajus* se divide em dois ramos distintos com consistência do nó de 96% para MP e 98% para NJ na árvore do Cytb. Um ramo é formado

pelo haplótipo 13, que apresentou 1,6% de divergência da amostra de *S. xanthosternos* do GenBank. O outro ramo apresenta dois agrupamentos na árvore de NJ, com consistência de 78%. O haplótipo 7 formou um ramo que apresentou maior distância genética (1,9%), quando comparado à amostra de *S. xanthosternos* e o haplótipo 12 (1,6% de divergência). Os haplótipos 8 e 9 formaram ramos com menor divergência (1%) e baixo valor de *bootstrap*. O alto grau de consistência no agrupamento de indivíduos com *S. xanthosternos* (figura 03) sugere que eles sejam da mesma espécie. O valor mais alto da distância genética desse grupo em relação aos demais pode ser devido ao maior tempo de divergência dessa espécie em relação às daquelas do Cerrado e Amazônia. Segundo Lynch Alfaro *et al.* (2012a), a expansão de *Sapajus* começou no Norte da Mata Atlântica (local de distribuição de *S. xanthosternos*) há 2,1 milhões de anos.

Dos 14 espécimes do Parque Municipal da Matinha, 09 foram sugeridos como *S. libidinosus* e 05 como *S. xanthosternos* (tabela 05). Esse resultado mostra que a classificação dos macacos-prego como *S. apella* utilizada pelo parque é equivocada. Como consequência desse equívoco, pode ocorrer cruzamento entre espécies distintas, estabelecendo a presença de híbridos, o que prejudicaria a conservação das espécies cativas e de preservação dos estoques genéticos puros. Dessa forma, tanto o Parque Municipal da Matinha, quanto os CETAS deveriam buscar parcerias com centros de pesquisa na tentativa de realizar análises moleculares com intuito de classificar os animais cativos.

### 5.1.3 D-loop

A base de dados de D-loop apresentou 697 pares de base com 148 sítios variáveis. Por problemas técnicos laboratoriais, a sequência nucleotídica do indivíduo número 1 não consta na análise. Dessa forma, analisamos 50 sequências de indivíduos de cativeiros e duas extraídas do Genbank, também com o objetivo de comparação. Por ser uma região muito variável, houve a formação de 40 haplótipos, aparecendo seis haplótipos em mais de um indivíduo. A matriz de distância genética variou nas sequências gerando valores mais altos que Cytb (0 e 11,8%).

Assim como no Cytb, o ramo constituído pelo gênero *Sapajus* formou dois grupos distintos na árvore de NJ. Alguns ramos apresentaram baixo valor de *bootstrap*. Um ramo está agrupado com a amostra de *S. apella* do GenBank. Essa foi a única amostra do gênero

encontrada no GenBank para esse marcador com tamanho do fragmento comparável às sequências produzidas por nossas amostras (figura 09). A amostra de *S. apella* do GenBank se agrupou com o haplótipo 22, tendo os haplótipos 30 e 31 como grupo irmão. Esse resultado é similar ao encontrado na árvore de NJ e MP do Cytb.

Tabela 05: Classificação sugerida, após análise das árvores de Neigbor-Joining (NJ) e comparação das distâncias genéticas entre amostras coletas e as retiradas do GenBank, tendo como região analisada o Cytb. Os números representam as amostras e as letras A, B, C e D correspondem respectivamente aos locais de coleta: Parque Municipal da Matinha, CETAS de Salvador, CETAS de Vitória da Conquista e CETAS de Porto Seguro.

Identificação	Local da coleta	Classificação sugerida
1	A	<i>Sapajus Libidinosus</i>
2	A	<i>Sapajus xanthosternos</i>
3	A	<i>Sapajus xanthosternos</i>
4	A	<i>Sapajus Libidinosus</i>
5	A	<i>Sapajus Libidinosus</i>
6	A	<i>Sapajus xanthosternos</i>
7	A	<i>Sapajus xanthosternos</i>
8	A	<i>Sapajus Libidinosus</i>
9	A	<i>Sapajus Libidinosus</i>
10	A	<i>Sapajus Libidinosus</i>
11	A	<i>Sapajus xanthosternos</i>
12	A	<i>Sapajus Libidinosus</i>
13	A	<i>Sapajus Libidinosus</i>
14	A	<i>Sapajus Libidinosus</i>
15	B	<i>Sapajus flavius</i>
16	B	<i>Sapajus Libidinosus</i>
17	B	<i>Sapajus xanthosternos</i>
18	B	<i>Sapajus Libidinosus</i>
19	B	<i>Sapajus Libidinosus</i>
20	B	<i>Sapajus Libidinosus</i>
22	B	<i>Sapajus xanthosternos</i>
23	B	<i>Sapajus Libidinosus</i>
24	B	<i>Sapajus Libidinosus/flavius</i> <sup>*1</sup>
25	C	<i>Sapajus Libidinosus</i>
26	C	<i>Sapajus robustus</i>
27	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
28	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
29	C	<i>Sapajus robustus</i>
30	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
31	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
32	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
33	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
34	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
35	C	<i>Sapajus Libidinosus</i>
36	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
37	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
38	C	<i>Sapajus Libidinosus</i>
39	C	<i>Sapajus robustus</i>
40	C	<i>Sapajus robustus</i>
41	C	<i>Sapajus robustus</i>
42	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
43	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
44	C	<i>Sapajus flavius</i>
45	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
46	C	<i>Sapajus Libidinosus</i>
47	C	<i>Sapajus xanthosternos</i>
48	C	<i>Sapajus robustus</i>
49	C	<i>Sapajus robustus</i>
50	C	<i>Sapajus robustus</i>
51	D	<i>Sapajus xanthosternos</i>
52	D	<i>Sapajus robustus</i>

<sup>1</sup>\*Amostra obteve distância genética igual para as duas espécies (*S. libidinosus* e *S. flavius*). A comparação morfológica foi confusa, assim não pudemos sugerir a espécie.

A árvore das sequências do D-loop traz alguns indivíduos, que haviam se agrupado na árvore do Cytb, em ramos separados, porém esses ramos estão próximos entre si e foram ramos únicos na árvore do Cytb (figura 09). A diferença na topologia entre os dois marcadores se deve ao fato de D-loop ser uma região mais variada, com taxa evolutiva mais acentuada que o Cytb. Sua utilização nesse trabalho partiu da necessidade de comparações entre regiões moleculares diferentes na tentativa de melhor explicar os dados.

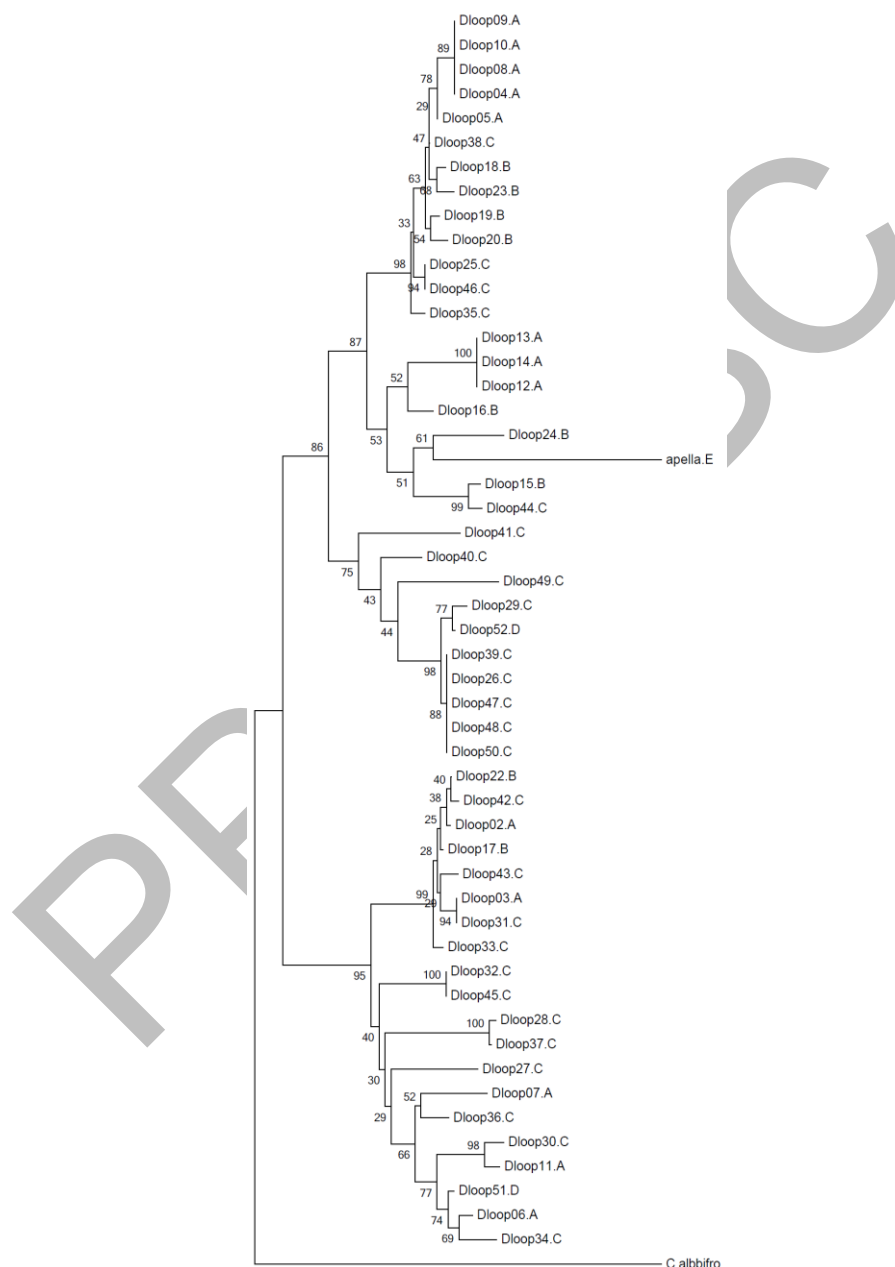


Figura. 09: Agrupamento por Neighbor-joining (NJ) baseado no sequenciamento do D-loop. Os números nos nós indicam o valor do *bootstrap*. As letras A, B, C e D indicam a localidade do espécime descrito tabela 4.

## 5.2 Marcadores nucleares

Os marcadores CeSa e Cebidae5 foram utilizados em todas as amostras, mas as comparações com os dados no GenBank são limitadas. No caso da região nuclear CeSa, apenas uma amostra da espécie *S. apella* foi encontrada no GenBank. As sequências analisadas desse marcador apresentaram 300 pares de bases, tendo oito sítios variáveis. Foram formados oito haplótipos, com cinco deles presentes em mais de um indivíduo. Similarmente, não encontramos amostras da região Cebidae5 no GenBank. As sequências dessa região apresentaram 548 pares de bases, tendo 10 sítios variáveis. Foram formados seis haplótipos, dois deles aparecendo em mais de um indivíduo. O haplótipo 1 está presente em 41 indivíduos.

Como o DNA nuclear é mais conservado que o DNA mitocondrial, as árvores formaram agrupamentos com poucos ramos, apresentando politomia na maioria deles. Apenas um ramo no marcador CeSa e dois no Cebidae 5 apresentaram alto valor de *bootstrap*, sendo esses utilizados na comparação com os marcadores mitocondriais. A matriz de distância mostrou variação maior na região CeSa (0 a 1,4%). A árvore de NJ da região CeSa formou dois grupos: um formado pelos haplótipos 5 e 7 e, outro agrupando os haplótipos 1, 2, 3, 4, 6 e 8 (figura 10). A região Cebidae5 é mais conservada de modo que a árvore de NJ formou dois grupos com poucos ramos (figura 11). Um ramo comportou os haplótipos 1, 2, 3 e 6 e o outro formou dois grupos com os haplótipos 4 e 5, com *bootstrap* de 87%. A matriz de distância variou entre 0 e 0,9%.

## 5.3 Verificação de híbridos

A presença de híbridos na coleta era esperada, uma vez que todos os animais amostrados são de cativeiros e apresentam diferentes origens e variações na pelagem. Para validar essa hipótese, uma comparação entre os marcadores mitocondriais e nucleares representa uma abordagem útil na determinação de híbridos. Na região CeSa, a amostra de *S. apella* depositada no GenBank formou um haplótipo com o indivíduo 32 (figura 10). Esse agrupamento é diferente do observado nas análises de mtDNA, no qual o indivíduo 32, se agrupou com a amostra de *S. xanthosternos* do GenBank. Esse fato sugere que o indivíduo 32 seja um híbrido.

Apesar de ser um animal cativo, o indivíduo 32 não nasceu no CETAS, e, portanto, a hibridação pode ter ocorrido na natureza entre espécies que tenham distribuição geográfica próxima (Rylands 2000 e Silva 2001; Albertos 2009; Casado 2010). Estaríamos assim considerando um híbrido formado pelas espécies *S. apella* e *S. xanthosternos*. Porém, essas espécies não têm zona de contato na natureza (figura 06) o que conduz a duas suposições.

A primeira delas sugere que apesar do indivíduo 32 ter se agrupado com a amostra de *S. apella*, a hibridação, caso tenha ocorrido na natureza, teria sido entre *S. libidinosus* e *S. xanthosternos*, uma vez que essas são espécies com distribuição geográfica próxima (figura 06). A ligação com a amostra de *S. apella*, teria ocorrido por essa ser uma espécie pouco divergente de *S. libidinosus* e por não termos amostras da região CeSa de *S. libidinosus* no GenBank.

A segunda hipótese versa sobre a incerteza da origem do indivíduo 32. Este foi apreendido pelo CETAS de Vitória da Conquista e tem origem geográfica desconhecida, portanto podemos também supor que o indivíduo já tenha vivido em outro cativeiro, onde a hibridação pode ter ocorrido.

Outros ramos da região CeSa formaram agrupamento entre espécies que divergiram dos dados com marcadores mitocondriais. Poderíamos sugerir que esses espécimes sejam híbridos, porém o baixo valor de *bootstrap* não permite assegurar a confiabilidade da composição desse ramo.

Na região Cebidae 5, um ramo com consistência entre nós de 87% agrupou os haplótipos 4 e 5. Outro grupo, com consistência de 64%, agrupou os haplótipos 2 e 3. O agrupamento formado pelos haplótipos 4 e 5 concorda com os marcadores mitocondriais. Já o haplótipo 3 é formado pelos indivíduos 4, 5, 8, 10 e 12, que de acordo com os dados mitocondriais são *S. libidinosus*, e pelo indivíduo 6 que agrupou-se com *S. xanthosternos* no Cytb. Todos esses indivíduos são do Parque Municipal da Matinha e a diferença encontrada entre os dois marcadores pode também indicar hibridação, fenômeno previamente comunicado pelo veterinário responsável do parque uma vez que todos os indivíduos estavam classificados como *S. apella*.

A possível hibridação entre espécies de macacos-prego na natureza é citada por vários autores (Rylands, 2000; Silva 2001; Reis *et al.* 2008; Casado, 2010). Porém não existem trabalhos que indiquem efetivamente a presença de híbridos selvagens. Dessa

forma, as análises de híbridos cativos, como os propostos nesse trabalho, poderiam elucidar questões quanto ao desempenho reprodutivo desses animais.

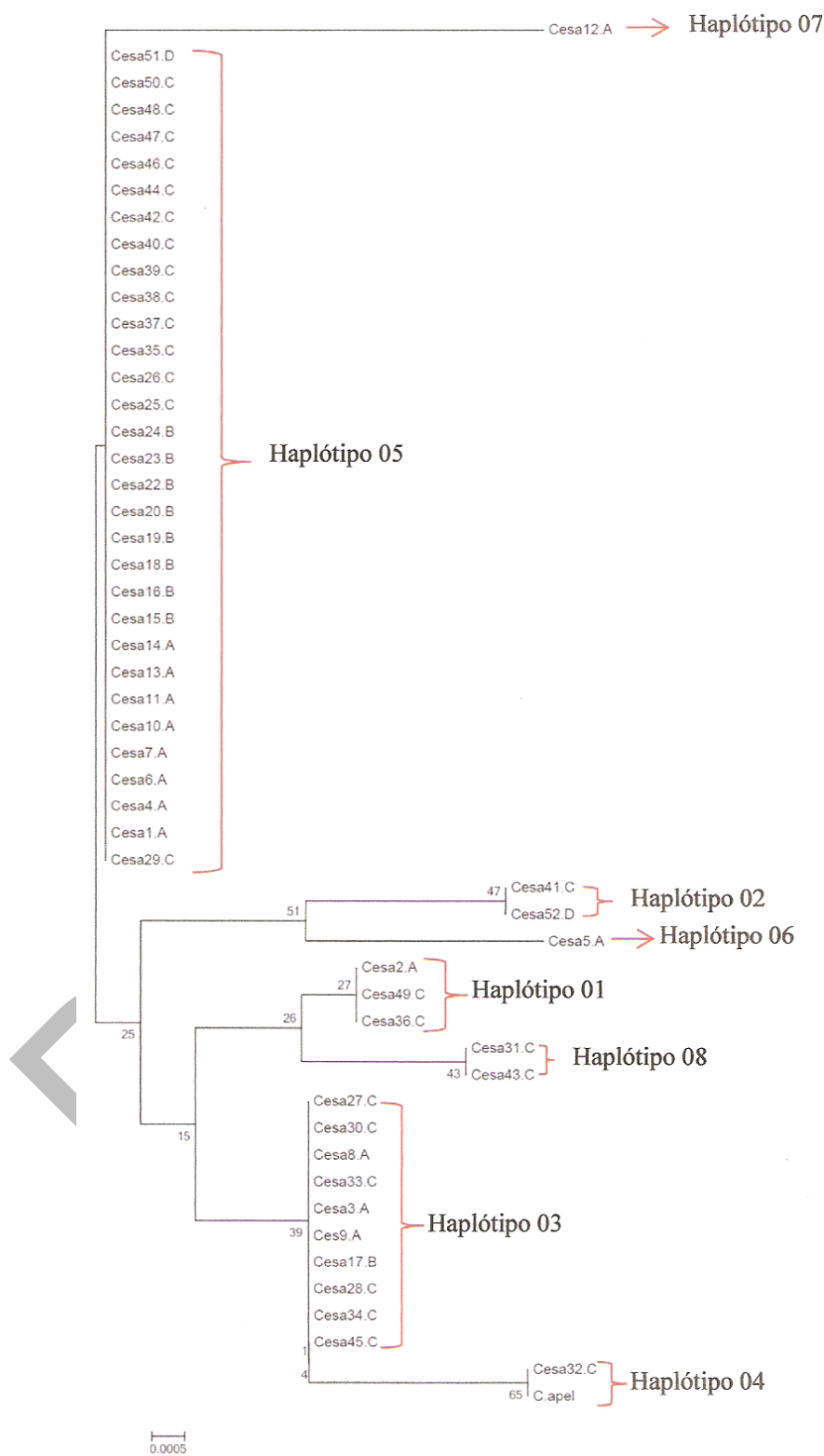


Figura 10: Agrupamento (NJ) baseados na região CeSa do DNA nuclear. Os números nos nós indicam o valor do *bootstrap*. Haplótipos são indicados na tabela 4.

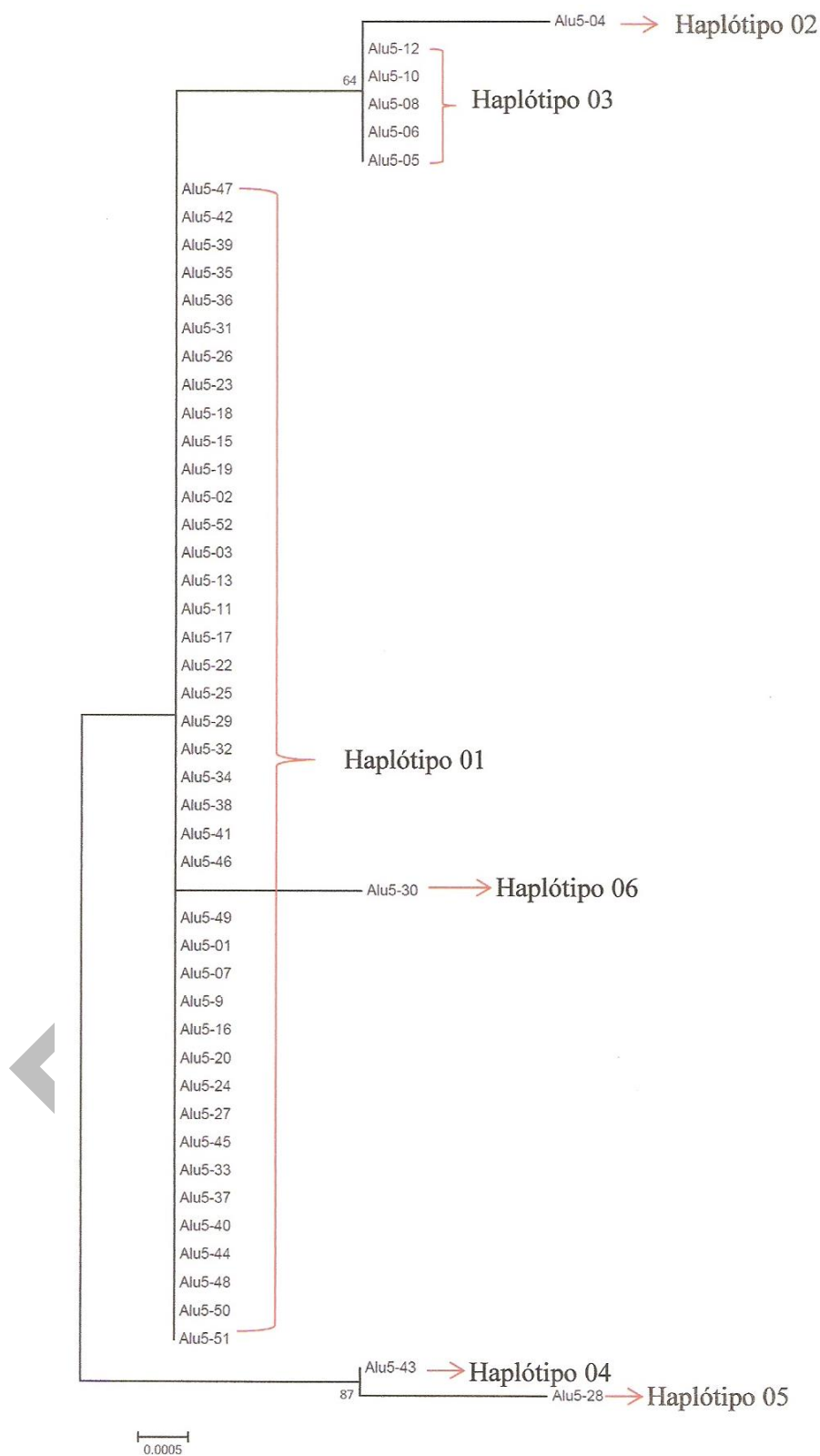


Figura 11: Agrupamento (NJ) baseados na região Cebidae5 do DNA nuclear. Os números nos nós indicam o valor do *bootstrap*. Haplótipos são indicados na tabela 4.



## 6 CONCLUSÕES

- Por ser um grupo polimórfico o gênero *Sapajus* necessita das diversas ferramentas metodológicas para que haja uma classificação taxonômica mais segura.
- As análises moleculares com os marcadores apropriados, envolvendo tanto sequências nucleares como mitocondriais mostra-se efetiva para identificar espécies e possíveis híbridos a partir da comparação com dados disponíveis no GenBank.
- O Cytb e o D-loop foram efetivos na separação dos gêneros *Cebus* e *Sapajus*,
- A grande quantidade de sequências do Cytb no GenBank, o faz um marcador útil na determinação de espécies do gênero *Sapajus*. Porém, para espécies com tempo de divergência mais recente, como espécies do Cerrado e Amazônia, ocorre a formação de muito ramos com politomia.
- A combinação entre distância genética e observação morfológica auxiliou na classificação de espécies que formaram ramos com politomia.
- Mesmo usando essas diferentes metodologias, um espécime não pode ser classificado. O conhecimento sobre sua distribuição geográfica poderia auxiliar na classificação.
- As diferenças na topologia entre as árvores de mtDNA e nuclear pode indicar existência de híbridos para alguns espécimes analisados. Nesse sentido, outros marcadores nucleares ainda devem ser utilizados para maximizar o número de espécimes identificados.
- Dos 15 espécimes do Parque Municipal da Matinha, nove foram classificados como *S. libidinosus* e cinco como *S. xanthosternos*. Dos nove espécimes do CETAS de Salvador, um foi classificado como *S. flavius*, cinco como *S. libidinosus*, dois como *S. xanthosternos* e um não pode ser classificado. Dos 26 espécimes do CETAS de Vitória da Conquista, quatro foram classificados como *S. libidinosus*, oito como *S. robustus*, 13 como *S. xanthosternos* e um como *S. flavius*. Dos dois espécimes do CETAS de Porto Seguro, um foi classificado como *S. xanthosternos* e um como *S. robustus*.

## 7 Referências Bibliográficas

- ALBERTOS, R.S. 2009. Levantamento de Primatas do Gênero *Cebus* em Cativeiro no Estado de São Paulo: Propostas para Destinação de Excedentes e Elaboração de Guia de Identificação. In: Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil. São Lourenço, MG. 01-04 p.
- ARIAS, MC; FRANCISCO, FO; SILVESTRE, D. 2003. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponídeos. In: MELO, GAR. Apoideia Neotrópica. Editora UNESCO. Criciúma. 305-309 p.
- BICCA-MARQUES, J. C.; SILVA, V. M.; GOMES, D. F. 2006. Ordem Primates. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Mamíferos do Brasil. Londrina/PR. Editora da Universidade Estadual de Londrina – Eduel. 437 p.
- BOORE, J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*. Vol. 27. No 8. 1767-1780.
- BORÉM, A. 2005. Considerações sobre fluxo gênico. Viçosa. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. N. 34. 86-90 p.
- BRANICKI, W; KUPIEC, T; PAWLOWSKI, P. 2003. Validation of Cytochrome b Sequence Analysis as a Method of Species Identification. *J Forensic Sci*, Jan. 2003, Vol. 48, No. 1.
- BRUNE, TO; RANGEL PHN; BRONDANI RPN; NEVES PCF; BRONDANI C. 2007. Fluxo Gênico entre Arroz Vermelho e Arroz Cultivado Estimado por Meio de Marcadores Moleculares Microsatélites. Goiás. *Pesquisa Agropecuária* (37) 2. 86-92 p.
- CAIXETA, E.T; OLIVEIRA, A.C; BRITO, G.G; SAKIYAMA, N.S. 2009. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, Aluizio. Marcadores Moleculares. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2ª ed. 11-94 p.
- CANTANHEDE, AM. 2008. Genética populacional do peixe-boi da Amazônia, *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia, Sirenia) na Amazônia Brasileira: Implicações para sua conservação. Manaus-AM. Universidade Federal do Amazonas. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas. 126 p.
- CASADO, F; BONVICINO, C.R; NAGLE, C; COMAS, B; MANZUR, T.D; LAHOZ, M.M; SEUÁNEZ, H.N. 2010. Mitochondrial Divergence Between 2 Populations of the Hooded Capuchin, *Cebus (Sapajus) cay* (Platyrrhini, Primates). *Journal of Heredity*. pg. 261-269. January.
- CASTRESANA, J. 2001. Cytochrome *b* Phylogeny and the Taxonomy of Great Apes and Mammals. *Mol. Biol. Evol.* 18(4):465–471.

DEWEERDT, S. 2002. What really is an evolutionarily significant unit? *Conservation Magazine*.3(1). Disponível em <http://www.conservationmagazine.org/2008/07/what-really-is-an-evolutionarily-significant-unit/>

FALEIRO, F G. 2007. Marcadores Genéticos Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina-DF. Embrapa.

FARIAS, I. P; ORTÍ, G; SAMPAIO, I; SCHNEIDER, H; MEYER, A. 2001. The Cytochrome b Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *J Mol Evol* 53:89–103.

FORD, M.J. 2002. Selection in captivity during supportive breeding may reduce fitness in the wild. *Conserv. Biol.* 16(3): 815–825.

FRANKHAN, R; BALLOU, J.D; BRISCOE, D.A. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto, SP. Sociedade Brasileira de Genética (SBG). 1<sup>a</sup> ed.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D., ELDRIDGE, M.D.B., LACY, R.C., RALLS, K., DUDASH, M.R. & FENSTER, C.B. 2011. Predicting the probability of outbreeding depression. *Conserv. Biol.* 25(3): 465–475.

FREEMAN, S; HERRON, J.C. 2009. Análise Evolutiva. Tradução: Maria Regina Borges-Osório, Rivo Fischer. 4. Ed. Porto Alegre. Artmed.

GALTIER, N; NABHOLZ, B.S; HURST, G. D. D. 2009. *Molecular Ecology* (2009) 18, 4541–4550

HALL, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

HEBERT, P. D. N; RATNASINGHAM, S; WAARD, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270, S96-S99

HEBERT, P. D. N; GREGORY, T. R. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology.* 54(5):852–859.

HERKE, S. W; XING. J; RAY, D. A; ZIMMERMAN J. W; RICHARD, C; BATZER, M. A. 2007. A SINE-based dichotomous key for primate identification. *Gene: Section Evolutionary Genomics.* 390. 39-51.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Lei nº 7.173 de dezembro de 1983. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br>. Acesso em: 01 de set. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Instrução Normativa 04, de 04 de Março de 2002. Disponível em: [http://www.ibama.gov.br/fauna-silvestre/wp-content/files/in\\_04\\_02.pdf](http://www.ibama.gov.br/fauna-silvestre/wp-content/files/in_04_02.pdf). Acesso em:

20 de ago 2009.

IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)> Acesso em: novembro de 2012.

IZAR, P. 2008. Dispersão de sementes por *Cebus nigrinus* e *Brachyteles arachnoides* em área de Mata Atlântica, Parque Estadual Intervales, SP pp. 8-24. In: A Primatologia no Brasil - 9 (S.F. Ferrari & J. Rímoli, Eds.) Aracaju, Sociedade Brasileira de Primatologia, Biologia Geral e Experimental – UFS

JACQUES, GS. 2005. Identificação de espécies animais usando sequências de genes mitocondriais no combate aos crimes contra a fauna. Brasília: Universidade Católica de Brasília Dissertação de Mestrado em Ciência Genômicas e Biotecnologias. 120 p.

JOHNS, G. C; AVISE, J. C. 1998. A Comparative Summary of Genetic Distances in the Vertebrates from the Mitochondrial Cytochrome b Gene. *Mol. Biol. Evol.* 15(11):1481–1490.

LYNCH ALFARO, JESSICA W. *et al.* 2012. Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)* 39, 272–288.

LYNCH ALFARO, J. W; SILVA JR, J. S; RYLANDS, A. B. 2012. How Different Are Robust and Gracile Capuchin Monkeys? An Argument for the Use of *Sapajus* and *Cebus*. *American Journal of Primatology* 74:273–286.

MANETTI, M. E. 2007. Caracterização de retrotransposons similares a Tnt1 em espécies silvestres e cultivadas do gênero *Solanum*. São Paulo. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado em Ciências.

MEYER, A. 1994. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Tree*. Vol. 9. No 8.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Lei nº 5.197, de 3 de janeiro de 1967. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=312>. Acesso em: 02 de julho de 2011.

MIRANDA, CL. 2008. Desenvolvimento do dimorfismo sexual em espécies de macacos-prego, gênero *Cebus* Erxleben, 1777 (PRIMATES, CEBIDAE). Pará: Universidade Federal do Pará. Dissertação de Mestrado em Zoologia. 110 p.

MORITZ, C. 1994. Defining “evolutionarily significant units” for conservation. *Trends Ecol. Evol.* 9(10): 373-375.

OLIVEIRA, M.M; LANGGUTH, A. 2006. Rediscovery of marçgrave’s capuchin monkey and designation of a neotype for *Simia Flavia* Schreber, 1774 (Primates, Cebidae). *Boletim do Museu Nacional. Bol. Mus. Nac., N.S., Zool., Rio de Janeiro, n.523, p.1-16, jul.2006*

OLIVEIRA, C.G.; GAIOTTO, F.A.; COSTA, M.A.; MARTINEZ, R.A. 2011. Molecular genetic analysis of the yellow-breasted capuchin monkey: recommendations for *ex situ* conservation. *Genetics and Molecular Research* 10 (3): 1471-1478.

OSTERHOLZ, M; WALTER, L; ROOS, C. 2009. Retropositional events consolidate the branching order among New World monkey genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50 . 507–513.

OTTONI, E.B; IZAR, P. 2008. Capuchin Monkey Tool Use: Overview and Implications. *Evolutionary Anthropology* 17:171–178.

PAGACOVA, E., CERNOHORSKA, H., KUBICKOVA, S., VAHALA, J. & RUBES, J. 2011. Centric fusion polymorphism in captive animals of family Bovidae. *Conservation Genetics* 12: 71–77.

PAGLIA, A. P; FONSECA, G.A.B; RYLANDS, A.B; HERRMANN, G; AGUIAR, L.M.S; CHIARELO, A.G; LEITE, Y.R.L; COSTA, L. P; SICILIANO, S; KIERULFF, M.C.M; MENDES, S.L; TAVARES, V.C; MITTERMEIER, R.A; PATTON, J.L. 2012. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. Occasional Papers in Conservation Biology . Número 6. Conservation International. Belo Horizonte.

PRAY, L. 2008. Functions and Utility of Alu Jumping Genes. *Nature Education* 1(1).

PRIMACK, R. RODRIGUES, E. 2001. *Biologia da Conservação*. Londrina: Editora Vida.

PRIMROSE, S. B. 2003. *Princípios de Análise do Genoma: Um guia para mapeamento e sequenciamento de DNA de diferentes organismos*. 2. Ed. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC-Editora.

RAY, D. A. *et al.* 2005. *Alu* insertion loci and platyrrhine primate phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35 . 117–126.

RIDLEY, M. 2006. *Evolução*. 3. Ed. Porto Alegre. Artmed.

RYDER, O. & CHEMNICK, L.G. 1993. Chromosomal and mitochondrial DNA variation in orangutans. *J. Hered.* 84: 405-409

RYLANDS, ANTHONY B.; SCHNEIDER, HORACIO; LANGGUTH, ALFREDO; MITTERMEIER, RUSSELL A.; GROVES, COLIN P.; RODRÍGUEZ-LUNA, ERNESTO. 2000. An assessment of the diversity of new World primates. *Neotropical Primates*. Volume 8. Number 2. June.

RYLANDS, A.B; MIERULFF, M.C.M & MITTERMEIER, R.A. 2005. Notes on the taxonomy and distributions of the tufted capuchin monkeys (*Cebus*, Cebidae) of South America. *Lundiana* 6 (supplement):97-110.

ROCA, A.L. 2001. Genetic Evidence for two species of elephant in Africa. *Science* 293: 1473-1477.

ROCHA, CAM. 2010. Genética e citogenética na caracterização de hibridações interespecíficas em diferentes ordens de mamíferos. Disponível em: <http://www.artigonal.com/biologia-artigos/genetica-e-citogenetica-na-caracterizacao-de-hibridacoes-interespecificas-em-diferentes-ordens-de-mamiferos-2626451.html>. Acesso em 27 de junho de 2011.

ROZAS, J.; LIBRADO, P. SANCHES-DELBARRIO, J.C.2010. DNA Sequence Polymorphism. Version 5.10.1. Universidade de Barcelona. March 4.

SANTOS, E. 1985. Ente o Gambá e o Macaco. 1ª ed. Belo Horizonte: Itatiaia. 280 p.

SANGER F, NICHLEN S & COULSON AR (1987) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5468.

SAUNDERS, M. A; EDWARDS, S.V. 2000. Dynamics and Phylogenetic Implications of MtDNA Control Region Sequences in New World Jays (Aves: Corvidae). J Mol Evol. 51: 97–109.

SCHMID CW & JELINEK WR. 1982. The Alu family of dispersed repetitive sequences. Science 216: 1065-1070.

SCHNEIDER, H. 2000. The Current Status of the New World Monkey Phylogeny. Rio de Janeiro. Anais da Academia Brasileira de Ciências. vol 72. n 2. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-37652000000200005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652000000200005). Acesso em: 10 de julho de 2011.

SILVA JÚNIOR JR. 2001. Especiação nos macacos-pregos e caiaras, Gênero *cebus* Erxleben, 1777 (Primates, Cebidae). Rio de Janeiro: Universidade federal do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado em Genética. 377 p.

SLUYS, M. V; SETTA, N; SCORTECCI, K. C; COSTA, A. P. P. 2012. O genoma instável, sequências genéticas móveis. In: MATIOLI, S. R. Biologia Molecular e Evolução. 2ª Ed. Ribeirão Preto: Holos Editora. p. 79 a 89.

TAGLIARO, C. H. 1997. A filogenia molecular na subfamília Callitrichinae (Platyrrhini, Primates): As relações intergenéricas e intragenéricas de *Callithrix*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil, 187 pg.

TAMURA, K; DUDLEY N; Kumar, S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Mol Biol Evol 24: 1596-1599p.

THOMPSON, J.D.; et al.1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994;22:4673-4680.

VIANA, J.A; SANTOS, F. R. 2006. Peixes-bois: Esforços de Conservação no Brasil. Ciência Hoje. vol. 39. nº 230. 32-37 p.

WARREN, K.S., VERSCHOOR, E.J., LANGENHUIJZEN, S., HERIYANTO, SWAN, R.A., VIGILANT, L. & HEENEY, J.L. 2001. Speciation and intrasubspecific variation of Bornean orangutans, *Pongo pygmaeus pygmaeus*. *Mol. Biol. Evol.* 18(4): 472–480.

WONG, L. H; CHOO, K. H. A. 2004. Evolutionary dynamics of transposable elements at the centromere. *TRENDS in Genetics* Vol.20 No.12 December.

PPGGGBC

Anexos

PPGGGBC











