

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Análise Citogenética de *Leontopithecus rosalia* (Platyrrhini,  
Primates)**

ORIENTADA: Carla Emanuelle Fernandes Aleixo Dias

ORIENTADORA: Dra. Marta Svartman

BELO HORIZONTE

Abril de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**Análise Citogenética de *Leontopithecus rosalia* (Platyrrhini,  
Primates)**

**Carla Emanuelle Fernandes Aleixo Dias**

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Dra. Marta Svartman

Área de concentração: Evolução e Genética de Populações

043 Dias, Carla Emanuelle Fernandes Aleixo.  
Análise citogenética de *Leontopithecus rosalia* (Platyrrhini, Primates)  
[manuscrito] / Carla Emanuelle Fernandes Aleixo Dias. – 2016.

49 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Marta Svartman.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Genética. 2. Citogenética - Teses. 3. Mico-leão-dourado - Teses. 4. Coloração cromossômica. I. Svartman, Marta. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



**Pós-Graduação em Genética**  
**Departamento de Biologia Geral, ICB**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**  
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



## "Análise Citogenética de *Leontopithecus rosalia* (Platyrrhini rimates)"

**Carla Emanuelle Fernandes Aleixo Dias**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Dra. Marta Svartman - Orientadora  
(UFMG)

Dr. Fabricio Rodrigues dos Santos  
(UFMG)

Dr. Adriano Pereira Paglia  
UFMG

Belo Horizonte, 20 de abril de 2016.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Olorum, aos Orixás, a todos os amigos do bem e da luz que me guiam por todos os meus caminhos, a Rosa minha guardiã e sentinela.

À minha mãe, Solange, por sempre me apoiar em tudo, acreditar que eu sou capaz e me dar forças para continuar mesmo quando tudo parecia desabar. Eu amo você te digo todos os dias e vou repetir sempre!

À minha orientadora, Professora Dra. Marta Svartman pela oportunidade e conhecimento.

À Naiara pela ajuda nas dúvidas, pelos ensinamentos de bancada e por toda ajuda e apoio do começo ao fim dessa jornada.

À todos os integrantes do LCEv pelas conversas, conselhos, risadas e por tornarem o meu ambiente de trabalho um lugar melhor. Em especial a Mirela que em tudo me auxiliou para a execução desse trabalho sem nunca duvidar da minha capacidade, sempre me encorajando e mantendo meus pés no chão.

À Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte pelo material cedido.

À todos os professores que me proporcionaram conhecimento durante o processo de formação profissional.

Aos meus irmãos e sobrinhos, agradeço pelo apoio e carinho.

À minha madrinha Elane por acreditar em mim e me dar força mesmo com tudo indo contra.

Aos que fizeram de BH um lugar menos ruim alegrando meus dias e me abrigando em suas casas. Wanda, Camila e Carol muito obrigada!

Aos amigos do LBEM e aos “Moojenianos” da UFMG.

À todos os meus amigos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e que torceram pelo sucesso deste trabalho. Com certeza, irão continuar presentes na minha vida.

Ao programa de pós-graduação em Genética, a CAPES pela bolsa de estudos concedida, ao CNPq pelo financiamento da pesquisa e a UFMG.

Aos membros da banca pela disponibilidade e atenção.

*“É vista quando há vento e grande vaga  
Ela faz um ninho no rolar da fúria e voa firme e certa como bala  
As suas asas empresta à tempestade  
Quando os leões do mar rugem nas grutas,  
Sobre os abismos, passa e vai em frente  
Ela não busca a rocha, o cabo, o cais  
Mas faz da insegurança a sua força e do risco de morrer, seu alimento  
Por isso me parece imagem justa  
Para quem vive e canta no mau tempo”  
Epahey!!!*

**(Maria Bethania)**

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Filogenia de <i>Platyrrhini</i> .....	14
1.2 <i>Callitrichinae</i> .....	15
1.3 O Gênero <i>Leontopithecus</i> .....	18
1.4 Citogenética de <i>Platyrrhini</i> .....	19
1.5 DNA Repetitivo .....	24
DNA Satélite .....	24
DNA Telomérico.....	25
DNA Centromérico .....	26
Justificativa para realização do trabalho .....	28
2. Objetivos.....	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos .....	29
3. Metodologia .....	30
3.1 Obtenção de preparações cromossômicas.....	30
3.2 Coloração convencional.....	30
3.3 Bandeamento GTG .....	31
3.4 Bandeamento CBG .....	31
3.6 Pintura cromossômica.....	32
3.7 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente com sonda telomérica.....	33
3.8 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente com sonda de DNA Alfa-satélite .....	34
3.9 Análise dos resultados .....	34
4. RESULTADOS.....	35
Coloração convencional .....	35
Bandeamento CBG.....	36
Pintura cromossômica .....	37
Sondas de sequências repetitivas .....	39
5. DISCUSSÃO .....	41
Sondas de sequências repetitivas .....	44
Conclusão.....	45
Referências.....	46

## Lista de figuras

- Figura 1. Árvore filogenética proposta por Schneider e Sampaio (2015) para os gêneros atuais de platirrínios, baseada em dados moleculares. Os números indicam o tempo de divergência em milhões de anos. Figura retirada de *Schneider e Sampaio 2015*.....14
- Figura 2. Arvore filogenética de Calitrichinae com ramos coloridos indicando o bioma de ocorrência do gênero; Mata Atlântica (azul) e Amazônia (verde). Figura retirada de *Schneider e Sampaio 2015*.....17
- Figura 3. Distribuição aproximada das espécies do gênero *Leontopithecus*. Figura retirada do site da Associação Mico-Leão-Dourado. Acesso em: 8 de setembro de 2015.....18
- Figura 4. Cariótipo ancestral de Platyrrhini com  $2n=54$ . Figura retirada de Oliveira e col., 2012.....20
- Figura 5: Correspondência dos cromossomos humanos no cariótipo de *L. chrysomelas* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ). Os números à direita indicam os cromossomos humanos correspondentes a cada par de *L. chrysomelas*. Figura retirada de Gerbault-Serreau e col. 2004.....23
- Figura 6. Cariótipo de uma fêmea de *Leontopithecus rosalia* com  $2n=46$  e  $NF=74$ , após coloração convencional.....35
- Figura 7. Cariótipo de uma fêmea de *Leontopithecus rosalia* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ) após bandeamento GTG.....36
- Figura 8. Cariótipo de uma fêmea de *Leontopithecus rosalia* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ) após bandeamento CBG.....37
- Figura 9. Metáfases de uma fêmea de *Leontopithecus rosalia* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ) após hibridação com sondas de cromossomos humanos. As sondas marcadas com biotina estão identificadas em verde e as marcadas com digoxigenina, em vermelho.....38
- Figura 10. Correspondência dos cromossomos humanos no cariótipo de uma fêmea de *L. rosalia* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ). Os números à direita indicam os cromossomos humanos correspondentes a cada par de *L. rosalia* .....39
- Figura 11. FISH com sequências teloméricas em cromossomos metafásicos de uma fêmea de *Leontopithecus rosalia* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ).....39

Figura 12. FISH com uma sonda de DNA alfa-satélite em cromossomos metafásicos de uma fêmea de *Leontopithecus rosalia* (2n=46; NF=74).....40

## Lista de tabelas

Tabela 1. Constituição dos cariótipos ancestrais de Platyrrhini e de cada uma de suas quatro famílias em relação aos cromossomos humanos segundo Oliveira e col. 2012.....	20
Tabela 2. Espécies de Cebidae já estudadas com pintura cromossômica segundo Oliveira e col., 2012.....	22
Tabela 3: Associações cromossômicas sintênicas encontrada nos cariótipos de <i>Leontopithecus rosalia</i> , <i>L. chrysomelas</i> (Gerbault-Serreau e col. 2004) , <i>Saguinus oedipus</i> (Muler e col. 2001) <i>Callimico goeldii</i> (Neusser e col., 2001) e <i>Cebus capucinus</i> (Amaral e col. 2008).....	42
Tabela 4. Correspondência de cromossomos humanos com os supostos cariótipos ancestrais de Platyrrhini, Cebidae e Callitrichinae (Oliveira e col. 2012).....	43

## Lista de abreviaturas

2n – Número diplóide

CBG – Padrão de bandas obtidos após tratamento com bário e coloração com Giemsa

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindole

DNA – Ácido desoxirribonucléico

FISH – Hibridação in situ fluorescente

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GTG – Padrão de bandas obtidos após tratamento com tripsina e coloração com Giemsa

HSA- *Homo sapiens*

Kb – Kilobases

LRO- *Leontopithecus rosalia*

NF- Número fundamental

pb (bp) – Pares de base

PBS – Tampão fosfato

PBT – Tampão -fosfato com Tween 20

PCR – Reação em cadeia da polimerase

## Resumo

Atualmente, com base em dados moleculares, são reconhecidos três clados monofiléticos de Platyrrhini: Cebidae, Atelidae, e Pitheciidae. Cebidae possui três subfamílias: Callitrichinae, Aotinae e Cebinae. Em Callitrichinae encontram-se os menores primatas conhecidos, pertencentes aos gêneros: *Callithrix*, *Cebuella*, *Mico*, *Saguinus*, *Leontopithecus* e *Callimico*. O gênero *Leontopithecus* Lesson, 1840 compreende quatro espécies popularmente conhecidas como mico-leões: *Leontopithecus rosalia* (mico-leão-dourado), *L. chrysomelas* (mico-leão-da-cara-dourada), *L. chrysopygus* (mico-leão-preto) e *L. caissara* (mico-leão-da-cara-preta). As quatro espécies do gênero *Leontopithecus* já tiveram seus cariótipos descritos e apresentaram o mesmo número de cromossomos ( $2n=46$ ) e um cariótipo que parece conservado, inclusive após a análise dos padrões de bandeamento GTG. Experimentos de citogenética molecular, incluindo a pintura cromossômica só foram realizados em *L. chrysomelas*.

Neste trabalho analisamos cariotipicamente três exemplares de *Leontopithecus rosalia* ( $2n=46$  e  $NF=74$ ), incluindo os padrões de bandeamento GTG e CBG, os quais foram comparados com dados da literatura. As preparações cromossômicas de *L. rosalia* foram submetidas à pintura cromossômica com sondas cromossomo-específicas humanas e os resultados foram comparados com os descritos para outros Platyrrhini. Após a hibridação in situ fluorescente (FISH) com sondas teloméricas e de DNA alfa-satélite não foram observados sinais intersticiais que poderiam fornecer indícios de rearranjos cromossômicos. A comparação dos cariótipos de *L. rosalia* e de *L. chrysomelas*, mostrou grande conservação cariotípica entre elas. Entretanto, nossos resultados de pintura cromossômica evidenciaram diferenças entre as regiões heterocromáticas das duas espécies, sugerindo que a análise de sequências repetitivas deve produzir dados que permitam diferenciar seus genomas.

## Abstract

There are currently three accepted monophyletic clades of Platyrrhini, based on molecular data: Cebidae, Atelidae and Pitheciidae. Cebidae has three subfamilies: Callitrichinae, Aotinae, and Cebinae. The smallest primates belong to the Callitrichinae subfamily and are included into the genera: *Callithrix*, *Cebuella*, *Mico*, *Saguinus*, *Leontopithecus*, and *Callimico*. Four species of the genus *Leontopithecus* Lesson, 1840, known as lion tamarins, are currently recognized: *Leontopithecus rosalia* (golden lion tamarin), *L. chrysomelas* (golden headed tamarin), *L. chrysopygus* (black lion tamarin) and *L. caissara* (black headed lion tamarin). These four species had their karyotypes described and presented the same diploid number ( $2n=46$ ) and a karyotype that seemed conserved, even after the analysis of the GTG-banding patterns. Molecular cytogenetics analyses, including chromosome painting, have only been performed on *L. chrysomelas*.

We karyotypically analyzed three specimens of *Leontopithecus rosalia* ( $2n=46$  and FN=74), including their GTG- and CBG- banding patterns, which were compared to published data. Chromosome painting with human chromosome-specific probes was performed in *L. rosalia* and the results were compared to those described for other Platyrrhini. FISH with telomeric and alpha-satellite DNA probes did not produce interstitial signals that could suggest chromosome rearrangements. The comparison of the karyotypes of *L. rosalia* and *L. chrysomelas* showed conservation during their speciation. Nevertheless, our chromosome painting results evidenced differences between the heterochromatic regions of both species, suggesting that the analysis of their repetitive sequences may yield data that will allow to differentiate their genomes.

# 1. INTRODUÇÃO

Os primeiros primatas antropoides surgiram na África há 90 milhões de anos (Ma) (Stanyon e Bigoni 2013) e sua colonização do Novo Mundo ocorreu na transição entre o Eoceno e o Oligoceno, entre 50 e 30 Ma atrás. Este período é contemporâneo ao isolamento da América do Sul, que foi um continente-ilha de 80 a 3,5 Ma atrás (Fleage 2013). Os primatas do Novo Mundo se originaram a partir de linhagens de antropoides do Velho Mundo. Os antropoides pertencem a duas parvordens: Catarrhini, que inclui os grandes primatas - o homem, o gorila e o chimpanzé - e Platyrrhini, representada pelos macacos do Novo Mundo, como os muriquis, macacos-prego e bugios (Ross 2000).

A ideia mais aceita atualmente é a de que os Platyrrhini, ou macacos do Novo Mundo, chegaram à América do Sul vindos da África pelo oceano Atlântico em balsas flutuantes (Houle 1998, Houle 1999, Bond e col. 2015).

Considerando as condições do vento, das correntes marítimas e de outras variáveis da migração transoceânica, Houle (1999) mostrou que a travessia poderia ser concluída entre 10-15 dias há 30 Ma e em 7-11 dias há 40 Ma. Tal suposição é possivelmente verdadeira se considerarmos que animais mantidos experimentalmente em condições de privação de água mostraram-se capazes de sobreviver por até 13 dias e voltaram ao seu estado fisiológico normal rapidamente (Houle 1999). Deve-se considerar também que uma ilha flutuante pode ser grande o suficiente para fornecer algum recurso nutricional. Houle (1999) sugeriu ainda que os Protoplatyrrhini deveriam ser animais adaptados a privações de recursos e que durante a migração podem ter-se comportado como em estações secas, consumindo qualquer recurso disponível.

Os fósseis mais antigos de platirríneos foram encontrados em localidades na Bolívia (datados de 26 Ma atrás) e no Peru (datado do fim do Eoceno 35-36 Ma). A ausência de fósseis na América do Norte e na Antártida é tida como mais uma evidência de que os primatas neotropicais tiveram sua origem nas linhagens africanas, que são representadas por um extenso registro fóssil, incluindo exemplares que se assemelham aos Platyrrhini (Bond e col. 2015, Fleage 2013).

## 1.1 Filogenia de Platyrrhini

Atualmente, com base em dados moleculares, são reconhecidos três clados monofiléticos de Platyrrhini: Cebidae (gêneros *Callithrix*, *Cebuella*, *Mico*, *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Saimiri*, *Cebus*, *Sapajus*, *Aotus* e *Callimico*), Atelidae (gêneros *Alouatta*,



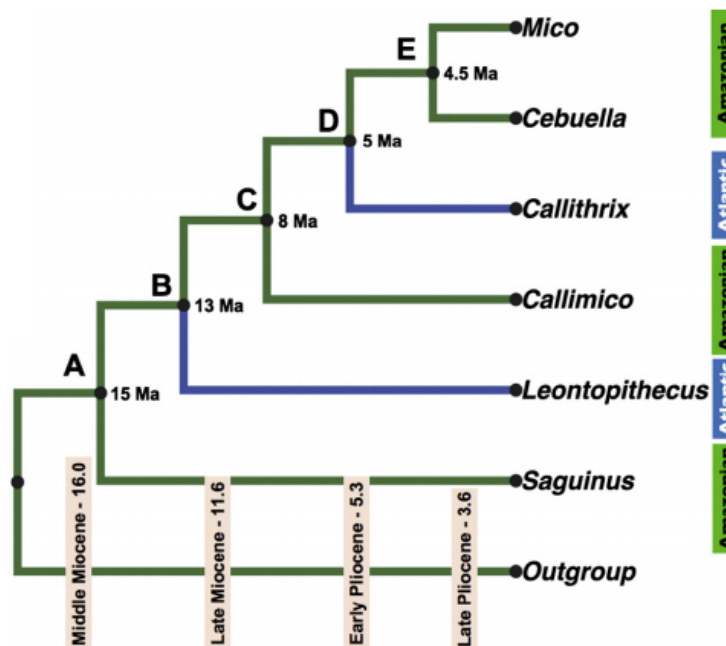
Com base em dados morfológicos, diferentes autores apresentaram conclusões variadas sobre a filogenia de Cebidae, principalmente quanto à posição de *Saguinus* e *Leontopithecus*. Assim, Rosenberger (1981) e Ford (1986) consideraram *Leontopithecus* como grupo-irmão da linhagem *Callithrix-Cebuella*, enquanto Kay (1990) apontou *Saguinus* como grupo-irmão da mesma linhagem. Estudos mais recentes com dados moleculares (Schneider e col. 1993, 1996) e citogenéticos (Oliveira e col. 2012) confirmaram *Saguinus* como basal dentro do grupo, seguido da divergência de *Leontopithecus*, posteriormente *Callimico* e, finalmente, *Callithrix*, *Cebuella* e *Mico* (Schneider e Sampaio 2015).

Os membros da subfamília Callitrichinae são estritamente relacionados e compartilham traços morfológicos, fisiológicos, ecológicos e comportamentais (Nagamachi e col. 1999, Schneider e Sampaio 2015). Entre estes estão a ausência do terceiro molar, a onivoria e a cauda maior que o corpo, que auxilia no equilíbrio, essencial para a locomoção saltatória (Auricchio e col. 1995).

Nagamachi e col. (1999) consideraram três cenários hipotéticos sobre a origem e diversificação de Callitrichinae. O primeiro foi descrito por Hershkovitz (1977) e sugere que a linhagem pré-Callitrichinae era amplamente distribuída e, devido a fatores climáticos, foi reduzida a populações isoladas que deram origem aos gêneros atuais. Assim, *Cebuella* poderia ter-se originado de uma população na área do Alto Solimões, e a linhagem que o autor denomina de pré-*Callithrix* poderia ter dado origem a *Leontopithecus* e *Callithrix*, com *Callithrix* divergindo primeiro e *Mico* derivando dele e dando origem a *Saguinus*. Uma segunda hipótese assume que a linhagem ancestral de Callitrichinae era amplamente distribuída pelas florestas Neotropicais. Com o aparecimento das florestas secas, o Cerrado e a Caatinga, as populações divergiram, dando origem a *Saguinus* na Bacia Amazônica e a *Leontopithecus* na Mata Atlântica. *Callithrix* pode ter derivado da linhagem que colonizou a Mata Atlântica ou de *Leontopithecus*. Posteriormente, uma irradiação da população costeira de saguis para o norte e oeste em direção da Bacia Amazônica teria dado origem a *Mico* e mais tarde a *Cebuella*, que pode ter derivado de uma forma de *Mico* (Ferrari 1993). O terceiro cenário, proposto por Barroso e col. (1997), supõe que durante o Mioceno médio, há cerca de 11 Ma, os Callitrichinae basais na região amazônica sofreram uma irradiação que os separou em dois clados: o primeiro originou posteriormente *Saguinus* e o segundo era o clado ancestral comum de *Leontopithecus*, *Callimico*, *Mico* e *Callithrix*, que foram separados em seguida, há cerca de 10 Ma. Os autores sugerem que a ampla distribuição de *Saguinus* em toda a vasta região amazônica é uma evidência de que este gênero teve uma radiação inicial se diferenciando diretamente da população de Callitrichinae basais. Os precursores de *Leontopithecus* migraram para o sul e para o leste e tornaram-se isolados na Mata Atlântica, ao passo que os ancestrais de *Callimico*, *Mico* e *Callithrix* podem ter ocupado o

sudoeste da Bacia Amazônica. Mais tarde, próximo ao início do Plioceno, uma população de *Callithrix* migrou para o leste e ocupou uma vasta área do sudoeste da região amazônica até o sudeste do Brasil. Posteriormente, devido a mudanças geoclimáticas e episódios de refúgios, *Callithrix* diferenciou-se na Amazônia dando origem a *Cebuella pygmaea* (monotípico) e a *Mico*, e o grupo do Brasil Central e Oriental originou os *Callithrix* atuais.

Estudos mais recentes apoiam um cenário diferente dos anteriormente descritos. Schneider e Sampaio (2015) propuseram que a radiação dos Callitrichinae se deu a partir de uma população basal na região central da Bacia Amazônica. *Saguinus* teria sido o primeiro a se diferenciar e o clado que deu origem a *Leontopithecus/Callimico/saguís* (*Cebuella-Mico-Callithrix*) pouco depois passou por um segundo evento de diferenciação, resultando em duas linhagens: (1) a que originou os micos-leões, que migraram e colonizaram a Mata Atlântica e (2) e a do ancestral comum de *Callimico* e dos saguís, que na Bacia Amazônica deu origem a *Callimico* e ao ancestral dos demais saguís (*Cebuella-Mico-Callithrix*). Subsequentemente, há cerca de 5 Ma, *Cebuella* e *Mico* na Amazônia se separaram da linhagem ancestral de *Callithrix*, que havia migrado para o leste para colonizar a Mata Atlântica - a segunda invasão de Callitrichinae neste bioma (Figura 2). A diferenciação dos grupos mais recentes teria ocorrido pouco tempo depois, separando os saguís amazônicos, *Cebuella* e *Mico*. Pelo menos duas linhagens diferentes de Callitrichinae podem ter colonizado a Mata Atlântica em períodos distintos: micos-leões há 9 Ma e ancestrais de *Callithrix* há 5 Ma.



**Figura 2.** Arvore filogenética de Calitrichinae com ramos coloridos indicando o bioma de ocorrência do gênero; Mata Atlântica (azul) e Amazônia (verde). Figura retirada de Schneider e Sampaio 2015.

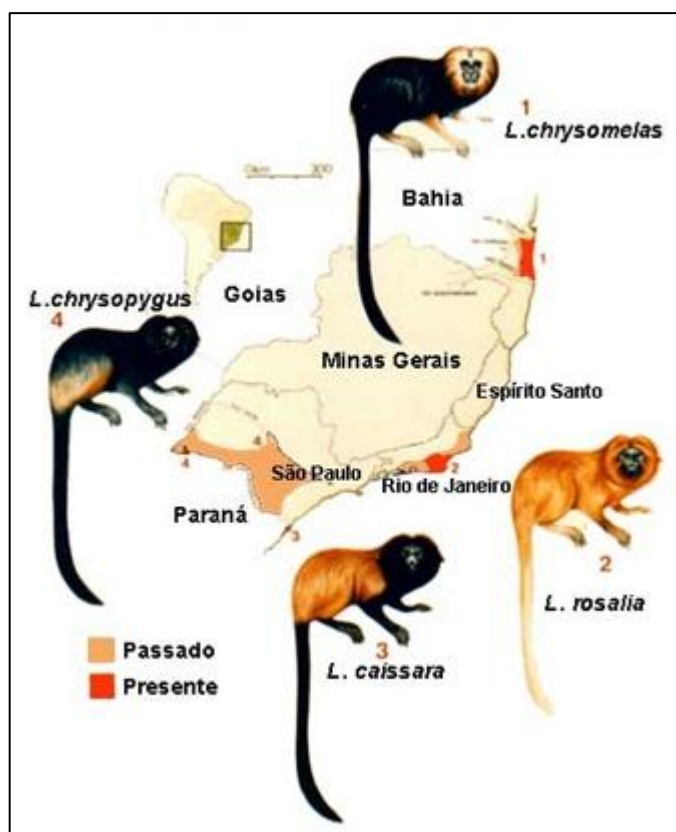
### 1.3 O Gênero *Leontopithecus*

O gênero *Leontopithecus* Linnaeus, 1766 compreende quatro espécies popularmente conhecidas como mico-leões: *Leontopithecus rosalia* (mico-leão-dourado), *L. chrysomelas* (mico-leão-da-cara-dourada), *L. chrysopygus* (mico-leão-preto) e *L. caissara* (mico-leão-da-cara-preta) (Auricchio e col. 1995, Nagamachi e col. 1997).

Os mico-leões apresentam uma pelagem brilhante e bastante farta ao redor da cabeça, formando uma juba característica que lhes confere os nomes popular e científico (Auricchio e col. 1995). São animais de hábitos diurnos e dieta bastante variada, alimentando-se de frutos, flores, néctar, exsudatos, invertebrados e pequenos vertebrados. São também importantes dispersores de sementes e sua extinção local pode mudar a composição da flora (Oliveira 2005).

O grupo é endêmico da Mata Atlântica e todos os seus membros encontram-se sob algum nível de ameaça, segundo a IUCN (2008). *L. rosalia*, anteriormente classificada como “criticamente em perigo”, está agora listada como “em perigo”, devido aos esforços para sua conservação. Esta espécie está restrita a uma área menor que 5.000 km<sup>2</sup> e o que resta do seu hábitat encontra-se severamente fragmentado (Kierulff e col. 2008a). *L. caissara* está classificada como “criticamente em perigo” devido principalmente ao tamanho de sua população de aproximadamente 400 indivíduos, divididos em três populações isoladas, localizadas em reservas ambientais que não oferecem a proteção necessária para evitar que as populações continuem a diminuir (Kierulff e col. 2008b). *L. chrysopygus* está listada como “em perigo”, apesar de sua população estar diminuindo (Kierulff e col. 2008c). *L. chrysomelas* está ameaçada de extinção pela grave redução de sua população durante as últimas três gerações, cerca de 50% (Kierulff e col. 2008d).

As quatro espécies de mico-leão se distribuem em áreas diferentes. O mico-leão-da-cara-dourada é encontrado na Bahia, o mico-leão-dourado habita o Rio de Janeiro, o mico-leão-preto, São Paulo, e o mico-leão-da-cara-preta está distribuído no Paraná e em São Paulo (Associação Mico-Leão-Dourado 2015) (Figura 3).



**Figura 3.** Distribuição aproximada das espécies do gênero *Leontopithecus*. Figura retirada do site da Associação Mico-Leão-Dourado. Acesso em: 8 de setembro de 2015.

Em 1976, Coimbra-Filho e Mittermeier descreveram os primeiros híbridos de mico-leão, gerados em cativeiro a partir de um macho de *L. rosalia* e uma fêmea de *L. chrysomelas*. Em 2009, houve uma soltura indiscriminada de *L. chrysomelas* em Niterói, na serra da Tiririca, região dentro da área de distribuição de *L. rosalia* (Kierulf 2009). Por representar ameaça a conservação do mico-leão-dourado a repatriação dos micos-leões-de-cara-dourada se fez necessária para evitar a hibridização entre as espécies (Kierulf 2009).

#### 1.4 Citogenética de Platyrrhini

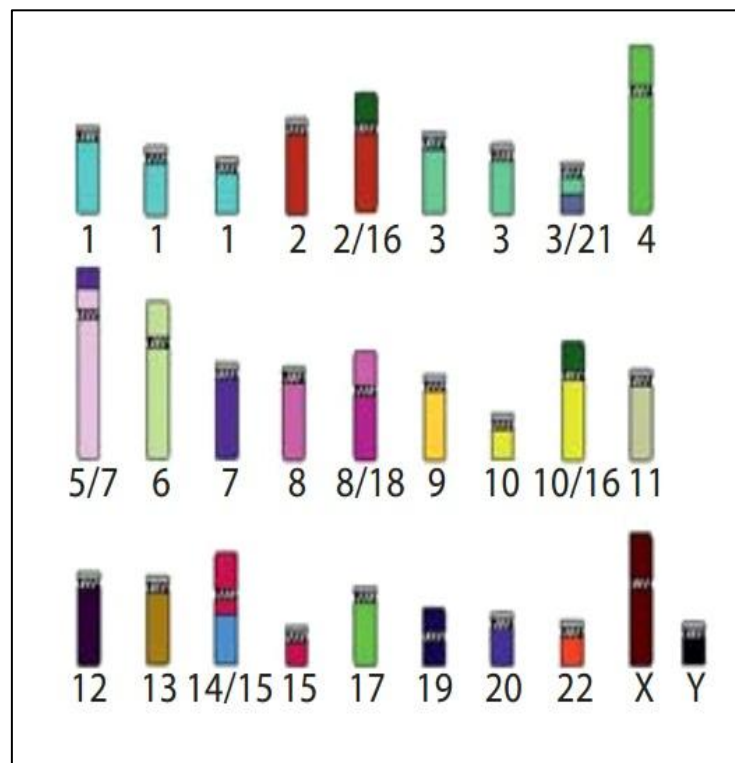
Platyrrhini exibe uma grande variabilidade cariotípica, com números diplóides variando de  $2n=16$  em *Callicebus lugens* a  $2n=62$  em todas as espécies do gênero *Lagothrix*. Graças a esta grande diversidade, muitas espécies deste grupo têm sido objeto de estudos citogenéticos desde os anos 1970. Mais recentemente, as análises neste grupo têm sido enriquecidas com dados de pintura cromossômica (Oliveira e col. 2012).

A pintura cromossômica é uma variante da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em que se usa como sondas bibliotecas de DNA compostas por sequências de cromossomos inteiros, isolados por microdissecção ou por fotocitometria de fluxo. A pintura cromossômica interespecífica é de grande utilidade para estudos evolutivos, pois permite construir mapas genômicos comparativos entre espécies com diferentes graus de parentesco e a

reconstrução de cariótipos ancestrais. Devido à segregação mendeliana dos cromossomos e por serem considerados eventos raros, os rearranjos cromossômicos são úteis no estudo de relações filogenéticas, já que sinapomorfias cromossômicas indicam uma relação entre taxa (Oliveira 2012, Stanyon e Bigoni 2013).

Stanyon e col. (2000) deduziram o provável cariótipo ancestral de Platyrrhini, que teria  $2n=56$  e seria composto pelos seguintes homólogos de cromossomos humanos: 1a; 1b; 1c; 2a; 2b; 3a; 3b; 3/21; 4; 5; 6; 7; 8a; 8/18; 9; 10a; 10/16; 11; 12; 13; 14/15; 15a; 16; 17; 19; 20; 22; X e Y. Nesse trabalho, os autores enfatizaram que a associação 5/7 poderia ser incluída no cariótipo ancestral, caso fosse encontrada em mais espécies. No ano seguinte, Neusser e col. (2001), com base em dados adicionais de pintura cromossômica, propuseram um cariótipo ancestral com  $2n=54$ , que incluía não só a associação 5/7, como também a 2/16.

O cariótipo ancestral de Platyrrhini mais aceito atualmente (Figura 4) tem  $2n=54$  foi publicado em 2012 por Oliveira e col. estando de acordo com vários estudos (Neusser e col. 2001; Stanyon e col. 2001; Müller 2006; Stanyon e col. 2008), existem também hipóteses de cariótipos ancestrais para cada família do grupo (Oliveira e col. 2012; Tabela 1).



**Figura 4.** Cariótipo ancestral de Platyrrhini com  $2n=54$ . Figura retirada de Oliveira e col., 2012.

**Tabela 1.** Constituição dos cariótipos ancestrais de Platyrrhini e de cada uma de suas quatro famílias em relação aos cromossomos humanos, segundo Oliveira e col. 2012.

Cariótipos Ancestrais	Conservados	Número de Fragmentos			Sinténias
		Dois	Três	Quatro	
Platyrrhini 2n=54	4, 6, 9, 11, 12, 13, 17, 19, 20, 22 e X	2, 7, 8, 10, 15 e 16	1 e 3	-	2/16, 3/21, 5/7, 8/18, 10/16 e 14/15
Atelidae 2n=62	6, 9, 11, 12, 13, 17, 19, 20, 22, X	2, 5, 10	3, 4, 7, 15, 16	1	2/16, 3/21, 7/5/7, 8/18, 16/10/16/10 (inversão), 4/15, 14/15
Cebidae 2n=54	4, 6, 9, 11, 12, 13, 17, 19, 20, 22 e X	2, 7, 8, 10, 15 e 16	1 e 3	-	2/16, 3/21, 5/7, 8/18 10/16 e 14/15 (14/15/14 em <i>Sapajus</i> )
Pitheciidae 2n=52	4, 6, 9, 11, 12, 13, 17, 19, 22 e X	2, 5, 7, 8, 10, 15 e 16	1 e 3		2/10, 2/16, 3/21, 5/7, 8/18, 14/15, 16/10/16/10 (inversão)

Até o momento, 38 espécies de Platyrrhini já tiveram seus cromossomos pintados com sondas cromossomo-específicas humanas, sendo 13 Atelidae, 10 Pitheciidae e 15 Cebidae (revisado por Oliveira e col. 2012).

Apesar de os dados moleculares e citogenéticos indicarem a monofilia de Atelidae, as relações intrafamiliares permanecem em discussão (Oliveira e col. 2012). A pintura cromossômica não esclarece as relações entre os gêneros, mas o bandeamento GTG, que permite a visualização de rearranjos intracromossômicos, acrescenta informações importantes para elucidar tais relações. Uma inversão no cromossomo homólogo ao 8 humano em todos os atelídeos, exceto *Alouatta*, indica que este gênero foi o primeiro a divergir, o que é corroborado nas filogenias moleculares. Os desacordos existentes em Atelidae são quanto às relações dentro da subfamília Atelinae (composta pelos gêneros *Lagothrix*, *Ateles* e *Brachyteles*). Dados citogenéticos sugerem que *Lagothrix* é o grupo-irmão de *Ateles* porque ambos compartilham uma inversão no homólogo ao 13 humano. Isto vai contra as os dados das filogenias moleculares, que colocam *Lagothrix* como grupo irmão de *Brachyteles* (Perelman e col. 2011, Oliveira 2012, Schneider e Sampaio 2015).

A citogenética molecular também não corrobora dados de filogenias moleculares que classificam *Callicebus* como Pitheciidae e *Aotus* como Cebidae. Esses dois gêneros compartilham uma associação dos homólogos aos cromossomos humanos 10 e 11, que

pode ser uma sinapomorfia, permitindo agrupá-los em um clado (Oliveira e col. 2012). Contudo, a associação 16/10/16/10 sugere que *Callicebus* se agrupe com Pitheciidae e, por estar ausente apenas em Cebidae, permite alocar *Aotus*, que não possui esta associação, nesta família. As relações filogenéticas destas taxa ainda não é consenso e mais estudos sobre o rearranjo HSA 10/11 podem ajudar a elucidá-las (Oliveira e col. 2012).

Pitheciidae reúne os gêneros *Chiropotes*, *Pithecia* e *Cacajao*, que têm como sinapomorfia a associação HSA 2/10, *Chiropotes* e *Cacajao* são espécies mais derivadas que compartilham uma fissão no cromossomo HSA 5/7 (5, 5/7) e a associação HSA 14/15/20 (Oliveira e col. 2012).

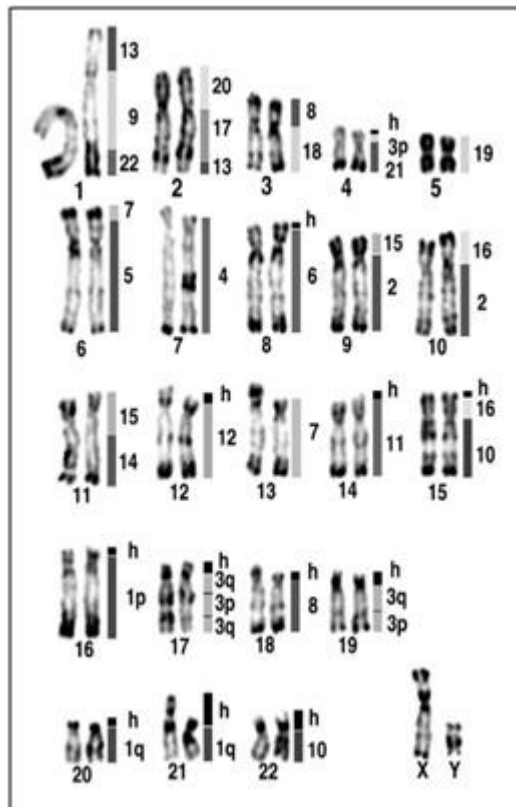
Grande parte dos gêneros de Cebidae já teve algum representante analisado por pintura cromossômica (Tabela 2) e é consenso que o cariótipo ancestral dos primatas do Novo Mundo é mais próximo ao encontrado em *Cebus capucinus* (Amaral e col. 2008). Dados citogenéticos apoiam Cebidae como o grupo mais basal, já que representantes desta família não têm uma inversão da associação sintênica HSA 10/16 (16/10/16/10), uma característica compartilhada por Atelidae e Pitheciidae (Oliveira e col. 2012).

**Tabela 2.** Espécies de Cebidae já estudadas por pintura cromossômica, segundo Oliveira e col., 2012.

Gênero	Espécies	Referências
<i>Cebus</i>	<i>C. albifrons</i>	Amaral e col. 2008
	<i>C. capucinus</i>	Richard e col. 1996
	<i>C. olivaceus</i>	Amaral e col. 2008
<i>Sapajus</i>	<i>S. apella</i>	Garcia e col. 2000
	<i>S. nigrivitatus</i>	Garcia e col. 2002
<i>Callithrix</i>	<i>C. jacchus</i>	Neusser e col. 2001; Sherlock e col. 1996
<i>Mico</i>	<i>M. argentata</i>	Neusser e col. 2001
<i>Callimico</i>	<i>C. goeldii</i>	Neusser e col. 2001
<i>Cebuella</i>	<i>C. pygmaea</i>	Neusser e col. 2001
<i>Leontopithecus</i>	<i>L. chrysomelas</i>	Gerbault-Serreau e col. 2004
<i>Saguinus</i>	<i>S. oedipus</i>	Müller e col. 2001
<i>Saimiri</i>	<i>S. sciureus</i>	Stanyon e col. 2000
<i>Aotus</i>	<i>A. lemurinus griseimembra</i>	Stanyon e col. 2011
	<i>A. nancymae</i>	Stanyon e col. 2004
	<i>A. sp.</i>	Ruiz-Herrera e col. 2005

As quatro espécies do gênero *Leontopithecus* já tiveram seus cariótipos descritos: *L. rosalia* foi descrito por Benirschke e col. (1962); *L. chrysomelas* e *L. chrysopygus* por Soares (1982) e *L. caissara* por Sbalqueiro e col. (1992). Seuánez e col. (1988) realizaram estudos citogenéticos com a análise dos bandeamentos GTG de três espécies de *Leontopithecus* (*L. rosalia*, *L. chrysomelas* e *L. chrysopygus*) e encontraram três cariótipos iguais, o que os levou a sugerir uma classificação de subespécies para os três taxa estudados. *L. caissara* foi analisado posteriormente, mas apresentou um cariótipo igual ao das outras três espécies. As quatro espécies apresentaram  $2n=46$  e um cariótipo que parece conservado, inclusive após a análise dos padrões de bandejamento GTG (Nagamachi e col. 1997).

Experimentos de pintura cromossômica só foram realizados em *L. chrysomelas* (Gerbault-Serreau e col. 2004). Como resultado, foram encontrados treze autossomos totalmente conservados (HSA 4, 5, 6, 9, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 20, 21 e 22) Sete cromossomos humanos correspondiam a dois blocos em *L. chrysomelas*: HSA 2, 7, 8, 10, 13, 15 e 16; enquanto HSA 1 e HSA 3 estavam divididos em três blocos. Também foram encontradas as associações HSA 3p/21, 5/7, 8/18, 13/9/22, 15/2, 15/14, 16/2, 16/10 e 20/17/13 (Figura 5).



**Figura 5:** Correspondência dos cromossomos humanos no cariótipo de *L. chrysomelas* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ). Os números à direita indicam os cromossomos humanos correspondentes a cada par de *L. chrysomelas*. Figura retirada de Gerbault-Serreau e col. (2004).

Os resultados de pintura cromossômica com sondas humanas obtidos em *L. chrysomelas* (Gerbault-Serreau e col. 2004) são semelhantes aos descritos para *Saguinus oedipus* (Neusser e col. 2001). *Leontopithecus* e *Saguinus* são gêneros filogeneticamente próximos e os cariótipos das duas espécies estudadas diferem apenas por rearranjos intracromossômicos, não detectados por pintura cromossômica. São eles: uma inversão paracêntrica no braço curto do par 14, inversões pericêntricas nos pares 19, 20, 21 e 22, e variações no conteúdo e distribuição de heterocromatina constitutiva não centromérica, que são característicos para cada gênero (Nagamachi e col. 1997).

Os Callithrichinae já analisados por pintura cromossômica com sondas humanas (*Callithrix jacchus*, *Mico argentata*; *Callimico goeldii*, *Cebuella pygmaea*, *Leontopithecus chrysomelas*, *Saguinus oedipus* e *Saimiri sciureus*) compartilham as associações HSA 2/15, 13/9, 13/17 e 13/22. A associação HSA 1/10 é compartilhada apenas por *Cebuella*, *Callithrix*, *Mico* e *Callimico*, mas não por *Leontopithecus* e *Saguinus*, o que reforça a proximidade dos micos-leões com *Saguinus* (Oliveira e col. 2012).

## 1.5 DNA Repetitivo

De modo geral, existem três tipos de sequências no genoma (Madalena 2008):

- Sequências de cópia única: apresentam renaturação lenta e contêm a maioria dos genes funcionais;
- Sequências moderadamente repetitivas: genes de rRNA e de histonas estão inclusos nesta fração;
- Sequências altamente repetitivas: podem estar repetidas milhares de vezes no genoma e renaturam rapidamente. As repetições em tandem fazem parte dessa porção;

De acordo com vários critérios, incluindo o tamanho da unidade de repetição, número de cópias e distribuição genômica, as repetições em tandem são classificadas em três classes principais: DNAs satélites, minissatélites e microsatélites (López- Flores e Garrido-Ramos 2012).

### DNA Satélite

Após a constatação de que é possível observar a renaturação do DNA de mamíferos, verificou-se que parte dele se renaturava com mais rapidez que o DNA de *E. coli*, um organismo com um genoma muito menor. Essa fração foi denominada satélite e sua rápida renaturação foi explicada pela hipótese de que haveriam sequências repetidas muitas vezes no genoma (Waring e Britten, 1966). O termo DNA satélite foi inicialmente usado para se referir à fração de DNA que se situava em uma banda separada da banda principal após centrifugação da amostra em um gradiente de cloreto de cério (Kit 1961).

Os DNAs satélites reúnem sequências altamente repetitivas que constituem uma parte considerável dos genomas eucarióticos. São sequências repetidas em tandem (López-Flores e Garrido- Ramos, 2012), normalmente organizadas em arranjos muito longos, que ocupam até vários megabases dentro de genomas. Estas repetições concentram-se principalmente na heterocromatina pericentromérica e subtelomérica (Ugarkovic e Plohl, 2002). DNAs satélites são o principal componente da heterocromatina, mas também podem estar intercalados na eucromatina (Pavlek e col. 2015). Podem estar em autossomos ou cobrindo cromossomos sexuais. O mais estudado entre os DNAs satélites centroméricos é o alfa-satélite humano, conservado nos centrômeros dos demais primatas (López- Flores e Garrido- Ramos 2012).

DNAs satélites são diversos em comprimento de monômeros, sequência de nucleotídeos e abundância genômica. As sequências não são rigorosamente idênticas e apresentam polimorfismos dentro de uma mesma espécie. No entanto, são mais semelhantes neste caso do que quando comparados com repetições de outras espécies (Dover 1982).

Nos genomas eucarióticos, as repetições satélite estão entre os componentes mais dinâmicos. Resultados de diferentes estudos nas últimas décadas indicaram papéis biológicos para os DNAs satélites, o que contrasta com os primeiros estudos nos quais eram considerados como “DNA lixo” acumulado nos genomas. Dentre suas funções, destaca-se a contribuição para processos de regulação epigenética através do seu papel no estabelecimento e manutenção dos estados de cromatina e a formação de heterocromatina, influenciando a expressão gênica e o comportamento adequado dos cromossomos na mitose e meiose (Ugarkovic e Plohl 2002, Ugarkovic 2005, López-Flores e Garrido-Ramos 2012).

## **DNA Telomérico**

Hermann J. Müller, em 1938, foi o primeiro a empregar a palavra telômero para definir as extremidades dos cromossomos. Com base em seus estudos sugeriu que possuíam uma estrutura diferenciada e propôs que possuíam a função de "selar" as pontas dos cromossomos, já que a irradiação com raios X em larvas de *Drosophila* não produzia mutantes com alterações que envolvessem extremidades cromossômicas. Assim, o telômero seria uma extremidade protetora que asseguraria a integridade do cromossomo, uma proteção contra o ataque de endonucleases, recombinações e fusões intercromossômicas.

O telômero deve compensar a perda de material genético gerada pela incapacidade da DNA polimerase em replicar completamente a extremidade da molécula de DNA e a enzima telomerase é a responsável pela adição das repetições teloméricas, resolvendo o problema de replicação nas extremidades da molécula de DNA (Blackburn 2001).

A telomerase tem atividade de transcriptase reversa e possui sua própria molécula de RNA, que serve de molde para as cópias da sequência telomérica. A enzima reconhece a sequência telomérica rica em G alongando-a na direção 5'-3'. A DNA polimerase utiliza as extensões criadas após vários ciclos de replicação das repetições teloméricas como molde para sintetizar uma nova fita complementar (Blackburn 2001).

Sequências teloméricas foram descritas em diversas espécies e até o momento a maioria dos organismos eucariontes estudados apresentaram telômeros constituídos por sequências curtas e ricas em G. Blocos de repetições em tandem (TTAGGG)<sub>n</sub> foram inicialmente caracterizados em humanos e encontrados na maioria dos vertebrados (Meyne e col.1989). Embora exista variação entre sequências teloméricas, os telômeros e a telomerase têm função muito semelhante nos eucariontes (Blackburn 2001). As sequências teloméricas podem não ter um papel efetivo na função dos telômeros, mas facilitam o emparelhamento dos cromossomos na meiose (Henderson 1995).

Quando presentes em regiões intersticiais as sequências teloméricas podem indicar pontos de rearranjo. Por este motivo, sua localização pode ser muito informativa em estudos citogenéticos.

## **DNA Centromérico**

O centrômero, ou constrição primária, divide o cromossomo em dois braços, definindo sua morfologia (López-Flores e Garrido-Ramos 2012). Dentre as funções do centrômero, estão manter a coesão entre as cromátides-irmãs e regular a segregação dos

cromossomos durante a divisão celular. No centrômero encontra-se o cinetócoro, estrutura proteica que promove a adesão do cromossomo às fibras do fuso que guiam o movimento dos cromossomos durante a divisão celular (Stimpson e Sullivan 2010). Estas funções são comuns a todas as espécies eucarióticas, mas as sequências de DNA do centrômero diferem abundantemente entre si, mesmo entre espécies estreitamente relacionadas (López-Flores e Garrido-Ramos 2012).

O fato de as sequências não serem conservadas entre espécies sugere que a sequência de DNA não é o principal determinante da função e identidade do centrômero, que são reguladas epigeneticamente através da formação de uma estrutura especializada da cromatina (López-Flores e Garrido-Ramos 2012).

A maioria dos centrômeros de eucariotos tem uma variante da histona H3, que em mamíferos é a proteína centrômero-específica CENP-A (Stimpson e Sullivan 2010). Mesmo não havendo uma sequência centromérica conservada, é possível que todos os centrômeros partilhem uma característica comum que seja capaz de promover a deposição de CENP-A. As possibilidades incluem a composição rica em AT e o comprimento das unidades de repetições satélite (Buscaino e col. 2010).

O DNA centromérico alfa foi descrito em cromossomos humanos e é conservado nos demais primatas. Sua estrutura mais simples é composta por monômeros de 170 pb em tandem, que é organizado em matrizes que se estendem por 0,2-5 Mb. A CENP-A em cromossomos humanos se localiza no DNA alfa-satélite, mas a ligação não parece ser sequência-específica, pois a proteína não se liga ao DNA alfa-satélite não ordenado, monomérico, ou em centrômeros inativos que ocorrem em cromossomos dicêntricos, com duas regiões de DNA de alfa-satélite (Prakhongcheep e col. 2013a, Stimpson e Sullivan 2010).

Estudos comparativos do DNA alfa-satélite mostraram que os principais táxons de primatas muitas vezes têm variações nas sequências ou formas de unidades de repetição específica do táxon. Em Platyrrhini, sabe-se que os monômeros têm comprimento em torno de 340 pb e, no lugar da unidade de repetição básica, existe um conjunto de duas unidades fundamentais de repetição com uma diferença de sequência entre elas, o que pode ser devido a um evento que ocorreu num ancestral comum (Prakhongcheep e col. 2013a).

## Justificativa para realização do trabalho

A citogenética é uma ferramenta muito útil na identificação de espécies e de variações intraespecíficas. Dados da literatura apontam para a grande conservação dos cariótipos das quatro espécies de mico-leão, bem como a semelhança destes com os encontrados no gênero *Saguinus*. No entanto, estudos mais detalhados em *Leontopithecus*, incluindo dados de citogenética molecular, só foram realizados em *L. chrysomelas*. Desta forma, o presente trabalho foi realizado com o intuito de obter mais detalhes sobre o complemento de *L. rosalia* e verificar se há características que poderiam diferenciá-lo de outros Callitrichinae.

A elucidação dos mecanismos que diferenciam os complementos aparentemente iguais das espécies de mico-leão visa fornecer dados que em conjunto com outros estudos sobre o gênero futuramente possam a explicar a especiação no grupo.

As quatro espécies de *Leontopithecus* estão ameaçadas de extinção. Um melhor conhecimento sobre seus genomas pode dar indicações importantes sobre características que as diferenciam e futuramente auxiliar esforços de manejo e conservação.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Descrever o cariótipo do mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) utilizando citogenética clássica e molecular.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Obter e avaliar os padrões de bandas GTG, CBG e pintura cromossômica interespecífica com cromossomos humanos individuais em metáfases de *L. rosalia*;
- Verificar a localização das sequências repetitivas alfa-satélite e teloméricas por FISH;

### **3. Metodologia**

#### **3.1 Obtenção de preparações cromossômicas**

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de fibroblastos mantidos em cultura de três fêmeas de *Leontopithecus rosalia* oriundas da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte (FZBH), todos os exemplares são nascidos em cativeiro cujos pais também nasceram nessas condições.

Para o cultivo de fibroblastos foram usados fragmentos de pele. As amostras foram colhidas pelos veterinários da FZBH, armazenadas em meio de coleta composto por meio de cultura, 10% de soro fetal bovino e 2% de estreptomicina e penicilina, e mantidas a 4°C até a chegada ao laboratório. No laboratório, as amostras foram lavadas em PBS, cortadas mecanicamente em placa de Petri, transferidas para tubos de centrífuga cônicos contendo aproximadamente 2 ml de solução de colagenase 1mg/ml e os tubos foram agitados a cada 30 minutos até que o tecido estivesse digerido pela enzima. O material foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, ressuspensionado em meio DMEM (Meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbecco), transferido para frascos de cultivo T25 contendo 5,0 mL de meio DMEM, 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Os frascos foram mantidos em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C e o meio era trocado a cada 48 horas, até a formação de uma monocamada de células. Após a formação da monocamada, procedia-se à tripsinização para repicar ou congelar as células. Quando era observado um pico mitótico ao microscópio invertido, eram adicionados 5 µL de colcemida ao frasco, que era incubado a 37°C por 3 a 5 horas. Realizava-se então a tripsinização para que as células descolassem dos frascos. O conteúdo do frasco era transferido para um tubo de centrífuga cônico, centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante descartado. As células eram ressuspensionadas em 5 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) e incubadas a 37°C por 20 minutos. Após a incubação, era feita a pré-fixação, adicionando 0,5 mL de fixador (solução de metanol e ácido acético 3:1), e então o material era centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante descartado. Este último procedimento era repetido três vezes e a suspensão final era armazenada a – 20°C para análise posterior.

#### **3.2 Coloração convencional**

A coloração convencional foi realizada com Giemsa a 10% em tampão fosfato por 5 minutos.

### **3.3 Bandeamento GTG**

Foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Seabright (1971), com algumas modificações:

1. Mergulhar as lâminas em solução de tripsina (20% em PBS, pH 7,2) por 60 segundos;
2. Imergir as laminas em Hanks BSS ou solução de soro fetal bovino (2,5% em água)
3. Corar o material com Giemsa 2% em tampão fosfato por 30 minutos;
4. Lavar com água destilada e deixar secar.

As lâminas eram analisadas quanto à digestão adequada pela tripsina e o tempo ajustado de acordo com o aspecto dos cromossomos.

### **3.4 Bandeamento CBG**

A heterocromatina constitutiva foi evidenciada através da técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações:

1. Incubar a lâmina com preparações cromossômicas em 2xSSC a 60°C por 10 minutos;
2. Lavar com água destilada;
3. Incubar a lâmina em HCl 0,2N à temperatura ambiente por 15 min;
4. Incubar a lâmina por 10-14 segundos em uma solução 5% de hidróxido de bário pré-aquecida a 60°C em banho-maria;
5. Lavar a lâmina com água destilada, incubá-la rapidamente em HCl 1N 60°C e lavar novamente com água destilada;
6. Incubar a lâmina por 30 minutos em 2xSSC pré-aquecido a 60°C em banho-maria;
7. Lavar com água destilada;
8. Corar com Giemsa 5% em tampão fosfato por 50 minutos.

### 3.6 Pintura cromossômica

Para a realização de experimentos de pintura cromossômica foram utilizadas sondas de cromossomos humanos individuais obtidos por fotocitometria de fluxo pela Dra. Marta Svartman durante seu pós-doutoramento no NIH e estocadas no nosso laboratório.

As sondas cromossômicas foram amplificadas por DOP-PCR com o iniciador 6MW (Telenius e col., 1992). Os reagentes usados para 50 µl de volume final da reação eram:

1. 1 µL de dNTP MIX (dATP, dCTP, dTTP, dGTP – 2 mM de cada nucleotídeo);
2. 6 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM);
3. 5 µl Tampão 10x (200mM Tris-HCl pH 8,4; 500mM KCl);
4. 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL);
5. 1 µl de iniciador 6 MW (100µM);
6. 4 µl de DNA.

O ciclo usado foi: 94°C por 3 minutos; 30 vezes do ciclo 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; alongamento a 72°C por 7 minutos.

A visualização das sondas amplificadas na PCR foi feita pela aplicação de 3 µl do produto da reação somado a 1 µl de corante em gel de agarose 1% em TAE 1X. O marcador de pares de base usado - DNA ladder 100-1000 pb (Jena Bioscience) - permitiu observar no gel bandas de 200 a 400 pares de bases. A corrida do gel foi feita a 70v por 30 min. A análise da qualidade das sondas foi feita pelo tamanho das bandas e quantidade de DNA observados no padrão em rastro deixado no gel após a corrida.

As sondas foram marcadas com biotina ou digoxigenina por DOP-PCR. Os reagentes usados para 50 µl de volume final da reação para marcação com biotina foram:

1. 5 µL de dNTP MIX (dATP, dCTP, dGTP, dTTP –2:2:2:1) (0,2 mM);
2. 6 µl de MgCl<sub>2</sub>, (25 mM);
3. 5 µl Tampão 10x (200mM Tris-HCl pH8,4; 500mM KCl);
4. 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL);
5. 1 µl de iniciador 6 MW (100µM);
6. 1,3 µl de biotina
7. 2 µl de DNA.

Os reagentes usados para 50 µl de volume final da reação foram para marcação com digoxigenina:

1. 5 µL de dNTP MIX (dATP, dCTP, dGTP, dTTP –2: 2: 2: 1) (0,2 mM);

2. 6 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM);
3. 5 µl Tampão 10x (200mM Tris-HCl pH8,4; 500mM KCl);
4. 0,5 µl de Taq polimerase (5U/µL);
5. 1 µl de iniciador 6 MW (100µM);
6. 1µl de digoxigenina
7. 2 µl de DNA.

O ciclo de usado era: 94°C por 3 minutos; 30 vezes do ciclo 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; alongamento a 72°C por 7 minutos.

Uma sonda marcada com biotina e outra marcada com digoxigenina eram precipitadas com DNA Cot humano (Invitrogen) na proporção 1:50 e ressuspendidas em meio de hibridação (formamida 50% em 2xSSC). Esta mistura era desnaturada em banho-maria a 98°C por 10 minutos, colocada em estufa a 37°C por uma hora e aplicada sobre a área de hibridação.

As preparações cromossômicas eram envelhecidas por dois dias em estufa a 37°C antes da hibridação. Os cromossomos eram desnaturados em solução de formamida (70% de formamida deionizada em 2xSSC) por 90 segundos a 75°C. A hibridação era feita por três dias a 37°C. Em seguida, procedia-se a lavagem das lâminas em três banhos de 5 minutos em 2xSSC a 45°C. A imunodeteção era feita com avidina+FITC e antidigoxigenina+rodamina e as lâminas eram montadas com 18 µL de DAPI (0,8 ng/µL) em Slowfade (Invitrogen).

### **3.7 Hibridação *in situ* fluorescente com sonda telomérica**

Sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>4</sub> com uma molécula de biotina na extremidade foram sintetizadas (Invitrogen). As condições de hibridação foram similares às descritas para os experimentos de pintura cromossômica, com poucas modificações:

1. Aplicar o mix de hibridação, constituído por 1040 ng de sonda em 50% formamida/2xSSC, sem desnaturá-lo, às preparações cromossômicas desnaturadas;
2. Manter as lâminas com a sonda em uma câmara de hibridação a 37°C overnight;
3. Lavar as lâminas três banhos de 5 minutos em 2xSSC a 37°C,
4. Proceder à imunodeteção com antidigoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science) e montar a lâmina com SlowFade e DAPI.

### **3.8 Hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNA Alfa-satélite**

O satélite alfa foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *Leontopithecus rosalia* com os seguintes iniciadores: Alfa-R (GCTTACTGCTGTTTCTTCCATATG) e Alfa-F (ACAGGGAAATATCTGCTTCTAAATC). Os iniciadores foram desenhados a partir de alinhamentos gerados utilizando as sequências do satélite alfa de primatas do Novo Mundo depositados nos bancos de dados Resultados da pesquisa (GenBank-NCBI e Replibase – GIRI).

As reações de PCR consistiram de um passo inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 60s, 55°C por 60s e 72°C por 60s, e uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da reação de PCR foram excisados de um gel de agarose 1% e purificados com o Kit Wizard SV Gel e PCR Clean-up System (Promega). O fragmento purificado foi marcado por nick translation com digoxigenina-11-dUTP com o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche Applied Science). As condições de hibridação foram idênticas às da FISH com sonda telomérica.

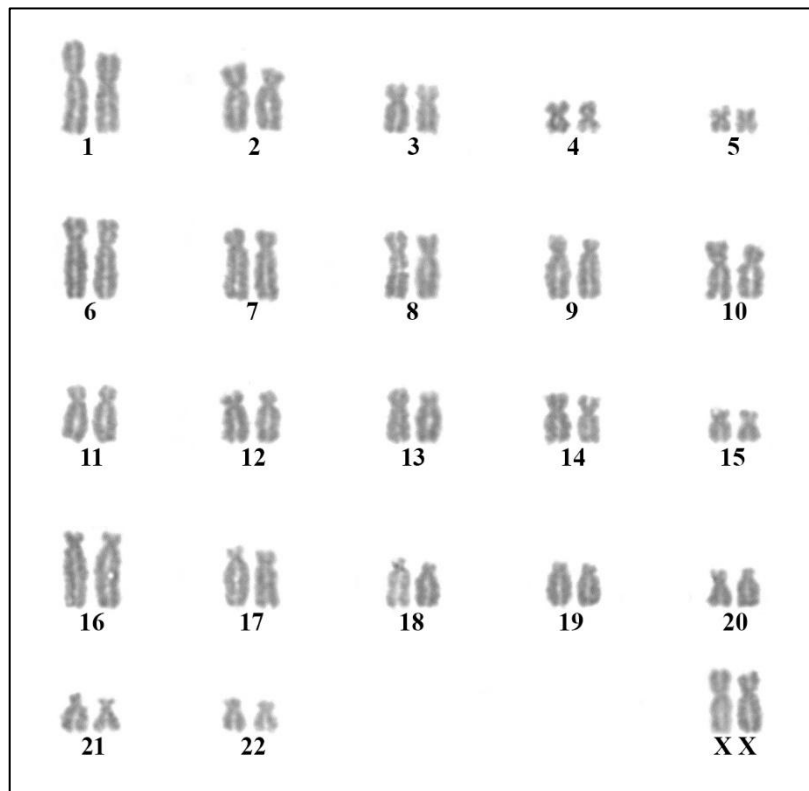
### **3.9 Análise dos resultados**

As preparações cromossômicas foram analisadas sob um microscópio de epifluorescência Axio Imager A2 equipado com a câmara AxioCamMRm (Zeiss). As imagens foram capturadas com o programa Axiovision (Zeiss) e editadas em Adobe Photoshop.

## 4. RESULTADOS

### Coloração convencional

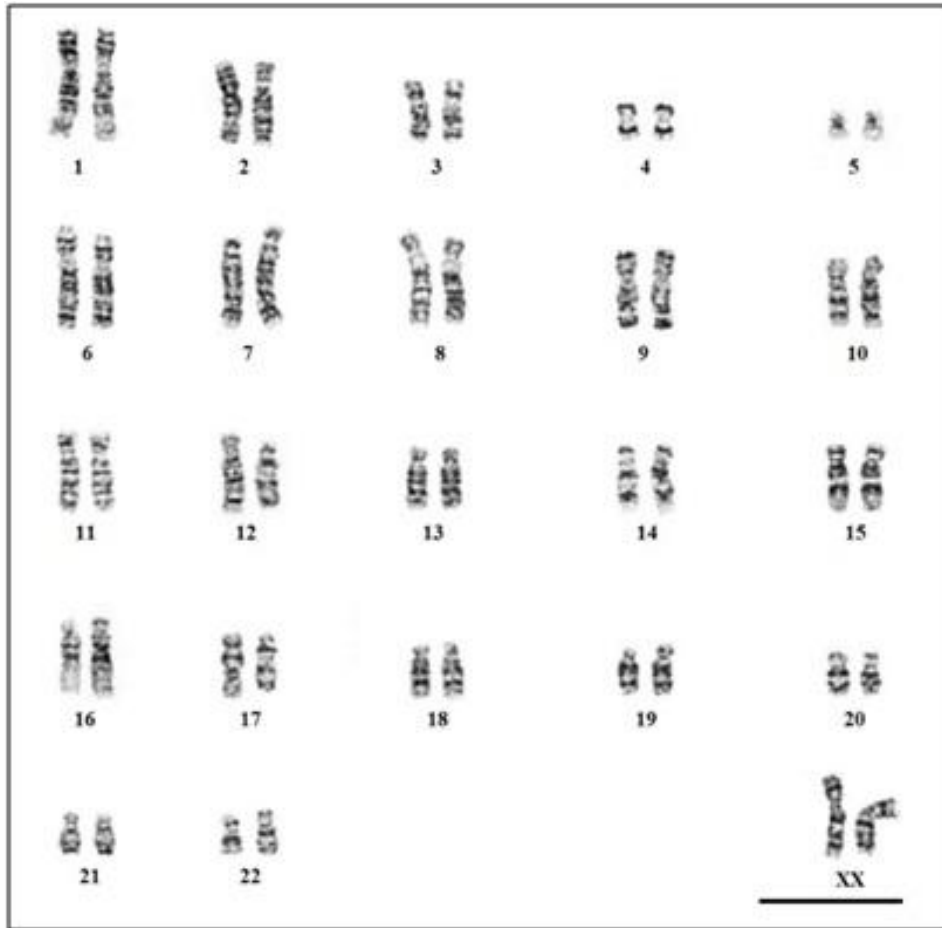
Os três exemplares de *Leontopithecus rosalia* apresentaram um cariótipo com  $2n=46$  e  $NF=74$  (Figura 6), composto por cinco pares de autossomos metacêntricos, dez pares submetacêntricos e sete pares acrocêntricos, o X era um cromossomo metacêntrico médio, semelhante em tamanho ao par 2. Não foi obtida informação acerca do Y, já que os três espécimes estudados eram fêmeas.



**Figura 6.** Cariótipo de uma fêmea de *Leontopithecus rosalia* com  $2n=46$  e  $NF=74$ , após coloração convencional.

### Bandeamento GTG

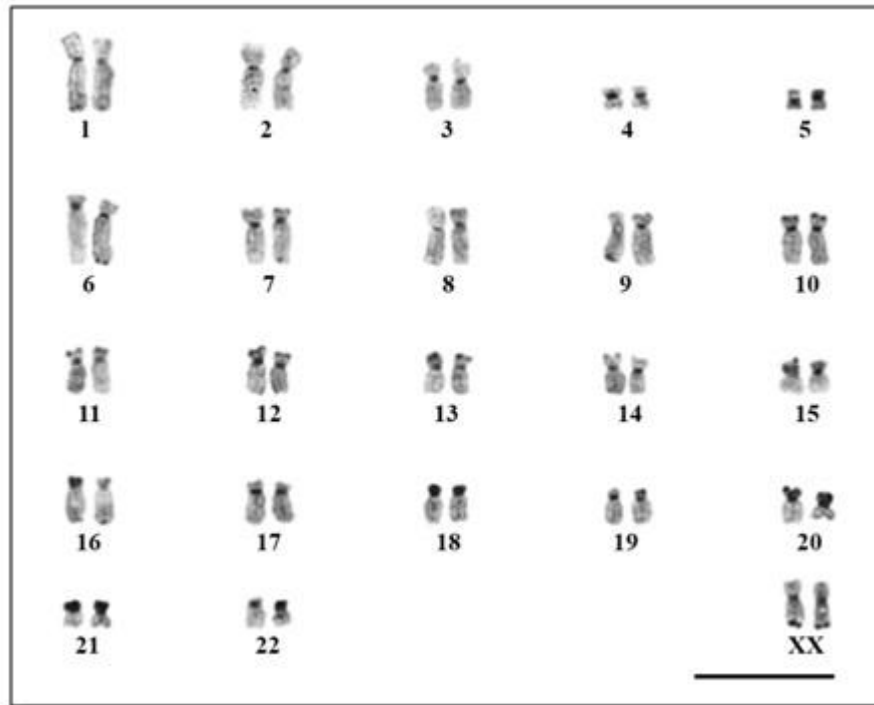
Após o bandeamento GTG, foi possível reconhecer individualmente todos os pares cromossômicos (Figura 7).



**Figura 7.** Cariótipo de um fêmea de *Leontopithecus rosalia* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ) após bandeamento GTG.

### **Bandeamento CBG**

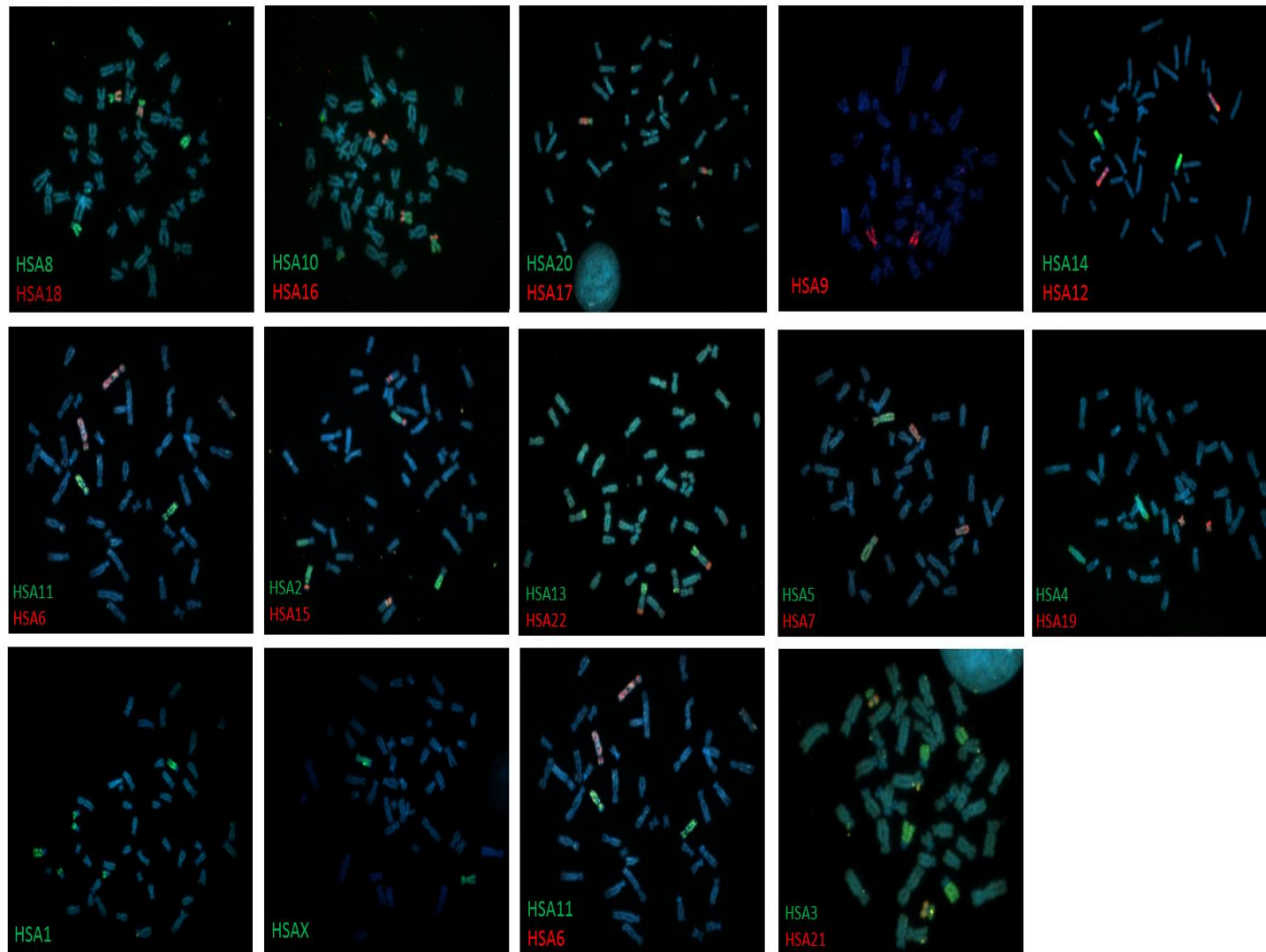
Após a aplicação do bandeamento CBG, foi constatada a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, na porção distal dos braços longos dos pares 1, 6, 16 e X e nos braços curtos dos pares 10-13 e 15, 16, 18-22 (Figura 8).



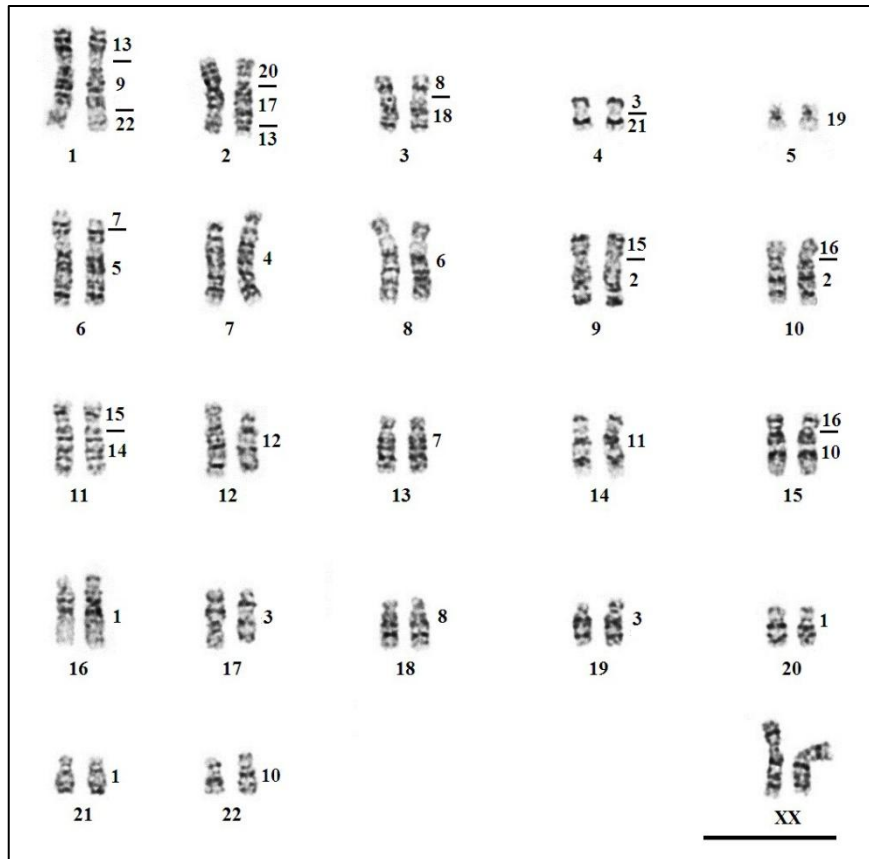
**Figura 8.** Cariótipo de um fêmea de *Leontopithecus rosalia* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ) após bandeamento CBG.

#### **Pintura cromossômica**

Após a hibridação com as sondas de todos cromossomos humanos, foram encontrados 33 segmentos conservados. Treze cromossomos se apresentaram conservados, cinco deles não associados a outros cromossomos: HSA4, HSA6, HSA11, HSA12, HSA19. Os outros oito cromossomos conservados em um único bloco estavam envolvidos em associações : HSA5 (5/7), HSA9 (13/9/22), HSA14 (15/14), HSA17 (20/17/13), HSA18 (8/18), HSA20 (20/17/13), HSA21 (3p/21) e HSA22 (13/9/22). Sete cromossomos se mostraram divididos em dois fragmentos: HSA 2, 7, 8, 10, 13, 15 e 16. HSA1 e 3 estavam divididos em três blocos cada um (Figuras 9 e 10).



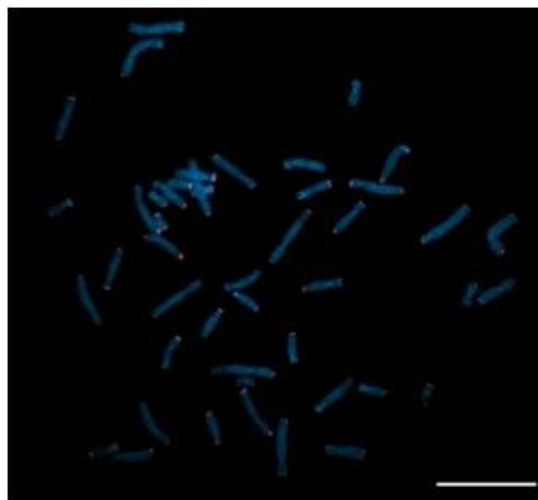
**Figura 9.** Metáfases de uma fêmea de *Leontopithecus rosalia* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ) após hibridação com sondas de cromossomos humanos. As sondas marcadas com biotina estão identificadas em verde e as marcadas com digoxigenina, em vermelho.



**Figura 10.** Correspondência dos cromossomos humanos no cariótipo de uma fêmea de *L. rosalia* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ). Os números à direita indicam os cromossomos humanos correspondentes a cada par de *L. rosalia*.

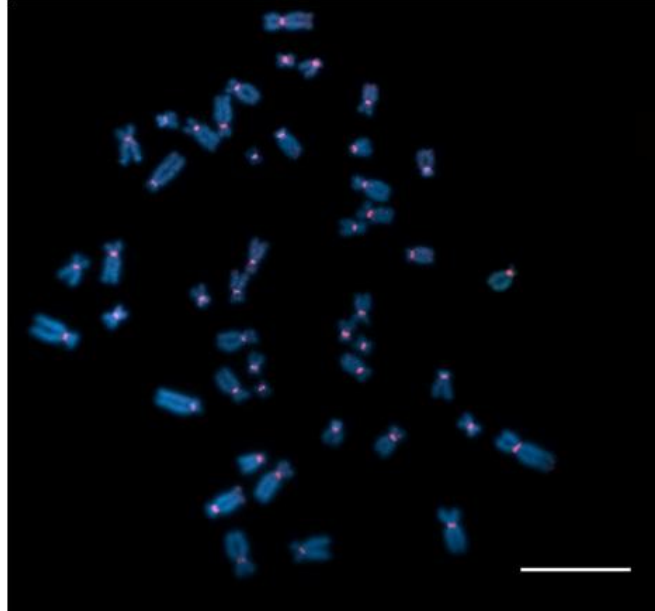
### Sondas de sequências repetitivas

A sonda telomérica hibridou nas extremidades de todos dos cromossomos (Figura 11). Não foram observados sinais intersticiais que poderiam indicar pontos de rearranjos.



**Figura 11.** FISH com sequências teloméricas em cromossomos metafásicos de uma fêmea de *Leontopithecus rosalia* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ).

Após a hibridação com a sonda de DNA alfa-satélite, as regiões pericentroméricas de todos os cromossomos mostraram marcação (Figura 12).



**Figura 12.** FISH com uma sonda de DNA alfa-satélite em cromossomos metafásicos de uma fêmea de *Leontopithecus rosalia* ( $2n=46$ ;  $NF=74$ ).

## 5. DISCUSSÃO

O complemento cromossômico encontrado nas três fêmeas estudadas ( $2n=46$  e  $NF=74$ ; Figura 6) era igual ao descrito na literatura para a mesma espécie (Nagamachi e col. 1997).

Os padrões de bandeamento GTG obtidos por nós (Figura 7) mostraram-se semelhantes aos descritos para a *Leontopithecus rosalia* (Nagamachi e col. 1997), *Leontopithecus chrysomelas* (Gerbault-Serreau e col. 2004) e *Saguinus midas* (O'Brien e col. 2006).

A grande semelhança entre os padrões de bandeamento GTG das quatro espécies de mico-leão e a semelhança destes cariótipos com o de *Saguinus* foi notada anteriormente por Nagamachi e col. (1997), que concluíram que estes dois gêneros estão intimamente relacionados cromossomicamente, sugerindo que provavelmente se originaram a partir do mesmo ramo ancestral. Os dados obtidos nos permitem confirmar os resultados de Nagamachi e col. (1997).

Nos nossos exemplares verificamos a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, na porção distal dos braços longos dos pares 1, 6 e 16, na extremidade dos braços curtos dos pares 10-13 e ao longo dos braços curtos dos pares 15-22. Nagamachi e col. (1997) não encontraram diferenças entre os cariótipos de *L. rosalia* e *L. chrysomelas* quando analisadas sob padrões de banda C. As diferenças encontradas entre os nossos resultados e o padrão comum descrito pelos autores foram a ausência de heterocromatina constitutiva na porção distal do braço curto dos pares 6, 8, 9 e 17 e a presença de bandas heterocromáticas nos braços longos do par 6 e 16 e no braço curto do par 13 nos nossos exemplares.

Estudos sobre a composição da heterocromatina têm aumentado muito nos últimos anos. Prakhongcheep e col. (2013) analisaram a composição da heterocromatina constitutiva que compõe os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos de *Aotus* que, assim como os de *L. rosalia*, são totalmente heterocromáticos. As sequências de DNA satélite chamadas de OwlRep foram descritas como a principal ou possivelmente única sequência que compõe a heterocromatina constitutiva dos braços curtos de *Aotus*. Análises deste tipo ainda não foram realizadas em *Leontopithecus* e, em vista dos papéis biológicos que vêm sendo atribuídos à heterocromatina, seriam de grande interesse.

### **Pintura cromossômica**

A pintura cromossômica permite o mapeamento físico comparativo entre espécies e apresenta enorme interesse biológico para o estudo da evolução cariotípica (Solinas-Toldo 1995). A reconstrução de possíveis cariótipos ancestrais tem sido feita com dados obtidos em estudos comparativos usando sondas de cromossomos humanos em experimentos interespecíficos de FISH. Platyrrhini é um táxon bastante diverso do ponto de vista citogenético e morfológico e quanto mais dados forem adicionados, maior será o entendimento sobre história da evolutiva e cromossômica neste grupo (Oliveira 2001).

Associações cromossômicas vistas em diferentes espécies podem indicar sinapomorfias que as unem filogeneticamente (Stanyon e col. 2000). A aplicação da técnica de FISH com sondas humanas cromossomo-específicas permite comparar as homologias dos cromossomos humanos no cariótipo de *Leontopithecus rosalia* e de outros primatas analisados e da literatura (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3:** Associações cromossômicas sintênicas encontrada nos cariótipos de *Leontopithecus rosalia*, *L. chrysomelas* (Gerbault-Serreau e col. 2004), *Saguinus oedipus* (Muler e col. 2001) *Callimico goeldii* (Neusser e col. 2001) e *Cebus capucinus* (Amaral e col. 2008).

Associações	<i>Leontopithecus</i>		<i>Saguinus oedipus</i>	<i>Callimico goeldii</i>	<i>Cebus capucinus</i>
	<i>L. rosalia</i>	<i>L. chrysomelas</i>			
1/10	-	-	-	+	-
2/15	+	+	+	+	-
2/16	+	+	+	+	+
3/21	+	+	+	+	+
5/7	+	+	+	+	+
8/18	+	+	+	+	+
10/16	+	+	+	+	+
13/9/22	+	+	+	-	-
14/15	+	+	+	+	+
20/17/13	+	+	+	-	-

As sintenias 3/21, 5/7, 8/18 e 14/15 estão presentes no cariótipo ancestral de Platyrrhini e permanecem conservadas em *L. rosalia*. As sintenias 2/15, 13/9/22, 13/17/20 são comuns a quase todos os Callitrichinae, exceto *Callimico*), no qual os cromossomos 13/9/22, 13/17/20 estão organizados de outra maneira, apresentando as associações 13/9, 13/17 e 9/22 (Neusser e col. 2001). Os autores sugeriram que essa condição é derivada,

fato apoiado pela posição de *Callimico* na filogenia de Platyrrhini mais recente (Schneider e Sampaio 2015).

**Tabela 4.** Correspondência de cromossomos humanos com os supostos cariótipos ancestrais de Platyrrhini, Cebidae e Callitrichinae (Oliveira e col. 2012).

Cariótipo	Conservados	Dois Fragmentos	Três Fragmentos	Associações
Ancestral Platyrrhini 2n=54	4, 6, 9, 11, 12, 13, 17, 19, 20, 22, X e Y	2, 7, 8, 10, 15 e 16	1 e 3	3/21, 5/7, 8/18, 10/16 e 14/15
Ancestral Cebidae 2n=54	4, 6, 9, 11, 12, 13, 17, 19, 20, 22, X e Y	2, 7, 8, 10, 15 e 16	1 e 3	3/21, 5/7, 8/18, 10/16 e 14/15
Ancestral Callitrichinae	4, 6, 11, 12, 19, 20, X e Y	2, 7, 8, 10, 15 e 16	1, 3, 13	3/21, 5/7, 8/18 e 14/15, 2/15, 13/9/22, 13/17/20

Os resultados que obtivemos após a pintura cromossômica em *L. rosalia* mostraram-se semelhantes aos descritos para as regiões eucromáticas de *L. chrysomelas* (Gerbault-Serreau e col. 2004).

Apesar da grande semelhança encontrada entre os resultados obtidos nas duas espécies de *Leontopithecus*, observamos diferenças em regiões heterocromáticas. Assim, enquanto onze segmentos cromossômicos heterocromáticos que não apresentavam hibridação nos nossos experimentos (regiões terminais dos braços curtos de LRO8, LRO12, LRO14, LRO15, LRO16, LRO17, LRO18, LRO19, LRO20, LRO21 e LRO22) mostraram o mesmo resultado em *L. chrysomelas* (Gerbault-Serreau e col. 2004), o cromossomo LRO4 mostrou-se diferente, sendo descrito como possuidor de uma porção heterocromática na extremidade do braço curto que não foi encontrada nos nossos exemplares. Os cromossomos LRO9 e LRO11 apresentaram regiões heterocromáticas não hibridadas também na extremidade do braço curto, diferindo do descrito nos cromossomos correspondentes de *L. chrysomelas* (Gerbault-Serreau e col. 2004).

Os braços curtos de todos os cromossomos acrocêntricos de *L. rosalia* são inteiramente heterocromáticos e mais corados após o bandeamento CBG. O mesmo padrão foi observado nos cromossomos acrocêntricos de *Aotus*, cuja composição é de sequências repetitivas espécie-específicas (Prakhongcheep e col. 2013b). As regiões heterocromáticas

são formadas por DNAs satélites, que possuem evolução rápida, divergindo até mesmo em espécies bastante próximas (López- Flores e Garrido- Ramos 2012). Assim, nossos resultados indicam que, apesar da grande semelhança entre os complementos de *L. rosalia* e *L. chrysomelas*, a análise das sequências de DNA satélite das duas espécies deve produzir resultados que permitam diferenciá-los, sendo um importante objeto para pesquisas futuras.

### **Sondas de sequências repetitivas**

As sondas das sequências repetitivas telomérica e alfa-satélite apresentaram hibridação apenas nas extremidades e regiões centroméricas de todos os cromossomos, respectivamente.

Sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> foram inicialmente descritas em humanos e são conservadas na maioria dos organismos eucariontes (Meyne e col.1989). A presença de sequências teloméricas intersticiais, que poderiam indicar pontos de rearranjos cromossômicos, não foram observadas nos nossos exemplares.

As sequências alfa-satélite variam em diferentes taxa (Prakhongcheep e col. 2013a), assim como outras sequências repetitivas, compostas em grande parte por DNAs satélites que, por não codificarem proteínas, estão entre os componentes mais dinâmicos do genoma, podendo divergir bastante mesmo entre espécies muito próximas (Strachan e cols. 1986; Piras e cols. 2010).

Porém, a seleção sobre estas sequências as mantém mais conservadas, o que acontece em regiões ligadas, por exemplo à atividade centromérica (López- Flores e Garrido-Ramos 2012).

A especificidade da heterocromatina explica o fato de não haver hibridação nessas regiões em experimentos de pintura cromossômica interespecífica e também deve explicar as diferenças encontradas quando da pintura cromossômica interespecífica em *L. chrysomelas* e *L. rosalia*. Apesar de se tratarem de espécies muito próximas com cariótipos bastante conservados, nossos resultados indicam que o estudo mais aprofundado das sequências repetitivas deve produzir resultados que permitam distinguir os genomas das duas espécies.

## Conclusão

Após a análise dos padrões de bandeamento GTG e CBG e da pintura cromossômica com sondas cromossomo-específicas humanas concluímos que:

1. O bandeamento CBG revelou um padrão diferente do descrito anteriormente para a espécie por Nagamachi e col.(1997);
2. *Leontopithecus rosalia*, assim como *L. chrysomelas* possui sete associações conservadas encontradas no provável cariótipo ancestral de Callithrichinae (2/15, 3/21, 5/7, 8/18, 13/9/22, 13/17/20 e 14/15), das quais quatro estão presentes no cariótipo ancestral de Platyrrhini (3/21, 5/7, 8/18 e 14/15);
3. As sondas de sequências repetitivas não evidenciaram sinais que poderiam indicar pontos de rearranjo;
4. Apesar de nossos resultados de pintura cromossômica apontarem grande semelhança entre o cariótipo de *L. rosalia* e o descrito o cariótipo para *L. chrysomelas* (Gerbault-Serreau e col. 2004) uma diferença significativa na heterocromatina foi observada entre essas espécies, sugerindo a existência de padrões divergentes a nível molecular.

## Referências

- Amaral PJ, Finotelo LF, de Oliveira EH, Pissi-natti A, Nagamachi CY, Pieczarka JC. 2008. Phylogenetic studies of the genus *Cebus* (Cebidae-primates) using chromosome painting and g-banding. *BMC Evolutionary Biology* 8, 169.
- Associação Mico-Leão-Dourado (AMLD). 2015. <[www.micoleao.org.br](http://www.micoleao.org.br)> Download on 8 September 2015.
- Auricchio P. 1995. *Primatas do Brasil*. Terra Brasilis Comércio de Material Didático e Editora Ltda – ME. São Paulo, SP.
- Barroso CML. 1997. Update on the phylogenetic systematics of New World monkeys: further DNA evidence for placing the Pygmy marmoset (*Cebuella*) within the genus *Callithrix*. *International Journal of Primatology* 18, 651–673.
- Benirschke K, Anderson JM, Brownhill LE. 1962. Marrow chimerism in marmosets. *Science* 138, 513–515.
- Blackburn EH. 2001. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 21, 661-73.
- Bond M, Tejedor MF, Campbell Jr K E, Chornogubsky L, New N, Goin F. 2015. Eocene primates of South America and the African origins of New World monkeys. *Nature* 520, 538-541.
- Buscaino A, Allshire R, Pidoux A. 2010. Building centromeres: home sweet home or a nomadic existence? *Current Opinion Genetics Development* 20, 118–126.
- Coimbra-Filho AF, Mittermeier RA. 1976. Hybridization in the genus *Leontopithecus*, *L. r. rosalia* (Linnaeus, 1766) X *L. r. chrysomelas* (Kuhl, 1820) (Callitrichidae, Primates). *Revista Brasileira de Biologia* 36 (1), 129-137.
- Dover GA. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299, 111–117.
- Ferrari SF. 1993. Ecological differentiation in the Callitrichidae. In: Rylands AB, editor. *Marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology*, 1ª edição. New York: Oxford University Press 1, 314–328.
- Fleage, JG. 2013. *Primate Adaptation and Evolution*. 3ª Edição. Stony Brook University, Stony Brook, NY.
- Ford, SM. 1986. Systematics of the New World monkeys. In: Swindler, D.R., Erwin, J. (Eds.), *Comparative Primate Biology, Systematics, Evolution and Anatomy*. Alan R. Liss, New York, 73–135.
- Gerbault-Serreau M, Bonnet-Garnier A, Richard F, Dutrillaux B 2004: Chromosome painting comparison of *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichine, Platyrrhini) with man and its phylogenetic position. *Chromosome Research* 12, 691-701.
- Groves, CP. 2001. *Primate Taxonomy*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.

- Henderson E. 1995. Telomere DNA structure; in Blackburn EH, Greider CW (eds): Telomeres. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 11– 34.
- Hershkovitz P. 1977. Living New World monkeys (Platyrrhini), 1ª edição.. Chicago: The University of Chicago Press 1, 1131.
- Hodgson JA, Sterner KN, Matthews LJ, Burrell AS, Jani RA, Raaum RL, Stewart CB, Disotell RT. 2009. Successive radiations, not stasis, in the South American primate fauna. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A 106, 5534-5539.
- Houle A. 1998. Floating islands: a mode of long-distance dispersal for small to medium-sized terrestrial vertebrates. Diversity Distributions 4, 201–216.
- Houle A. 1999. The origin of platyrrhines: An evaluation of the Antarctic scenario and the floating island model. American Journal of Physical Anthropology 109, 541-559.
- IUCN Red List Of The Threatened Species. 2008. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Download on 6 November 2015.
- Kay RF. 1990. The phyletic relationships of extant and fossil Pitheciinae (Platyrrhini, Anthropeida). Journal of Human Evolution 19, 175–208.
- Kierulff, M.C.M., Rylands, A.B. & de Oliveira, M.M. 2008a. *Leontopithecus rosalia*. A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN de 2008: e.T11506A3287321. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T11506A3287321.en>. Downloaded on 6 November 2015.
- Kierulff MCM, Rylands AB, Mendes SL, de Oliveira, MM. 2008b. *Leontopithecus caissara*. A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN de 2008: e.T11503A3289886. [Http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T11503A3289886.en](http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T11503A3289886.en). Downloaded on 15 January 2016.
- Kierulff MCM, Rylands AB, Mendes SL, de Oliveira, MM 2008c. *Leontopithecus chrysopygus*. A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN de 2008: e.T11505A3290864. [Http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T11505A3290864.en](http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T11505A3290864.en). Downloaded on 15 January 2016.
- Kierulff MCM, Rylands AB, Mendes SL, de Oliveira, MM 2008d. *Leontopithecus chrysomelas*. A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN de 2008: e.T40643A10347712. [Http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T40643A10347712.en](http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T40643A10347712.en). Downloaded on 15 January 2016.
- Kierulff MCM. 2009. Invasive introduced golden-headed lion tamarins - a new threat to golden lion tamarins. Tamarin Tales, 10, 5-7.
- Kit, S. 1961. Equilibrium sedimentation in density gradient of DNA preparations from animal tissues. Journal of Molecular Biology 3, 711-716.
- López-Flores, I, Garrido- Ramos MA. 2012. The Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes. Repetitive DNA. Genome Dyn. Basel, Karger 7, 1–28.

- Madalena, CRG. 2008. DNA repetitivo e seu papel na estrutura cromossômica terminal de *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae). Universidade de São Paulo, Genética e Biologia Evolutiva. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-02102008-144225/pt-br.php>
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. 1989. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 86, 7049-53.
- Müller S, Neusser M, O'Brien PC, Wienberg J. 2001. Molecular cytogenetic characterization of the EBV-producing cell line B95–8 (*Saguinus oedipus*, Platyrrhini) by chromosome sorting and painting. *Chromosome Research* 9, 689–693.
- Müller S. 2006. Primate chromosome evolution. In *Genomic Disorders*. Humana Press 133-152.
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Schwarz M, Barros RMS, Mattevi MS. 1997. Chromosomal similarities and differences between tamarins, *Leontopithecus* and *Saguinus* (Platyrrhini, Primates). *American Journal of Primatology* 43, 265–276.
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Muniz JAPC, Barros RMS, Mattevi MS. 1999. Proposed Chromosomal Phylogeny for the South American Primates of the Callitrichidae Family (Platyrrhini). *American Journal of Primatology* 49, 133–152.
- Nascimento, ATA. 2014. Ecologia e Conservação do Mico-Leão-Da-Cara-Preta (*Leontopithecus caissara*) Na Região do Ariri, Cananeia, São Paulo. 117 f. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte
- Neusser M, Stanyon R, Bigoni F, Wienberg J, Müller S. 2001. Molecular cytogenetics of New World monkeys (Platyrrhini) – comparative analysis of five species by multi-color chromosome painting gives evidence for a classification of *Callimico goeldii* within the family of Callitrichidae. *Cytogenetic and Genome Research* 94, 206–215.
- Oliveira, CR. 2005. Comportamento de Brincadeira em Micos-Leões-Dourados (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus, 1766): Ontogenia, Aspectos Sociais e Interações Interespecíficas. 120 f. Tese (Doutorado em Psicobiologia), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade De São Paulo, Ribeirão Preto.
- Oliveira EHC, Neusser M, Müller S. 2012. Chromosome Evolution in New World Monkeys (Platyrrhini). *Cytogenetic and Genome Research* 137, 259–272.
- Pavlek M, Gelfand Y, Plohl M, Meštrović N. 2015. Genome-wide analysis of tandem repeats in *Tribolium castaneum* genome reveals abundant and highly dynamic tandem repeat families with satellite DNA features in euchromatic chromosomal arms. *DNA Research* dsv021.

- Perelman P, Johnson EW, Roos C, Seuánez HN, Horvath JE, Moreira MAM, Kessing B, Pontius J, Roelke M, Rumpler Y, Schneider MPC, Silva A, O'Brien SJ, Pecon-Slattery J. 2011. A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genetics* 7:e1001342.
- Prakhongcheep O, Hirai Y, Hara T, Srikulnath K, Hirai H, Koga A. 2013a. Two Types of Alpha Satellite DNA in Distinct Chromosomal Locations in Azara's Owl Monkey. *DNA Research* 3, 235-240.
- Prakhongcheep O, Chaiprasertsri N, Terada S, Hirai Y, Srikulnath K, Hirai H, Koga A. 2013b. Heterochromatin Blocks Constituting the Entire Short Arms of Acrocentric Chromosomes of Azara's Owl Monkey: Formation Processes Inferred From Chromosomal Locations. *DNA Research* 20, 461-470.
- Richard F, Lombard M, Dutrillaux B. 1996. ZOO-FISH suggests a complete homology between human and capuchin monkey (*Platyrrhini*) euchromatin. *Genomics* 36, 417–423.
- Rosenberger, AL. 1981. Systematics: the higher taxa. In: Coimbra-Filho, A.F., Mittermeier, A.R. (Eds.), *Ecology and Behavior of Neotropical Primates*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 9–27.
- Ross CF. 2000. Into the light: The Origin of Anthrooidea. *Annual Review of Anthropology* 29, 147-194.
- Ruiz-Herrera A, García F, Aguilera M, Garcia M, Ponsà Fontanals M. 2005. Comparative chromosome painting in *Aotus* reveals a highly derived evolution. *American Journal of Primatology* 65, 73–85.
- Sbalqueiro IJ, Persson VG, Lorini ML. 1992. O cariótipo de *Leontopithecus caissara* (Callitrichidae, Primates). *Resumos Do XIX Congresso Brasileiro De Zoologia*. Belém, Pará, Brasil.
- Schneider H, Schneider MP, Sampaio I, Harada ML, Stanhope M, Czelusniak J, Goodman M. 1993. Molecular phylogeny of the New World monkeys (*Platyrrhini*, primates). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2, 225–242.
- Schneider H, Sampaio MIC, Harada ML, Barroso CML, Schneider MPC, Czelusniak J, Goodman M. 1996. Molecular phylogeny of the New World monkeys (*Platyrrhini*, Primates) based on two unlinked nuclear genes: IRBP intron 1 and e-globin sequences. *American Journal of Physical Anthropology* 100, 153–179.
- Schneider H. 2000. The current status of the New World monkey phylogeny. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72, 165-172.
- Schneider H, Sampaio I. 2015. The systematics and evolution of New World primates – A review. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 82, 348–357.
- Schrager, CG, Menezes, NA, Furtado, C, Bonvicino, R C, Seuanez, HN. 2012. Multispecies Coalescent Analysis of the Early Diversification of Neotropical Primates: Phylogenetic

- Inference under Strong Gene Trees/Species Tree Conflict. *Genome Biology and Evolution* 6, 3105-3114.
- Seabright M. 1971. A rapid technique for human chromosomes. *Lancet* 2, 971-972. doi:10.1016/S0140-6736(71)90287-X
- Seuáñez HN, Armada JL, Barroso C, Rezende C, Da Silva VF. 1983. The meiotic chromosomes of *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini). *Cytogenetic and Genome Research* 36, 517-524.
- Sherlock JK, Griffin DK, Delhanty JD, Par-rington JM. 1996. Homologies between human and marmoset (*Callithrix jacchus*) chromosomes revealed by comparative chromosome painting. *Genomics* 33, 214–219.
- Soares VMFC. 1982. Estudos Cromossômicos Nos Gêneros *Callithrix* e *Leontopithecus* (Primata Platyrrhini–Callithricidae). Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Solinas-Toldo S, Lengauer C, FRIES R. 1995. Comparative genome map of human and cattle. *Genomics* 27, 489-496.
- Stanyon R, Consiglière S, Müller S, Morescalchi A, Neusser M, Wienberg J. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) maps chromosomal homologies between the dusky titi and squirrel monkey. *American Journal of Primatology* 50, 95-107.
- Stanyon R, Consiglière S, Bigoni F, Ferguson-Smith M, O'Brien PC, Wienberg J. 2001. Reciprocal chromosome painting between a New World primate, the woolly monkey, and humans. *Chromosome Research* 9, 97–106.
- Stanyon R, Bigoni F, Slaby T, Müller S, Stone G. 2004. Multi-directional chromosome painting maps homologies between species belonging to three genera of New World monkeys and humans. *Chromosoma* 113, 305–315.
- Stanyon R, Rocchi M, Capozzi O. 2008 Primate chromosome evolution: ancestral karyotypes, marker order and neo-centromeres. *Chromosome Research* 16, 17-39.
- Stanyon R, Garofalo F, Steinberg ER, Capozzi O, Di Marco S, Nieves M, Archidiacono N, Mudry MD. 2011. Chromosome Painting in Two Genera of South American Monkeys: Species Identification, Conservation, and Management. *Cytogenetic and Genome Research* 134, 40–50.
- Stanyon R, Bigoni F. 2013. Reconstruction of Ancestral Genomes. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020752.pub2
- Stimpson KM, Sullivan BA. 2010. Epigenomics of centromere assembly and function. *Current Opinion in Cell Biology* 22, 772– 780.
- Sumner AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75, 304-306. doi: 10.1016/0014-4827(72)90558-7

- Ugarkovic D, Pohl M. 2002. Variation in satellite DNA profiles – causes and effects. *The EMBO Journal* 21. 22, 5955-5959.
- Ugarkovic D. 2005. Functional elements residing within satellite DNAs. *The EMBO Journal* 6, 1035– 1039.
- Waring M, Britten RJ. 1966. Nucleotide sequence repetition: a rapidly reassociating fraction of mouse DNA. *Science* 154, 791-794.