



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

Análise fenotípica, citogenética e de genética molecular em macaco-prego-preto, *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae), em localidades dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, Brasil

DIEGO MATTOS PENEDO

Sob a Orientação da Professora
Denise Monnerat Nogueira

e Coorientação do Professor
Jorge Luís Azevedo de Armada

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Animal, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração em Biodiversidade Animal.

Seropédica, RJ

Julho de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P397a Penedo, Diego Mattos, 1987-
Análise fenotípica, citogenética e de genética
molecular em macaco-prego-preto, *Sapajus nigritus*
(Platyrrhini, Cebidae), em localidades dos estados do
Rio de Janeiro e de São Paulo, Brasil / Diego Mattos
Penedo. - Seropédica, 2020.
101 f.: il.

Orientadora: Denise Monnerat Nogueira.
Coorientador: Jorge Luís Azevedo de Armada.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Biologia
Animal, 2020.

1. Filogeografia. 2. Heterocromatina constitutiva.
3. Genes mitocondriais. I. Nogueira, Denise Monnerat,
1961-, orient. II. de Armada, Jorge Luís Azevedo, 1953
, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.
IV. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

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

DIEGO MATTOS PENEDO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Biologia Animal**, no **Programa de Pós Graduação em Biologia Animal**, Área de Concentração em **Biodiversidade Animal**.

TESE APROVADA EM 30/07/2020

Banca não presencial

Conforme deliberação nº. 001/2020 da PROPPG/UFRRJ, de 30/06/2020, as assinaturas dos membros da banca examinadora foram substituídas por assinaturas digitais, que constam em anexo.

Membros Titulares

Denise Monnerat Nogueira. Dr^a., UFRRJ
(Orientadora)

Carlos Eduardo da Silva Verona. Dr., TRIADE

Hélio Ricardo da Silva. Dr., UFRRJ

Lena Geise. Dr^a., UERJ

Mariela Nieves. Dr^a., UBA/Argentina

Membros Suplentes

Andréa Maria de Oliveira. Dr^a., UERJ

Rodrigo Salles de Carvalho. Dr., PREA

Ao meu avô, Milton, e à minha filha de quatro patas, Gaya, que partiram este ano e nos deixaram as suas lembranças, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles dedicados ao ensino e à pesquisa, principalmente aos professores que tive durante toda a minha formação.

Agradeço à minha orientadora, Denise Nogueira, pela parceria e dedicação em todos esses anos. A caminhada pelas descobertas e encantamentos da ciência muito contribuiu em minha formação acadêmica.

Agradeço ao meu coorientador, Jorge Armada, pelos ensinamentos, apoio nos trabalhos em laboratório e ao microscópio, e pelas conversas durante uma pausa para o café.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por me acolher e ser uma segunda casa durante muitos anos. Sou grato também por todos os servidores que atuam em prol do ensino, pesquisa e extensão na mais linda Universidade do Mundo.

Agradeço à minha esposa, Carolline, que me acompanhou por toda a caminhada acadêmica, estando ao meu lado nas certezas, incertezas, alegrias, tristezas, calmarias e turbulências. Hoje, tese e dissertação são escritas lado a lado, em uma mesma mesa de estudos.

Agradeço aos meus pais, Mara e Paulo, pela forma como me criaram, com amor e carinho me ajudaram a entender o mundo e respeitar todos os seres. Agradeço às minhas irmãs, Ana Paula e Daniele, pelo apoio, carinho e amor, sempre me incentivando em minhas conquistas e comemorando juntos. Agradeço os meus sobrinhos, Davi e José Vitor, que iniciam suas vidas e trazem luz e felicidade para nossa família. Agradeço ao meu cunhado Júlio pela amizade e companheirismo de tantos anos, conversas sobre as ciências e literaturas e apoio pelas novas vitórias. Agradeço aos meus sogros, Petterson e Eliane, não somente por gerarem a companheira da minha vida, mas também por me acolherem com tanto carinho na família. A todos, agradeço pela compreensão nas ausências que se fizeram necessárias para a construção deste trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos, principalmente Bianca, Ícaro, Igor, Jeniffer, Lilian, Melissa, Tiago e Viviane, com os quais as risadas são sempre sinceras e duradouras.

Agradeço às colegas de laboratório do Departamento de Genética, Fernanda, Jéssica, Juliana, Renata e Thamires por todo apoio no desenvolvimento deste trabalho. Em especial, agradeço à Beatriz pelo apoio e pelas conversas no laboratório, e ao Diogo, que embora não tenha formado comigo uma dupla sertaneja, me fez companhia nos muitos trabalhos de campo em busca dos macacos-prego. A todos os outros que em algum momento passaram pelo laboratório e contribuíram de alguma forma, também fica meu agradecimento.

Agradeço ao assistente de laboratório José Francisco pelo auxílio nas análises citogenéticas e pelas conversas descontraídas que sempre nos alegravam.

Agradeço ao Angelo Marzano, o fotógrafo oficial da equipe, que sempre nos auxiliava nos trabalhos de campo com seu olhar atento aos macacos-prego.

Agradeço aos Professores Roberto de Xerez e Marcelo Souza por intermediarem nosso contato com o Centro de Avaliação da Ilha da Marambaia e nos darem todo o apoio possível para realização de nosso trabalho na Ilha da Marambaia.

Agradeço ao comando do Centro de Avaliação da Ilha da Marambaia, Marinha do Brasil, pelo apoio na logística de transportes em nossos trabalhos de campo pela Ilha da Marambaia e pelas refeições disponibilizadas no quartel para nossa equipe.

Agradeço aos coordenadores de pesquisas das Unidades de Conservação, Jorge do Nascimento – Julião (Parque Nacional da Serra dos Órgãos), Gustavo Peixoto (Reserva Biológica de Poço das Antas), Katyucha Kossel (Parque Nacional da Tijuca) e Leonardo Nascimento (Parque Nacional do Itatiaia), tanto pelas autorizações quanto pelo apoio e informações que ajudaram nas buscas pelos macacos-prego.

Agradeço aos Médicos Veterinários dos Centros de Reabilitação de Animais Silvestres, Dr^a. Hanna Kokubun da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) e Dr. Jeferson Pires da Estácio de Sá, por se disponibilizarem e permitirem a coleta de amostras dos macacos-prego que se encontravam em suas instituições.

Agradeço a todos os moradores da Ilha da Marambaia, por nos receberem tão bem e nos auxiliarem nas buscas pelos macacos-prego. Em especial, agradeço ao José Carlos (Tio Zé) e Seu Sebastião (Tião), pela amizade construída em minhas visitas à Ilha.

Agradeço aos trabalhadores das Unidades de Conservação que nos auxiliaram indicando os locais com maior probabilidade de avistamento dos macacos-prego e por todo o suporte que nos deram.

Agradeço aos componentes da banca de qualificação, Dr^a. Lena Geise e Dr. Hélio da Silva, pelos valiosos comentários que ajudaram na construção desta tese.

Agradeço à Dr^a Izeni Farias, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Amazonas, por ceder uma alíquota dos *primers* do gene mitocondrial citocromo b que permitiram os testes iniciais.

Agradeço à Dr^a Marcela Lima, do Laboratório de Biogeografia da Conservação e Macroecologia da Universidade Federal do Pará, pelas informações concedidas para amplificação dos fragmentos com o gene mitocondrial citocromo c oxidase I.

Agradeço ao Dr. Alcides Pissinatti, do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, e ao Dr. José de Souza e Silva Júnior, do Museu Paraense Emílio Goeldi, pelos comentários acerca da pelagem dos macacos-prego.

Agradeço ao Dr. João Oliveira, curador do setor de mamíferos do Museu Nacional do Rio de Janeiro, por autorizar o acesso aos exemplares de macaco-prego-preto.

Agradeço aos componentes da banca, por aceitarem gentilmente o convite para participação dessa etapa tão importante e por contribuírem para sua finalização.

Agradeço à agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado a mim concedida no período de meu trabalho.

Agradeço à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, assim como a secretaria, pelo suporte ao longo do meu doutorado.

Agradeço àqueles, sem os quais este trabalho não existiria: os macacos-prego.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho ou para minha formação, meu sincero agradecimento.

RESUMO

PENEDO, Diego Mattos. **Análise fenotípica, citogenética e de genética molecular em macaco-prego-preto, *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae), em localidades dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, Brasil.** 2020. 101p. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

O macaco-prego-preto, *Sapajus nigritus*, é um primata neotropical com ampla distribuição na Mata Atlântica, nos estados do sudeste e sul do Brasil e na província de Misiones, Argentina. A espécie apresenta diversidade fenotípica e genética, muitas vezes associadas a padrões biogeográficos. A coloração da pelagem varia de forma intraespecífica, sendo sugerida transição na predominância do padrão preto ao marrom, no sentido sul-norte da distribuição. Análises citogenéticas em populações da Argentina demonstram polimorfismo específico no par cromossômico 11. Enquanto na maioria das espécies de *Sapajus* esse par é o maior acrocêntrico, com grande bloco de heterocromatina extra-centromérica (HC) terminal, em *S. nigritus*, nessas populações, é descrita deleção total da HC. No entanto, o grande bloco de HC terminal já foi demonstrado em exemplares do Rio de Janeiro (RJ). Além da divergência cromossômica, dados filogenéticos demonstram parafilia entre amostras do RJ e de outras localidades ao longo da distribuição. Essas variações podem corresponder a um padrão de descontinuidade filogeográfica descrito na região de Mata Atlântica em São Paulo (SP), associado a refúgios florestais ocorridos no Pleistoceno. O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade fenotípica e genética de *S. nigritus* em SP e RJ, averiguando os padrões de pelagem, a distribuição da HC no par 11 e a diversidade molecular no estado do RJ, comparando-a com outras localidades. Foram analisados indivíduos de cinco populações do estado do RJ: Ilha da Marambaia (IM), Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), Parque Nacional do Itatiaia (PNI), da Tijuca (PNT) e da Serra dos Órgãos (PARNASO); além de exemplares *ex situ* de Guaratiba/RJ (Gua) e de cidades de São Paulo: capital (cSP), São José dos Campos (SJC), São Sebastião (SS), Paraibuna (PB) e Campos do Jordão (CJ). Espécimes de *S. nigritus* do Museu Nacional do Rio Janeiro (MNRJ), provenientes de Angra dos Reis, Itatiaia, Paraty e Teresópolis foram incluídos nas análises fenotípicas. Foi avaliada a coloração do dorso, ventre, membros, cauda e face. A presença e a distribuição de HC foram analisadas com técnicas de citogenética clássica e molecular. As relações filogenéticas foram inferidas com base nos genes mitocondriais citocromo c oxidase I, II e citocromo b, incluindo sequências disponíveis no GenBank[®]. Em 49 indivíduos capturados, seis *ex situ* e oito exemplares do MNRJ foram identificados os padrões de pelagem marrom (n=37) e preto (n=26), com variação intrapopulacional, predominando o preto à oeste (PNI e MNRJ) e marrom à leste (IM e PNT). A associação desse achado à predominância do padrão preto descrita em uma população de SP sugere um limite na variação preto-marrom na distribuição SP-RJ. O par 11 com a deleção da HC foi observado nas amostras à leste (IM, Gua, PNT, PARNASO e RBPA), enquanto à oeste ambos os padrões foram identificados, sem (cSP, CJ e SS) e com (SJC, PB e PNI) bloco de HC. Foi observada divergência molecular entre as amostras do RJ e aquelas de SP, PR e Argentina, incluindo o PNI, formando clados parafiléticos. A diversidade intraespecífica observada em *S. nigritus* pode representar unidades evolutivamente significativas (UES) e confirmar a região amostrada como um ponto de descontinuidade filogeográfica para a espécie.

Palavras-chave: Filogeografia, Heterocromatina constitutiva, Genes mitocondriais.

ABSTRACT

PENEDO, Diego Mattos. **Phenotypic, cytogenetic and molecular genetic analysis in black-horned capuchin, *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae), from areas of Rio de Janeiro and São Paulo states, Brazil.** 2020. 101p. Thesis (Ph.D. in Animal Biology). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

The black-horned capuchin, *Sapajus nigritus*, is a Neotropical primate with a wide distribution in the Atlantic Forest, from southeast Brazil to Misiones province, Argentina. The species presents phenotypic and genetic diversity, often associated with biogeographic patterns. The coat coloration varies with intraspecific differences, with transition in the predominance from black to brown pattern, in the south-north distribution. Cytogenetic analysis in populations from Argentina showed a specific polymorphism in the chromosome pair 11. While in most *Sapajus*' species this pair is the largest acrocentric, with a terminal extracentromeric heterochromatic (HC) block, in *S. nigritus*, in these populations, the total deletion of HC is described. However, the terminal HC block has already been demonstrated in specimens from Rio de Janeiro (RJ). In addition to the chromosomal divergence, phylogenetic data demonstrate paraphyly among samples from RJ and other localities along the distribution. These variations may correspond to a pattern of phylogeographic discontinuity described in Atlantic Forest at São Paulo (SP), associated to forest refuges occurring in Pleistocene. The objective of this study was to analyze the phenotypic and genetic diversity of *S. nigritus* in SP and RJ, investigating the coat patterns, the distribution of HC in the par 11 and the molecular diversity in the state of RJ, comparing it with other localities. Individuals from five populations in the RJ state were analyzed: Ilha da Marambaia (IM), Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), Parque Nacional do Itatiaia (PNI), da Tijuca (PNT) and da Serra dos Órgãos (PARNASO); as well as *ex situ* specimens from Guaratiba/RJ (Gua) and cities of São Paulo: capital (cSP), São José dos Campos (SJC), São Sebastião (SS), Paraibuna (PB) and Campos do Jordão (CJ). Specimens of *S. nigritus* at the Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), from Angra dos Reis, Itatiaia, Paraty and Teresópolis, were included in the phenotypic analysis. Coloration of the back, belly, limbs, tail and face were evaluated. The presence and distribution of HC were analyzed using classical and molecular cytogenetic techniques. The phylogenetic relationships were inferred based on the mitochondrial genes cytochrome c oxidase I, II and cytochrome b, including sequences available in GenBank®. In 49 individuals captured, six *ex situ* and eight MNRJ specimens were identified brown (n=37) and black (n=26) coat patterns, with intrapopulation variation, predominating black to the west (PNI and MNRJ) and brown to the east (IM and PNT). The association of this finding with the predominance of the black pattern described in an SP population suggests a limit on the black-brown variation in the SP-RJ distribution. The pair 11 with the deletion of HC was observed in the samples to the east (IM, Gua, PNT, PARNASO and RBPA), while to the west both patterns were identified, without (cSP, CJ and SS) and with (SJC, PB and PNI) HC block. Molecular divergence was observed between the samples from RJ and those from SP, PR and Argentina, including the PNI, forming paraphyletic clades. The intraspecific diversity observed in *S. nigritus* may represent evolutionary significant units (ESU) and confirm the sampled region as a phylogeographic discontinuity point for the species.

Keywords: Philogeography, Constitutive heterochromatin, Mitochondrial genes.

LISTA DE ABREVIÇÕES

\bar{X}	Média
μL	Microlitro
μM	Micromolar
2n	Número diploide
ANOVA	análise de variância
CADIM	Centro de Avaliação da Ilha da Marambaia
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CJ	Campos do Jordão
cm	Centímetro
CRAS	Centro de Reabilitação de Animais Silvestres
cSP	Cidade de São Paulo
CxLxA	Dimensões de comprimento, largura e altura
d	Índice de distância genética
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FA	Fêmea adulta
FISH	Hibridização por fluorescência <i>in situ</i>
FJ	Fêmea jovem
g	Gramas
Gua	Guaratiba
h	Número de haplótipos
HC	Heterocromatina constitutiva
Hd	Diversidade haplotípica
IC	Intervalo de confiança
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IM	Ilha da Marambaia
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
Kg	Quilograma
Km	Quilômetros
Km ²	Quilômetros quadrados
L	Litro
m	Metro
M	Molar
Ma	Milhões de anos
MA	Macho adulto
MSA	Macho subadulto
mg	Miligramas
min	Minutos
MJ	Macho jovem
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MNRJ	Museu Nacional do Rio de Janeiro
MT-CO1	Gene mitocondrial Citocromo c Oxidase I
MT-CO2	Gene mitocondrial Citocromo c Oxidase II
MT-CYB	Gene mitocondrial Citocromo b

n	Número amostral
N	Normal
NF	Número fundamental
ng	Nanograma
NS	Número de sequências
PARNASO	Parque Nacional da Serra dos Órgãos
PB	Paraibuna
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PNI	Parque Nacional do Itatiaia
PNT	Parque Nacional da Tijuca
RBPA	Reserva Biológica de Poço das Antas
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Segundos
S	Sítios polimórficos
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SJC	São José dos Campos
SS	São Sebastião
SSC	Solução salina de cloreto e citrato de sódio
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidades
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UNIVAP	Universidade do Vale do Paraíba
V	Volts
WCP	<i>Whole chromosome painting</i>
xg	Força centrífuga relativa
π	Diversidade nucleotídica

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). (A) Mapa da América do Sul. (B) Distribuição de *S. nigritus* nos estados do Sul e Sudeste do Brasil, além da Região de Misiones na Argentina, destacada na área preenchida. A linha tracejada demarca a delimitação aproximada das subespécies *S. n. nigritus* (ao norte) e *S. n. cucullatus* (ao sul). Adaptado de Martins *et al.* (2019) - *The IUCN Red List of Threatened Species*.....8
- Figura 2:** Fenótipo de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). (A) Retirado de Reis *et al.* (2015); (B) Retirado de iucnredlist.org/species.....8
- Figura 3:** Locais de origem das amostras de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). (A) Mapa do Brasil. (B) Destaque para o estado do Rio de Janeiro e leste de São Paulo com as localidades: 1 – São Paulo, capital (cSP); 2 - São José dos Campos (SJC); 3 - Paraibuna (PB); 4 - Campos do Jordão (CJ); e 5 - São Sebastião (SS), SP; 6 - Parque Nacional do Itatiaia (PNI), cidade de Itatiaia; 7 – Paraty; 8 – Angra dos Reis; 9 – Ilha da Marambaia (IM), cidade de Mangaratiba; 10 – bairro de Guaratiba (Gua), cidade do Rio de Janeiro; 11 – Parque Nacional da Tijuca (PNT), cidade do Rio de Janeiro; 12 – Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), cidade de Teresópolis; e 13 – Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), cidade de Silva Jardim, RJ. A linha pontilhada representa o Rio Paraíba do Sul.....11
- Figura 4:** Armadilha do tipo *Tomahawk* em plataforma de bambu suspensa com auxílio de cordas, para habituação e captura de indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). Foto: Diego M. Penedo.....14
- Figura 5:** Procedimento de imobilização dos indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) no fundo das armadilhas modelo *Tomahawk* com auxílio de hastes de ferro presas em suportes de madeira para sedação. Foto: Angelo F. Marzano.....15
- Figura 6:** Regiões do corpo observadas para análise do fenótipo de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). Acima, cabeça em detalhe, decúbito dorsal à esquerda e decúbito ventral à direita. Os números indicam: (1) dorso; (1.1) faixa dorsal; (2) ventre; (3) membros; (4) cauda; (5) topo, parte posterior e laterais da cabeça; (6) face; (7) tufo de pelos no topo da cabeça. Ilustração por Diego M. Penedo.....16
- Figura 7:** Padrão de pelagem marrom, observado em 37 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de localidades dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo. (A) dorso marrom, podendo ter os ombros e terço superior dos braços mais claros, na cor bege. Capuz (topo e parte posterior da cabeça), antebraço, membros inferiores e cauda pretos, contrastantes com o dorso; (B) ventre variando em tons de amarelo, mais claro ou mais escuro. Em (A) e (B), da esquerda para direita: IM, PNT, PARNASO, RBPA e cSP. À direita estão representados os extremos da variação do padrão no dorso e no ventre (*apricot yellow* e *brussels brown* em A e *lemon chrome* e *sulphine yellow* em B), segundo o atlas de cores publicado por Ridgway (1912); (C) faixa dorsal para jovens da IM (quatro primeiros) e um subadulto da RBPA (direita). Identificação individual (ver anexo I), em (A) e (B), da esquerda para direita: IM01, PNT04, PNSO06, RBPA06 e cSP01; (C): IM02, IM05, IM12, IM23 e RBPA03. Fotos: Diego M. Penedo.....18
- Figura 8:** Padrão de pelagem preto, observado em 26 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de localidades dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo. (A) dorso marrom-escuro a preto, com pouca ou nenhuma distinção para o capuz, antebraço, membros e

cauda. (B) ventre marrom ao preto. Em (A) e (B), da esquerda para direita: IM, PNI, PARNASO, RBPA e SJC. À direita estão representados os extremos da variação deste padrão no dorso e no ventre (*raw umber* e preto em A e *medal bronze* e preto em B), segundo o atlas de cores publicado por Ridgway (1912); (C) exemplares do MNRJ, a partir da esquerda: Angra dos Reis (dorso e ventre), Itatiaia (dorso e ventre), Paraty (pele aberta) e Teresópolis (pele aberta). Identificação individual (ver anexo I), em (A) e (B), da esquerda para direita: IM04, PNI04, PNSO03, RBPA02 e SJC01; em (C): MNAR01 (dorso e ventre), MNIT01 (dorso e ventre), MNPT02 e MNTE01. Fotos: Diego M. Penedo.....19

Figura 9: Padrão de coloração de pelagem da cabeça e face em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de localidades dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo. O capuz preto do topo da cabeça estende-se para as laterais da face, como costeletas. Internamente ao pelo preto, face contornada por pelagem branca a amarela (*lemon chrome*) nas têmporas, bochechas e queixo. Indivíduos de frente e perfil. Estão representados indivíduos das localidades: (A) IM; (B) PNI; (C) PARNASO; (D) PNT; (E) RBPA; (F) SS. À direita estão representadas as cores observadas (branco, *lemon chrome* e preto), segundo o atlas de cores publicado por Ridgway (1912). . Identificação individual (ver anexo I): (A) IM15 e IM05; (B) PNI01 e PNI04; (C) PNSO6 e PNSO04; (D) PNT02 e PNT01; (E) RBPA05 e RBPA08; (F) SS01. Fotos: Diego M. Penedo.....20

Figura 10: Formas dos tufos de pelos no topo da cabeça dos indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) estudados. (A) tufos voltados para os lados; (B) tufos eretos bipartidos; (C) tufos eretos sem divisão; (D) sem tufos. Identificação individual (ver anexo I): (A) IM10; (B) IM08; (C) PNT03; (D) PNSO05. Fotos: Diego M. Penedo.....21

Figura 11: Médias de comprimento do corpo de 49 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária. As delimitações das caixas representam a distribuição de 50% das amostras; o traço interno, a mediana; os traços acima e abaixo das caixas os outros 50% das amostras; os círculos representam as médias; * *outlier*. FA – fêmea adulta; FJ – fêmea jovem; MA – macho adulto; MJ – macho jovem; MSA – macho subadulto.....22

Figura 12: Médias de comprimento do corpo de 47 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária, excluindo-se *outliers*. As delimitações das caixas representam a distribuição de 50% das amostras; o traço interno, a mediana; os traços acima e abaixo das caixas os outros 50% das amostras; os círculos representam as médias; FA – fêmea adulta; FJ – fêmea jovem; MA – macho adulto; MJ – macho jovem; MSA – macho subadulto.....23

Figura 13: Médias de massa corporal de 49 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária. As delimitações das caixas representam a distribuição de 50% das amostras; o traço interno, a mediana; os traços acima e abaixo das caixas os outros 50% das amostras; os círculos representam as médias; * *outlier*. FA – fêmea adulta; FJ – fêmea jovem; MA – macho adulto; MJ – macho jovem; MSA – macho subadulto.....25

Figura 14: Médias de massa corporal de 47 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária, excluindo-se *outliers*. As delimitações das caixas representam a distribuição de 50% das amostras; o traço interno, a mediana; os traços acima e

abaixo das caixas os outros 50% das amostras; os círculos representam as médias; FA – fêmea adulta; FJ – fêmea jovem; MA – macho adulto; MJ – macho jovem; MSA – macho subadulto.....26

Figura 15: Médias de tamanho do canino superior direito de 47 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária. As delimitações das caixas representam a distribuição de 50% das amostras; o traço interno, a mediana; os traços acima e abaixo das caixas os outros 50% das amostras; os círculos representam as médias; * outlier. FA – fêmea adulta; FJ – fêmea jovem; MA – macho adulto; MJ – macho jovem; MSA – macho subadulto.....28

Figura 16: Metáfase de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) da região de Misiones, Argentina, com hibridização por fluorescência *in situ* utilizando a sonda 21WCP, em verde (setas), identificando o par 11. Marcações em vermelho correspondem à sonda de heterocromatina constitutiva extra-centromérica, #11qHe+. Adaptado de Nieves *et al.* (2008).....38

Figura 17: Distribuição das amostras de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). (A) Mapa do Brasil. (B) Destaque para região leste do estado de São Paulo e estado do Rio de Janeiro com as 11 áreas de amostragem: 1 - cidade de São Paulo (cSP); 2 - São José dos Campos (SJC); 3 - Paraibuna (PB); 4 - Campos do Jordão (CJ); e 5 - São Sebastião (SS), SP; 6 - Parque Nacional do Itatiaia (PNI), cidade de Itatiaia; 7 - Ilha da Marambaia (IM), cidade de Mangaratiba; 8 - bairro de Guaratiba (Gua), cidade do Rio de Janeiro; 9 - Parque Nacional da Tijuca (PNT), cidade do Rio de Janeiro; 10 - Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), cidade de Teresópolis; 11 - Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), cidade de Silva Jardim, RJ. A linha pontilhada representa o Rio Paraíba do Sul.....40

Figura 18: Cariótipo de um indivíduo macho ($2n=54,XY$) de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae), com coloração convencional, demonstrando o padrão observado nos indivíduos estudados. Estão representadas as duas formas do par cromossômico 11 (caixa): pequeno (à esquerda) nas amostras da Ilha da Marambaia, Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Reserva Biológica de Poço das Antas, Parque Nacional da Tijuca, bairro de Guaratiba, estado do Rio de Janeiro, além das amostras de Campos do Jordão, São Sebastião e cidade de São Paulo, SP; e grande (direita) nas amostras do Parque Nacional do Itatiaia, RJ, além de São José dos Campos e Paraibuna, SP.....44

Figura 19: Metáfases de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) com hibridização pelas sondas 21WCP (vermelho) e #11qHe+ (verde). Aumento de 1000x. (A) Marcações em uma fêmea da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ e (B) no indivíduo macho de Guaratiba, cidade do Rio de Janeiro, RJ. As setas apontam o par cromossômico 11, pequeno acrocêntrico sem heterocromatina constitutiva extra-centromérica. (C) Marcações em um macho do Parque Nacional do Itatiaia, RJ. As setas indicam os cromossomos do par 11 como um dos maiores do cariótipo, com grande bloco de heterocromatina constitutiva terminal.....45

Figura 20: Cariótipo com bandamento C e G em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. Pares 4, 12, 13 (polimórfico) e 17 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica nas amostras de todos os indivíduos, além dos pares 6, 19 e 21 de forma menos consistente. (A) Par cromossômico 11 como um pequeno acrocêntrico. Está sendo representado o par 13 com bloco proximal em homozigose, identificado em 13 indivíduos; (B) padrão, com banda C e G, semelhante ao apresentado em "A" (esquerda) e seu homólogo (direita) com tamanho reduzido e bloco

intercalar distal, identificados em dez indivíduos; (C) ambos os homólogos do par 13 são menores que o par 12, com blocos intercalares, sendo um proximal e outro distal, identificado em três indivíduos.....46

Figura 21: Cariótipo com bandamento C em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) do Parque Nacional do Itatiaia, RJ. Pares 4, 11 (polimórfico), 12, 13 e 17 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica. (A) Par cromossômico 11 com grande bloco heterocromático em homozigose, identificado em três indivíduos; (B) homólogos do par cromossômico 11 em heterozigose para o tamanho da banda, identificado em dois indivíduos.....47

Figura 22: Cariótipo com bandamento C em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ. Pares 4, 6, 12 (polimórfico), 13, 17 e 19 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica. (A) Par cromossômico 12 com blocos heterocromáticos intercalares em heterozigose, sendo um mais próximo e outro mais distal ao centrômero, identificado nas amostras de quatro indivíduos; (B) homólogos do par 12 em homozigose para a posição da banda, de forma proximal, identificados em um indivíduo; (C) homozigose para posição da banda, de forma intercalar e distal no par 12, identificado em um indivíduo.....48

Figura 23: Cariótipo com bandamento C em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) da Reserva Biológica de Poço das Antas, RJ. Pares 4, 6, 12, 13 e 17 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica.....49

Figura 24: Cariótipo com bandamento C e G em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) do Parque Nacional da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ. Pares 4, 12, 13 e 17 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica.....50

Figura 25: Cariótipo com bandamento C em um indivíduo de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) do CRAS/Estácio de Sá, oriundo do bairro de Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ. Pares 4 (polimórfico), 12, 13, 17 e 21 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica.....51

Figura 26: Cariótipo com bandamento C em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) alocados no CRAS/UNIVAP, provenientes da região leste do estado de São Paulo. Pares 4, 12,13 e 17 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica. (A) par cromossômico 11 pequeno acrocêntrico em três indivíduos (Campos do Jordão, São Sebastião e cidade de São Paulo), além de ambos os representantes do polimorfismo de posição da banda heterocromática encontrado no par 12, observado em heterozigose nos indivíduos de São Sebastião e da cidade de São Paulo; (B) Par cromossômico 11 com grande bloco heterocromático em homozigose em um indivíduo da cidade de Paraibuna; (C) par cromossômico 11 com grande bloco heterocromático em heterozigose (deleção parcial) no indivíduo da cidade de São José dos Campos.....52

Figura 27: Filogenia obtida através do sequenciamento dos genes mitocondriais 12S e citocromo b, demonstrando a separação e o tempo de divergência (escala) das espécies de *Cebus* e *Sapajus*. Adaptado de Lynch Alfaro *et al.* (2012a).....60

Figura 28: Distribuição das espécies de *Sapajus* na América do Sul. Retirado de Lynch Alfaro *et al.*, 2012a.....61

Figura 29: Árvores filogenéticas obtidas, em três estudos distintos, com o gene mitocondrial citocromo b de espécies *Sapajus* destacando (setas) a posição da amostra de *S. nigritus* do

estado do Rio de Janeiro, de forma mais basal, não agrupando com outras da mesma espécie, provenientes de São Paulo, Minas Gerais e Argentina. (A) modificado de Martins-Jr *et al.* (2018); (B) modificado de Lynch Alfaro *et al.* (2012a); (C) modificado de Nascimento *et al.* (2015).....62

Figura 30: Árvore filogenética construída através do método de Máxima Verossimilhança, segundo o modelo *Kimura-2-parameter* (Kimura, 1980), pela comparação de sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (*MT-COI*). Estão demonstradas as relações das amostras de *Sapajus nigrinus* (Platyrrhini, Cebidae), provenientes dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, com sequências do GenBank® para esta e outras espécies. Os números nas ramificações correspondem a valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), com base em 1000 replicações, estando representados apenas aqueles maiores que 50.....69

Figura 31: Árvore filogenética construída através do método de Máxima Verossimilhança, segundo o modelo *Kimura-2-parameter* (Kimura, 1980), pela comparação de sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase II (*MT-CO2*). Estão demonstradas as relações das amostras de *Sapajus nigrinus* (Platyrrhini, Cebidae), provenientes dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, com sequências do GenBank® e fornecidas por Dr. Manuel Ruiz-García (com. pess.) para esta espécie, *S. cay* e *S. xanthosternos*. Os números nas ramificações correspondem a valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), com base em 1000 replicações, estando representados apenas aqueles maiores que 50.....70

Figura 32: Árvore filogenética construída através do método de Máxima Verossimilhança, segundo o modelo *Kimura-2-parameter* (Kimura, 1980), pela comparação de sequências do gene mitocondrial citocromo b (*MT-CYB*). Estão demonstradas as relações das amostras de *Sapajus nigrinus* (Platyrrhini, Cebidae), provenientes dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, com sequências do GenBank® para esta e outras espécies. Os números nas ramificações correspondem a valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), com base em 1000 replicações, estando representados apenas aqueles maiores que 50.....71

Figura 33: Rede de haplótipos gerada pelo método *Median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) através da comparação de sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (*MT-COI*) de *Sapajus nigrinus*, demonstrando dois grupamentos distintos. Os círculos pretos e brancos correspondem aos grupamentos “*S. nigrinus* leste” e “*S. nigrinus* oeste”, respectivamente. Pontos vermelhos representam haplótipos hipotéticos. O tamanho dos círculos pretos e brancos é proporcional ao número de sequências de cada haplótipo. Os traços representam o número de passos mutacionais entre haplótipos.....72

Figura 34: Rede de haplótipos gerada pelo método *Median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) através da comparação de sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase II (*MT-CO2*) de *Sapajus nigrinus*, demonstrando três grupamentos. Os círculos em cinza, preto e branco correspondem aos grupamentos “*S. nigrinus* oeste”, “*S. nigrinus* leste” e “*S. nigrinus* Argentina”, respectivamente. Pontos vermelhos representam haplótipos hipotéticos. O tamanho dos círculos cinza, preto e branco é proporcional ao número de sequências de cada haplótipo. Os traços representam o número de passos mutacionais entre haplótipos.....73

Figura 35: Rede de haplótipos gerada pelo método *Median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) através da comparação de sequências do gene mitocondrial citocromo b (*MT-CYB*) de *Sapajus nigrinus*, demonstrando dois grupamentos distintos. Os círculos pretos e brancos correspondem aos grupamentos “*S. nigrinus* leste” e “*S. nigrinus* oeste”, respectivamente. Pontos vermelhos representam haplótipos hipotéticos. O tamanho dos círculos pretos e brancos é proporcional ao número de sequências de cada haplótipo. Os traços representam o número de passos mutacionais entre haplótipos.....74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Características fenotípicas e comportamentais utilizadas para definição das principais faixas etárias de macacos-prego e caiararas (*Sapajus* e *Cebus*, Platyrrhini, Cebidae), segundo Izawa (1980) e MacKinnon (2013).....9
- Tabela 2:** Médias de comprimento do corpo de 49 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) amostrados em cinco populações no estado do Rio de Janeiro, agrupados em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa.....21
- Tabela 3:** Análise de variância e comparação de médias de comprimento do corpo por categoria (sexo/faixa etária) de indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro.....22
- Tabela 4:** Médias de comprimento do corpo de 47 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) amostrados em cinco populações no estado do Rio de Janeiro, agrupadas em categorias de acordo com o sexo e a faixa etária, excluindo dois *outliers*.....23
- Tabela 5:** Análise de variância e comparação de médias de comprimento do corpo por categoria (sexo/faixa etária) de indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, excluindo-se *outliers*.....24
- Tabela 6:** Médias de massa corporal de 49 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) amostrados em cinco populações no estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária.....24
- Tabela 7:** Análise de variância e comparação de médias de massa corporal por categoria (sexo/faixa etária) de indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro.....25
- Tabela 8:** Médias de massa corporal de 47 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) amostrados em cinco populações no estado do Rio de Janeiro, agrupadas em categorias de acordo com o sexo e a faixa etária, excluindo dois *outliers*.....26
- Tabela 9:** Análise de variância e comparação de médias de massa corporal por categoria (sexo/faixa etária) de indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, excluindo-se *outliers*.....27
- Tabela 10:** Médias de tamanho do canino superior direito de 47 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) amostrados em cinco populações no estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária.....27
- Tabela 11:** Análise de variância e comparação de médias de tamanho do canino superior direito por categoria (sexo/faixa etária) de indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro.....28
- Tabela 12:** Associação das comparações emparelhadas de Tukey para as variáveis morfométricas comprimento do corpo, massa corporal e tamanho do canino superior direito de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). Em destaque, as variáveis que permitiram a separação de todas as faixas etárias em cada categoria.....29
- Tabela 13:** Valores de distância genética obtidos para grupamentos de *Sapajus nigritus* utilizando os genes *MT-CO1*, *MT-CO2* e *MT-CYB*.....75
- Tabela 14:** Índices de diversidade genética obtidos para *Sapajus nigritus* utilizando os genes *MT-CO1*, *MT-CO2* e *MT-CYB*.....75

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I - ANÁLISE DA COLORAÇÃO DE PELAGEM DE <i>Sapajus nigrinus</i> (PLATYRRHINI, CEBIDAE) EM LOCALIDADES DOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E DE SÃO PAULO E AVALIAÇÃO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS PARA DELIMITAÇÃO DE FAIXAS ETÁRIAS.....	4
1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Classificação em faixas etárias.....	9
1.2 Justificativa.....	10
1.3 Objetivos.....	11
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1 Áreas de estudo.....	11
2.1.1 Descrição dos locais de captura <i>in situ</i>	12
2.1.2 Origem das amostras <i>ex situ</i>	13
2.2 Metodologia de captura <i>in situ</i> , sedação e identificação individual.....	13
2.3 Caracterização fenotípica e análises morfométricas.....	15
2.4 Retorno da sedação e soltura dos animais <i>in situ</i>	17
3 RESULTADOS.....	17
3.1 Análise de coloração da pelagem.....	17
3.2 Dados morfométricos para classificação em faixas etárias.....	21
3.2.1 Comprimento do corpo.....	21
3.2.2 Massa corporal.....	24
3.2.3 Tamanho do canino superior direito.....	27
4 DISCUSSÃO.....	29
4.1 Análise fenotípica.....	29
4.2 Análises morfométricas para classificação em faixas etárias.....	31
5 CONCLUSÕES.....	32
CAPÍTULO II - ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM <i>Sapajus nigrinus</i> (PLATYRRHINI, CEBIDAE) EM LOCALIDADES DOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E DE SÃO PAULO.....	34
1 INTRODUÇÃO.....	37
1.1 Justificativa.....	39
1.2 Objetivos.....	39
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1 Origem das amostras.....	40
2.2 Coleta de amostras biológicas.....	40
2.3 Cultivo celular.....	41
2.4 Coloração convencional.....	42
2.5 Hibridização por fluorescência <i>in situ</i> (FISH).....	42
2.6 Bandamento de heterocromatina constitutiva (banda C).....	42
2.7 Banda G.....	43
2.8 Registro fotográfico das metáfases e organização do cariótipo.....	43

3	RESULTADOS	43
3.1	Coloração convencional	43
3.2	Sondas 21WCP e #11qHe+	44
3.3	Distribuição da heterocromatina constitutiva extra-centromérica nos pares cromossômicos	45
4	DISCUSSÃO	52
5	CONCLUSÕES	55
CAPÍTULO III - ANÁLISE DE GENES MITOCONDRIAIS EM <i>Sapajus nigrinus</i> (PLATYRRHINI, CEBIDAE), EM LOCALIDADES DOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E DE SÃO PAULO		56
1	INTRODUÇÃO	59
1.1	Justificativa	63
1.2	Objetivos	64
2	MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1	Amostras de <i>Sapajus nigrinus</i> utilizadas nas análises	64
2.2	Extração do DNA	64
2.3	Amplificação de fragmentos de DNA mitocondrial por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	65
2.3.1	Gene Citocromo c Oxidase I (<i>MT-CO1</i>)	65
2.3.2	Gene Citocromo c Oxidase II (<i>MT-CO2</i>)	66
2.3.3	Gene Citocromo b (<i>MT-CYB</i>)	66
2.4	Análise dos produtos de PCR em gel de agarose	66
2.5	Sequenciamento e análise de eletroferogramas	67
2.6	Análises filogenéticas	67
2.7	Análises de diversidade genética, redes de haplótipos e divergência entre grupos	67
3	RESULTADOS	68
3.1	Análises filogenéticas baseadas em genes mitocondriais em <i>Sapajus</i> spp.	68
3.2	Divergência entre grupos e diversidade genética de <i>S. nigrinus</i>	72
3.2.1	Redes de haplótipos	72
3.2.2	Estimativas de distância genética entre grupos	74
3.2.3	Diversidade haplotípica	75
4	DISCUSSÃO	75
5	CONCLUSÕES	79
CONCLUSÕES GERAIS		80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		81
ANEXOS		
Anexo I - Identificação individual das amostras <i>in situ</i>, <i>ex situ</i> e exemplares do Museu Nacional do Rio de Janeiro		96

Anexo II - Identificação das sequências dos genes mitocondriais citocromo c oxidase I (<i>MT-CO1</i>) e II (<i>MT-CO2</i>) e citocromo b (<i>MT-CYB</i>) do GenBank®, utilizadas neste estudo.....	98
ANEXO III – Folha de aprovação de banca não presencial.....	100

INTRODUÇÃO GERAL

O macaco-prego-preto, *Sapajus nigritus* (Goldfuss, 1809), é um primata neotropical com ampla distribuição na porção sul da Mata Atlântica, no sudeste e sul do Brasil, além de uma pequena região no nordeste da Argentina, na província de Misiones (Groves, 2001a; Rylands *et al.*, 2005; Lynch Alfaro *et al.*, 2014).

Estimada como a primeira espécie a se diferenciar na história evolutiva do gênero, *S. nigritus* é descrita com variabilidade fenotípica ao longo de sua distribuição, além de grande diversidade genética, tanto cariotípica quanto molecular (Mudry *et al.*, 1991; Silva Jr, 2001; Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Ruiz-García *et al.*, 2012; Van Roosmalen & Van Roosmalen, 2016; Nieves *et al.*, 2017).

Fenotipicamente, é a espécie que possui pelagem mais escura do gênero, variando do preto ao marrom na maior parte do corpo, inclusive de forma intrapopulacional (Silva Jr, 2001; Fragaszy *et al.*, 2004; Vieira & Oliveira, 2014; Penedo, 2016), sendo sugerida a predominância do padrão preto nas populações ao sul da distribuição e do marrom ao norte (Van Roosmalen & Van Roosmalen, 2016). A relação da pelagem com a distribuição geográfica já foi demonstrada também por algumas características predominantes ao norte e ao sul do Rio Paraíba do Sul (Silva Jr, 2001).

Em relação à citogenética, a variabilidade de *S. nigritus* se dá na quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva (HC) extra-centromérica (Nieves *et al.*, 2017), a qual corresponde a porções do DNA transcricionalmente inativas e consequentemente com pressão seletiva neutra, na ocorrência de mutações (Grewal & Moazed, 2003). No par cromossômico 11, por exemplo, a deleção total do grande bloco de HC terminal é descrita, a partir de amostras da Argentina, como específica de *S. nigritus* (Mudry, 1990; Mudry *et al.*, 1991), enquanto na maioria das espécies do gênero este bloco está conservado (Matayoshi *et al.*, 1987). Entretanto, esta não parece ser a única forma do par 11 desta espécie, uma vez que estudos com amostras do estado do Rio de Janeiro já identificaram o grande bloco de HC terminal (Freitas & Seuánez, 1982; Matayoshi *et al.*, 1987).

A diversidade no genoma de *S. nigritus* não se dá apenas no nível cromossômico, mas também é descrita de forma molecular. Análises de genes mitocondriais demonstram ter sido esta a primeira dentre as oito espécies do gênero a divergir e também uma daquelas com maior diversidade haplotípica (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Ruiz-García *et al.*, 2012). Esta diversidade é demonstrada, por exemplo, na divergência entre amostras do estado do Rio de Janeiro e outras da mesma espécie no restante da distribuição, formando clados parafiléticos (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Nascimento *et al.*, 2015; Penedo, 2016; Martins-Jr *et al.*, 2018).

A maior diversidade relatada para *S. nigritus* e demais espécies de *Sapajus* da Mata Atlântica, quando comparadas àquelas que ocorrem no Cerrado, Caatinga e Amazônia, é descrita como reflexo do início da diversificação e maior período de permanência dos ancestrais do gênero nesse habitat, estando sujeitas a um maior número de eventos geológicos e ecológicos ao longo da sua evolução (Rylands *et al.*, 2005; Lynch Alfaro *et al.*, 2012a).

Diferentes teorias buscam explicar os processos evolutivos que geraram a atual diversidade das espécies animais em florestas tropicais. Como exemplo, pode ser citada a ocorrência de atividades neotectônicas no quaternário (Riccomini & Assumpção, 1999; Thomé *et al.*, 2010; Amaro *et al.*, 2012), diversificando as espécies por vicariância, ou a teoria de gradientes ecológicos, modelo parapátrico no qual a diversidade teria se dado por diferenças ambientais bem demarcadas, ainda que houvesse fluxo gênico (Endler, 1977; Smith *et al.*, 1997; Orr & Smith, 1998). Entretanto, a ocorrência de refúgios florestais é a

principal teoria considerada para explicar a diversificação de grupos animais em florestas tropicais (Filho & Miyaki, 2011) e a mais provável influência na diversificação de primatas neotropicais (Lynch Alfaro *et al.*, 2015). Segundo essa teoria, a evolução das espécies em ambientes florestais teria acompanhado ciclos de retração e expansão de fragmentos, ocorridos em períodos de flutuações climáticas no Pleistoceno, propiciando diversificações alopátricas, em menor ou maior grau, dependendo do tempo de isolamento entre as populações (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1970; Brown & Ab'Sáber, 1979). Na Mata Atlântica, estudos apontam a existência de três áreas de descontinuidade filogeográfica, decorrente de refúgios florestais (Filho & Miyaki, 2011, Cabanne *et al.*, 2008, Carnaval *et al.*, 2009). Uma dessas zonas estaria localizada na região sudeste, aproximadamente na extensão entre São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, tendo sido demonstrada para espécies de aves, anuros, répteis e morcegos (Grazziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2007; Carnaval *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009). Esta região é a mesma onde variações fenotípicas, citogenéticas e moleculares são descritas para *S. nigritus* (Freitas & Seuánez, 1982; Matayoshi *et al.*, 1987; Mudry, 1990; Mudry *et al.*, 1991; Silva Jr, 2001; Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Nascimento *et al.*, 2015; Martins-Jr *et al.*, 2018).

O primeiro passo para compreensão da biodiversidade é a identificação das espécies que resultam de diferentes processos na evolução de um grupo (Mayden & Wood, 1995). Para isso, diversos conceitos de espécie foram propostos, representando ferramentas para descrever e definir a biodiversidade, nenhum deles mais correto que o outro, mas sim mais adequado a determinado grupo de organismo, dependendo de sua evolução (Thorop *et al.*, 2015). Dentre os mais difundidos podem ser citados o conceito biológico (Mayr, 1942), o conceito evolutivo (Wiley, 1981) e o filogenético de espécie (Cracraft, 1983). Este último conceito tem sido amplamente utilizado para diversos grupos animais nas últimas décadas, com base na compreensão de que as espécies representam linhagens evolutivas (Groves, 2014). O conceito filogenético define que uma espécie é um agrupamento irreduzível de organismos distintos de outros agrupamentos, contendo um padrão parental de ancestralidade e descendência (Cracraft, 1989). Em estudos com primatas, o conceito filogenético de espécie tem sido considerado o mais adequado (Groves, 2012; Rylands *et al.*, 2012; Groves, 2014). As subespécies representam segmentos geográficos de uma espécie que fixaram características herdáveis distintas (Groves, 2001b), mas sob o conceito filogenético elas podem não ser consideradas (Cracraft, 1983; Cracraft, 1989). Alguns autores, entretanto, validam o reconhecimento de subespécies sob o conceito filogenético de espécies (Nixon & Wheeler, 1990, Groves, 2001b). Neste trabalho, foi adotado o conceito filogenético de espécies, assim como aceita a ocorrência de duas subespécies na distribuição de *S. nigritus* (*S. n. nigritus* e *S. n. cucullatus*), seguindo diversos trabalhos que consideram válida a divisão nesta espécie (ex.: Vieira, 1944; Groves, 2001a; Silva Jr., 2001; Fragaszy *et al.*, 2004; Rylands *et al.*, 2005; Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Lynch Alfaro *et al.*, 2014).

Nesta tese, estão apresentados em três capítulos os dados das análises dos padrões de pelagem, de citogenética clássica e molecular e de genes mitocondriais de indivíduos de *S. nigritus*, obtidos a partir de amostras coletadas em localidades *in situ* e *ex situ* no estado do Rio de Janeiro, e *ex situ* na porção leste do estado de São Paulo.

No primeiro capítulo são apresentados dados de coloração e distribuição dos padrões de pelagem de 49 indivíduos provenientes de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, cinco indivíduos de cativeiro oriundos de distintas cidades de São Paulo e um da cidade do Rio de Janeiro, além de oito exemplares do estado do Rio de Janeiro depositados no Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ). Foram avaliadas variações intrapopulacionais e verificado se a predominância dos padrões preto ao sul e marrom ao norte, descrita na totalidade da distribuição da espécie, também se repete entre São Paulo e Rio de Janeiro.

Neste capítulo foram analisadas ainda diferentes medidas morfométricas que possam auxiliar na identificação de faixas etárias, a qual geralmente é feita através de características da pelagem em *Sapajus*.

No segundo capítulo, análises de citogenética clássica e molecular foram realizadas para todas as localidades nos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, com exceção dos espécimes do MNRJ. São apresentados dados da presença e distribuição de HC extra-centromérica nos pares cromossômicos, por meio da técnica de banda C e através da hibridização de sondas em regiões cromossômicas específicas. Foi investigada, principalmente, a ocorrência de polimorfismos descritos para o par cromossômico 11 de *S. nigritus*.

No terceiro capítulo, foram realizadas análises moleculares, empregando três genes mitocondriais, com amostras das mesmas localidades de São Paulo e do Rio de Janeiro do capítulo II. Comparações das sequências obtidas com outras publicadas na literatura permitiram analisar a filogeografia e diversidade de *S. nigritus*, sendo investigada principalmente a ocorrência de divergências previamente relatadas em amostras do estado do Rio de Janeiro.

CAPÍTULO I

ANÁLISE DA COLORAÇÃO DE PELAGEM DE *Sapajus nigrinus* (PLATYRRHINI, CEBIDAE) EM LOCALIDADES DOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E DE SÃO PAULO E AVALIAÇÃO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS PARA DELIMITAÇÃO DE FAIXAS ETÁRIAS

RESUMO

As características de pelagem são fundamentais na sistemática dos macacos-prego (*Sapajus*) e caiararas (*Cebus*), sendo altamente variáveis, não apenas entre as espécies, mas também de forma intraespecífica. Dentre os macacos-prego, *S. nigritus* é descrita como a espécie mais escura, com a distribuição mais ao sul. Os indivíduos dessa espécie possuem dorso variando do marrom ao preto, com ventre amarelo ou marrom, membros e cauda pretos e face branca contrastante. A partir das populações ao sul, que correspondem a *S. n. cucullatus*, haveria uma tendência à perda de pigmentos em direção àquelas ao norte, que representam *S. n. nigritus*. Dois padrões de pelagem foram descritos também de forma intrapopulacional nesta espécie, predominando o padrão preto em SP e o marrom no RJ. A região de SP já foi descrita como uma importante área de descontinuidade filogeográfica em espécies animais e a diferença observada entre as populações de SP e RJ pode indicar este trecho como uma área de transição na pelagem de *S. nigritus*. A identificação de faixas etárias em *Sapajus*, feita com base em caracteres fenotípicos, é dificultada pelas variações na pelagem. Análises morfométricas podem ser empregadas de forma complementar, mas esses dados ainda são escassos para *S. nigritus*. Os objetivos deste estudo foram analisar o fenótipo de indivíduos de *S. nigritus* em localidades do estado de SP e RJ, verificando a ocorrência de ambos os padrões de pelagem e a possível associação com a distribuição geográfica, além de avaliar a utilização de medidas morfométricas na separação de faixas etárias. Foram analisados indivíduos de cinco populações do RJ: Ilha da Marambaia (IM), Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), Parque Nacional do Itatiaia (PNI), da Tijuca (PNT) e da Serra dos Órgãos (PARNASO); exemplares *ex situ* de Guaratiba/RJ (Gua) e de cidades de São Paulo: capital (cSP), São José dos Campos (SJC), São Sebastião (SS), Paraibuna (PB) e Campos do Jordão (CJ); e espécimes depositados no Museu Nacional do Rio Janeiro (MNRJ), provenientes de Angra dos Reis, Itatiaia, Paraty e Teresópolis. Foi avaliada a coloração do dorso, ventre, membros, cauda e face, além dos tufos no topo da cabeça de todos os indivíduos, comparando com o descrito para *S. nigritus*. Foram analisadas as medidas de massa corporal, comprimento do corpo e tamanho do canino superior direito, somente nos indivíduos de vida livre, agrupando-os em faixas etárias de cada sexo. Diferenças significativas entre as faixas etárias foram verificadas por ANOVA e comparações de Tukey. Nos 49 indivíduos *in situ*, seis *ex situ* e oito do MNRJ, foram identificados dois padrões de pelagem, um marrom (37 indivíduos) e outro preto (26 indivíduos). O dorso variou do marrom ao preto, ventre amarelo ao preto, face branca a amarela e membros e cauda pretos. Tufos voltados para os lados, eretos com divisão e eretos fundidos foram observados. Todas as características de pelagem correspondem ao descrito para *S. nigritus*. Ambos os padrões foram identificados na IM, PARNASO e RBPA, além dos indivíduos *ex situ*. Somente o padrão preto foi observado no PNI e nos exemplares do MNRJ, e o marrom no PNT. Houve predomínio do padrão preto à oeste e marrom à leste. Tufos tiveram correlação com a faixa etária, sendo ausente nos jovens. Foi observada diferença significativa ($P=0,000$) entre todas as faixas etárias dos machos (jovens, subadultos e adultos) em relação ao comprimento do corpo e tamanho dos caninos e entre fêmeas jovens e adultas, com massa corporal. A análise conjunta das três medidas morfométricas foi eficaz para separação de todas as faixas etárias em ambos os sexos. A distribuição dos padrões preto à oeste e marrom à leste na distribuição SP-RJ demonstra essa região como a área de transição na pelagem de *S. nigritus*.

Palavras-chave: Macaco-prego-preto, Fenótipo, Variação intrapopulacional.

ABSTRACT

The coat characteristics are fundamental in the classification of robust (*Sapajus*) and gracile (*Cebus*) capuchins, being highly variable, not only among the species, but also intraspecifically. The metachromatism theory describes the tendency to lose tegumentary pigments from the darker, or primitive, to the lighter, or derived, forms in mammalian species. Applied to capuchins, *S. nigritus* is described as the darkest and most ancestral, with the most southern distribution. The individuals of this species have the back varying from brown to black, yellow to brown belly, black limbs and tail and contrasting white face. From the southern populations, which correspond to *S. n. cucullatus*, there is a tendency to lose pigments towards the northern ones, which represent *S. n. nigritus*. The other species are gradually clearer, culminating in the yellowish of *S. flavius*. Two coat patterns were described intra-population in *S. nigritus*, predominating the black pattern in SP and the brown in RJ. The region of SP has already been described as an important area of phylogeographic discontinuity in animal species and the difference observed between the populations of SP and RJ may indicate this stretch as a transition area in the coat of *S. nigritus*. The identification of age groups in *Sapajus*, based on phenotypic characters, is hampered by coat variations. Morphometric analysis can be employed in a complementary way, but these data are still scarce for *S. nigritus*. The objectives of this study were to analyze the phenotype of *S. nigritus* individuals from SP and RJ states, verifying the occurrence of both coat patterns and the possible association with the geographical distribution, in addition to evaluating the use of morphometric measurements in the separation of age groups. Individuals from five populations in RJ were analyzed: Ilha da Marambaia (IM), Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), Parque Nacional do Itatiaia (PNI), Tijuca (PNT) and Serra dos Órgãos (PARNASO); *ex situ* specimens from Guaratiba/RJ (Gua) and cities of São Paulo: capital (cSP), São José dos Campos (SJC), São Sebastião (SS), Paraibuna (PB) and Campos do Jordão (CJ); and specimens deposited at the Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), from Angra dos Reis, Itatiaia, Paraty and Teresópolis. The coloration of the back, belly, limbs, tail and face was evaluated, as well as the tufts at the top of the head of all individuals, compared to that described for *S. nigritus*. Body mass, body length, and upper right canine size were analyzed only in individuals *in situ*, grouping them in age groups of each sex. Significant differences between age groups were verified by ANOVA and Tukey comparisons. In the 49 individuals *in situ*, six *ex situ* and eight from MNRJ, two coat patterns were identified, one brown (37 individuals) and one black (26 individuals). The back varied from brown to black, belly yellow to black, face white to yellow and limbs and tail black. Tufts turned sideways, erects with division and erects without division were observed. All coat characteristics correspond to those described for *S. nigritus*. Both patterns were identified in IM, PARNASO and RBPA, in addition to *ex situ* individuals. Only the black pattern was observed in the PNI and MNRJ specimens, and the brown in the PNT. There was a predominance of black in the west and brown in the east. Tufts had correlation with the age group, being absent in the young. A significant difference ($P=0.000$) was observed among all age groups of males (young, sub-adults and adults) in relation to body length and canine size and between young and adult females, with body mass. The joint analysis of the three morphometric measurements was effective for separation of all age groups in both sexes. The distribution of black patterns to the west and brown patterns to the east in the SP-RJ distribution demonstrates this region as the transition area of *S. nigritus* coat patterns.

Keywords: Black-horned capuchin, Phenotype, Intra-population variation.

1 INTRODUÇÃO

Os macacos-prego e caiararas (gêneros *Sapajus* Kerr, 1792 e *Cebus* Erxleben, 1777 – Platyrrhini, Cebidae) são primatas neotropicais com ampla distribuição geográfica pelas Américas do Sul e Central (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a). Na sistemática destes grupos, as características de pelagem são um fator fundamental, mas ao mesmo tempo a tornam uma das mais controversas da ordem Primates, devido às variações que podem ocorrer conforme a faixa etária, sexo ou região geográfica (Hill, 1960; Silva Jr, 2001).

A presença ou ausência de tufo de pelos no topo da cabeça, destacada por Hershkovitz (1949), representa uma das características fenotípicas mais relevantes, utilizada em distintas classificações para separação das espécies em dois grupos, até recentemente compondo o gênero *Cebus* (Cabrera, 1957; Hill, 1960; Groves, 2001a; Silva Jr, 2001). Uma das mais utilizadas agrupava *C. capucinus*, *C. albifrons*, *C. olivaceus* e *C. kaapori* no grupo sem tufo, enquanto *Cebus apella*, *C. libidinosus*, *C. xanthosternos* e *C. nigrinus* compunham o grupo com tufo (Groves, 2001a). Seguindo esta classificação e agregando dados fenotípicos de pelagem e de morfologia cranial, Silva Jr (2001) sugeriu a divisão ao nível de subgêneros, *Cebus* e *Sapajus*, mantendo as espécies sem e com tufo, respectivamente, e adicionou *C. robustus*, *C. macrocephalus* e *C. cay* no grupo com tufo. Em 2012, reunindo dados de morfologia, ecologia, comportamento, biogeografia e de biologia molecular, os subgêneros propostos por Silva Jr (2001) foram elevados ao nível de gêneros, com *Cebus* representando as espécies sem tufo e *Sapajus* aquelas com tufo (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Lynch Alfaro *et al.*, 2012b). A forma do corpo passa a ser incorporada aos dados morfológicos já obtidos e os representantes de *Cebus* (*C. albifrons*, *C. capucinus*, *C. olivaceus* e *C. kaapori*) são descritos como “gráceis”, tendo corpo esguio ou delgado e membros longilíneos, enquanto os de *Sapajus* (*S. apella*, *S. macrocephalus*, *S. cay*, *S. libidinosus*, *S. robustus*, *S. xanthosternos*, *S. flavius* e *S. nigrinus*) são considerados “robustos”, com membros, cauda e cabeça mais compactos (Lynch Alfaro *et al.*, 2012b).

No Brasil, as espécies de *Cebus* ocorrem apenas na Região Norte e em parte da Região Nordeste, enquanto as de *Sapajus* estão distribuídas por todo o território nacional, inclusive em simpatria com *Cebus* na Bacia Amazônica (Vilanova *et al.*, 2005; Lynch Alfaro *et al.*, 2012a).

Dentre as espécies de *Sapajus*, *S. nigrinus* (Goldfuss, 1809) é a que apresenta distribuição mais ao sul, sendo endêmica de Mata Atlântica e a única deste bioma que ocorre abaixo do Rio Doce. Está delimitada ao norte por este rio, nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, ao sul pela transição Mata Atlântica-Pampa nos municípios de Porto Alegre e Santa Cruz (Rio Grande do Sul), a leste pelo oceano Atlântico e a oeste pelo Rio Paraná (Fragaszy *et al.*, 2004; Vilanova *et al.*, 2005). Dentro de sua distribuição (Figura 1), duas subespécies são reconhecidas: *S. n. nigrinus*, restrita ao Brasil, com distribuição geográfica em todos os estados do Sudeste até a metade norte do estado de São Paulo; e *S. n. cucullatus*, presente desde a metade sul do estado de São Paulo até os estados da Região Sul do Brasil e província de Misiones, na Argentina (Groves, 2001a; Rylands *et al.*, 2005; Lynch Alfaro *et al.*, 2014).

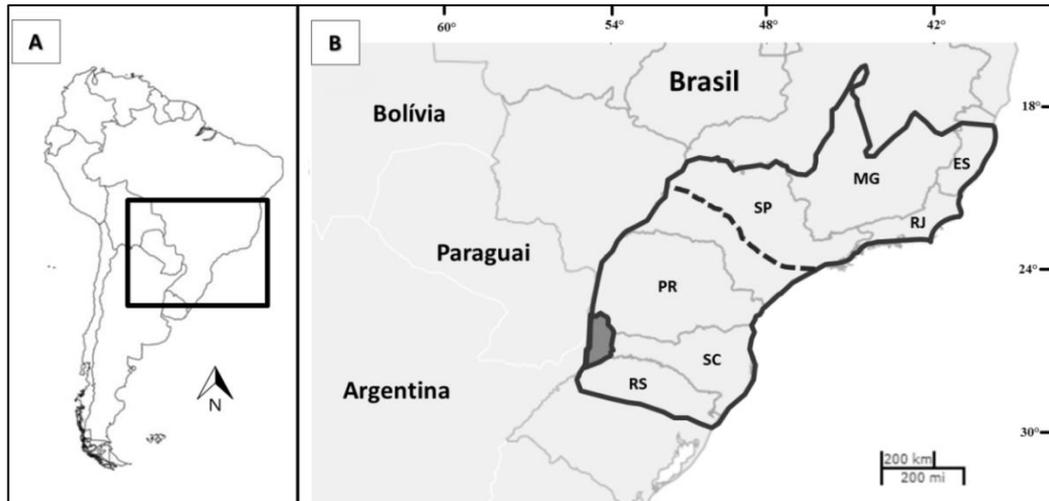


Figura 1: Distribuição de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). (A) Mapa da América do Sul. (B) Distribuição de *S. nigritus* nos estados do Sul e Sudeste do Brasil, além da Região de Misiones na Argentina, destacada na área preenchida. A linha tracejada demarca a delimitação aproximada das subespécies *S. n. nigritus* (ao norte) e *S. n. cucullatus* (ao sul). Adaptado de Martins *et al.* (2019) - *The IUCN Red List of Threatened Species*.

Vulgarmente conhecida como macaco-prego-preto (ou *black-horned capuchin* em inglês), *S. nigritus* possui pelagem do dorso variando do marrom ao preto (Figura 2), podendo estar presente uma discreta faixa com pelos mais escuros estendendo-se da nuca até a base da cauda. O ventre pode ser amarelo, marrom, marrom-avermelhado ou marrom-enegrecido. Os membros e a cauda são geralmente mais escuros que o restante do corpo e a face é circundada por pelagem branca a amarela, em contraste com o restante do corpo. O capuz, que cobre o topo e a parte posterior da cabeça, é escuro e os tufo de pelos na parte anterior são geralmente evidentes, podendo ser eretos, voltados para os lados ou para frente, mas ausente nos jovens (Vieira, 1944; Silva Jr, 2001; Fragaszy *et al.*, 2004; Rylands *et al.*, 2005). É descrita, somente para *S. n. cucullatus*, a presença de pelos brancos misturados aos pretos no corpo, principalmente no dorso (Vieira, 1944).

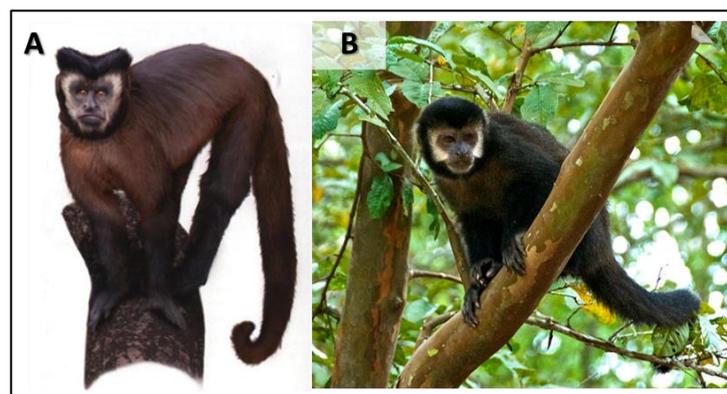


Figura 2: Fenótipo de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). (A) Retirado de Reis *et al.* (2015); (B) Retirado de iucnredlist.org/species.

As características de pelagem nos macacos-prego, de modo geral, são bastante variáveis, inclusive de forma intraespecífica (Hill, 1960), já tendo sido descritos distintos padrões em *S. flavius*, *S. libidinosus* (Silva, 2010) e *S. nigritus* (Silva Jr, 2001; Vieira & Oliveira, 2014; Penedo, 2016). A variabilidade intraespecífica na pelagem de *S. nigritus* já foi

sugerida com predominância de um padrão mais escuro (preto) nas populações ao sul da distribuição (representando *S. n. cucullatus*) e de um padrão mais claro (marrom) naquelas ao norte (correspondendo a *S. n. nigritus*), com gradual transição entre os padrões (Van Roosmalen & Van Roosmalen, 2016). Silva Jr (2001) descreveu, nesta espécie, uma variação de forma não-gradual na predominância de algumas características da pelagem em populações ao norte e ao sul do Rio Paraíba do Sul, que corta o estado do Rio de Janeiro de sul a norte. Nas populações ao norte deste rio predominam, por exemplo, tufos eretos, região proximal dos membros anteriores marrom-enegrecida e o ventre avermelhado. Nas populações ao sul do Rio Paraíba do Sul predominam tufos fundidos com pelos voltados para frente e para os lados, região proximal dos membros anteriores preta e o ventre marrom-enegrecido. As variações na pelagem de *S. nigritus* já foram identificadas também de forma intrapopulacional. Na população do Parque Ecológico Cidade da Criança de Presidente Prudente, estado de São Paulo, os distintos padrões foram descritos como "marrom" e "preto-brilhante", com 78% de predominância deste (Vieira & Oliveira, 2014), e nos macacos-prego da Ilha da Marambaia, cidade de Mangaratiba, RJ, um padrão "marrom" e outro "enegrecido", com 83% de predominância do primeiro (Penedo, 2016).

1.1 Classificação em faixas etárias

A classificação etária de primatas é utilizada em diversos tipos de estudos, como: na análise da composição de grupos (Bezerra *et al.*, 2014; Galvis *et al.*, 2014), preferência alimentar (Pebsworth *et al.*, 2012; Chalk *et al.*, 2015), diferenças na concentração hormonal (Behringer *et al.*, 2014) ou a variação do repertório vocal conforme a faixa etária (Bouchet *et al.*, 2012).

O reconhecimento de faixas etárias é muitas vezes feito através do acompanhamento de grupos habituados, nos quais se reconhece os indivíduos e se tem registros dos nascimentos de novos integrantes (Leão *et al.*, 2009; Bouchet *et al.*, 2012; Izar *et al.*, 2012; Pebsworth *et al.*, 2012; Galbany *et al.*, 2014; Chalk *et al.*, 2015; Tokuda *et al.*, 2017). Quando esses dados não estão disponíveis, a identificação requer alternativas para definição das faixas etárias. Para macacos-prego e caiararas, essa classificação pode ser feita utilizando uma combinação de características de pelagem, morfologia e comportamento (Tabela 1).

Tabela 1: Características fenotípicas e comportamentais utilizadas para definição das principais faixas etárias de macacos-prego e caiararas (*Sapajus* e *Cebus*, Platyrrhini, Cebidae), segundo Izawa (1980) e MacKinnon (2013).

Faixa etária	Características
Infante	Menores integrantes do grupo. Não apresentam tufos de pelos no topo da cabeça. Geralmente são carregados por outros membros do grupo.
Jovem	São maiores que os infantes. Os membros parecem desproporcionalmente longos. Não apresentam tufos de pelos no topo da cabeça e a testa geralmente é coberta por pelos mais claros.
Subadulto	Características intermediárias entre jovens e adultos. Definida somente para machos. A face é mais clara que dos adultos e ainda podem parecer um pouco "desengonçados". Não apresentam a robustez dos machos adultos.
Adulto	Demarcado dimorfismo sexual. As fêmeas são maiores que os jovens, porém menores que os machos adultos. Os tufos de pelos no topo da cabeça são bem desenvolvidos para ambos. Diferente dos subadultos, os machos adultos são mais musculosos, com face robusta e mandíbulas proeminentes.

Análises morfométricas são empregadas em estudos que busquem demonstrar a associação entre uma característica ou padrão, como dominância social (Lefevre *et al.*, 2014), desgaste dentário (Galbany *et al.*, 2014) ou variações sazonais (Richard *et al.*, 2000), de acordo com o crescimento ou o sexo de primatas. As medidas de massa corporal, tamanho do corpo e dentes caninos são as mais usadas, mas na maioria dos casos para demonstrar dimorfismo sexual (Aquino & Encarnación, 1986; Fragaszy *et al.*, 2015; Mota *et al.*, 2016). Embora as medidas morfométricas apresentem correlação positiva com a faixa etária (Strum, 1991; Galbany *et al.*, 2015), ainda poucos estudos as utilizam como ferramentas na separação de faixas etárias. Leão *et al.* (2009), por exemplo, utilizando medidas de massa corporal, identificaram diferenças com significância estatística para oito classes etárias (infante I, II e III, juvenil I e II, subadulto, adulto e adulto mais velho) de *Callithrix jacchus* em cativeiro, recomendando seu uso, em associação a outras medidas morfométricas, em animais de vida livre.

Valores de massa corporal são descritos em indivíduos adultos de *S. nigrurus* com média de 3,25 Kg nos machos e 2,30 Kg nas fêmeas, enquanto o comprimento do corpo pode variar de 38 a 56 cm nos machos e de 34 a 48 cm nas fêmeas (Aguiar, 2006; Silveira *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2015a). Valores de tamanho dos dentes caninos ainda não estão disponíveis.

1.2 Justificativa

Análises fenotípicas e morfológicas em populações ao longo da distribuição das espécies de *Sapajus* estão dentre as urgências citadas para o aprimoramento do conhecimento sobre a biologia e evolução do grupo (Lynch Alfaro *et al.*, 2014).

A ocorrência de distintos padrões de pelagem de forma intrapopulacional nas espécies de *Sapajus* da Mata Atlântica, incluindo *S. nigrurus*, é resultado de repetidos eventos de isolamento e recolonização entre populações geneticamente distintas (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a). Esse fenômeno corresponde à teoria dos refúgios florestais (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1970; Brown & Ab'Sáber, 1979), que influenciaram a diversidade de espécies animais nesse bioma (Grazziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2007; Cabanne *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009).

A predominância do padrão preto relatada em indivíduos de *S. nigrurus* em uma população do estado de São Paulo (Vieira & Oliveira, 2014) e do padrão marrom em outra do Rio de Janeiro (Penedo, 2016), acompanhando a variação sul-norte proposta para a espécie (Van Roosmalen & Van Roosmalen, 2016), pode indicar este trecho da distribuição como uma área de transição, uma vez que a região de São Paulo já foi descrita com uma importante descontinuidade filogeográfica na diversidade de espécies animais (Grazziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2007; Carnaval *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009). A análise de mais indivíduos de *S. nigrurus* em localidades de São Paulo e Rio de Janeiro, além de confirmar se essa região corresponde a uma área de transição dos padrões de pelagem preto e marrom, pode contribuir para avaliação da diversidade fenotípica da espécie.

A definição de faixas etárias em *S. nigrurus*, feita com base em caracteres fenotípicos (Izawa, 1980; MacKinnon, 2013), pode ser dificultada pelas variações na pelagem que ocorrem de forma intrapopulacional. Análises morfométricas de comprimento do corpo, da massa corporal e do tamanho dos caninos, que apresentam potencial para distinção de faixas etárias e dimorfismo sexual em primatas não-humanos (Aquino & Encarnación, 1986; Strum, 1991; Leão *et al.*, 2009; Fragaszy *et al.*, 2015; Galbany *et al.*, 2015; Mota *et al.*, 2016), ainda

são pouco empregadas em estudos com espécies de *Sapajus* (Fragaszy *et al.*, 2015; Bacalhao *et al.*, 2016). Análises morfométricas em indivíduos de populações naturais poderão identificar se essas variáveis são úteis na classificação das distintas faixas etárias de *S. nigritus*, de acordo com o sexo.

1.3 Objetivos

Analisar o fenótipo de indivíduos de *S. nigritus* em localidades do estado Rio de Janeiro e de São Paulo, verificando os padrões de coloração da pelagem e formato dos tufos no topo da cabeça, e avaliar uma possível associação com a distribuição geográfica. Hipótese: será verificada variação na coloração de pelagem com predominância de padrão mais escuro nos indivíduos provenientes de localidades ao sul, e padrão mais claro naqueles ao norte da distribuição amostrada.

Avaliar se há diferença significativa quanto ao comprimento do corpo, massa corporal e tamanho do canino de indivíduos de *S. nigritus* de populações naturais que possam ser úteis para a estimativa de faixas etárias. Hipótese: haverá diferença significativa entre as faixas etárias, considerando as variáveis morfométricas propostas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo

Foram capturados indivíduos de *Sapajus nigritus* em cinco localidades do estado do Rio de Janeiro: Parque Nacional do Itatiaia (PNI), cidade de Itatiaia; Ilha da Marambaia (IM), em Mangaratiba; Parque Nacional da Tijuca (PNT), no Rio de Janeiro; Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), em Teresópolis; e Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), em Silva Jardim. Além destes, foram analisados: indivíduos de cativeiro com origem no bairro de Guaratiba (Gua), cidade do Rio de Janeiro, e de cinco cidades do estado de São Paulo – capital (cSP), São José dos Campos (SJC), Paraibuna (PB), Campos do Jordão (CJ) e São Sebastião; além de exemplares depositados no Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) com procedência nas cidades de Angra dos Reis, Itatiaia, Paraty e Teresópolis, estado do Rio de Janeiro (Figura 3).

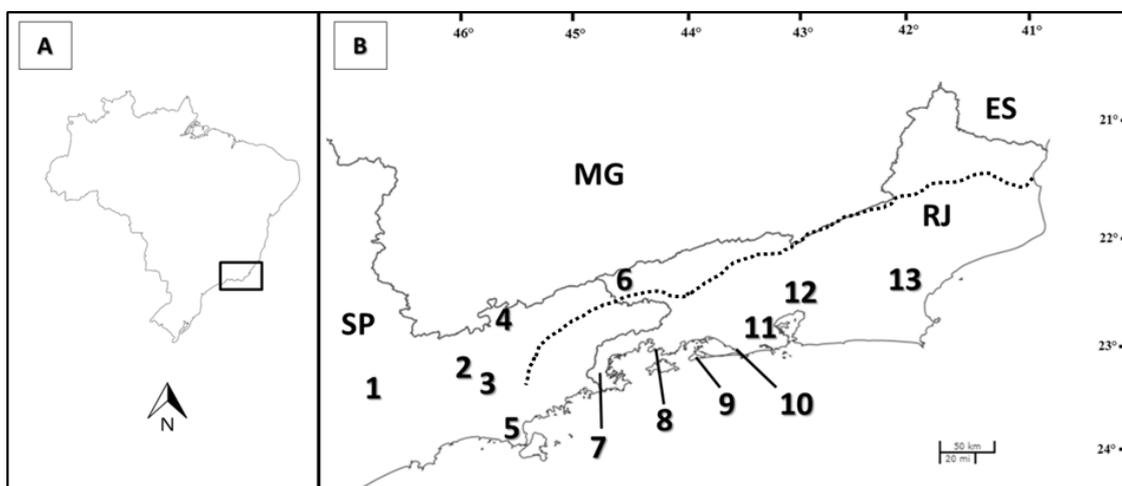


Figura 3: Locais de origem das amostras de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). (A) Mapa do Brasil. (B) Destaque para o estado do Rio de Janeiro e leste de São Paulo com as localidades: 1 – São Paulo, capital (cSP); 2 - São José dos Campos (SJC); 3 - Paraibuna (PB);

4 - Campos do Jordão (CJ); e 5 - São Sebastião (SS), SP; 6 - Parque Nacional do Itatiaia (PNI), cidade de Itatiaia; 7 - Paraty; 8 - Angra dos Reis; 9 - Ilha da Marambaia (IM), cidade de Mangaratiba; 10 - bairro de Guaratiba (Gua), cidade do Rio de Janeiro; 11 - Parque Nacional da Tijuca (PNT), cidade do Rio de Janeiro; 12 - Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), cidade de Teresópolis; e 13 - Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), cidade de Silva Jardim, RJ. A linha pontilhada representa o Rio Paraíba do Sul.

2.1.1 Descrição dos locais de captura *in situ*

O PNI (22°27'S/44°36'W), primeiro Parque Nacional do Brasil instituído pelo decreto 1.713/37, localizado na Serra da Mantiqueira, compreende um remanescente florestal de 280 Km², abrangendo os municípios de Resende e Itatiaia, no sudoeste do estado do Rio de Janeiro, e Bocaina de Minas e Itamonte, ao sul de Minas Gerais (Morim, 2006). A região é caracterizada pelo relevo montanhoso, com altitudes variando entre 650 e 2.789 m, sendo o ponto mais alto no Pico das Agulhas Negras. A temperatura mensal varia de 9°C, nos pontos mais altos, a 20°C na região mais baixa (Martins *et al.* 2015b). O Parque apresenta Floresta Ombrófila Densa como vegetação predominante, tendo variados graus de conservação (Aximoff *et al.*, 2015). As capturas ocorreram próximo à casa 12 (22°27'7.83"S/44°36'38.23"W), um dos abrigos onde os pesquisadores ficam alojados, e nas proximidades da oficina de carros do parque (22°27'20.90"S/ 44°36'27.85"W). Ambos os locais estão 800 m acima do nível do mar, distantes 500 m entre si e afastados das áreas de visitação.

A IM (23°04'S e 43°53'W) está localizada no município de Mangaratiba, sul do estado do Rio de Janeiro. Com aproximadamente 42 Km², a área apresenta relevo montanhoso, tendo como ponto mais alto o Pico da Marambaia, com 641m de altitude (Pereira *et al.*, 1990). Entre a IM e o continente está presente uma estreita faixa arenosa de 40 km de extensão, a Restinga da Marambaia (Conde *et al.*, 2005; Roncarati & Menezes, 2005). Ilha e restinga encerram, na porção sul, a Baía de Sepetiba (Carvalho *et al.*, 2007). A vegetação ocupa aproximadamente 21 Km², com predominância de mata secundária com sub-bosque denso, além de vegetação de Restinga e Mata Pluvial Costeira (Pereira *et al.*, 1990; Conde *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2008a). As médias mensais de temperatura estão sempre acima de 20°C (Paula *et al.*, 2009). A região está incluída na Área de Proteção Ambiental de Mangaratiba, instituída pelo Decreto estadual 9.802/87 (Rio de Janeiro, 1987). As capturas ocorreram no local denominado Buraco Quente (23°3'24.70"S/ 43°58'37.85"W), nas proximidades do Centro de Avaliação da Ilha da Marambaia (CADIM), Marinha do Brasil, e em uma região denominada Armação (23°2'59.84"S/ 43°57'16.02"W), ambas ao nível do mar. Na primeira localidade há concentração de casas de moradores e árvores frutíferas nos quintais, enquanto o segundo estava localizado em uma região mais distante (aproximadamente 2,4 Km de distância do primeiro local), próxima à vegetação de restinga, sem moradores no local.

O PNT (22°55'S/43°11'W), instituído pelos decretos 50923/61 e 183/62, está localizado na cidade do Rio de Janeiro e representa um dos maiores parques urbanos do mundo, com 32 km² de área (Costa & Yano, 1988; Freitas *et al.*, 2006). Fazendo parte do conjunto de montanhas do maciço da Tijuca, tem como ponto mais alto o Pico da Tijuca (1021 m) e na vegetação secundária predomina Floresta Ombrófila Densa (Costa & Yano, 1988; Freitas & Carrijo, 2008; Dias & Netto, 2010). A média anual de temperatura é de 22°C, geralmente variando de 19°C a 25°C (Dias & Netto, 2010). Neste local, as capturas ocorreram na casa do pesquisador (22°57'19.34"S/43°17'08.91"W) e no barracão

(22°57'13.64"S/43°16'58.83"W), local onde se concentram os trabalhadores do parque. Ambos os locais estão a aproximadamente 500 m acima do nível do mar e tem 330 m de distância entre si.

O PARNASO (22°23'S/43°10'W), instituído pelo decreto 1.822/39, apresenta aproximadamente 200 Km² de área total, abrangendo quatro municípios do estado do Rio de Janeiro: Petrópolis, Magé, Guapimirim e Teresópolis (Guimarães *et al.*, 2009; Aximoff *et al.*, 2015). Os indivíduos capturados neste estudo são provenientes da área pertencente ao município de Teresópolis. O parque concentra as maiores elevações da Serra do Mar, com altitudes variando entre 200 e 2.263 m (Guimarães *et al.*, 2009). Devido à sua localização e altitude, as temperaturas registradas são geralmente mais baixas que a média do estado, com média de 11°C no inverno (podendo atingir mínima de 0°C) e de 24°C no verão (Bragagnolo & Pinto-da-Rocha, 2003). Há predomínio de florestas tropicais até 2.000 m de altitude, e acima disso ocorrem os campos de altitude (Bragagnolo & Pinto-da-Rocha, 2003). Essa região é considerada localidade tipo de *S. n. nigritus* (Rylands *et al.*, 2005). As capturas dos macacos-prego ocorreram na mata próxima à administração do parque (22°27'0.10"S/42°59'8.83"W), onde se concentram as casas dos funcionários, e está a aproximadamente 1000 m acima do nível do mar.

A RBPA (22°30'S/42°15'W), que apresenta aproximadamente 50 Km² de área, está localizada no município de Silva Jardim, e foi estabelecida pelo decreto 73.791/74 (Lima *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008b). A região apresenta relevo predominantemente de planície costeira, com pequenos morros que atingem 200 m (Carvalho *et al.*, 2006). A RBPA compreende um mosaico de formações vegetais, com predominância de Floresta Ombrófila Densa, e a temperatura média anual é de aproximadamente 24,5°C, com pico registrado de 28°C nos meses de janeiro e fevereiro (Pereira *et al.*, 2008b). As capturas foram realizadas sobre uma plataforma de bambu montada como uma mesa, utilizada em um trabalho de conservação do mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), à qual os macacos-prego estavam acostumados a visitar. O local encontrava-se a aproximadamente 20 m da estrada principal da reserva (22°32'2.82"S/42°18'19.37"W) e a aproximadamente 35 m acima do nível do mar.

2.1.2 Origem das amostras *ex situ*

O indivíduo oriundo de Guaratiba, zona oeste da cidade do Rio de Janeiro, estava alocado no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) da Universidade Estácio de Sá em Vargem Pequena, cidade do Rio de Janeiro. Segundo o Médico Veterinário responsável, Dr. Jeferson Pires, o animal foi resgatado machucado e levado à instituição em 2016.

Os indivíduos oriundos das cidades de São Paulo, São José dos Campos, Paraíba, Campos do Jordão e São Sebastião, estado de São Paulo, estavam alocados no CRAS da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), bairro de Urbanova, São José dos Campos, São Paulo. Segundo a Médica Veterinária, Dr^a. Hanna Kokubun, os animais foram resgatados por órgãos ambientais, tendo chegado ao CRAS/UNIVAP entre 2004 e 2018.

2.2 Metodologia de captura *in situ*, sedação e identificação individual

Os procedimentos para captura seguiram o descrito em Verona (2008) e Penedo (2016), com adaptações. Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados

pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob o protocolo nº 013/2018 e a pesquisa foi autorizada junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO/ICMBio), sob o número 57417-6. Inicialmente foram identificados os locais com maior frequência de grupos de macacos-prego, através dos relatos de moradores ou trabalhadores das reservas e parques. Em seguida, eram feitas observações na região com mais relatos de avistamento. Identificados os locais mais propícios para captura, as armadilhas (modelo *Tomahawk*, três com as dimensões 70x40x40 cm e duas com 115x45x45 cm; sendo CxLxA), montadas sobre plataformas de bambu, foram suspensas com cordas (Figura 4) e mantidas abertas e desarmadas com bananas no seu interior para habituação dos animais. Diariamente, as bananas utilizadas como isca eram repostas. Ao se verificar que os indivíduos estavam habituados, as armadilhas eram armadas para a captura às 6h e fechadas às 18h, caso nenhum animal fosse capturado. No PARNASO, PNI e PNT, também foi utilizado o recurso de busca ativa, levando-se as armadilhas no carro e percorrendo constantemente a área até a visualização dos grupos. No momento do avistamento, as armadilhas eram colocadas no chão e armadas com bananas no gatilho para atrair os animais. Os esforços de captura variaram de 6 a 12 dias por trabalho de campo.

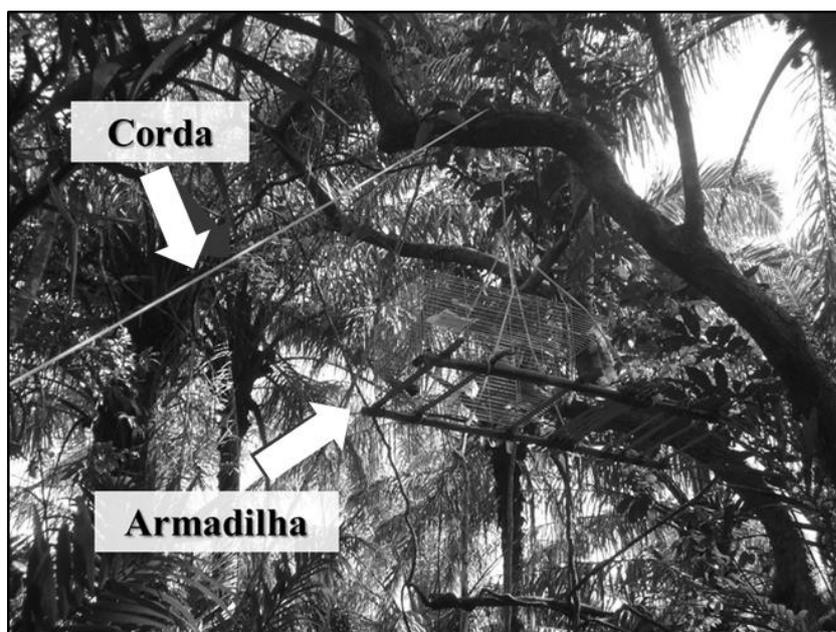


Figura 4: Armadilha do tipo *Tomahawk* em plataforma de bambu suspensa com auxílio de cordas, para habituação e captura de indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). Foto: Diego M. Penedo.

Com os indivíduos capturados, as armadilhas, quando suspensas, foram trazidas ao chão cuidadosamente, sempre cobertas com pano preto, na tentativa de diminuir o estresse provocado aos animais e levadas aos locais onde os procedimentos foram realizados.

Para a sedação, os animais de vida livre foram imobilizados no fundo da armadilha, com auxílio de hastes de ferro presas em suportes de madeira (Figura 5). A contenção química foi realizada com os animais ainda nas armadilhas, administrando simultaneamente cloridrato de cetamina e midazolam (15mg/Kg e 0,05 mg/Kg, respectivamente) via intramuscular utilizando seringas de 3mL e agulha de 20 x 5,5mm, o que garante um período médio de sedação de 30 min (Raposo *et al.*, 2015). Após constatado o efeito do sedativo, os animais foram retirados das armadilhas e levados para mesa de procedimentos montada próximo ao local de captura, ou ao laboratório, quando disponível (por exemplo, no PARNASO e na

RBPA). Todos os procedimentos de captura e sedação foram acompanhados pela Médica Veterinária Dr^a. Denise M. Nogueira.



Figura 5: Procedimento de imobilização dos indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) no fundo das armadilhas modelo *Tomahawk* com auxílio de hastes de ferro presas em suportes de madeira para sedação. Foto: Angelo F. Marzano.

Os procedimentos de imobilização e sedação dos animais *ex situ* foram realizados pelos Médicos Veterinários responsáveis de cada unidade, Dr. Jeferson Pires do CRAS/Estácio de Sá e Dr^a. Hanna Kokubun do CRAS/UNIVAP.

A identificação de 12 indivíduos da IM, capturados entre 2014 e 2016 (Penedo, 2016), foi realizada com tatuagem na face interna da coxa esquerda, contendo número sequencial, utilizando-se dermopigmentador Mei-Cha® portátil. Os demais indivíduos, tanto da IM quanto das outras localidades *in situ*, foram identificados com *microchip* subcutâneo (dimensões: 2x12mm) na região interescapular. Previamente à colocação do *microchip*, foi verificada a ocorrência de recaptura utilizando um leitor universal (Microchip Partners, modelo PA100). A identificação por *microchip* dos animais de São Paulo foi feita pela própria instituição e o indivíduo de Guaratiba não possuía identificação. Os dados referentes aos indivíduos *in situ*, *ex situ* e os números de registro dos exemplares do MNRJ constam no anexo I.

2.3 Caracterização fenotípica e análises morfométricas

O registro das características fenotípicas de pelagem foi feito com máquina fotográfica digital *Sony Cyber-shot*® de 14.1 megapixels, de corpo inteiro em decúbito ventral e dorsal, além da cabeça, em detalhe. A disponibilidade de luz ambiente variou conforme o local, sendo artificial com lâmpadas quando os procedimentos foram realizados em laboratório, CRAS ou MNRJ, e natural quando a mesa de procedimentos era preparada em local próximo ao da captura *in situ*.

Foram avaliadas as regiões do corpo destacadas na figura 6, conforme as publicações que já descreveram os padrões de pelagem em *Sapajus* e *Cebus* (Vieira, 1944; Silva Jr, 2001; Fragaszy *et al.*, 2004; Rylands *et al.*, 2005), observando-se: a coloração da pelagem do dorso (1), a presença ou ausência de faixa dorsal mais escura (1.1), a coloração do ventre (2), dos membros (3), da cauda (4), do topo, parte posterior e laterais da cabeça (5) e da face (6), além da presença ou ausência e o formato dos tufo de pelos no topo da cabeça (7).

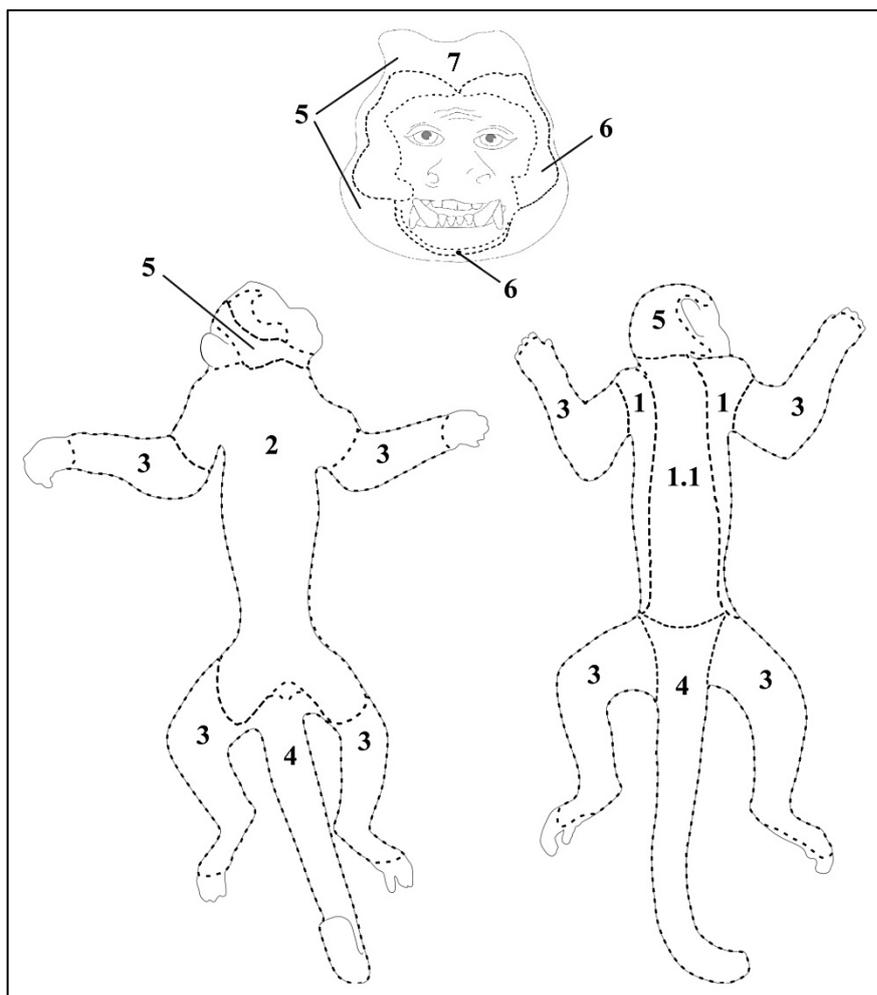


Figura 6: Regiões do corpo observadas para análise do fenótipo de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). Acima, cabeça em detalhe, decúbito dorsal à esquerda e decúbito ventral à direita. Os números indicam: (1) dorso; (1.1) faixa dorsal; (2) ventre; (3) membros; (4) cauda; (5) topo, parte posterior e laterais da cabeça; (6) face; (7) tufo de pelos no topo da cabeça. Ilustração por Diego M. Penedo.

Foi adotada a terminologia usual utilizada em trabalhos que descrevem a pelagem das espécies de *Sapajus*, empregando as cores preta, marrom, bege, amarela e branca, além das tonalidades clara e escura (Vieira, 1944; Fragaszy *et al.*, 2004; Rylands *et al.*, 2005; Vieira & Oliveira, 2014; Penedo, 2016), para possibilitar a comparação com os dados dos outros autores. Os termos utilizados para denominar os dois padrões de pelagem observados, “preto” e “marrom”, seguiram Vieira & Oliveira (2014), por ter sido o trabalho que descreveu uma variação intrapopulacional da pelagem em *S. nigritus*. Não foi empregada a variação “brilhante”, utilizada por esses autores para o padrão preto, por considerá-la uma característica subjetiva.

De forma complementar, foi incluída a terminologia do atlas de cores publicado por Ridgway (1912), visando representar de modo mais preciso a coloração dos presentes achados fenotípicos. Esta última terminologia será apresentada entre parênteses, mantendo-se o nome em inglês.

A faixa etária dos indivíduos, como adulto, subadulto e jovem, para machos, e adulta e jovem, para as fêmeas, foram identificadas inicialmente em campo, considerando os critérios

descritos por Izawa (1980) e MacKinnon (2013). A identificação do sexo foi feita pelo exame da genitália externa. As faixas etárias dos indivíduos de cativeiro foram informadas pelos Médicos Veterinários responsáveis de cada instituição e, em relação aos exemplares do MNRJ, foi utilizada a descrição da ficha individual.

Foram tomadas medidas de tamanho do corpo (topo da cabeça até a base da cauda) com fita métrica (precisão de 0,1 cm), de massa corporal, utilizando dinamômetro digital de 50 Kg (precisão de 10 g), e de tamanho do canino superior direito (da base até a ponta da coroa do dente), com paquímetro analógico (precisão de 1 mm), para cada indivíduo *in situ*. As medidas de todos os animais foram tomadas pelo mesmo pesquisador. Não foram incluídos nessas análises os indivíduos *ex situ* e os exemplares do MNRJ.

Foi realizada análise de variância (ANOVA) para avaliação de diferenças significativas entre faixas etárias, comparando-se o tamanho do corpo, massa corporal e tamanho do canino superior direito. Para todas as análises, foi realizado teste de comparação múltipla de Tukey, confrontando cada média, de modo a verificar quais apresentavam diferenças significativas. Foi utilizado o programa de análises estatísticas Minitab® (versão 19.2).

2.4 Retorno da sedação e soltura dos animais *in situ*

Após o retorno completo dos reflexos e tônus muscular, ainda dentro das armadilhas, os animais foram alimentados e levados para a soltura nos mesmos locais onde haviam sido capturados. Após a soltura os animais foram observados para certificação de seu bem-estar.

3 RESULTADOS

Foram capturados 49 indivíduos de *S. nigritus* no estado do Rio de Janeiro, sendo cinco (um macho e quatro fêmeas) do PNI, 26 (18 machos e oito fêmeas) da IM, quatro (três machos e uma fêmea) do PNT, seis (três machos e três fêmeas) do PARNASO e oito (seis machos e duas fêmeas) da RBPA. Foram analisados ainda, apenas quanto à pelagem: seis indivíduos de cativeiro, sendo um (macho) de Gua, dois (machos) de SJC e SS e três (fêmeas) de cSP, CJ e PB; e oito exemplares do estado do Rio de Janeiro depositados no MNRJ, sendo três (fêmeas) de Paraty, um (macho) de Angra dos Reis, três (machos) de Itatiaia e um (fêmea) de Teresópolis.

3.1 Análise de coloração da pelagem

Foram observados dois padrões de pelagem dentre os indivíduos de ambos os sexos amostrados nas localidades do Rio de Janeiro e de São Paulo, sendo o padrão mais claro, marrom; e o mais escuro, preto.

No padrão marrom, os indivíduos apresentavam dorso marrom (*brussels brown*), podendo ter os ombros e o terço superior dos braços mais claros, de cor bege (*apricot yellow*), ou da mesma cor que o dorso. O capuz (topo e parte posterior da cabeça), antebraço, membros inferiores e cauda eram pretos, contrastantes com o dorso (Figura 7A). O ventre variou em tons de amarelo, podendo ser um pouco mais claro (*lemon chrome*) ou mais escuro (*sulphine yellow* - Figura 7B). Este padrão foi observado em 37 indivíduos, sendo 22 da IM (sete machos adultos, três machos subadultos, quatro machos jovens, cinco fêmeas adultas e três

fêmeas jovens), todos os quatro indivíduos do PNT (dois machos adultos, uma fêmea adulta e um macho subadulto), três do PARNASO (um macho adulto e duas fêmeas jovens), quatro da RBPA (dois machos adultos, um macho subadulto e uma fêmea adulta), um de Gua (macho jovem), um de cSP (fêmea jovem), um de PB (fêmea jovem) e um de SS (macho jovem). Apresentaram faixa dorsal de pelos discretamente mais escura, estendendo-se do capuz até a base da cauda, seis indivíduos jovens, de ambos os sexos, da IM e um macho subadulto da RBPA (Figura 7C).



Figura 7: Padrão de pelagem marrom, observado em 37 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de localidades dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo. (A) dorso marrom, podendo ter os ombros e terço superior dos braços mais claros, na cor bege. Capuz (topo e parte posterior da cabeça), antebraço, membros inferiores e cauda pretos, contrastantes com o dorso; (B) ventre variando em tons de amarelo, mais claro ou mais escuro. Em (A) e (B), da esquerda para direita: IM, PNT, PARNASO, RBPA e cSP. À direita estão representados os extremos da variação do padrão no dorso e no ventre (*apricot yellow* e *brussels brown* em A e *lemon chrome* e *sulphine yellow* em B), segundo o atlas de cores publicado por Ridgway (1912); (C) faixa dorsal para jovens da IM (quatro primeiros) e um subadulto da RBPA (direita). Identificação individual (ver anexo I), em (A) e (B), da esquerda

para direita: IM01, PNT04, PNSO06, RBPA06 e cSP01; (C): IM02, IM05, IM12, IM23 e RBPA03. Fotos: Diego M. Penedo.

O padrão preto variou entre o marrom-escuro (*raw umber*) e o preto, cobrindo todo o dorso e parte superior dos braços dos animais, com pouca ou nenhuma distinção para o capuz, antebraço, membros inferiores e cauda (Figura 8A). O ventre variou entre o marrom (*medal bronze*) e o preto (Figura 8B). Esse padrão foi observado em 26 indivíduos, sendo quatro da IM (três machos adultos e um macho subadulto), todos os cinco do PNI (um macho jovem, três fêmeas adultas e uma fêmea jovem), três do PARNASO (um macho subadulto, um macho jovem e uma fêmea jovem), quatro da RBPA (dois machos adultos, uma fêmea adulta e um macho jovem), um (macho adulto) de SJC e um (fêmea adulta) de CJ, além dos oito indivíduos amostrados no MNRJ, sendo três (fêmeas adultas) de Paraty, um (macho adulto) de Angra dos Reis, três (machos jovens) de Itatiaia e um (fêmea adulta) de Teresópolis (Figura 8C).



Figura 8: Padrão de pelagem preto, observado em 26 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de localidades dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo. (A) dorso marrom-escuro a preto, com pouca ou nenhuma distinção para o capuz, antebraço, membros e cauda. (B) ventre marrom ao preto. Em (A) e (B), da esquerda para direita: IM, PNI, PARNASO, RBPA e SJC. À direita estão representados os extremos da variação deste padrão

no dorso e no ventre (*raw umber* e preto em A e *medal bronze* e preto em B), segundo o atlas de cores publicado por Ridgway (1912); (C) exemplares do MNRJ, a partir da esquerda: Angra dos Reis (dorso e ventre), Itatiaia (dorso e ventre), Paraty (pele aberta) e Teresópolis (pele aberta). Identificação individual (ver anexo I), em (A) e (B), da esquerda para direita: IM04, PNI04, PNSO03, RBPA02 e SJC01; em (C): MNAR01 (dorso e ventre), MNIT01 (dorso e ventre), MNPT02 e MNTE01. Fotos: Diego M. Penedo.

Independente da faixa etária, sexo e localização geográfica, todos os indivíduos apresentaram o capuz preto se estendendo para as laterais da face, como costeletas. Internamente ao pelo preto, a face era contornada por pelagem branca a amarela (*lemon chrome*) nas têmporas, bochechas e queixo (Figura 9).

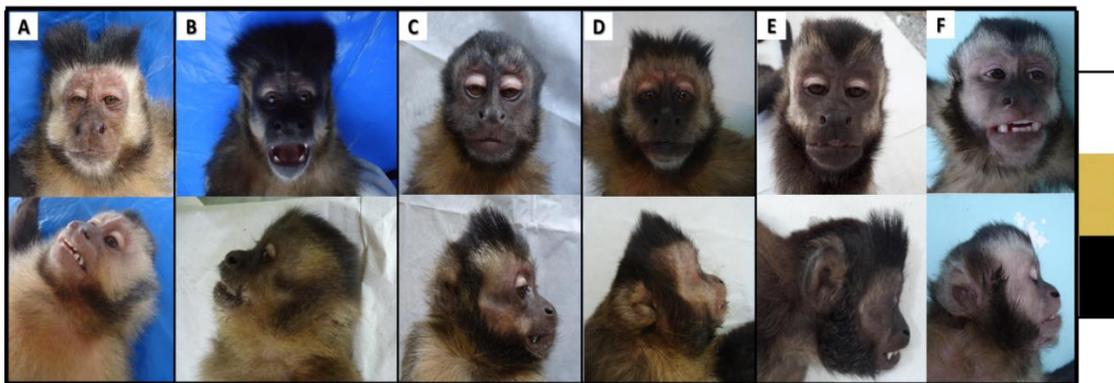


Figura 9: Padrão de coloração de pelagem da cabeça e face em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de localidades dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo. O capuz preto do topo da cabeça estende-se para as laterais da face, como costeletas. Internamente ao pelo preto, face contornada por pelagem branca a amarela (*lemon chrome*) nas têmporas, bochechas e queixo. Indivíduos de frente e perfil. Estão representados indivíduos das localidades: (A) IM; (B) PNI; (C) PARNASO; (D) PNT; (E) RBPA; (F) SS. À direita estão representadas as cores observadas (branco, *lemon chrome* e preto), segundo o atlas de cores publicado por Ridgway (1912). Identificação individual (ver anexo I): (A) IM15 e IM05; (B) PNI01 e PNI04; (C) PNSO6 e PNSO04; (D) PNT02 e PNT01; (E) RBPA05 e RBPA08; (F) SS01. Fotos: Diego M. Penedo.

Foram observados três tipos de tufos de pelos no topo da cabeça. Os pelos eram voltados para os lados (Figura 10A) em 24 indivíduos, sendo 13 da IM (oito machos adultos, duas fêmeas adultas e três machos subadultos), uma fêmea adulta do PNI, dois indivíduos do PNT (um macho adulto e uma fêmea adulta), um macho adulto do PARNASO, seis indivíduos da RBPA (quatro machos adultos e duas fêmeas adultas) e um macho adulto de Angra dos Reis (MNRJ). Em sete indivíduos, os tufos eram eretos e bipartidos (Figura 10B), sendo três fêmeas adultas da IM, um macho adulto do PNT, um macho adulto de SJC, uma fêmea adulta de CJ e uma fêmea adulta de Paraty (MNRJ). Outros sete indivíduos apresentaram tufos eretos sem divisão (Figura 10C), sendo dois machos adultos da IM, duas fêmeas adultas do PNI, duas fêmeas adultas de Paraty (MNRJ) e uma fêmea adulta de Teresópolis (MNRJ). Não apresentaram tufos (Figura 10D) 25 indivíduos, correspondendo a oito da IM (quatro machos jovens, três fêmeas jovens e um macho subadulto), dois do PNI (um macho jovem e uma fêmea jovem), um macho subadulto do PNT, cinco indivíduos do PARNASO (um macho subadulto, três fêmeas jovens e um macho jovem), dois indivíduos da RBPA (um macho subadulto e um macho jovem), um macho jovem de Gua, uma fêmea jovem de PB, uma fêmea jovem de cSP, um macho jovem de SS e três machos jovens de Itatiaia (MNRJ).

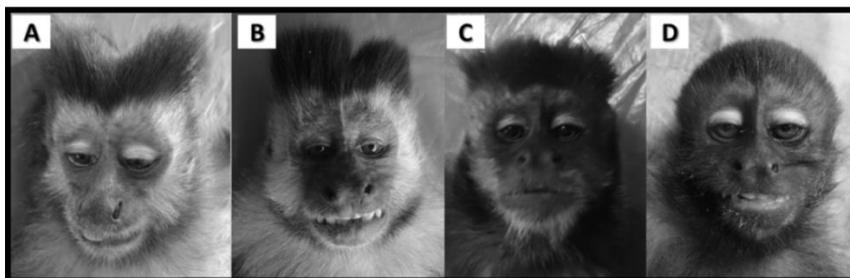


Figura 10: Formas dos tufos de pelos no topo da cabeça dos indivíduos de *Sapajus nigrurus* (Platyrrhini, Cebidae) estudados. (A) tufos voltados para os lados; (B) tufos eretos bipartidos; (C) tufos eretos sem divisão; (D) sem tufos. Identificação individual (ver anexo I): (A) IM10; (B) IM08; (C) PNT03; (D) PNSO05. Fotos: Diego M. Penedo.

3.2 Dados morfométricos para classificação em faixas etárias

Foram tomadas as medidas de comprimento do corpo e massa corporal nos 49 indivíduos *in situ*. O tamanho do canino superior direito foi medido em 47 indivíduos, não sendo possível a medição em uma fêmea adulta do PNI e um macho subadulto da RBPA, devido à rápida absorção do sedativo e retorno dos reflexos dos animais antes do esperado.

Os indivíduos foram agrupados em cinco categorias, associando as faixas etárias com o sexo, previamente identificados: macho adulto (MA), fêmea adulta (FA), macho subadulto (MSA), macho jovem (MJ) e fêmea jovem (FJ).

3.2.1 Comprimento do corpo

Os machos adultos apresentaram o maior comprimento médio do corpo, de aproximadamente 40 cm, seguidos pelos machos subadultos (37 cm) e fêmeas adultas (aprox. 35 cm). A média das fêmeas jovens foi a menor observada (aprox. 33 cm), seguida pelos machos jovens (aprox. 34 cm – Tabela 2).

Tabela 2: Médias de comprimento do corpo de 49 indivíduos de *Sapajus nigrurus* (Platyrrhini, Cebidae) amostrados em cinco populações no estado do Rio de Janeiro, agrupados em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa.

Sexo/Faixa etária	n	\bar{x} (cm)	DP	IC 95%
MA	17	40,235	2,488	39,042; 41,428
FA	11	35,091	1,868	33,608; 36,574
MSA	7	37,00	1,915	35,141; 38,859
MJ	7	34,21	3,89	32,36; 36,07
FJ	7	32,929	1,592	31,069; 34,788

MA – macho adulto; FA – fêmea adulta; MSA – macho subadulto; MJ – macho jovem; FJ – fêmea jovem; n – número amostral; \bar{x} – média; cm – centímetro; DP – desvio padrão; IC – intervalo de confiança.

Pela representação das médias de comprimento do corpo dos 49 indivíduos estudados de *S. nigrurus* no gráfico em *boxplot* (Figura 11), pode ser observada a diferença dos MA em

relação às outras categorias e a presença de dois indivíduos *outliers* (um MA da IM e um MSA da RBPA), com medidas discrepantes em relação aos demais, identificados por asteriscos (*).

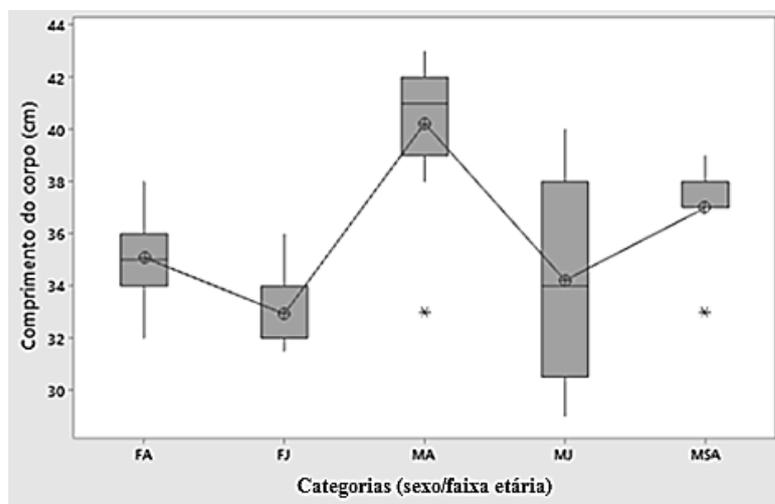


Figura 11: Médias de comprimento do corpo de 49 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária. As delimitações das caixas representam a distribuição de 50% das amostras; o traço interno, a mediana; os traços acima e abaixo das caixas os outros 50% das amostras; os círculos representam as médias; * *outlier*. FA – fêmea adulta; FJ – fêmea jovem; MA – macho adulto; MJ – macho jovem; MSA – macho subadulto.

A análise de variância considerando as médias de cada categoria, ao nível de significância de 5%, demonstrou que há diferença significativa ($P = 0,000$) em pelo menos uma das médias. As comparações emparelhadas de Tukey, que confrontam cada média, evidenciaram que os machos adultos podem ser diferenciados, apresentando o maior comprimento do corpo, em relação às demais faixas etárias. Machos subadultos, machos jovens e fêmeas adultas não apresentaram diferença significativa em relação a esta variável, da mesma forma que machos jovens, fêmeas adultas e fêmeas jovens (Tabela 3).

Tabela 3: Análise de variância e comparação de médias de comprimento do corpo por categoria (sexo/faixa etária) de indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro.

ANOVA		Comparações emparelhadas de Tukey	
Valor F	Valor P	Sexo/Faixa etária	Grupamentos
16,13	0,000	MA	A
		MSA	B
		FA	B C
		MJ	B C
		FJ	C

MA – macho adulto; FA – fêmea adulta; MSA – macho subadulto; MJ – macho jovem; FJ – fêmea jovem. Para as comparações emparelhadas de Tukey, médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

As duas médias de tamanho corporal *outliers*, observadas no gráfico *boxplot* (Figura 14), foram excluídas e as análises foram refeitas, para verificar os resultados sem esses valores discrepantes (Tabela 4, Figura 12).

Tabela 4: Médias de comprimento do corpo de 47 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) amostrados em cinco populações no estado do Rio de Janeiro, agrupadas em categorias de acordo com o sexo e a faixa etária, excluindo dois *outliers*.

Sexo/Faixa etária	n	\bar{x} (cm)	DP	IC 95%
MA	16	40,688	1,702	39,621; 41,754
FA	11	35,091	1,868	33,608; 36,574
MSA	6	37,667	0,816	35,924; 39,409
MJ	7	34,21	3,89	32,36; 36,07
FJ	7	32,929	1,592	31,069; 34,788

MA – macho adulto; FA – fêmea adulta; MSA – macho subadulto; MJ – macho jovem; FJ – fêmea jovem; n – número amostral; \bar{x} – média; cm – centímetro; DP – desvio padrão; IC – intervalo de confiança.

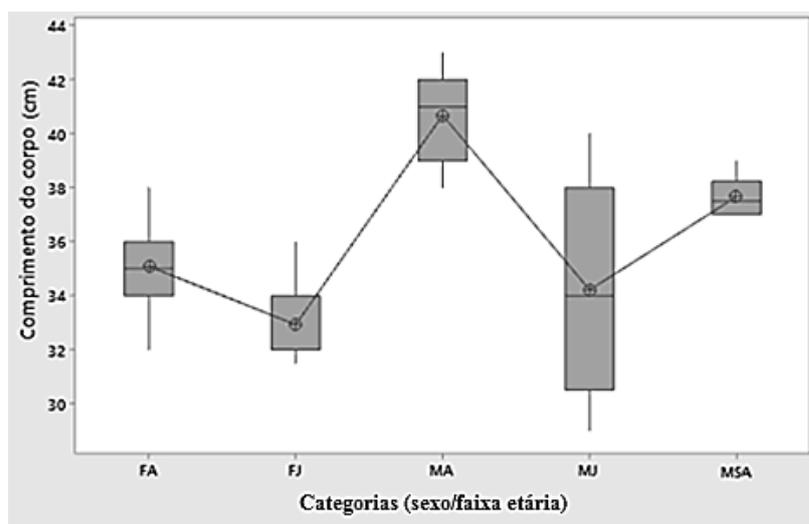


Figura 12: Médias de comprimento do corpo de 47 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária, excluindo-se *outliers*. As delimitações das caixas representam a distribuição de 50% das amostras; o traço interno, a mediana; os traços acima e abaixo das caixas os outros 50% das amostras; os círculos representam as médias; FA – fêmea adulta; FJ – fêmea jovem; MA – macho adulto; MJ – macho jovem; MSA – macho subadulto.

A análise de variância considerando as médias de cada categoria ao nível de significância de 5%, e excluindo os *outliers*, demonstrou haver diferença significativa ($P = 0,000$) em pelo menos uma das médias. As comparações emparelhadas de Tukey demonstraram novamente que os machos adultos diferem das demais categorias e que fêmeas adultas, machos jovens e fêmeas jovens não podem ser discriminados considerando o comprimento do corpo, assim como machos subadultos e fêmeas adultas. Entretanto, ao serem removidos os *outliers*, foi possível diferenciar machos subadultos de machos jovens (Tabela 5).

Tabela 5: Análise de variância e comparação de médias de comprimento do corpo por categoria (sexo/faixa etária) de indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, excluindo-se *outliers*.

ANOVA		Comparações emparelhadas de Tukey		
Valor F	Valor P	Sexo/Faixa etária	Grupamentos	
24,03	0,000	MA	A	
		MSA	B	
		FA	B	C
		MJ	C	
		FJ	C	

MA – macho adulto; FA – fêmea adulta; MSA – macho subadulto; MJ – macho jovem; FJ – fêmea jovem. Para as comparações emparelhadas de Tukey, médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

3.2.2 Massa corporal

Os machos adultos, assim como para comprimento do corpo, apresentaram a maior média de massa corporal (aprox. 3,6 Kg), com diferença de quase 1 Kg para a média das fêmeas adultas e dos machos subadultos (aprox. 2,65 Kg, cada). Fêmeas e machos jovens apresentaram médias de massa corporal praticamente iguais (aprox. 1,94 Kg - Tabela 6).

Tabela 6: Médias de massa corporal de 49 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) amostrados em cinco populações no estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária.

Sexo/Faixa etária	n	\bar{x} (Kg)	DP	IC 95%
MA	17	3,569	0,419	3,340; 3,799
FA	11	2,690	0,566	2,405; 2,975
MSA	7	2,633	0,439	2,276; 2,990
MJ	7	1,936	0,350	1,579; 2,293
FJ	7	1,954	0,541	1,597; 2,311

MA – macho adulto; FA – fêmea adulta; MSA – macho subadulto; MJ – macho jovem; FJ – fêmea jovem; n – número amostral; \bar{x} – média; cm – centímetro; DP – desvio padrão; IC – intervalo de confiança.

Na representação das médias de massa corporal dos 49 indivíduos estudados de *S. nigritus* através do gráfico em *boxplot* (Figura 13), pode ser observada, assim como para o comprimento do corpo, diferença dos MA em relação às outras categorias e a presença de dois indivíduos *outliers* (um MA e um MJ, ambos da IM).

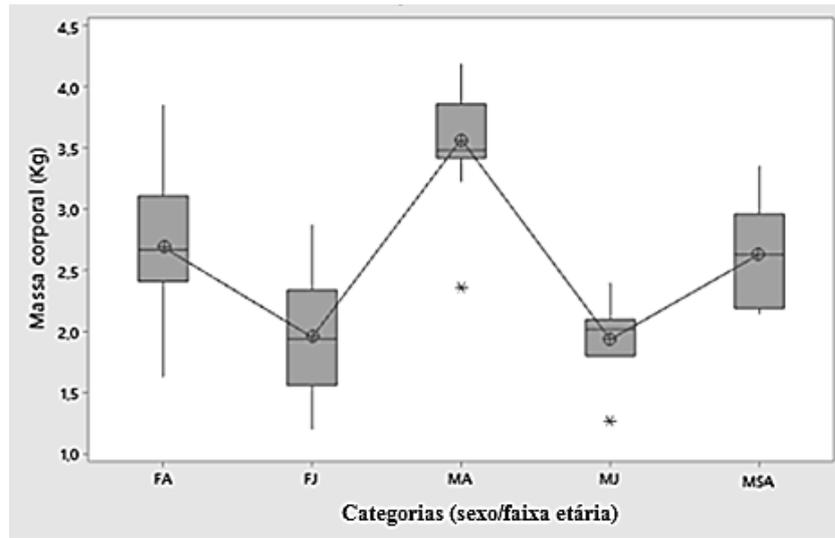


Figura 13: Médias de massa corporal de 49 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária. As delimitações das caixas representam a distribuição de 50% das amostras; o traço interno, a mediana; os traços acima e abaixo das caixas os outros 50% das amostras; os círculos representam as médias; * *outlier*. FA – fêmea adulta; FJ – fêmea jovem; MA – macho adulto; MJ – macho jovem; MSA – macho subadulto.

A análise de variância considerando as médias de cada categoria, ao nível de significância de 5%, demonstrou diferença significativa ($P = 0,000$) em pelo menos uma das médias de massa corporal. As comparações emparelhadas de Tukey demonstraram, assim como para comprimento do corpo, que os machos adultos podem ser diferenciados das demais categorias. Machos subadultos e fêmeas adultas não apresentaram diferença significativa nesta variável, da mesma forma que machos subadultos, machos jovens e fêmeas jovens. Diferente do comprimento do corpo, fêmeas adultas e jovens puderam separadas (Tabela 7).

Tabela 7: Análise de variância e comparação de médias de massa corporal por categoria (sexo/faixa etária) de indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro.

ANOVA		Comparações emparelhadas de Tukey	
Valor F	Valor P	Sexo/Faixa etária	Grupamentos
23,44	0,000	MA	A
		FA	B
		MSA	B C
		MJ	C
		FJ	C

MA – macho adulto; FA – fêmea adulta; MSA – macho subadulto; MJ – macho jovem; FJ – fêmea jovem. Para as comparações emparelhadas de Tukey, médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Assim como foi observado para o comprimento do corpo, as duas médias *outliers*, identificadas no gráfico *boxplot* (Figura 13), podem ter sido decorrentes de indivíduos erroneamente classificados ou que simplesmente apresentaram valores extremos dentro das faixas etárias. As análises foram refeitas, desconsiderando os *outliers*, para verificar os resultados sem esses valores discrepantes (Tabela 8, Figura 14).

Tabela 8: Médias de massa corporal de 47 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) amostrados em cinco populações no estado do Rio de Janeiro, agrupadas em categorias de acordo com o sexo e a faixa etária, excluindo dois *outliers*.

Sexo/Faixa etária	n	\bar{x} (Kg)	DP	IC 95%
MA	16	3,6450	0,2899	3,4307; 3,8593
FA	11	2,690	0,566	2,432; 2,948
MSA	7	2,633	0,439	2,309; 2,957
MJ	6	2,0483	0,2004	1,6984; 2,3983
FJ	7	1,954	0,541	1,630; 2,278

MA – macho adulto; FA – fêmea adulta; MSA – macho subadulto; MJ – macho jovem; FJ – fêmea jovem; n – número amostral; \bar{x} – média; cm – centímetro; DP – desvio padrão; IC – intervalo de confiança.

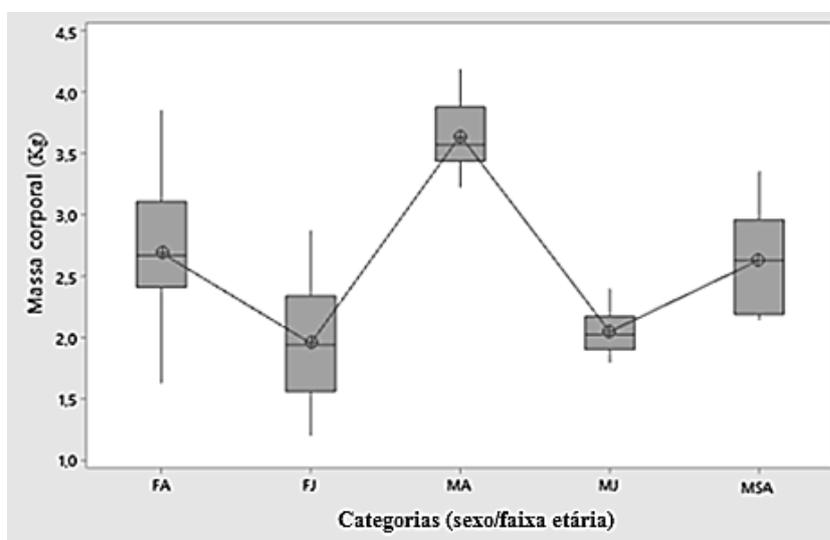


Figura 14: Médias de massa corporal de 47 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária, excluindo-se *outliers*. As delimitações das caixas representam a distribuição de 50% das amostras; o traço interno, a mediana; os traços acima e abaixo das caixas os outros 50% das amostras; os círculos representam as médias; FA – fêmea adulta; FJ – fêmea jovem; MA – macho adulto; MJ – macho jovem; MSA – macho subadulto.

A análise de variância considerando as médias de cada categoria, ao nível de significância de 5%, e excluindo os *outliers*, demonstrou que há diferença significativa ($P = 0,000$) em pelo menos uma das médias. As comparações emparelhadas de Tukey demonstraram que machos subadultos de machos jovens continuaram não sendo separados, mas as fêmeas jovens foram diferenciadas de machos subadultos, embora não de machos jovens (Tabela 9).

Tabela 9: Análise de variância e comparação de médias de massa corporal por categoria (sexo/faixa etária) de indivíduos de *Sapajus nigrinus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, excluindo-se *outliers*.

ANOVA		Comparações emparelhadas de Tukey			
Valor F	Valor P	Sexo/Faixa etária	Grupamentos		
27,90	0,000	MA	A		
		FA		B	
		MSA		B	C
		MJ			C D
		FJ			D

MA – macho adulto; FA – fêmea adulta; MSA – macho subadulto; MJ – macho jovem; FJ – fêmea jovem. Para as comparações emparelhadas de Tukey, médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

3.2.3 Tamanho do canino superior direito

Foram excluídos destas análises dois indivíduos (uma fêmea adulta do PNI e um macho subadulto da RBPA), devido à impossibilidade em medir o canino, uma vez que os indivíduos estavam retornando da sêdção, havendo risco de acidente por mordida.

Assim como para as outras duas medidas morfométricas, os machos adultos apresentaram a maior média de tamanho do canino superior direito (aprox. 1,5 cm), seguidos dos machos subadultos (aprox. 1,3 cm) e fêmeas adultas (aprox. 0,93 cm). As menores médias foram para os jovens, sendo de aproximadamente 0,73 cm para fêmeas e de 0,63 cm para os machos (Tabela 10).

Tabela 10: Médias de tamanho do canino superior direito de 47 indivíduos de *Sapajus nigrinus* (Platyrrhini, Cebidae) amostrados em cinco populações no estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária.

Sexo/Faixa etária	n	\bar{x} (cm)	DP	IC 95%
MA	17	1,5088	0,1292	1,4362; 1,5815
FA	10	0,9310	0,0617	0,8363; 1,0257
MSA	7	1,3014	0,2611	1,1882; 1,4147
MJ	6	0,6367	0,0638	0,5144; 0,7590
FJ	7	0,7343	0,1803	0,6210; 0,8475

MA – macho adulto; FA – fêmea adulta; MSA – macho subadulto; MJ – macho jovem; FJ – fêmea jovem; n – número amostral; \bar{x} – média; cm – centímetro; DP – desvio padrão; IC – intervalo de confiança.

Pela representação das médias de tamanho do canino superior direito dos 47 indivíduos estudados de *S. nigrinus* no gráfico em *boxplot* (Figura 15), pode ser observada diferença dos MA e MSA em relação às outras categorias, além da presença de um *outlier* (um MSA do PARNASO).

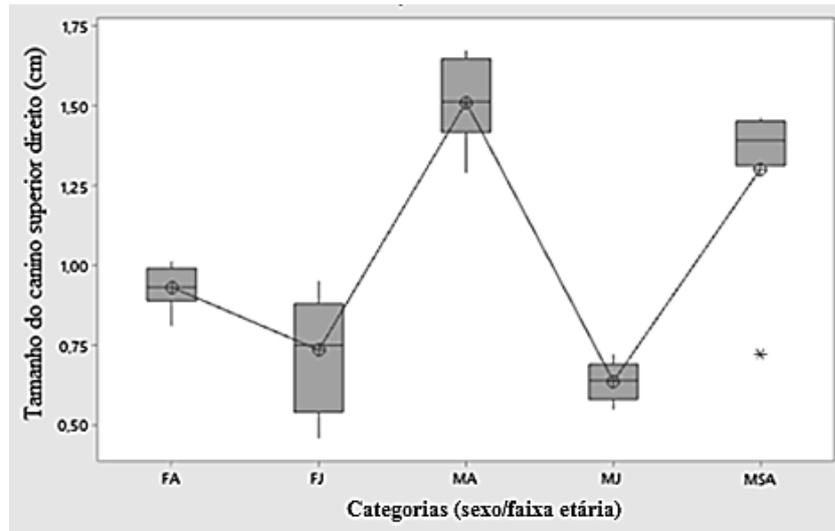


Figura 15: Médias de tamanho do canino superior direito de 47 indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro, agrupadas em cinco categorias de acordo com o sexo e a faixa etária. As delimitações das caixas representam a distribuição de 50% das amostras; o traço interno, a mediana; os traços acima e abaixo das caixas os outros 50% das amostras; os círculos representam as médias; * outlier. FA – fêmea adulta; FJ – fêmea jovem; MA – macho adulto; MJ – macho jovem; MSA – macho subadulto.

A análise de variância considerando as médias de cada categoria, ao nível de significância de 5%, demonstrou que há diferença significativa ($P = 0,000$) em pelo menos uma das médias de tamanho do canino superior direito. As comparações emparelhadas de Tukey demonstraram, assim como para as demais medidas, que os machos adultos podem ser diferenciados de todas as demais categorias. Embora o gráfico *boxplot* (Figura 15) tenha apresentado um macho subadulto como *outlier*, essa categoria também foi diferenciada de todas as demais, não sendo necessário refazer as análises. Fêmeas adultas e fêmeas jovens não apresentaram diferença significativa, da mesma forma que machos e fêmeas jovens (Tabela 11).

Tabela 11: Análise de variância e comparação de médias de tamanho do canino superior direito por categoria (sexo/faixa etária) de indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) de cinco populações do estado do Rio de Janeiro.

ANOVA		Comparações emparelhadas de Tukey	
Valor F	Valor P	Sexo/Faixa etária	Grupamentos
63,50	0,000	MA	A
		MSA	B
		FA	C
		FJ	C D
		MJ	D

MA – macho adulto; FA – fêmea adulta; MSA – macho subadulto; MJ – macho jovem; FJ – fêmea jovem. Para as comparações emparelhadas de Tukey, médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Os valores de F, obtidos através das análises de variância, demonstram o grau de variabilidade dentro dos grupos. Ou seja, quanto maior é o valor, menor é a variação dentro de

cada categoria e maior é a influência das médias. Desconsiderando os cálculos com *outliers*, os valores de F para comprimento do corpo e de massa corporal foram próximos (24,03 e 27,90, respectivamente) e do tamanho do canino superior direito foi maior do que o dobro destes (63,50).

Analisando as comparações emparelhadas de Tukey em conjunto, excluídos os *outliers*, foi possível identificar que as três variáveis morfométricas propostas se complementam na separação de todas as faixas etárias de cada sexo (Tabela 12).

Tabela 12: Associação das comparações emparelhadas de Tukey para as variáveis morfométricas comprimento do corpo, massa corporal e tamanho do canino superior direito de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). Em destaque, as variáveis que permitiram a separação de todas as faixas etárias em cada categoria.

Sexo/Faixa etária	Comprimento do corpo			Massa corporal			Tamanho do canino superior direito		
	MA	MSA	MJ	MA	MSA	MJ	MA	MSA	MJ
MA		✓	✓		✓	✓		✓	✓
MSA	✓		✓	✓		-	✓		✓
MJ	✓	✓		✓	-		✓	✓	
Sexo/Faixa etária	FA		FJ	FA		FJ	FA		FJ
FA			-			✓			-
FJ	-			✓			-		

MA – macho adulto; FA – fêmea adulta; MSA – macho subadulto; MJ – macho jovem; FJ – fêmea jovem. ✓ diferença estatisticamente significativa entre as categorias; – não diferem estatisticamente entre as categorias.

4 DISCUSSÃO

4.1 Análise fenotípica

A coloração observada na pelagem de todos os indivíduos estudados corresponde ao descrito para *S. n. nigritus* (Vieira, 1944; Groves, 2001a; Fragaszy *et al.*, 2004; Rylands *et al.*, 2005), conforme o esperado nas localidades amostradas, onde somente esta subespécie de *Sapajus* ocorre.

As variações interpopulacionais observadas condizem, em parte, com o descrito por Silva Jr (2001) nas distribuições ao norte e ao sul do Rio Paraíba do Sul. Nos oito indivíduos de Itatiaia, a única localidade amostrada ao norte desse rio, a região anterior dos membros marrom-enebecida, descrita como predominante nessa área de distribuição, foi observada em todos os indivíduos amostrados. Também foi predominante a ocorrência de tufo de pelos eretos no topo da cabeça, conforme o esperado. Entretanto, a coloração do ventre avermelhada, descrita como predominante nas populações acima do Rio Paraíba do Sul, não foi observada em nenhum dos indivíduos.

As características descritas como predominantes nas populações ao sul do Rio Paraíba do Sul, como região proximal dos membros anteriores preta e ventre marrom-enebecido

(Silva Jr, 2001), foram observadas em apenas 18 indivíduos, sendo 11 de vida livre (IM, PARNASO, RBPA), dois amostrados *ex situ*, oriundos de SJC e CJ, e cinco exemplares do MNRJ, de Paraty, Angra dos Reis e Teresópolis. Os demais 37 indivíduos dessa região não apresentavam essas características. Os tufo descritos como voltados para frente e para os lados, como a forma predominante ao sul do Rio Paraíba do Sul (Silva Jr, 2001), não foram observados, tendo sido identificados em predominância (23 indivíduos) voltados para os lados, somente, mas não para frente.

A variação intrapopulacional observada nos indivíduos da IM, que representam o maior número amostral, já havia sido descrita com base em 12 indivíduos, tendo sido identificados 10 com padrão marrom e dois com padrão preto (Penedo, 2016). Neste trabalho, incluindo mais 14 indivíduos desta localidade, 22 (84,6%) apresentaram o padrão marrom e quatro (15,4%), o preto. No PARNASO e na RBPA, apesar do pequeno número amostral (seis e oito, respectivamente), também foram identificadas ambos os padrões de pelagem, proporcionais dentro de cada amostra.

A variação da coloração da pelagem descrita em uma população do estado de São Paulo (Vieira & Oliveira, 2014) provavelmente se deu para *S. n. cucullatus*, devido à localização da cidade de Presidente Prudente, ao sudoeste do estado, próxima à divisa com Mato Grosso do Sul e Paraná. O tom avermelhado no dorso e no ventre, descrito nos espécimes estudados nesta população com padrão marrom (Vieira & Oliveira, 2014) não foi observado nos 37 indivíduos analisados no estado do Rio de Janeiro e região leste do estado de São Paulo (área de distribuição de *S. n. nigrinus*), com o mesmo padrão. Em relação aos 26 indivíduos identificados com padrão preto, não foram observados pelos brancos no ventre, como descrito na população de *S. n. cucullatus* em São Paulo (Vieira & Oliveira, 2014). Essas variações provavelmente correspondem a características distintas entre as subespécies.

Dentre as localidades amostradas, o padrão preto foi o único em Itatiaia (PNI e MNRJ) e região Sul do estado (Paraty e Angra dos Reis), indicando uma predominância desse padrão à oeste, principalmente se associado ao descrito para a população de São Paulo, onde predominou o mesmo padrão (Vieira & Oliveira, 2014). Comparadas a estas, em algumas localidades situadas à leste da região amostrada, foi observada a predominância do padrão marrom, correspondendo a 84,6% na IM (22 dentre 26), a 100% no PNT (quatro indivíduos) e no único indivíduo oriundo de Gua. A associação do predomínio do padrão preto na pelagem dos indivíduos das localidades amostradas a oeste do estado do Rio de Janeiro e da população de São Paulo (Vieira & Oliveira, 2014), com o padrão marrom predominante em algumas das localidades amostradas a leste, indica uma possível correspondência com a transição gradual descrita na distribuição de *S. nigrinus* (Van Roosmalen & Van Roosmalen, 2016). A transição na predominância dos padrões de pelagem de *S. nigrinus* na região entre São Paulo e Rio de Janeiro pode indicar a área amostrada como o limite entre os padrões preto e marrom, associado à área de descontinuidade filogeográfica já demonstrada na diversidade de outras espécies animais (Grazziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2007; Carnaval *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009), não estando necessariamente associado às subespécies.

As amostras obtidas no PARNASO, na RBPA e *ex situ*, em cidades de São Paulo, embora tenham demonstrado a ocorrência de ambos os padrões nessas áreas, não contribuíram para avaliação da distribuição dos padrões preto e marrom, uma vez que estes foram observados em proporções semelhantes. Um maior esforço amostral nestas e em outras localidades na distribuição entre São Paulo e Rio de Janeiro é necessário para se avaliar a manutenção do padrão esperado.

A presença de faixa dorsal mais escura foi confirmada como uma característica inerente à faixa etária, observada em seis (dentre sete) indivíduos jovens da IM e um

subadulto da RBPA. Indivíduos jovens de muitas espécies de primatas possuem pelagem com coloração distinta dos adultos (Mundy & Kelly, 2003), o que pode proporcionar uma maior visibilidade e favorecer o monitoramento pelos pais (Sumner & Mollon, 2003). Em populações de *S. nigritus* na planície costeira entre o Rio Grande do Sul e Santa Catarina (provavelmente *S. n. cucullatus* devido à distribuição geográfica) também foi verificada variação na coloração da pelagem de jovens, sendo o peito e dorso descritos com coloração mais avermelhada ou amarelada, embora não seja mencionada a presença de faixa dorsal (Gonçalves, 2006).

As formas dos tufos, eretos e os voltados para os lados, observadas nos indivíduos estudados, se enquadram naquelas descritas para *S. nigritus*, mas não foram identificados tufos voltados para frente (Silva Jr, 2001; Fragaszy *et al.*, 2004; Vieira & Oliveira, 2014). A ausência de tufos em todos os indivíduos jovens (21) e em quatro machos subadultos indica ser essa mais uma característica relacionada à faixa etária, conforme descrito por Vieira (1944).

A descrição de cores em primatas tem sido feita de forma subjetiva sem a utilização de um padrão com denominação mais precisa, o que dificulta a comparação entre estudos e o entendimento a respeito de sua variação. A padronização da nomenclatura de cores, utilizando a paleta publicada por Ridgway (1912), pode minimizar a subjetividade na comparação entre trabalhos que descrevam a pelagem de primatas, como já é feito em outros mamíferos (ex. Díaz *et al.*, 2002; Hutterer *et al.*, 2009; Moratelli & Wilson, 2011; Neves *et al.*, 2014; Novaes *et al.*, 2017).

4.2 Análises morfométricas para classificação em faixas etárias

A média de comprimento do corpo de indivíduos de *S. nigritus* oriundos das populações estudadas do estado do Rio de Janeiro possibilitou diferenciar os machos adultos dos demais, mas não os subadultos dos jovens, assim como não foi possível diferenciar fêmeas adultas de fêmeas jovens. Após a exclusão dos *outliers*, presentes nas categorias MA e MSA, houve diferença significativa para todas as faixas etárias pré-estabelecidas para os machos, mas FA e FJ continuaram sem diferenciação.

Em relação às médias de massa corporal, novamente MA pode ser diferenciada, com significância estatística, das demais categorias, com MSA e MJ sem diferenciação. Fêmeas adultas e jovens, diferente do encontrado pelas médias de comprimento do corpo, puderam ser diferenciadas com significância estatística. Mesmo após a exclusão dos *outliers*, presentes nas categorias MA e MJ, não foi possível diferenciar MSA de MJ.

Analisando separadamente, ambas as medidas não foram eficientes para diferenciação, com significância estatística, de todas as faixas etárias de cada sexo. Entretanto, se observarmos em conjunto os resultados obtidos pelas médias de tamanho do corpo e massa corporal, é possível diferenciar todas as faixas etárias de um mesmo sexo. Aquelas categorias indistinguíveis através dessas médias, como MJ de FJ e MSA de FA, podem ser facilmente discriminadas através da análise da genitália externa.

A terceira característica morfológica analisada, tamanho do canino superior direito, demonstrou desempenho semelhante ao obtido com comprimento do corpo, possibilitando diferenciar as três faixas etárias dos machos, mas não as duas das fêmeas. Essa característica, entretanto, teve valor do teste F, obtido pela análise de variância, maior do que o dobro (= 63,50) daqueles obtidos com comprimento do corpo (= 24,03) e massa corporal (= 27,90), indicando agrupamentos mais concisos, correspondendo a uma variável morfológica mais

precisa na separação das faixas etárias dos machos de *S. nigritus*. Assim como as demais variáveis analisadas, esta não pode ser considerada isoladamente na classificação de faixas etárias em ambos os sexos de *S. nigritus*, mas sua análise em conjunto com comprimento do corpo e massa corporal torna mais robustos os resultados.

Os valores médios de comprimento do corpo de MA ($40,688 \pm 1,702$) e FA ($35,091 \pm 1,868$) estão dentro do esperado para *S. nigritus* (38 a 56 cm e 34 a 48 cm, respectivamente), assim como as médias de massa corporal (MA = $3,645 \pm 0,289$ e FA = $2,690 \pm 0,566$) estão próximas às aquelas (3,25 e 2,30Kg, respectivamente) descritas para esta espécie (Aguiar, 2006; Silveira *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2015a). A diferenciação entre MA e FA, bem definida para essas variáveis, assim como para o tamanho do canino, reforça o dimorfismo sexual já demonstrado para *S. nigritus* em um estudo com exemplares do Museu Argentino de Ciências Naturais e do Museu de La Plata, oriundos da Região de Misiones, Argentina, utilizando médias de medidas craniais (Arístide *et al.*, 2013).

A diferença significativa entre FA e FJ, apenas em relação à massa corporal, pode estar relacionada a uma correlação positiva desta característica com a atividade reprodutiva e parece ser comum em algumas espécies de primatas (Richard *et al.*, 2000), uma vez que fêmeas adultas têm elevados custos energéticos com gestação e lactação (Key & Ross, 1999). Seguindo essa tendência, a fase adulta para as fêmeas de *S. nigritus* pode ser demarcada pelo ganho de massa corporal após o crescimento do corpo, visto não ter sido observada diferença entre FA e FJ quanto a esta última variável.

Os valores *outliers*, observados para os machos nas três variáveis estudadas e que influenciaram nos resultados de comprimento do corpo para diferenciar estatisticamente as três faixas etárias deste sexo, podem indicar indivíduos erroneamente identificados com base nas características utilizadas para classificação inicial em campo (Izawa, 1980; MacKinnon, 2013) ou apenas representarem indivíduos com valores extremos em uma curva de distribuição normal de amostras.

5 CONCLUSÕES

A predominância dos padrões de pelagem preto, ao oeste, e marrom, ao leste, na distribuição de *Sapajus nigritus* entre São Paulo e Rio de Janeiro, parecem corresponder à transição na coloração da pelagem descrita para a espécie (Van Roosmalen & Van Roosmalen, 2016), tendo seu limite nesta região.

A variação na predominância dos padrões de pelagem não parece estar associada às subespécies, mas sim corresponder à área de descontinuidade filogeográfica, decorrente de refúgios florestais, descrita na diversidade de espécies animais na região de São Paulo.

O predomínio em algumas características de pelagem ao norte do Rio Paraíba do Sul (Silva Jr, 2001) foram confirmadas nos indivíduos de Itatiaia, mas não aquelas descritas com predominância ao sul deste rio, onde houve maior amostragem neste estudo.

A ausência de tufos de pelos na cabeça e a presença de faixa dorsal mais escura foram características observadas predominantemente nos jovens de *S. nigritus* e confirmam a importância do seu uso na classificação das faixas etárias, principalmente em estudos fundamentados em observação, ou seja, sem a captura dos primatas.

Somente machos adultos puderam ser diferenciados, com significância estatística, das demais categorias em relação ao comprimento do corpo, massa corporal e tamanho do canino superior direito, sendo sempre os indivíduos com os maiores valores encontrados.

As médias de comprimento do corpo e do tamanho do canino superior direito permitiram individualmente a distinção entre as faixas etárias nos machos.

A média de massa corporal foi a única variável morfológica que diferiu significativamente entre fêmeas adultas e jovens.

De forma isolada, nenhuma das médias morfométricas se mostrou eficiente para separação de todas as faixas etárias em ambos os sexos.

Em conjunto, as médias de comprimento do corpo, massa corporal e tamanho do canino superior direito são eficientes para separação de todas as faixas etárias de cada sexo e podem ser utilizadas como método complementar ao descrito por Izawa (1980) e MacKinnon (2013).

CAPÍTULO II

ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM *Sapajus nigrinus* (PLATYRRHINI, CEBIDAE) EM LOCALIDADES DOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E DE SÃO PAULO

RESUMO

O cariótipo das espécies de *Sapajus* e *Cebus* é considerado o mais semelhante ao do ancestral dos Platyrrhini, tanto pelo número diploide quanto por regiões de eucromatina que se mantiveram conservadas na história evolutiva. A fonte de diversidade se dá, principalmente, em regiões de heterocromatina constitutiva (HC) extra-centromérica, as quais representam porções de DNA transcricionalmente inativas que podem sofrer rearranjos estruturais sem afetar o DNA codificante. Alguns polimorfismos na HC são considerados espécie-específicos, como o que é observado no par cromossômico 11. Enquanto na maioria das espécies de *Sapajus* esse par possui um grande bloco de HC terminal, *S. nigritus* é descrita como a única com deleção total desse bloco, com o cromossomo sendo convertido em um pequeno acrocêntrico. A deleção total da HC terminal, descrita com base em indivíduos da Argentina e confirmada em uma população do estado do Rio de Janeiro, entretanto, não parece ser o único padrão da espécie, uma vez que análises de indivíduos também do RJ já demonstraram a ocorrência do grande bloco de HC terminal no par 11. A distribuição de HC extra-centromérica nas espécies de *Sapajus* e *Cebus* parece seguir uma gradiente, diminuindo em quantidade do norte para o sul, mas a compreensão de como essa distribuição se dá em *S. nigritus* é dificultada pelo fato de as análises citogenéticas serem realizadas predominantemente em populações da Argentina. O objetivo deste estudo foi analisar os padrões de HC extra-centromérica nos pares cromossômicos de *S. nigritus* em amostras do RJ e de SP, verificando a ocorrência de polimorfismo no par 11, assim como nos demais pares, e um possível padrão de distribuição geográfica. Foram analisados indivíduos de cinco populações do estado do RJ: Ilha da Marambaia (IM), Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), Parque Nacional do Itatiaia (PNI), da Tijuca (PNT) e da Serra dos Órgãos (PARNASO); além de exemplares ex situ de Guaratiba/RJ (Gua) e de cidades de São Paulo: capital (cSP), São José dos Campos (SJC), São Sebastião (SS), Paraibuna (PB) e Campos do Jordão (CJ). A presença e distribuição de HC extra-centromérica foram analisadas com as técnicas de banda C e hibridização por fluorescência *in situ* da sonda #11qHe+. O par cromossômico 11 de algumas amostras foi identificado utilizando a sonda 21WCP, que hibridiza na região eucromática desse par. Nos 55 indivíduos analisados, foi identificado $2n=54$, XX ou XY (NF = 76). Marcações de HC foram identificadas nos pares 4, 12, 13 e 17 de todos os indivíduos, além dos pares 6, 11, 19 e 21 em alguns deles. O par 11 com a deleção da HC foi identificado nas amostras à leste (IM, Gua, PNT, PARNASO e RBPA), enquanto à oeste ambos os padrões foram identificados, sem (cSP, CJ e SS) e com (SJC, PB e PNI) bloco de HC. Somente no par 11 a distribuição da HC extra-centromérica parece seguir um padrão biogeográfico, evidenciado principalmente pela ocorrência do pequeno acrocêntrico em todas as localidades à leste. A ocorrência de polimorfismo nas localidades do PNI e cidades de São Paulo, sem um padrão de distribuição geográfica definido, parece estar associada à zona de descontinuidade relatada para espécies animais nessa região da Mata Atlântica, representando uma área de transição entre o grande bloco de HC terminal e o pequeno acrocêntrico. Outra possibilidade é que o polimorfismo no par 11, decorrente de deleção, tenha surgido nessa região como forma derivada, uma vez que o grande bloco de HC terminal é compartilhado com as demais espécies de *Sapajus* e *Cebus*. A partir dali, o pequeno acrocêntrico teria radiado nas populações ao leste, no RJ (IM, Gua, PNT, PARNASO e RBPA), e a sul, na Argentina. A diversidade genética evidenciada nos polimorfismos de HC extra-centromérica em *S. nigritus* deve ser considerada na conservação da espécie e a área amostrada, onde ambas as formas do par 11 foram identificadas, deve receber especial atenção para manutenção da diversidade cromossômica da espécie.

Palavras-chave: Polimorfismos, Banda C, Hibridização por fluorescência *in situ*.

ABSTRACT

The karyotype of *Sapajus* and *Cebus* species is considered the most similar to that of the ancestor of Platyrrhini, both for the diploid number and for euchromatic regions that have remained conserved in evolutionary history. The source of diversity, then, occurs mainly in regions of extracentromeric constitutive heterochromatin (HC), which represent portions of transcriptionally inactive DNA that can undergo structural rearrangements without affecting the coding DNA. Some HC polymorphisms are considered specific, such as that in chromosome pair 11. While in most *Sapajus* species this pair has a large block of terminal HC, *S. nigritus* is described as the only one with total deletion of this block, with the chromosome being converted to a small acrocentric. The total deletion of the terminal HC, described based on individuals from Argentina and confirmed in a population of Rio de Janeiro state, however, does not seem to be the unique pattern of this species, since analyses of individuals also from RJ have already demonstrated the occurrence of the large block of terminal HC in the pair 11. The distribution of extracentromeric HC in *Sapajus* and *Cebus* species seems to follow a gradient, decreasing in quantity from north to south, but the understanding of how this distribution occurs in *S. nigritus* is hindered by the fact that cytogenetic analyses are predominantly performed in populations from Argentina. The objective of this study was to analyze the patterns of extracentromeric HC in the chromosomal pairs of *S. nigritus* in samples from RJ and SP, verifying the occurrence of polymorphism in the pair 11, as well as in other pairs, and a possible pattern of biogeographic distribution. Individuals from five populations in RJ state were analyzed: Ilha da Marambaia (IM), Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), Parque Nacional do Itatiaia (PNI), Tijuca (PNT) and Serra dos Órgãos (PARNASO); as well as *ex situ* specimens from Guaratiba/RJ (Gua) and cities of São Paulo: capital (cSP), São José dos Campos (SJC), São Sebastião (SS), Paraibuna (PB) and Campos do Jordão (CJ). The presence and distribution of extracentromeric HC were analyzed with C-band and fluorescence *in situ* hybridization, with the probe #11qHe+. The pair 11 of some samples was identified using the 21WCP probe, which hybridizes in the euchromatic region of this pair. In the 55 individuals analyzed, $2n=54$, XX or XY (NF = 76) was identified. Extracentromeric HC were identified in pairs 4, 12, 13 and 17 of all individuals, in addition to pairs 6, 11, 19 and 21 in some of them. The pair 11 with the deletion of HC was identified in the samples to the east (IM, Gua, PNT, PARNASO and RBPA), while to the west both patterns were identified, without (cSP, CJ and SS) and with (SJC, PB and PNI) HC block. Only in the pair 11 the distribution of extracentromeric HC seems to follow a biogeographic pattern, evidenced mainly by the occurrence of the small acrocentric in all locations to the east. The occurrence of both polymorphisms in the localities of the PNI and cities of São Paulo, without a defined geographical distribution pattern, seems to be associated with the discontinuity zone reported for animal species in this Atlantic Forest region, representing a transition area between the large terminal HC block and the small acrocentric. Another possibility is that the polymorphism in the pair 11, resulting from deletion, has appeared in this region as a derivative form, since the large terminal HC block is shared with the other *Sapajus* and *Cebus* species. From there, the small acrocentric would have radiated in the populations to the east, in RJ (IM, Gua, PNT, PARNASO and RBPA), and to the south, in Argentina. The genetic diversity evidenced in the polymorphisms of extracentromeric HC in *S. nigritus* must be considered in the conservation of the species and the sampled area, where both polymorphisms of pair 11 were identified, should receive special attention to maintain the species' chromosomal diversity.

Keywords: Polymorphisms, C banding, Fluorescence *in situ* hybridization.

1 INTRODUÇÃO

Os cariótipos dos macacos-prego (*Sapajus*) e caiararas (*Cebus*) são considerados os mais semelhantes ao do ancestral dos Platyrrhini, tanto pelo número diploide quanto por regiões que se mantiveram conservadas ao longo da história evolutiva (García *et al.*, 2002; Amaral *et al.*, 2008; Dumas & Mazzoleni, 2017; Nieves *et al.*, 2017).

Enquanto nas quatro espécies de *Cebus* o número diploide é $2n=52$ ou $2n=54$, todas as oito espécies de *Sapajus* apresentam $2n=54$, tendo 10 pares de cromossomos autossômicos metacêntricos ou submetacêntricos, 16 acrocêntricos e o par sexual XX ou XY (Matayoshi *et al.*, 1986; Amaral *et al.*, 2008). O cromossomo X é submetacêntrico (Matayoshi *et al.*, 1986; Mudry, 1990), enquanto o Y é geralmente descrito como um pequeno acrocêntrico (Matayoshi *et al.*, 1986; Clemente *et al.*, 1987; Mudry de Pargament & Slavutsky, 1987; Mudry, 1990; Amaral *et al.*, 2008; Iughetti, 2008), embora já tenha sido citado como submetacêntrico em *S. apella* (Freitas & Seuánez, 1982).

A homologia entre diversas regiões eucromáticas de *Sapajus* e *Cebus*, nas quais se localizam genes transcricionalmente ativos, também são compartilhadas com cromossomos humanos (Dumas & Mazzoleni, 2017). Por outro lado, regiões de heterocromatina constitutiva (HC) extra-centroméricas estão amplamente distribuídas e de forma variável no cariótipo das espécies desses gêneros, representando a principal fonte de diversidade cromossômica (Nieves *et al.*, 2005a; Nieves *et al.*, 2011; Nieves *et al.*, 2017). Essa diversidade, que se dá inclusive de forma intraespecífica (Freitas & Seuánez, 1982; Seuánez *et al.*, 1986; Matayoshi *et al.*, 1987; Mudry, 1990; Ponsà *et al.*, 1995; Nieves *et al.*, 2011; Steinberg *et al.*, 2014; Nieves *et al.*, 2017), é propiciada pelo fato de a HC extra-centromérica representar porções de DNA transcricionalmente inativas, nas quais rearranjos estruturais podem ocorrer sem afetar regiões codificantes do DNA (Garcia *et al.*, 1983; Grewal & Moazed, 2003).

O bandamento C é uma técnica de citogenética clássica que permite identificar regiões de HC centroméricas e extra-centroméricas (Kasahara, 2009). Nas espécies de *Sapajus*, através da sua aplicação em cromossomos metafásicos, a HC extra-centromérica já foi descrita, de forma intercalar ou terminal, em *S. nigritus*, *S. xanthosternos*, *S. cay*, *S. robustus*, *S. apella* e *S. libidinosus*, tendo sido observadas marcações nos pares cromossômicos 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20 e 21 (Freitas & Seuánez, 1982; Seuánez *et al.*, 1986; Matayoshi *et al.*, 1987; Mudry, 1990; Mudry *et al.*, 1991; Ponsà *et al.*, 1995; Nieves *et al.*, 2005; Nieves *et al.*, 2011; Steinberg *et al.*, 2014; Nieves *et al.*, 2017). No par 11, alguns polimorfismos são considerados espécie-específicos. Enquanto na maioria das espécies de *Sapajus* esse par possui um grande bloco heterocromático terminal ocupando de 62 a 86% do braço longo (Matayoshi *et al.*, 1987), *S. xanthosternos* é a única com bloco heterocromático intercalar (Seuánez *et al.*, 1986). Outro caso de polimorfismo é a deleção do grande bloco de HC terminal nesse par, sendo convertido em um pequeno acrocêntrico, descrito como específico de *S. nigritus* a partir da análise em populações da região de Misiones, Argentina (Mudry, 1990; Mudry *et al.*, 1991). Este mesmo padrão foi identificado em indivíduos de *S. nigritus* amostrados na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro (Penedo *et al.*, submetido).

A confirmação da deleção total da HC extra-centromérica do par 11, tanto para populações de *S. nigritus* na Argentina (Nieves *et al.*, 2005a) quanto para a população da Ilha da Marambaia (Penedo *et al.*, submetido) foi possível por meio da associação de técnicas de microdissecção cromossômica e hibridização por fluorescência *in situ* (FISH), que permitem a marcação de regiões cromossômicas específicas através da utilização de sondas de DNA (Nieves *et al.*, 2011). A sonda 21WCP (*whole chromosome painting*) é complementar ao

cromossomo 21 humano e sua homologia, descoberta através da análise genômica comparada, com a porção eucromática do par 11 das espécies de *Sapajus* e *Cebus* permite identificá-lo com precisão (García *et al.* 2002; Nieves *et al.*, 2008). Outra sonda, denominada #11qHe+, foi desenvolvida a partir da heterocromatina do par 11 de *S. libidinosus* e hibridiza em regiões de HC extra-centromérica de qualquer par cromossômico das espécies de macacos-prego e caiararas, cumprindo função semelhante à do bandamento C, mas que evidencia essas regiões com maior precisão (Nieves *et al.*, 2005a). Assim, com a utilização simultânea das sondas, o par 11 de *S. nigritus* é confirmado pela hibridização da sonda 21WCP e a ausência de HC extra-centromérica, pela não hibridização com a sonda #11qHe+ (Figura 16).

Embora a sonda #11qHe+ não hibridize no par 11 de *S. nigritus*, sua aplicação já confirmou marcações previamente demonstradas com banda C nos pares 4, 6, 12, 13, 17, 19 e 21 da espécie, com diferentes frequências de presença e ausência em amostras da Argentina e da Ilha da Marambaia, Brasil (Nieves *et al.*, 2005a; Nieves *et al.*, 2008; Nieves *et al.*, 2011; Penedo *et al.*, submetido).

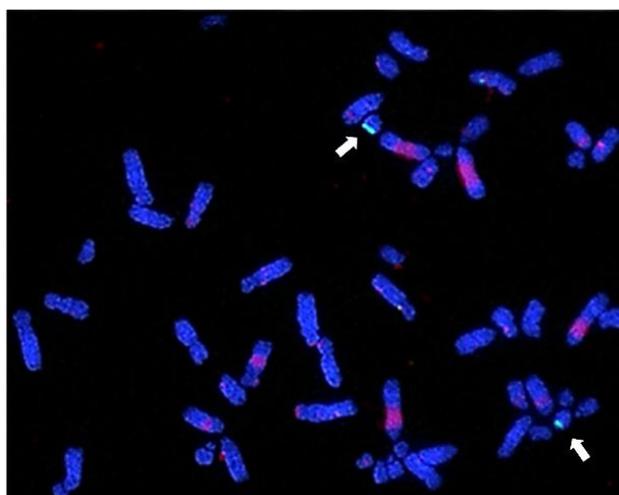


Figura 16: Metáfase de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) da região de Misiones, Argentina, com hibridização por fluorescência *in situ* utilizando a sonda 21WCP, em verde (setas), identificando o par 11. Marcações em vermelho correspondem à sonda de heterocromatina constitutiva extra-centromérica, #11qHe+. Adaptado de Nieves *et al.* (2008).

Os pares 4, 12 e 13 foram identificados com maior frequência de HC extra-centromérica em *S. nigritus*, a partir da análise de indivíduos da Argentina, enquanto os pares 6, 17 e 19 foram descritos como os mais variáveis, tanto pela presença e ausência quanto pelo tamanho dos blocos de HC intercalar. Entretanto, a relação da distribuição de HC extra-centromérica com a origem geográfica não foi bem estabelecida (Nieves *et al.*, 2017).

Variações intraespecíficas na HC extra-centromérica também são comuns em diversos outros grupos animais como, por exemplo, em crustáceos, *Artemis* spp. (Papeschi *et al.*, 2008), peixes, *Astyanax altiparanae* (Neto *et al.*, 2009), lagartos, *Lacerta kulzeri* (in den Bosch *et al.*, 2003) e roedores, *Ctenomys dorbignyi* (Argüelles *et al.*, 2001). Esse tipo de polimorfismo já foi identificado em associação a padrões biogeográficos em espécies na Mata Atlântica, como o observado entre populações de sapo-de-chifre, *Proceratophrys boiei*, ao norte e ao sul do estado de São Paulo, relacionada ao isolamento decorrente de uma falha na Fenda Continental Sul do Brasil, ocorrida no Mioceno (Amaro *et al.*, 2012). Entre populações de traíra, *Hoplias malabaricus*, na região do Médio Rio Doce, em Minas Gerais, a variação de HC extra-centromérica foi relacionada aos refúgios florestais ocorridos no Pleistoceno (Jacobina *et al.*, 2011).

1.1 Justificativa

A heterocromatina constitutiva é uma importante fonte de variabilidade no cariótipo de mamíferos, de um modo geral (Graphodatsky *et al.* 2011), e nas espécies de *Sapajus* e *Cebus*, a caracterização das variações na HC extra-centromérica podem contribuir em estudos de filogenia (Nieves *et al.*, 2017).

O par cromossômico 11 de *S. nigrinus*, descrito como pequeno acrocêntrico com base em espécimes da Argentina (Mudry, 1990; Mudry *et al.*, 1991) e confirmado na população da Ilha da Marambaia, RJ (Penedo *et al.*, submetido), pode não ser o padrão em toda a distribuição da espécie. A análise citogenética a partir de amostras de dois indivíduos de cativeiro, identificados fenotipicamente como *S. nigrinus*, mas sem origem geográfica conhecida, revelou a presença de um grande bloco de HC terminal no par 11 (Penedo *et al.*, 2014). Além destes, indivíduos do estado do Rio de Janeiro já foram reportados com o mesmo padrão no par 11, em homozigose, sendo dois provenientes da cidade do Rio de Janeiro (Freitas & Seuánez, 1982), identificados como *Cebus apella*, mas provavelmente *S. nigrinus* de acordo com a sua origem geográfica, e outros seis indivíduos, também do estado do Rio de Janeiro (Matayoshi *et al.*, 1987), identificados como *Cebus apella nigrinus* (= *S. nigrinus*).

A distribuição de HC extra-centromérica nas espécies de *Sapajus* e *Cebus* parece seguir um gradiente, diminuindo em quantidade do oeste para o leste, e do norte para o sul (Nieves *et al.*, 2017). A compreensão de como essa distribuição se dá em *S. nigrinus*, entretanto, é dificultada pelo fato de as análises citogenéticas serem realizadas predominantemente em populações da Argentina (Mudry, 1990; Ponsà *et al.*, 1995; Nieves *et al.* 2011; Steinberg *et al.*, 2014; Nieves *et al.* 2017), que é o limite sul da distribuição da espécie (Fragaszy *et al.*, 2004; Vilanova *et al.*, 2005). Seguindo a hipótese de redução da HC extra-centromérica no sentido norte-sul (Nieves *et al.*, 2017) e considerando os relatos de *S. nigrinus* no Rio de Janeiro com grande bloco de HC terminal (Freitas & Seuánez, 1982; Matayoshi *et al.*, 1987; Penedo *et al.*, 2014), é possível que populações ao norte da distribuição tenham naturalmente maior conteúdo de HC extra-centromérica.

A diferença na distribuição de HC extra-centromérica no par 11 de *S. nigrinus* pode estar associada à descontinuidade filogeográfica descrita para espécies na Mata Atlântica, na região de São Paulo, decorrente de refúgios florestais no Pleistoceno (Grazziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Filho & Miyaki, 2011), como foi demonstrado em relação ao fenótipo (capítulo I). A expansão das análises citogenéticas, com estudos em localidades de *S. nigrinus* no sudeste do Brasil, principalmente no Rio de Janeiro, onde foram relatados indivíduos com grande bloco de HC terminal, pode auxiliar na confirmação de ambas as formas e demonstrar a ocorrência de um padrão de distribuição geográfica.

1.2 Objetivos

Analisar os padrões de HC extra-centromérica nos pares cromossômicos de *Sapajus nigrinus* em amostras dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, verificando a ocorrência de polimorfismo no par 11, assim como nos demais pares, e um possível padrão de distribuição geográfica. Hipótese: os pares cromossômicos com HC extra-centromérica nas amostras dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo serão condizentes com o descrito para *S. nigrinus*, e no par 11 serão observados ambos os padrões, com e sem o grande bloco de HC terminal, sendo caracterizados com polimorfismos geográficos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das amostras

Foram analisados os cariótipos dos 55 indivíduos, de ambos os sexos, de *S. nigritus* descritos no capítulo I, sendo 49 amostras *in situ* do Rio de Janeiro - cinco do Parque Nacional do Itatiaia (PNI), 26 da Ilha da Marambaia (IM), quatro do Parque Nacional da Tijuca (PNT), seis do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO) e oito da Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA) – e seis *ex situ*, sendo uma de Guaratiba (Gua), cidade do Rio de Janeiro, e cinco de cidades do leste do estado de São Paulo – capital (cSP), São José dos Campos (SJC), Paraibuna (PB), Campos do Jordão (CJ), e São Sebastião (SS - Figura 17).

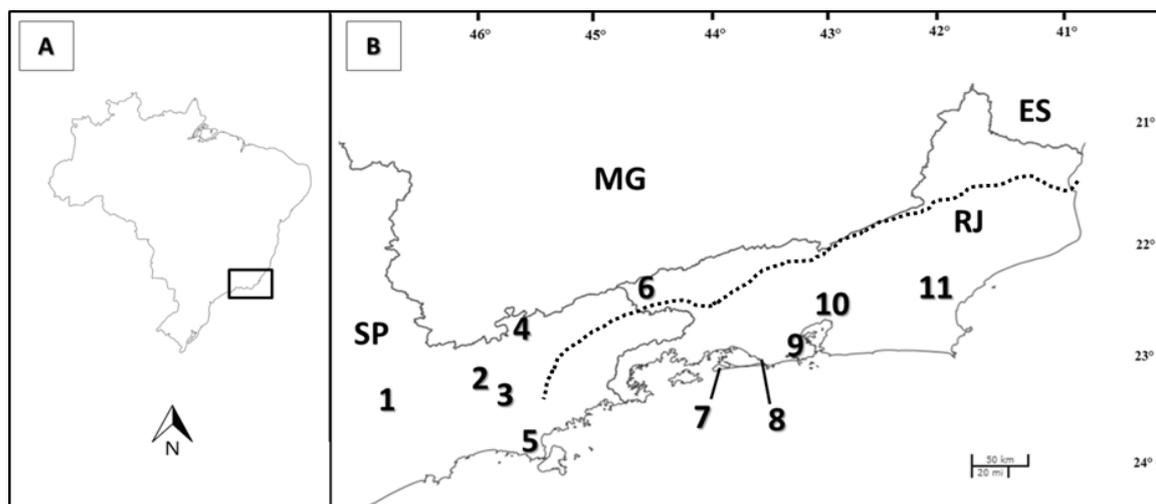


Figura 17: Distribuição das amostras de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae). (A) Mapa do Brasil. (B) Destaque para região leste do estado de São Paulo e estado do Rio de Janeiro com as 11 áreas de amostragem: 1 - cidade de São Paulo (cSP); 2 - São José dos Campos (SJC); 3 - Paraibuna (PB); 4 - Campos do Jordão (CJ); e 5 - São Sebastião (SS), SP; 6 - Parque Nacional do Itatiaia (PNI), cidade de Itatiaia; 7 - Ilha da Marambaia (IM), cidade de Mangaratiba; 8 - bairro de Guaratiba (Gua), cidade do Rio de Janeiro; 9 - Parque Nacional da Tijuca (PNT), cidade do Rio de Janeiro; 10 - Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), cidade de Teresópolis; 11 - Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), cidade de Silva Jardim, RJ. A linha pontilhada representa o Rio Paraíba do Sul.

As descrições dos locais de estudo *in situ* do estado do Rio de Janeiro, das instituições onde foram obtidas as amostras *ex situ*, os procedimentos de captura, sedação, identificação individual, retorno da sedação, soltura dos animais e licenças estão descritos nos itens 2.1, 2.2 e 2.4 do capítulo I.

2.2 Coleta de amostras biológicas

As amostras de sangue para as análises genéticas foram coletadas após a sedação e marcação dos animais. Após antissepsia do local da venopunção com álcool 70%, foram coletados, de cada animal, entre 2 e 4 mL de sangue da veia femoral utilizando seringas de 5mL e agulhas de calibre 20 x 5,5 mm. As amostras foram imediatamente transferidas para tubos de coleta estéreis contendo heparina sódica, para análise citogenética, e EDTA, para análises moleculares, sendo ambas armazenadas em isopor. O sangue em tubos com heparina

sódica foi implantado em meio de cultivo celular até 4h após a coleta, enquanto as amostras em EDTA foram armazenadas à 4°C em geladeira, no campo, e posteriormente transferidas para o Laboratório de Genética Animal do Departamento de Genética do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFRRJ, para extração de DNA e análise genética molecular (capítulo III).

As coletas de sangue dos indivíduos de cativeiro foram realizadas pelos Médicos Veterinários responsáveis de cada unidade, Dr^a. Hanna Kokubun do CRAS/UNIVAP e Dr. Jeferson Pires do CRAS/Estácio de Sá.

2.3 Cultivo celular

Os procedimentos para o cultivo de linfócitos do sangue periférico seguiram a técnica descrita por Moorhead *et al.* (1960). A implantação do sangue em cultivo celular foi iniciada em laboratórios improvisados nos locais de captura, buscando seguir os procedimentos de assepsia necessários para evitar contaminação. Nas coletas dos animais *ex situ*, a implantação do sangue foi realizada no laboratório Laboratório de Genética Animal do Departamento de Genética do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFRRJ, após transporte do sangue em isopor.

Foram adicionadas pelo menos oito gotas de sangue total em cada tubo *Falcon* de 15 mL contendo meio de cultura RPMI – 1640 (4 mL - *Vitrocell Embriolife*[®]) acrescido de 1 mL de soro fetal bovino (*Vitrocell Embriolife*[®]), que propicia a nutrição das células, além de 10 U (0,1 mL) de fitohemaglutinina (*Vitrocell Embriolife*[®]). Esta última promove a desdiferenciação dos linfócitos para que entrem em divisão celular *in vitro* (Kasahara, 2009). A cultura foi mantida, em banho-maria, à 37°C por 71h. Após 71h, 25 U de colchicina (10^{-5} M) foram adicionadas à cultura celular, que retornou ao banho-maria por mais uma hora à 37°C. Este procedimento interrompe o fuso mitótico, permitindo obter os cromossomos em metáfase, etapa na qual se encontram em grau máximo de condensação favorecendo o estudo do cariótipo. Completadas 72h, os tubos foram centrifugados por 5 min a 200 xg e o sobrenadante descartado. Foram acrescentados 5 mL de solução hipotônica de Cloreto de Potássio (KCl) a 0,075 M. A absorção dessa solução pelas células as tornam túrgidas, proporcionando uma melhor separação dos cromossomos na tentativa de diminuir sobreposições na lâmina (Kasahara, 2009). Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 20 min. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados a 200 xg durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e a fixação do material realizada adicionando-se ao *pellet* 5 mL de solução fixadora gelada (metanol e ácido acético, 3:1) sob agitação no vórtex, permanecendo em temperatura ambiente por 15 min. Essa solução promove a morte rápida das células e preserva a estrutura dos cromossomos. O processo de centrifugação e adição de solução fixadora foi repetido por mais duas vezes, acrescentando-se, por vez, 3 mL e 2 mL. O material foi armazenado em congelador a aproximadamente -10°C. Nos casos onde os procedimentos foram realizados em campo, o cultivo celular foi transportado posteriormente, em isopor com gelo, para o Laboratório de Genética Animal do Departamento de Genética do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

No laboratório, foi realizada nova centrifugação a 200 xg durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e um volume de solução fixadora gelada, proporcional ao *pellet*, foi adicionado. A solução foi homogeneizada e duas gotas do material foram pingadas, com o auxílio de pipeta *Pasteur*, em lâminas limpas com álcool 70% e previamente bafejadas, de modo a umedecê-las e permitir um melhor espalhamento do material. Para o armazenamento permanente do material, os tubos *Falcon* foram centrifugados a 200 xg durante 5 min, o

máximo possível de sobrenadante foi descartado e adicionado volume de metanol proporcional ao *pellet*. Após ressuspensão do material, todo o conteúdo foi transferido para tubos de 2 mL e armazenados em *freezer* a -18°C . Quando necessária a preparação de novas lâminas, uma parte da solução contendo o material em metanol foi pipetada com micropipeta para um tubo de 0,5 mL, adicionando-se ácido acético respeitando a proporção 3:1. A solução, homogeneizada, foi pingada em lâmina conforme descrito anteriormente.

2.4 Coloração convencional

As lâminas foram coradas utilizando-se solução de *Giemsa*[®] (Merck) 4% em água destilada por 6 min. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente. Foi utilizado microscópio óptico da marca *Olympus*, modelo CH30RF100, com objetiva de 10x para localização das metáfases e de 100x para a análise dos cromossomos e fotografia.

2.5 Hibridização por fluorescência *in situ* (FISH)

As técnicas sequenciais de FISH foram realizadas pela Dr^a. Mariela Nieves, no laboratório do Departamento de Ecología, Genética y Evolución, da Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina, utilizando um protocolo desenvolvido por sua equipe (comum. pess.). O material contido nas lâminas, preparadas no mesmo dia, foi desidratado com soluções contendo concentrações crescentes de etanol (70%, 90% e 100%), ficando imersas por 2 min em cada uma delas. A hibridização com as sondas (21WCP ou #11qHe+) foi feita colocando-se 3,5 μL de mix de hibridização (composto por 30% de formamida, 30% de polietilenoglicol, 10% de 20x SSC, 28% de iodeto de sódio e 2% de Tween) + 0,5 μL de cada sonda sobre o local da lâmina onde foram identificadas as metáfases, cobrindo com uma lamínula e selando com cola plástica removível. O conjunto lâmina + lamínula foi mantido a 70°C por 8 min para desnaturação e posteriormente em câmara úmida, a 37°C até o dia seguinte para hibridização das sondas. Na pós-hibridização, as lâminas foram lavadas em solução de 0,4x SSC e 0,3% Tween, a 70°C por 2 min. Após secas, as lâminas foram lavadas em nova solução de 2x SSC e 0,1% Tween a temperatura ambiente por 2 min. Após as lâminas estarem novamente secas, foi aplicado 15 μL de DAPI-antifade (diluição de 5 μL de solução estoque de DAPI, a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em 1mL de solução *antifade*, composta por 10 mg/mL de p-dicloridrato de fenilenodiamina diluído em PBS) e cobertas novamente com lamínula. As metáfases foram analisadas em microscópio Leica DMLB de fluorescência e fotografadas com a câmera do aparelho (Leica DFC340FX - Meyer Instruments, Inc).

2.6 Bandamento de heterocromatina constitutiva (banda C)

A técnica de banda C foi realizada segundo Sumner (1972) em lâminas envelhecidas por sete dias em temperatura ambiente, cujas metáfases com coloração convencional foram previamente identificadas e analisadas. Primeiramente, as lâminas foram imersas em solução de ácido clorídrico (HCl) 0,02 N por 5 min e, em seguida enxaguadas em água destilada e secas ao ar. Posteriormente, foram colocadas por aproximadamente 3 min em solução de Hidróxido de Bário ($\text{Ba}[\text{OH}]_2$) a 5%, preparada no dia anterior e deixada *overnight* em banho-maria a 37°C . As lâminas foram novamente lavadas, secas ao ar e imersas por aproximadamente 5 min em solução salina de cloreto e citrato de sódio (2x SSC - 17,55 g de

NaCl + 8,82 g de Citrato de Sódio para 1 L de água destilada) a 60°C. Essa solução foi preparada no dia anterior e mantida em estufa *overnight* a 60°C. As lâminas, após serem novamente lavadas e secas, foram coradas em solução de *Giemsa*[®] (*Merck*) 4% por 6 min. Em seguida, foram analisadas ao microscópio com objetivas de 10 e 100x de aumento.

2.7 Banda G

A técnica de banda G foi realizada segundo Seabright (1971) em lâminas de sete dias, mantidas em temperatura ambiente. Inicialmente, as lâminas foram imersas em solução de tripsina (0,1 g de tripsina em 100 mL de solução Dulbecco) em período que variou de 8 a 20 segundos. Em seguida, foram imediatamente imersas em solução tampão fosfato gelada, de modo a interromper a ação da enzima. Por fim, as lâminas foram coradas em solução de *Giemsa* (4 mL do corante, 50 mL de tampão fosfato e 46 mL de água destilada) e analisadas ao microscópio, com objetivas de 10 e 100x de aumento.

2.8 Registro fotográfico das metáfases e organização do cariótipo

Nas técnicas de citogenética clássica, as metáfases foram fotografadas em objetiva de 100x, com máquina digital *Sony Cyber-shot*[®] de 14.1 mega pixels e as imagens foram transferidas para o computador. Os cariótipos foram montados utilizando o programa *Adobe*[®] *Photoshop*[®] CS3, seguindo a organização dos cromossomos conforme Nieves (2007) e Nieves *et al.* (2017).

3 RESULTADOS

Foram analisadas ao menos 15 metáfases com coloração convencional e banda C de cada um dos 55 indivíduos de *S. nigritus* amostrados nas 11 localidades do Rio de Janeiro e de São Paulo. O bandamento G foi bem-sucedido apenas em metáfases provenientes de duas amostras da IM e uma do PNT, sendo analisadas 10 metáfases por indivíduo. As marcações por FISH foram obtidas a partir de amostras de dois indivíduos da IM, um de Gua e dois do PNI. Com esta técnica, foram analisadas ao menos 10 metáfases por indivíduo.

3.1 Coloração convencional

Foi identificado complemento cromossômico $2n=54$, XX ou XY (NF = 76) para todos os indivíduos de *S. nigritus* analisados, com nove pares de autossomos submetacêntricos, um metacêntrico e os demais 16 pares, acrocêntricos. Os cromossomos sexuais eram submetacêntricos, tendo o X tamanho equivalente ao do par 4 e o Y, ao par 23. No par 11 foi identificado polimorfismo de tamanho, sendo equivalente ao par 23 nas amostras da IM, PARNASO, RBPA, PNT, Gua, CJ, SS e cSP e representando o maior acrocêntrico nas amostras do PNI, SJC e PB (Figura 18).

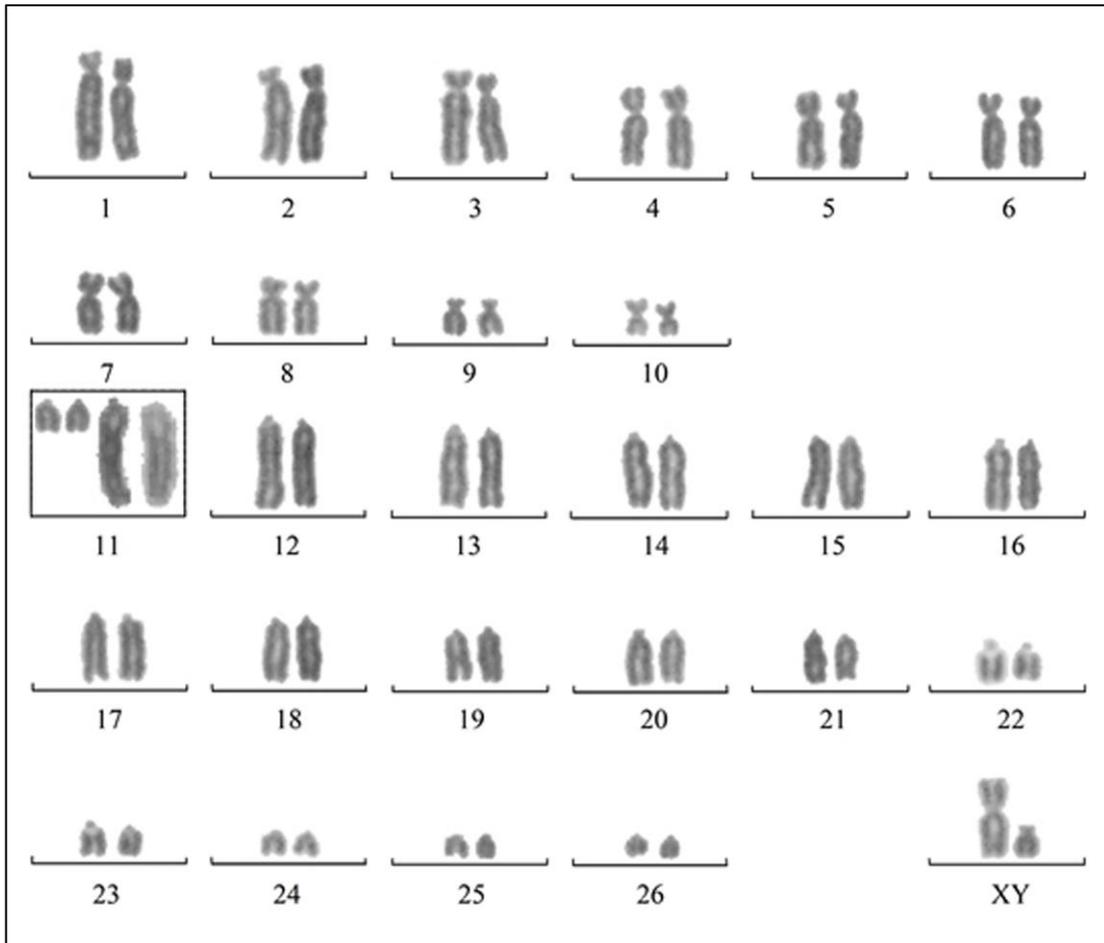


Figura 18: Cariótipo de um indivíduo macho ($2n=54,XY$) de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae), com coloração convencional, demonstrando o padrão observado nos indivíduos estudados. Estão representadas as duas formas do par cromossômico 11 (caixa): pequeno (à esquerda) nas amostras da Ilha da Marambaia, Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Reserva Biológica de Poço das Antas, Parque Nacional da Tijuca, bairro de Guaratiba, estado do Rio de Janeiro, além das amostras de Campos do Jordão, São Sebastião e cidade de São Paulo, SP; e grande (direita) nas amostras do Parque Nacional do Itatiaia, RJ, além de São José dos Campos e Paraibuna, SP.

3.2 Sondas 21WCP e #11qHe+

A identificação dos dois padrões distintos no par cromossômico 11 foi possível através da utilização das sondas 21WCP (em vermelho) e #11qHe+ (em verde). Nos dois indivíduos da IM e no de Gua, esse par foi identificado como um pequeno acrocêntrico, sem presença de HC extra-centromérica, a qual foi identificada, em diferentes proporções, em outros sete pares cromossômicos nos indivíduos da IM (Figura 19A) e em cinco pares do indivíduo de Gua (Figura 19B). Nas amostras do PNI, o par 11 foi o maior acrocêntrico, possuindo grande bloco de HC extra-centromérica terminal. Além deste, mais quatro pares cromossômicos foram marcados com a sonda #11qHe+ nas amostras desses indivíduos (Figura 19C).

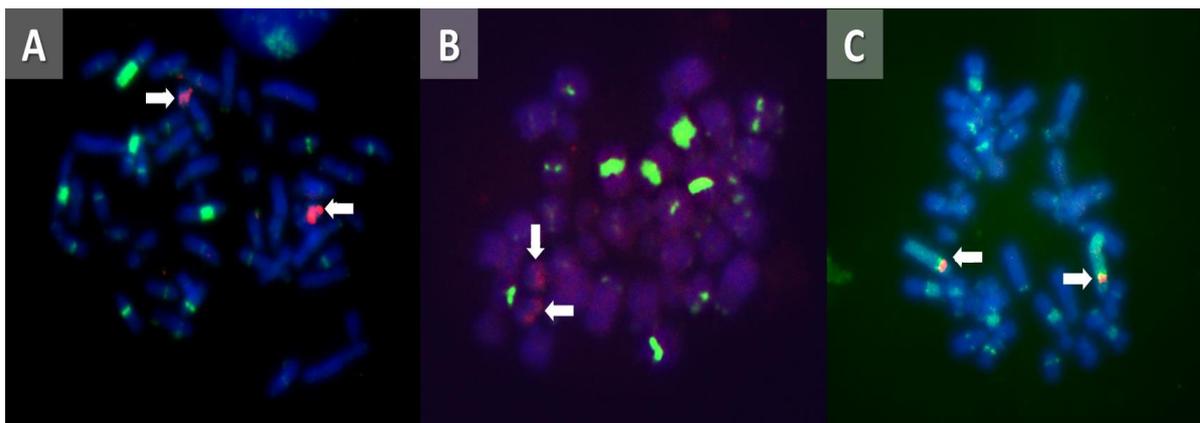


Figura 19: Metáfases de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) com hibridização pelas sondas 21WCP (vermelho) e #11qHe+ (verde). Aumento de 1000x. (A) Marcações em uma fêmea da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ e (B) no indivíduo macho de Guaratiba, cidade do Rio de Janeiro, RJ. As setas apontam o par cromossômico 11, pequeno acrocêntrico sem heterocromatina constitutiva extra-centromérica. (C) Marcações em um macho do Parque Nacional do Itatiaia, RJ. As setas indicam os cromossomos do par 11 como um dos maiores do cariótipo, com grande bloco de heterocromatina constitutiva terminal.

3.3 Distribuição da heterocromatina constitutiva extra-centromérica nos pares cromossômicos

Foram observadas regiões de HC extra-centromérica nos pares cromossômicos 4, 12, 13 e 17 de todos os indivíduos de *S. nigritus* estudados. O par 11 foi observado com grande bloco de HC extra-centromérica nas amostras dos indivíduos do PNI e dos indivíduos de SJC e PB. O par 6 foi marcado nos indivíduos do PARNASO, da RBPA e da IM (somente alguns indivíduos). No par 19, foram observadas marcações de banda C nas amostras dos indivíduos do PARNASO e da IM (somente alguns indivíduos). Por fim, foram observadas marcações no par 21 do indivíduo de Gua, além de alguns da IM.

Em todos os 26 indivíduos amostrados na IM foram observadas marcações nos pares 4, 12, 13 e 17, além dos pares 6, 19 e 21 de forma inconsistente (isto é, observadas em metáfases de alguns indivíduos). No par 11 não foi observado bloco de HC extra-centromérica (Figura 20A). No par 13, foi observado polimorfismo de banda C. Em 13 indivíduos, esse par foi observado com tamanho semelhante ao 12 e marcação de um bloco de HC intercalar proximal em homozigose (Figura 20A). Em dez indivíduos, foi evidenciada marcação de banda C em heterozigose neste par, na qual se observou, em um dos cromossomos, o mesmo padrão descrito anteriormente e no seu homólogo um bloco intercalar menor e mais distal, com tamanho total reduzido (Figura 20B - direita). Em três indivíduos, ambos os cromossomos do par 13 foram observados com tamanho menor que o 12, sendo identificada marcação de banda C em heterozigose, com um bloco intercalar proximal em um cromossomo e um bloco mais distal em seu homólogo (Figura 20C).

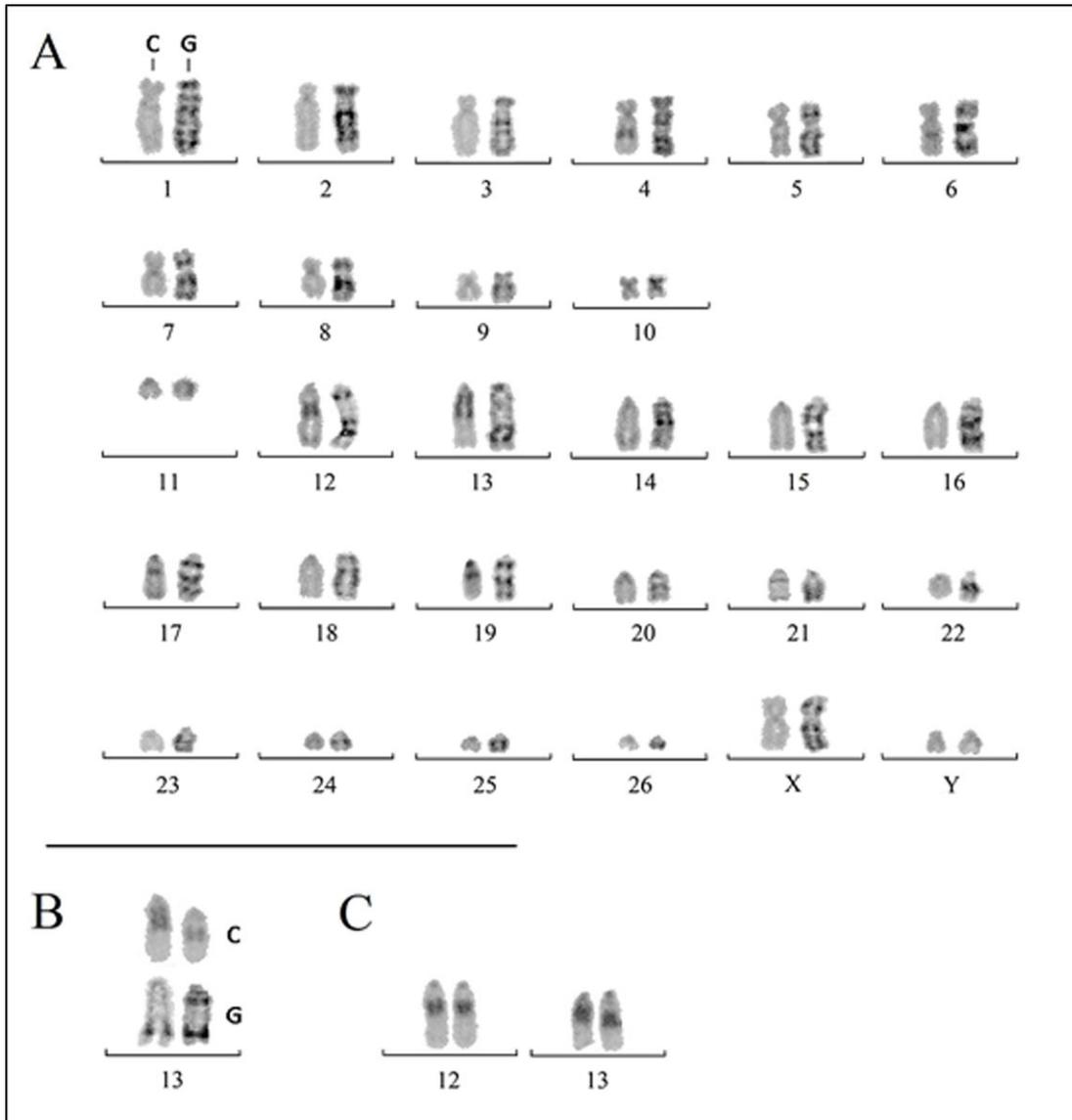


Figura 20: Cariótipo com bandamento C e G em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. Pares 4, 12, 13 (polimórfico) e 17 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica nas amostras de todos os indivíduos, além dos pares 6, 19 e 21 de forma menos consistente. (A) Par cromossômico 11 como um pequeno acrocêntrico. Está sendo representado o par 13 com bloco proximal em homozigose, identificado em 13 indivíduos; (B) padrão, com banda C e G, semelhante ao apresentado em "A" (esquerda) e seu homólogo (direita) com tamanho reduzido e bloco intercalar distal, identificados em dez indivíduos; (C) ambos os homólogos do par 13 são menores que o par 12, com blocos intercalares, sendo um proximal e outro distal, identificado em três indivíduos.

Nos cinco indivíduos capturados no PNI foi identificada banda C nos pares 4, 11 (com grande bloco de HC terminal), 12, 13 e 17 (Figura 21). Em três deles, o par 11 foi observado com marcações de HC extra-centromérica terminal em homozigose (Figura 21A), enquanto nos outros dois, esse par foi identificado com marcações em heterozigose, com deleção parcial do bloco heterocromático, reduzindo o tamanho total (Figura 21B).

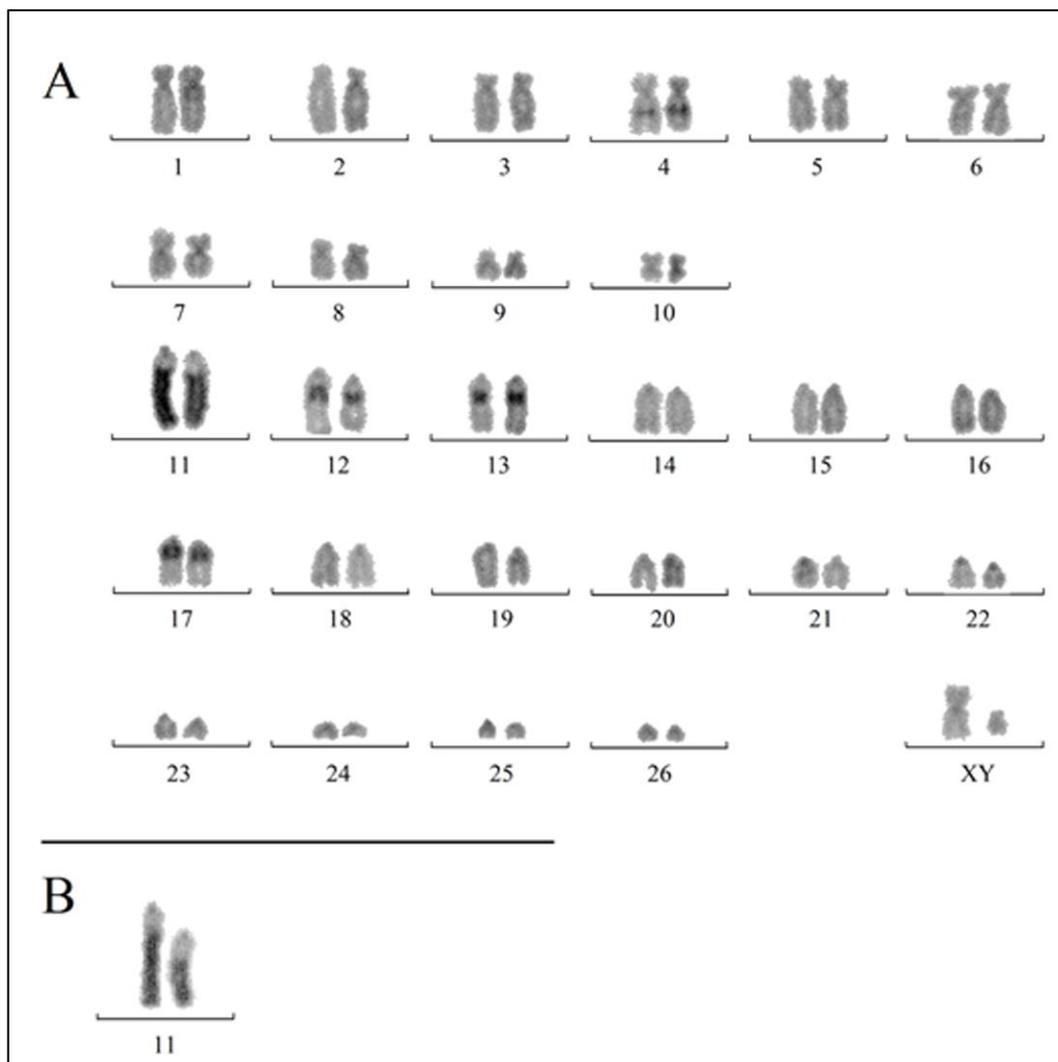


Figura 21: Cariótipo com bandamento C em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) do Parque Nacional do Itatiaia, RJ. Pares 4, 11 (polimórfico), 12, 13 e 17 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica. (A) Par cromossômico 11 com grande bloco heterocromático em homozigose, identificado em três indivíduos; (B) homólogos do par cromossômico 11 em heterozigose para o tamanho da banda, identificado em dois indivíduos.

Em todos os seis indivíduos amostrados no PARNASO foi observada marcação de banda C nos pares 4, 6, 12, 13, 17 e 19 (Figura 22). No par cromossômico 12 foi identificado polimorfismo na posição do bloco de HC extra-centromérica. Em quatro indivíduos, um dos cromossomos foi observado com bloco intercalar proximal e no seu homólogo, um mais distal (Figura 22A). Nos dois indivíduos restantes foram identificados bandamentos intercalares em homozigose nesse par, sendo proximal em um (Figura 22B) e distal no outro (Figura 22C). Devido à ausência de HC extra-centromérica em grande bloco, o par 11 foi identificado como um pequeno acrocêntrico.

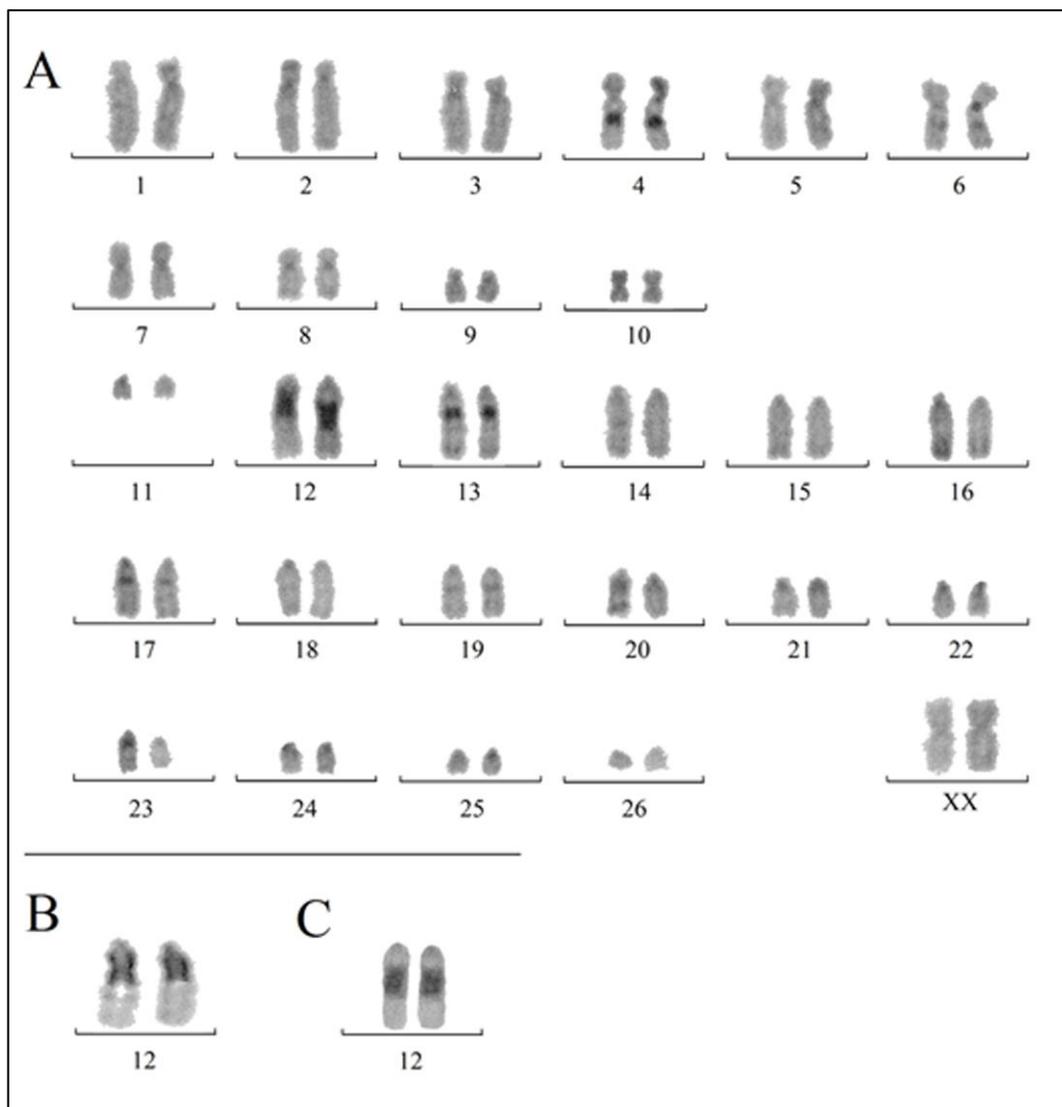


Figura 22: Cariótipo com bandamento C em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ. Pares 4, 6, 12 (polimórfico), 13, 17 e 19 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica. (A) Par cromossômico 12 com blocos heterocromáticos intercalares em heterozigose, sendo um mais próximo e outro mais distal ao centrômero, identificado nas amostras de quatro indivíduos; (B) homólogos do par 12 em homozigose para a posição da banda, de forma proximal, identificados em um indivíduo; (C) homozigose para posição da banda, de forma intercalar e distal no par 12, identificado em um indivíduo.

Nos oito indivíduos da RBPA, marcações de banda C foram observadas nos pares cromossômicos 4, 6, 12, 13 e 17 (Figura 23). O par cromossômico 11 foi identificado como um pequeno acrocêntrico devido à ausência do grande bloco de HC extra-centromérica.

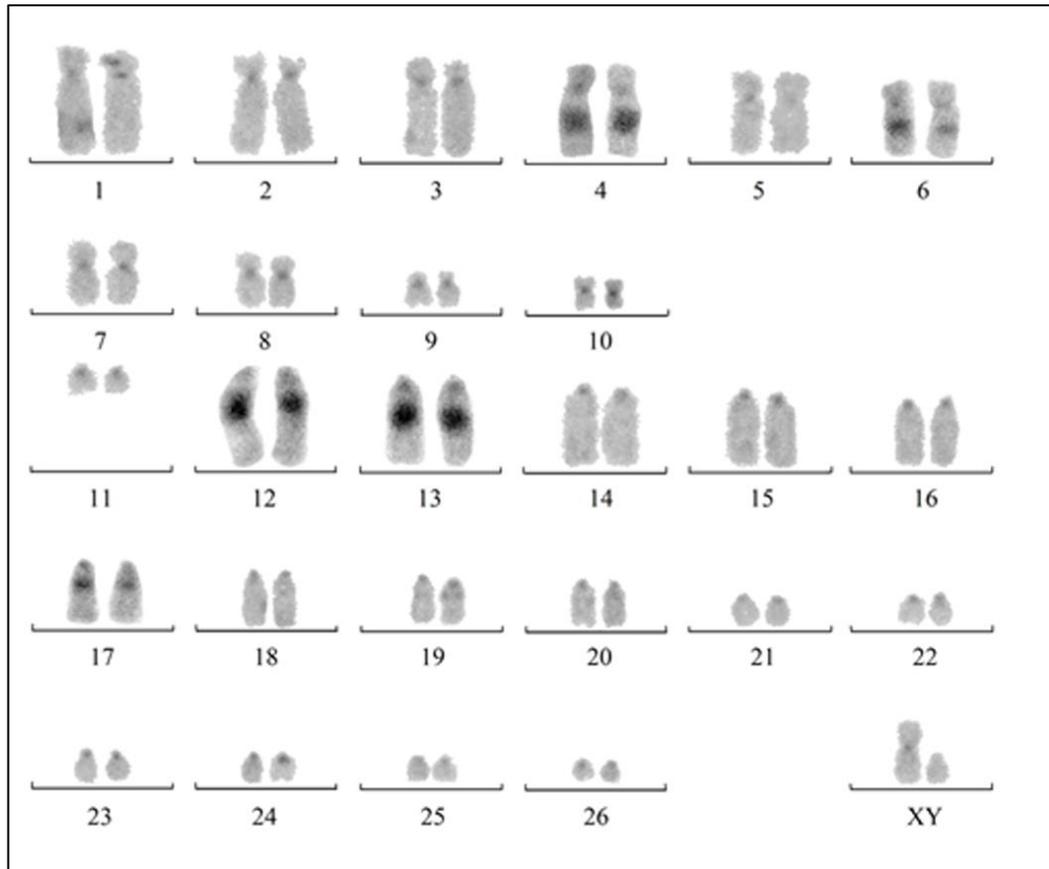


Figura 23: Cariótipo com bandamento C em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) da Reserva Biológica de Poço das Antas, RJ. Pares 4, 6, 12, 13 e 17 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica.

Nos quatro indivíduos do PNT foram observadas marcações de banda C nos pares cromossômicos 4, 12, 13 e 17 (Figura 24). O par cromossômico 11 foi observado como um pequeno acrocêntrico e o par 12 com bloco de HC intercalar proporcionalmente maior do que o descrito na maioria das localidades.

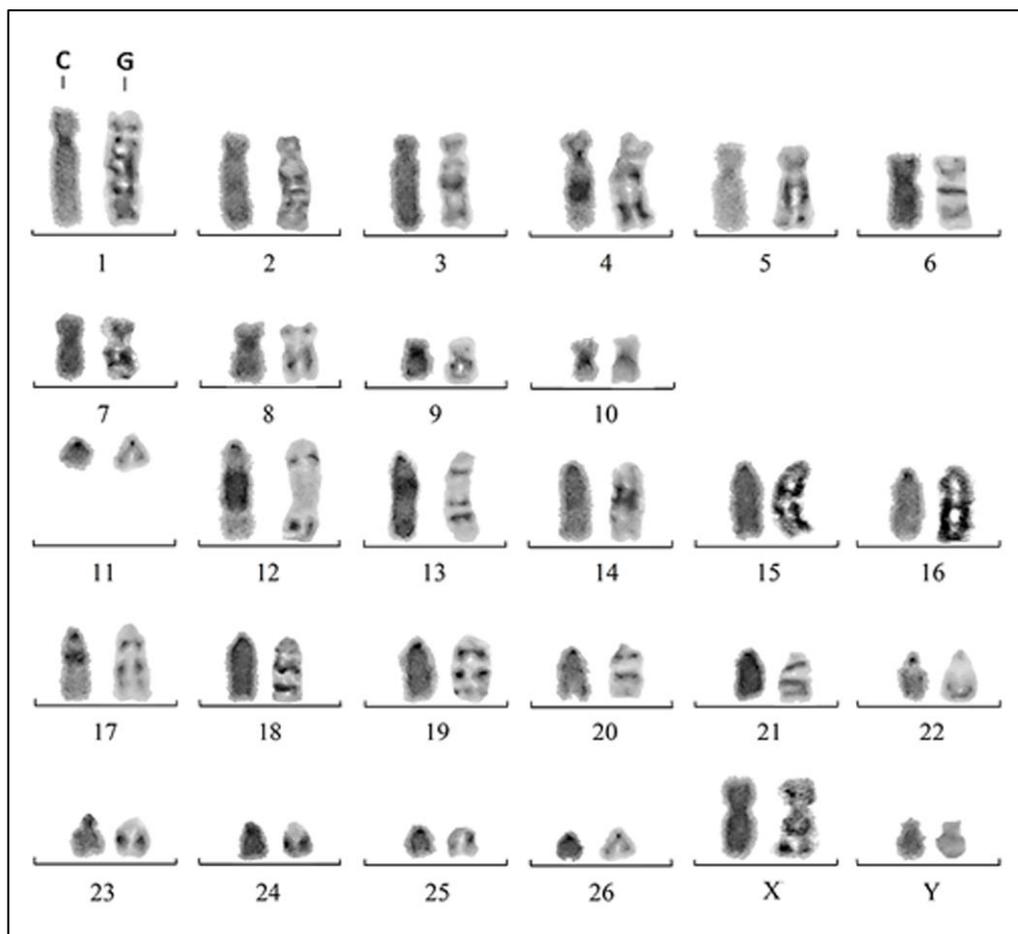


Figura 24: Cariótipo com bandamento C e G em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) do Parque Nacional da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ. Pares 4, 12, 13 e 17 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica.

No indivíduo de Gua, foram observadas marcações nos pares 4, 12, 13, 17 e 21. O par cromossômico 11 foi identificado como um pequeno acrocêntrico, com deleção total do bloco heterocromático. Nos pares 12 e 13, os blocos intercalares foram identificados com tamanho proporcionalmente maior do que o observado na maioria das amostras estudadas (com exceção do par 12 dos indivíduos do PNT), ocupando maior porcentagem dos cromossomos, enquanto o par 4 foi identificado com heterozigose no tamanho da banda C (Figura 25).

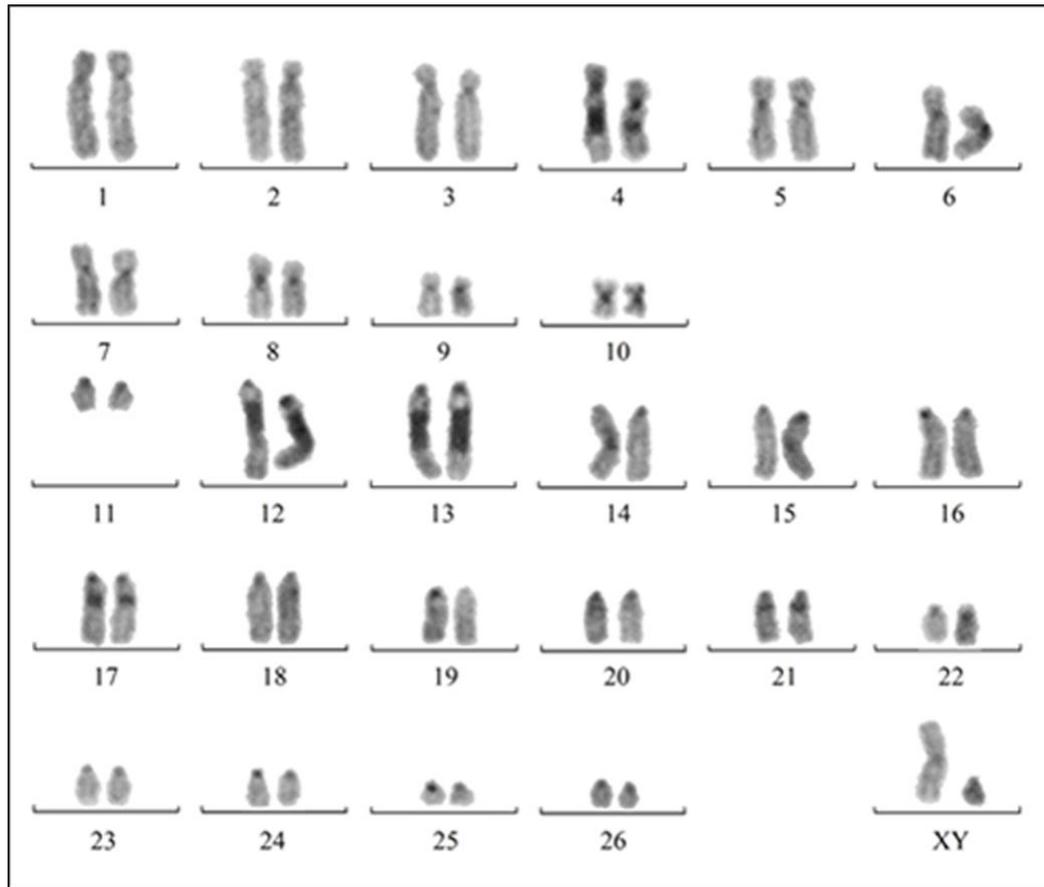


Figura 25: Cariótipo com bandamento C em um indivíduo de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) do CRAS/Estácio de Sá, oriundo do bairro de Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ. Pares 4 (polimórfico), 12, 13, 17 e 21 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica.

Nos cinco indivíduos amostrados no CRAS/UNIVAP, da região leste do estado de São Paulo, foram observadas marcações de banda C nos pares 4, 12, 13 e 17 em todos eles (Figura 26). Nas amostras de CJ, SS e cSP, os cromossomos do par 11 foram observados como pequenos acrocêntricos (Figura 26A). Nos outros dois indivíduos o par 11 foi observado com grande bloco de HC terminal, em homozigose no indivíduo de PB (Figura 26B) e em heterozigose com relação ao tamanho da banda no indivíduo de SJC (Figura 26C). O par cromossômico 12 foi identificado com polimorfismo de banda C em dois indivíduos (SS e cSP), sendo um bloco intercalar distal e outro proximal (Figura 26A). Nos três indivíduos restantes, o par 12 foi observado com padrão de banda C em homozigose, sendo proximal no indivíduo de PB e distal nos indivíduos de SJC e CJ.

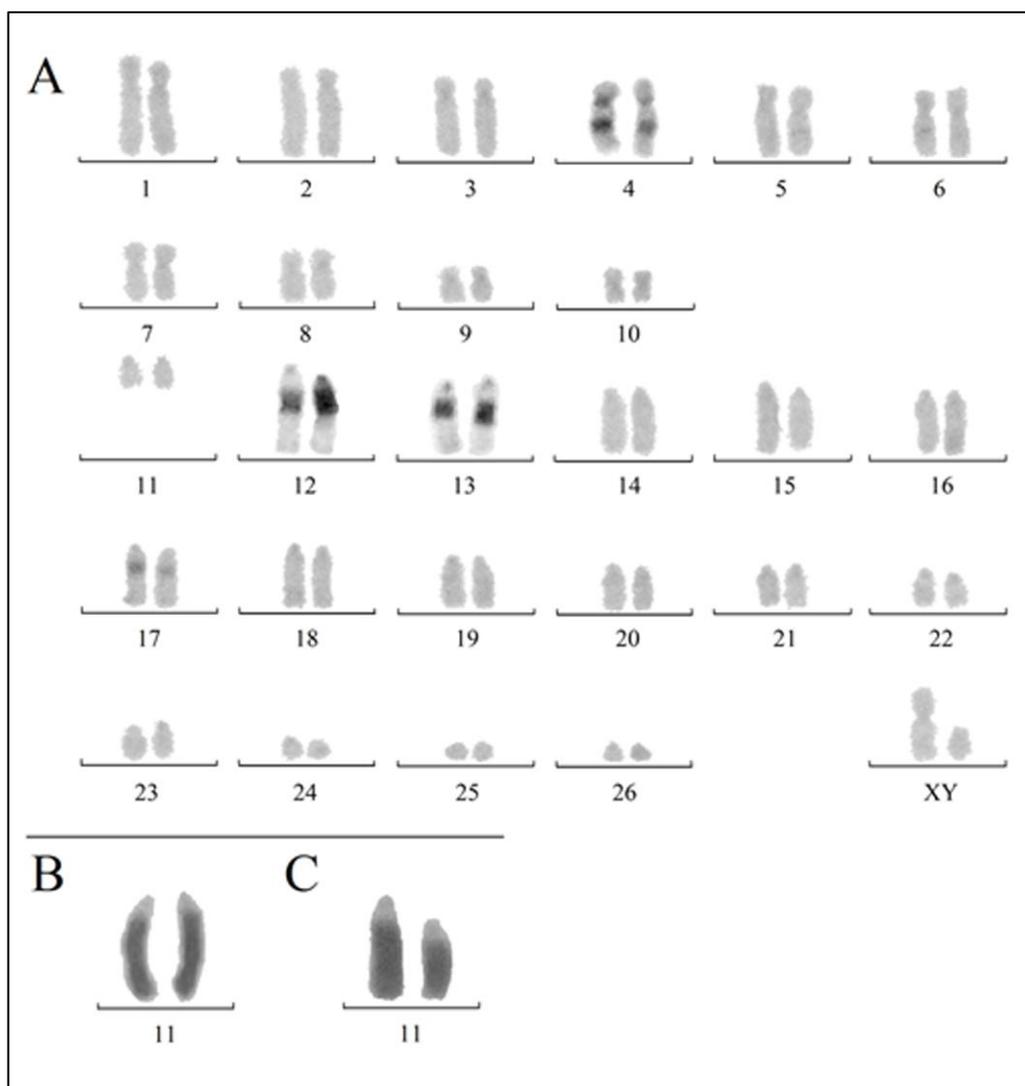


Figura 26: Cariótipo com bandamento C em indivíduos de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae) alocados no CRAS/UNIVAP, provenientes da região leste do estado de São Paulo. Pares 4, 12, 13 e 17 com presença de heterocromatina constitutiva extra-centromérica. (A) par cromossômico 11 pequeno acrocêntrico em três indivíduos (Campos do Jordão, São Sebastião e cidade de São Paulo), além de ambos os representantes do polimorfismo de posição da banda heterocromática encontrado no par 12, observado em heterozigose nos indivíduos de São Sebastião e da cidade de São Paulo; (B) Par cromossômico 11 com grande bloco heterocromático em homozigose em um indivíduo da cidade de Paraibuna; (C) par cromossômico 11 com grande bloco heterocromático em heterozigose (deleção parcial) no indivíduo da cidade de São José dos Campos.

4 DISCUSSÃO

O cariótipo de todos os indivíduos amostrados neste estudo foi identificado com número diploide e morfologia dos cromossomos compatível com o descrito para as espécies de *Sapajus* (Matayoshi *et al.*, 1986). O cromossomo Y, identificado como um pequeno submetacêntrico, diverge da maioria das publicações, sendo geralmente descrito como acrocêntrico (Matayoshi *et al.*, 1986; Clemente *et al.*, 1987; Mudry de Pargament &

Slavutsky, 1987; Mudry, 1990; Amaral *et al.*, 2008; Iughetti, 2008). A morfologia do cromossomo Y como submetacêntrico já foi descrita em espécimes de *Cebus apella* do Rio de Janeiro, Bahia e Pará (Freitas & Seuánez, 1982), que atualmente representam, de acordo com a distribuição geográfica, *S. nigritus*, *S. xanthosternos* e *S. apella*, respectivamente. A ocorrência desse polimorfismo provavelmente decorre de inversão pericêntrica. A forma submetacêntrica, por ser menos identificada nas espécies de *Sapajus*, talvez seja mais derivada. Esse cromossomo sexual já foi descrito com polimorfismos em outras espécies de Platyrrhini, como *Alouatta*, *Ateles* e *Callicebus* (Koiffmann & Saldanha, 1974; Armada *et al.*, 1987; Barros *et al.*, 2003; Nieves *et al.*, 2005b) e parece ser comum nesse nível taxonômico.

As marcações de banda C observadas nos pares cromossômicos 4, 12, 13 e 17, de todos os indivíduos de *S. nigritus* deste estudo, além dos pares 6, 19 e 21 nos indivíduos de algumas localidades, já foram descritas, com a técnica de citogenética clássica ou com a utilização da sonda #11qHe+, para a espécie (Mudry, 1990; Mudry *et al.*, 1991; Ponsà *et al.*, 1995; Steinberg *et al.*, 2014; Nieves *et al.*, 2017; Penedo *et al.*, submetido).

A identificação de HC terminal em grande bloco no par 11 nos indivíduos do PNI, SJC e PB, confirma a ocorrência dessa forma cromossômica demonstrada nos achados anteriores em amostras de *S. nigritus* do estado do Rio de Janeiro (Freitas & Seuánez, 1982; Matayoshi *et al.*, 1987) e em indivíduos de cativeiro, sem origem conhecida, mas identificados fenotipicamente (Penedo *et al.*, 2014).

Esse par cromossômico havia sido identificado anteriormente nos indivíduos da IM com HC intercalar, utilizando a metodologia de citogenética clássica (Penedo, 2016), devido à semelhança com o padrão descrito como específico de *S. xanthosternos* (Seuánez *et al.* 1986). Essa identificação foi influenciada ainda pela similaridade obtida entre as sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase II destas amostras com *S. xanthosternos* (Penedo, 2016). Com o uso da sonda 21WCP, foi confirmado que o par 11 é um pequeno acrocêntrico nas amostras dessa população (Penedo *et al.*, submetido), correspondendo ao já descrito nas populações da Argentina (Mudry, 1990; Mudry *et al.*, 1991; Ponsà *et al.*, 1995; Steinberg *et al.*, 2014; Nieves *et al.*, 2017). Este polimorfismo foi identificado também em amostras do PARNASO, RBPA, PNT, Gua, CJ, SS e cSP. Desse modo, a única espécie com HC intercalar no par 11 continua sendo *S. xanthosternos*, embora ainda não tenham sido implementadas as sondas #11qHe+ e 21WCP para sua confirmação.

As marcações de banda C nos pares 4, 12 e 13, observadas em todos os 55 indivíduos analisados em SP e no RJ, confirmam o descrito em populações da Argentina, onde esses pares são os mais frequentemente observados com HC extra-centromérica (Nieves *et al.*, 2017), e talvez seja o padrão em toda distribuição de *S. nigritus*. A mesma consideração pode ser feita para a menor frequência de marcação nos pares 6, 19 e 21, observada tanto nas amostras de SP e RJ, quanto na Argentina (Nieves *et al.*, 2017). Diferente desses, o par 17 foi observado com HC intercalar em todos os indivíduos amostrados em SP e RJ, mas possui baixa frequência de marcação nas populações da Argentina (Nieves *et al.*, 2017), o que pode indicar uma tendência biogeográfica na distribuição da HC extra-centromérica desse par.

A marcação de banda C no par 21, somente observada nas localidades da IM e Gua, do mesmo modo que a ocorrência do bloco de HC intercalar no par 12 com tamanho relativamente maior em Gua e PNT, parecem ter origens geográficas definidas, por terem sido compartilhados por localidades próximas. Entretanto, não foi possível estabelecer, para a maioria das marcações ou polimorfismos de HC extra-centromérica, um padrão de distribuição geográfica.

Considerando as localidades amostradas em SP e no RJ, somente no par 11 a distribuição da HC extra-centromérica parece seguir um padrão biogeográfico, evidenciado principalmente pela ocorrência do pequeno acrocêntrico nas localidades mais a leste (IM, Gua, PNT, PARNASO e RBPA). A ocorrência de ambas as formas dentre as localidades do PNI e cidades de São Paulo, sem um padrão de distribuição geográfica definido, parece estar associada à zona de descontinuidade filogeográfica decorrente de refúgios florestais, relatada para espécies animais neste trecho da Mata Atlântica (Grazziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Filho & Miyaki, 2011), como uma área de transição. Outra possibilidade é que o polimorfismo decorrente de deleção tenha surgido como forma derivada nesta região, uma vez que o grande bloco de HC terminal é compartilhado com as demais espécies de *Sapajus* e *Cebus*. A partir de São Paulo, a radiação dos ancestrais de *S. nigritus* teria mantido o pequeno acrocêntrico em predomínio a leste, no RJ (IM, Gua, PNT, PARNASO e RBPA) e a sul, na Argentina (Mudry, 1990; Mudry *et al.*, 1991; Ponsà *et al.*, 1995; Nieves *et al.*, 2017). O grande bloco de HC terminal deve ser investigado em outras populações ao norte (Minas Gerais e Espírito Santo) e ao sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), de modo que se possa confirmar o padrão de distribuição das distintas formas.

Rearranjos na HC extra-centromérica são comuns e fazem parte do processo evolutivo das espécies de Platyrrhini (Garcia *et al.*, 1983; Nieves *et al.*, 2005a). Os pares 11, 12 e 13 foram observados nas localidades de SP e RJ com maior ocorrência de rearranjos na HC extra-centromérica, diferente do descrito em populações da Argentina, nas quais foram observadas mais variações nos pares 6, 17 e 19 (Nieves *et al.*, 2017), o que pode indicar tendências evolutivas distintas em cada uma dessas regiões.

O polimorfismo de tamanho da região de HC extra-centromérica em heterozigose, observado no par 11 de dois indivíduos do PNI e do indivíduo de SJC, é decorrente de deleção parcial. Uma vez que regiões de HC representam porções do DNA transcricionalmente inativas (Grewal & Moazed, 2003), essa perda não resulta em alteração fenotípica nos indivíduos e parece ser comum nas espécies de *Sapajus*. A deleção parcial do grande bloco de HC do par 11, em heterozigose, já foi relatada, sem menção à alteração fenotípica, em indivíduos de cativeiro identificados como *C. apella* (Garcia *et al.*, 1983). A ocorrência de heterozigose, com o pequeno acrocêntrico e o grande bloco de HC terminal, já foi considerada como indicativo de hibridação em indivíduos de cativeiro, identificados fenotipicamente como *S. nigritus* (Nieves *et al.*, 2008). É possível que esses indivíduos, identificados como híbridos, tenham sido gerados a partir de cruzamento entre populações distintas de *S. nigritus*.

O par identificado como 12 em *S. nigritus* da IM, com banda C intercalar e polimorfismo de tamanho e posição (Penedo, 2016) é, na verdade, o par 13, confirmado por bandamento G. O polimorfismo neste par cromossômico provavelmente resultou de inversão paracêntrica, um dos rearranjos mais comuns para as espécies de *Sapajus* (Ruiz-Herrera *et al.*, 2004), além de duplicação. A diferença na posição dos blocos de HC intercalar, de forma distal e proximal, observada no par 12 dos indivíduos do PARNASO e daqueles do estado de SP também devem decorrer de inversão paracêntrica. As marcações de banda C nos pares 4 (em heterozigose de tamanho), 12 e 13 do indivíduo de Gua e no par 12 nas amostras do PNT são as que ocupam a maior porcentagem desses pares cromossômicos dentre as localidades amostradas e provavelmente foram originadas a partir da duplicação da região de HC intercalar.

A diversidade genética evidenciada nos polimorfismos de HC extra-centromérica em *S. nigritus* deve ser levada em consideração para a conservação da espécie. A área amostrada,

na qual ambas as formas do par cromossômico 11 foram observados, e onde a deleção da HC terminal pode ter gerado o pequeno acrocêntrico, deve receber especial atenção em políticas de conservação para manutenção da diversidade cromossômica de *S. nigritus*.

5 CONCLUSÕES

O número diploide e a morfologia dos cromossomos dos indivíduos de *Sapajus nigritus* analisados nas localidades de São Paulo e Rio de Janeiro condizem com o descrito para espécies de *Sapajus*.

Foi confirmado que a deleção total do bloco de HC terminal no par 11 não é característica em toda a área de distribuição de *S. nigritus*, ocorrendo também o grande bloco de HC terminal.

Sapajus nigritus parece ser a única espécie a apresentar em sua distribuição dois padrões de HC extra-centromérica no par 11. Entretanto, deve-se investigar se o mesmo ocorre nas demais espécies de *Sapajus* e *Cebus* descritas com grande bloco de HC terminal neste par cromossômico.

Indivíduos de cativeiro ou resgatados na natureza, identificados fenotipicamente como *S. nigritus*, que possuam ambos os padrões de HC extra-centromérica descritos aqui no par 11, não podem ser diagnosticados como híbridos somente por essa característica, uma vez que podem ser provenientes de populações com distintas formas desse par cromossômico.

Não foi possível estabelecer um padrão de distribuição geográfica de HC extra-centromérica nos pares 4, 6, 12, 13, 17, 19 e 21 na área estudada.

A distribuição geográfica de ambas as formas do par 11 poderá contribuir para o entendimento da evolução de *S. nigritus* na Mata Atlântica.

CAPÍTULO III

ANÁLISE DE GENES MITOCONDRIAIS EM *Sapajus nigrinus* (PLATYRRHINI, CEBIDAE), EM LOCALIDADES DOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E DE SÃO PAULO

RESUMO

As espécies de *Sapajus* na Mata Atlântica são mais numerosas e consideradas com maior diversidade fenotípica do que aquelas que ocorrem no Cerrado, Caatinga e Amazônia. Com a distribuição mais ampla dentre as espécies da Mata Atlântica, *S. nigrinus* é estimada como a primeira espécie a se diferenciar e uma das que possui maior variabilidade genética no gênero, com base em sequências mitocondriais. Essa diversidade pode estar refletida na divergência já demonstrada entre amostras do Rio de Janeiro e outras no restante da distribuição, formando grupamentos parafiléticos. Os refúgios florestais ocorridos no Pleistoceno, que ocasionaram descontinuidades filogeográficas demonstradas em outras espécies animais na região de São Paulo, podem ser a causa dessa divergência. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação filogeográfica das amostras de *S. nigrinus* provenientes do RJ e de SP, através da comparação das sequências de genes mitocondriais com aquelas disponíveis no GenBank®, investigando principalmente a divergência haplotípica de populações do RJ em relação a outras no restante da distribuição. Foram analisados indivíduos de cinco populações do estado do RJ: Ilha da Marambaia (IM), Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), Parque Nacional do Itatiaia (PNI), da Tijuca (PNT) e da Serra dos Órgãos (PARNASO); além de exemplares *ex situ* de Guaratiba/RJ (Gua) e de cidades de SP: capital (cSP), São José dos Campos (SJC), São Sebastião (SS), Paraibuna (PB) e Campos do Jordão (CJ). Análises filogenéticas, de redes de haplótipos e divergência entre grupos foram realizadas comparando as sequências obtidas a partir da amplificação por PCR dos genes mitocondriais citocromo c oxidase I (*MT-CO1*) e II (*MT-CO2*) e citocromo b (*MT-CYB*), com outras de *S. nigrinus*, disponíveis no GenBank®, provenientes de Angra dos Reis, SP, PR e Argentina. Foram sequenciados 27 amplicons do gene *MT-CO1*, 23 do *MT-CO2* e 22 do *MT-CYB*. Árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança demonstraram, para *MT-CO1* e *MT-CYB*, dois grupamentos dentre as amostras de *S. nigrinus*, de forma parafilética. As sequências oriundas de IM, Gua, PNT, PARNASO e RBPA (além de Angra dos Reis para o *MT-CYB*), formaram um clado, denominado “*S. nigrinus* leste”. As sequências do PNI, SP, PR e/ou Argentina formaram outro clado, denominado “*S. nigrinus* oeste”. Na análise do gene *MT-CO2*, três cladogramas foram formados: “*S. nigrinus* leste”, “*S. nigrinus* oeste” (com amostras do PNI e de SP) e um terceiro clado com sequências da Argentina. As divergências observadas através das árvores filogenéticas foram confirmadas pelas redes de haplótipos, que demonstraram de 11 a 17 mutações entre os grupos “*S. nigrinus* leste” e “*S. nigrinus* oeste”, e ao menos 27 entre estes e “*S. nigrinus* Argentina” (*MT-CO2*). Os valores de distância genética possibilitaram uma quantificação mais precisa da divergência entre os grupos. Em relação ao gene *MT-CO1*, o valor $d = 0,0032$ obtido na comparação entre “*S. nigrinus* leste” e “*S. nigrinus* oeste” está abaixo do valor esperado na comparação entre populações de uma mesma espécie utilizando este gene ($d = 0,0089 \pm 0,0016$). Da mesma forma, a distância entre esses grupos utilizando o gene *MT-CYB* ($d = 0,0421$), embora seja maior que estimado entre populações ($d = 0,0138 \pm 0,003$), ainda é menor do que o esperado na comparação entre subespécies ($d = 0,0510 \pm 0,0091$). Entretanto, os valores obtidos com *MT-CO2* entre os grupos “*S. nigrinus* leste” e “*S. nigrinus* oeste” ($d = 0,0263$) e destes com sequências da Argentina ($d = 0,0605$ e $d = 0,0638$, respectivamente) correspondem ao esperado entre subespécies ($d = 0,02$) ou até mesmo entre espécies distintas ($d = 0,0582$) em comparações com base neste gene. As análises mitocondriais confirmaram a divergência entre populações do RJ, com exceção do PNI, e o restante das localidades estudadas, o que deve ser resultado dos refúgios florestais e da atuação do Rio Paraíba do Sul como barreira. Os grupamentos observados podem representar unidades evolutivamente significativas (UES), que devem ser consideradas na conservação de *S. nigrinus*.

Palavras-chave: Sequenciamento de DNA, Redes de haplótipos, Divergência genética.

ABSTRACT

The *Sapajus* species in the Atlantic Forest are more numerous and considered to have greater phenotypic diversity than those that occur in the Cerrado, Caatinga and Amazon. With the widest distribution among the Atlantic Forest species, *S. nigritus* is estimated as the first species to diverge and one of those with the greatest genetic variability in the genus, based on mitochondrial sequences. This diversity may be reflected in the divergence demonstrated between samples from Rio de Janeiro and others in the rest of the distribution, forming paraphyletic groups. The forest refuges that occurred in Pleistocene, which caused phylogeographic discontinuities demonstrated in other animal species in the region of São Paulo, may be the cause of this divergence. The aim of this study was to evaluate the phylogeographic relationship of *S. nigritus* samples from RJ and SP, comparing mitochondrial gene sequences with those available in GenBank®, investigating mainly the haplotypic divergence of RJ populations from others in the rest of the distribution. Were analyzed individuals from five populations in RJ state: Ilha da Marambaia (IM), Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), Parque Nacional do Itatiaia (PNI), Tijuca (PNT) and Serra dos Órgãos (PARNASO); and *ex situ* specimens from Guaratiba/RJ (Gua) and cities of SP: capital (cSP), São José dos Campos (SJC), São Sebastião (SS), Paraibuna (PB) and Campos do Jordão (CJ). Phylogenetic analysis, haplotype networks and divergence between groups were performed comparing the sequences obtained by PCR amplification of cytochrome c oxidase I (*MT-CO1*) and II (*MT-CO2*) and cytochrome b (*MT-CYB*) mitochondrial genes with others of *S. nigritus*, available in GenBank®, from Angra dos Reis, SP, PR and Argentina. 27 amplicons of the *MT-CO1*, 23 of the *MT-CO2* and 22 of the *MT-CYB* genes were sequenced. Phylogenetic trees of Maximum Likelihood demonstrated, for *MT-CO1* and *MT-CYB*, two groups among the samples of *S. nigritus*, in a paraphyletic way. Sequences from IM, Gua, PNT, PARNASO and RBPA (besides Angra dos Reis for *MT-CYB*), formed a clade, called "*S. nigritus* east". The sequences from PNI, SP, PR and/or Argentina formed another clade, called "*S. nigritus* west". In the *MT-CO2* gene analysis, three clades were formed: "*S. nigritus* east", "*S. nigritus* west" (with samples of PNI and SP) and a third clade with sequences from Argentina. The differences observed through the phylogenetic trees were confirmed by the haplotype networks, which showed 11 to 17 mutations between "*S. nigritus* east" and "*S. nigritus* west", and at least 27 between these and "*S. nigritus* Argentina" (*MT-CO2*). The genetic distance values allowed a more precise quantification of the divergence between the groups. For the *MT-CO1* gene, the value $d=0.0032$ obtained in the comparison between "*S. nigritus* east" and "*S. nigritus* west" is lower than the expected value in the comparison between populations of the same species using this gene ($d=0.0089\pm 0.0016$). Similarly, the distance between these groups using the *MT-CYB* gene ($d=0.0421$), although greater than estimated between populations ($d=0.0138\pm 0.003$), is still lower than the expected in subspecies comparison ($d=0.0510\pm 0.0091$). However, the values obtained with *MT-CO2* between the groups "*S. nigritus* east" and "*S. nigritus* west" ($d=0.0263$) and of these with sequences from Argentina ($d=0.0605$ and $d=0.0638$, respectively) correspond to the expected between subspecies ($d=0.02$) or even between different species ($d=0.0582$) in comparisons based on this gene. The mitochondrial analyses confirmed the divergence between populations in RJ, with the exception of the PNI, and the rest of the studied localities, which should be the result of the forest refuges and the influence of the Paraíba do Sul River as a barrier. The observed groups may represent evolutionary significant units (ESU), which must be considered in the conservation of *S. nigritus*.

Keywords: DNA sequencing, Haplotype networks, Genetic divergence.

1 INTRODUÇÃO

A história evolutiva dos macacos-prego (*Sapajus*) e caiararas (*Cebus*) tem sido alvo de diversos estudos recentes que buscam, através do entendimento das relações entre as espécies, o meio pelo qual seus ancestrais migraram e ocuparam as Américas do Sul e Central (Silva Jr, 2001; Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Lynch Alfaro *et al.*, 2012b; Nascimento *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2017; Martins-Jr *et al.*, 2018).

A proposta de classificação mais recente descreve que a divergência inicial entre os ancestrais dos gêneros (Figura 27) se deu entre 5,8 e 6,8 milhões de anos (Ma) atrás (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Lima *et al.*, 2017; Martins-Jr *et al.*, 2018), tendo origem no norte da América do Sul devido ao surgimento do Rio Amazonas (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a), datado em 7 Ma (Hoorn *et al.*, 2010). O tempo de divergência estimado entre *Sapajus* e *Cebus* é tão antigo quanto o encontrado, por exemplo, entre humanos (*Homo*) e chimpanzés (*Pan*), datado em 6,5 Ma (Perelman *et al.*, 2011).

A partir desse evento de vicariância na bacia Amazônica, os ancestrais de *Cebus* teriam ficado restritos na região das Guianas e posteriormente radiado pela Amazônia, Andes, norte da Colômbia, Venezuela e América Central. Os ancestrais de *Sapajus* teriam migrado em direção ao sul, para a região da Mata Atlântica, onde permaneceram a maior parte de sua história evolutiva. A partir desta região, as espécies de *Sapajus* expandiram sua distribuição em direção ao norte, reocupando a Amazônia há aproximadamente 400 mil anos, onde estabeleceram áreas de simpatria com espécies de *Cebus*. Estima-se que a diversificação tenha iniciado na transição Plio-Pleistoceno, há aproximadamente 2,7 Ma para *Sapajus* e 2,1 Ma para *Cebus* (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a).

Outras teorias para a divergência entre os gêneros já foram propostas, como a que sugere a presença do ancestral comum aos gêneros na Mata Atlântica e estes terem evoluído a partir dessa região (Nascimento *et al.*, 2015). Entretanto, a vicariância na bacia Amazônica foi posteriormente confirmada, com agregação de um maior número amostral de diferentes regiões geográficas e pela inclusão de novos marcadores moleculares (Lima *et al.*, 2017).

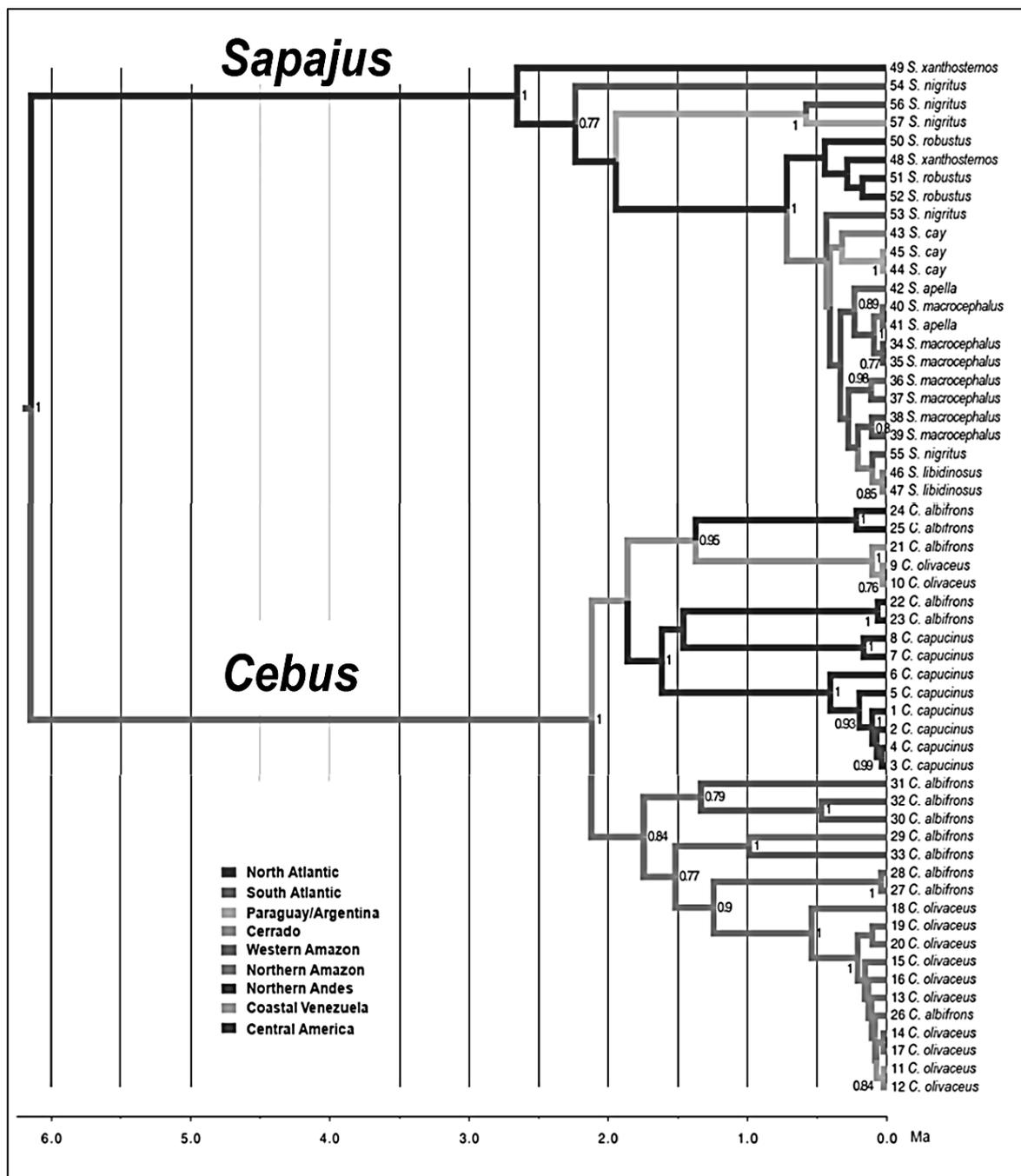


Figura 27: Filogenia obtida através do sequenciamento dos genes mitocondriais 12S e citocromo b, demonstrando a separação e o tempo de divergência (escala) das espécies de *Cebus* e *Sapajus*. Adaptado de Lynch Alfaro *et al.* (2012a).

O início da diversificação de *Sapajus* na Mata Atlântica, associado ao longo período de permanência de seus ancestrais nessa região (ao menos 2,2 Ma), propiciou maior diversidade no fenótipo e no número de espécies que atualmente ocupam esse habitat (*S. nigrinus*, *S. robustus*, *S. xanthosternos* e *S. flavius* – Figura 28) em comparação com aquelas da Amazônia (*S. macrocephalus* e *S. apella*) e do Cerrado e Caatinga (*S. cay* e *S. libidinosus* – Lynch Alfaro *et al.*, 2012a).

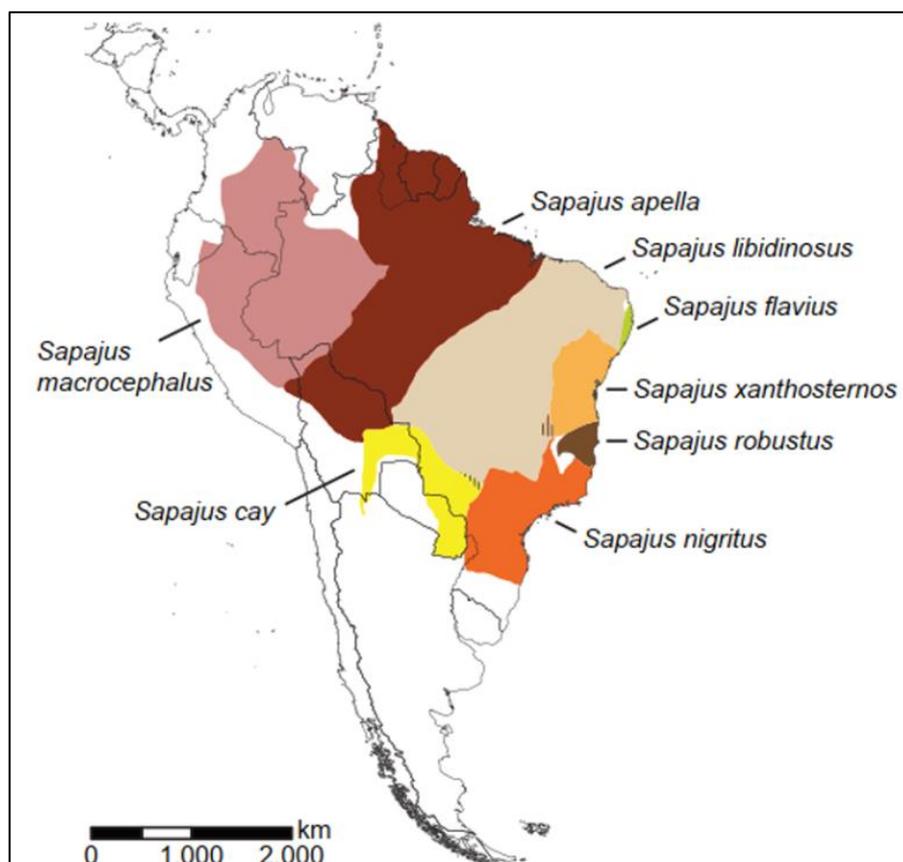


Figura 28: Distribuição das espécies de *Sapajus* na América do Sul. Retirado de Lynch Alfaro *et al.*, 2012a.

Análises filogenéticas demonstram as espécies da Mata Atlântica agrupando em clados monofiléticos (Lima *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2018), enquanto aquelas presentes na Amazônia, Caatinga e Cerrado comumente formam clados em politomia (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Nascimento *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2018; Martins-Jr *et al.*, 2018). A dificuldade em estabelecer a filogenia de algumas espécies é atribuída ao rápido processo evolutivo na expansão de *Sapajus*, denominado como “*explosive process*”, que propiciou relativamente pouco tempo para a diferenciação genética significativa das espécies da Amazônia, Caatinga e Cerrado (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Martins-Jr *et al.*, 2018).

Algumas estimativas destacam *S. nigritus* como a primeira espécie a se diferenciar na história evolutiva dos macacos-prego, sendo grupo irmão para as demais (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Lynch Alfaro *et al.*, 2012b), com tempo de surgimento de 357 mil anos, seguida por *S. xanthosternos*, há 276 mil anos (Ruiz-García *et al.*, 2012), com ambas as espécies já tendo sido demonstradas proximamente relacionadas (Lima *et al.*, 2017; Martins-Jr *et al.*, 2018). Geralmente, *S. robustus* agrupa de forma mais próxima a *S. nigritus* e *S. xanthosternos* (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Nascimento *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2018) e as demais (*S. flavius*, *S. cay*, *S. libidinosus*, *S. apella* e *S. macrocephalus*) formam um subclado em arranjos parafiléticos (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Lima *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2018; Martins-Jr *et al.*, 2018).

Embora a monofilia de *S. nigritus* tenha sido identificada (Lima *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2018), grupamentos parafiléticos foram demonstrados sem relação às subespécies (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Nascimento *et al.*, 2015; Martins-Jr *et al.*, 2018), *S. n. cucullatus*, que ocorre na porção sul do estado de São Paulo, região Sul do Brasil e Argentina, e *S. n. nigritus*,

que ocorre ao norte de SP e demais estados do Sudeste (Groves, 2001a; Rylands *et al.*, 2005; Lynch Alfaro *et al.*, 2014). Nos casos onde *S. nigrinus* é demonstrada como um grupo parafilético, a divergência se dá por amostras do estado do Rio de Janeiro em relação a outros pontos da distribuição, como o demonstrado por uma sequência amplificada a partir do gene mitocondrial citocromo b, proveniente da cidade de Angra dos Reis (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Nascimento *et al.*, 2015; Martins-Jr *et al.*, 2018). O fato dessa amostra não ter agrupado com outras de *S. nigrinus*, de São Paulo e da Argentina, mas sim com *S. xanthosternos* (Figura 29a), foi ressaltado por Martins-Jr *et al.* (2018). A mesma amostra também não agrupou com outras de *S. nigrinus*, de Minas Gerais, São Paulo e Argentina, nos achados de Lynch Alfaro *et al.* (2012a; Figura 29b) e Nascimento *et al.* (2015; Figura 29c). A partir da análise do gene mitocondrial citocromo c oxidase II de indivíduos da Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, em comparação com sequências de *S. nigrinus* da Argentina, também foi identificada divergência, com agrupamentos em clados distintos, sendo demonstrada maior proximidade da população da Ilha da Marambaia com *S. xanthosternos* (Penedo, 2016).

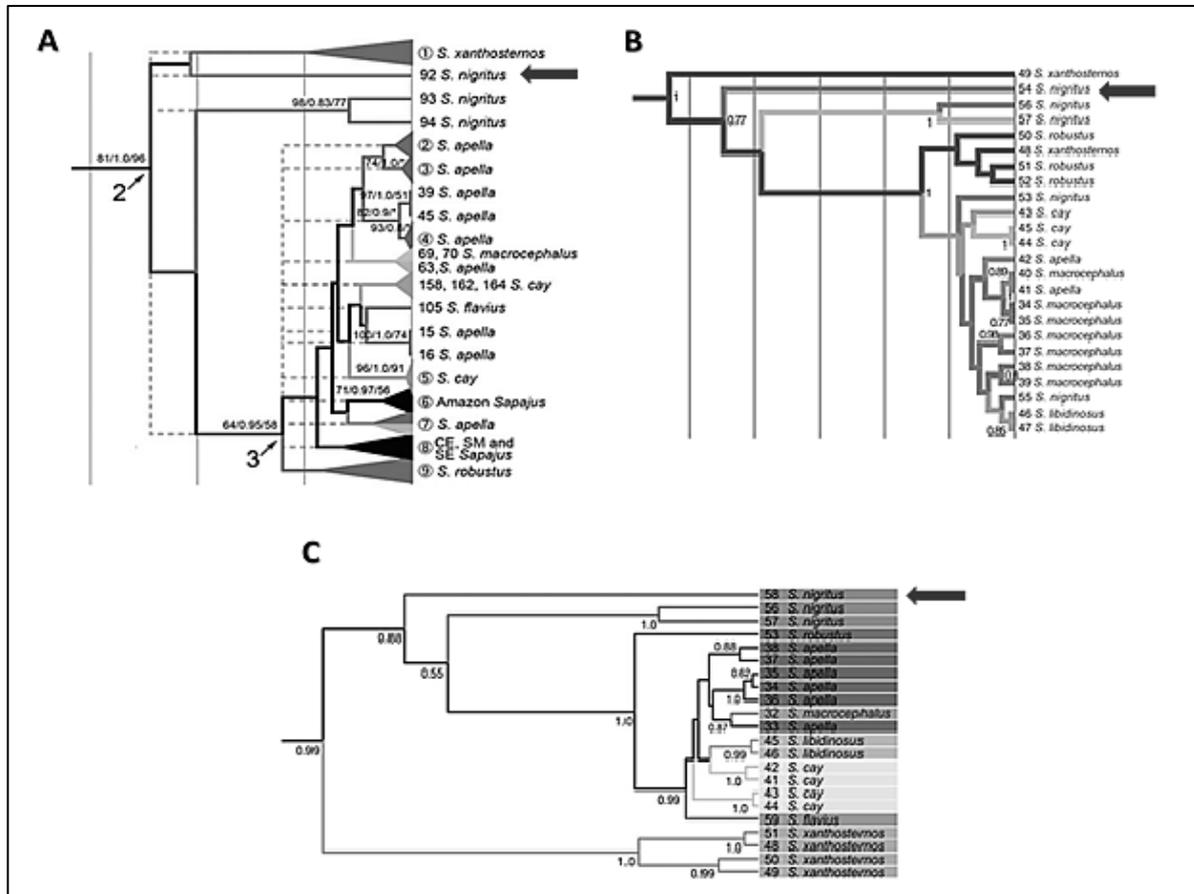


Figura 29: Árvores filogenéticas obtidas, em três estudos distintos, com o gene mitocondrial citocromo b de espécies *Sapajus* destacando (setas) a posição da amostra de *S. nigrinus* do estado do Rio de Janeiro, não agrupando com outras da mesma espécie, provenientes de São Paulo, Minas Gerais e Argentina. (A) modificado de Martins-Jr *et al.* (2018); (B) modificado de Lynch Alfaro *et al.* (2012a); (C) modificado de Nascimento *et al.* (2015).

1.1 Justificativa

Conhecer a diversidade das espécies de *Sapajus* é fundamental para esforços de conservação, uma vez que seus habitats estão cada vez mais degradados e informações genéticas podem ser perdidas antes mesmo que sejam identificadas (Rylands *et al.*, 2005).

Dentre as espécies da Mata Atlântica, *S. nigritus* já foi identificada com a maior diversidade genética, estimada com base em amostras apenas da Argentina (Ruiz-García *et al.*, 2012). Com a mais ampla distribuição geográfica dentre as espécies desse bioma (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a), a diversidade de *S. nigritus* pode ser ainda maior se analisadas amostras das duas subespécies reconhecidas, *S. n. nigritus* e *S. n. cucullatus* (Groves, 2001a; Rylands *et al.*, 2005; Lynch Alfaro *et al.*, 2014), incluindo nas análises, principalmente, mais localidades do Rio de Janeiro, onde já foram demonstradas divergências (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Nascimento *et al.*, 2015; Penedo, 2016; Martins-Jr *et al.*, 2018).

Assim como foi demonstrada entre São Paulo e Rio de Janeiro uma zona de transição entre os padrões de pelagem preto e marrom e a ocorrência de polimorfismos de heterocromatina constitutiva extra-centromérica no par 11 (capítulos I e II), a divergência mitocondrial de amostras de *S. nigritus* do estado do Rio de Janeiro para o restante da distribuição pode estar relacionada à descontinuidade filogeográfica decorrente de refúgios florestais (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1970; Brown & Ab'Sáber, 1979).

As divergências observadas em diferentes grupos animais, como em aves, anuros, répteis e morcegos, relacionadas a refúgios florestais, foram demonstradas através da comparação entre sequência de regiões mitocondriais (Grazziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2007; Cabanne *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009). O DNA mitocondrial possui vantagens em estudos de filogenia, se comparado ao DNA nuclear, como maior taxa de mutação, ausência de recombinação e herança materna (Simon *et al.*, 2006). Os genes mitocondriais citocromo c oxidase I, II e citocromo b, que codificam algumas das mais conservadas proteínas envolvidas no sistema de transporte de elétrons da cadeia respiratória, são considerados especialmente importantes, devido às suas taxas de mutação (Lunt *et al.*, 1996; Sicheritz-Pontén *et al.*, 1998). Estes genes são considerados variáveis o suficiente para inferir relações entre populações ou espécies próximas, como também são conservados o bastante para questões filogenéticas entre grupos menos relacionados (Meyer, 1994; Lunt *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1982; Seuánez *et al.*, 2005; Lynch Alfaro *et al.*, 2014), sendo empregados nos mais diversos grupos animais (Ex.: Ascunce *et al.*, 2003; Kartavtsev, 2011; Ruiz-García *et al.*, 2012; Ruiz-García *et al.*, 2016).

Tanto a diversidade intraespecífica de *S. nigritus* como as relações filogenéticas com as demais espécies do gênero têm sido estabelecidas a partir da amplificação e análise dos genes mitocondriais citocromo c oxidase I, II e citocromo b, além da região D-loop, utilizando de duas a sete amostras provenientes de um número ainda restrito de áreas dentro da distribuição da espécie, em sua maioria provenientes de exemplares de museus (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Ruiz-García *et al.*, 2012; Nascimento *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2018; Martins-Jr *et al.*, 2018). A análise destes três genes mitocondriais na identificação das relações filogeográficas e da diversidade de *S. nigritus*, comparando amostras de vida livre do estado do Rio de Janeiro com outros pontos da distribuição, poderá contribuir para o entendimento da variabilidade genética da espécie, já demonstrada no capítulo II ao nível cromossômico, e agregar dados que auxiliem na sua conservação.

1.2 Objetivos

Analisar a relação filogenética entre sequências de DNA mitocondrial de *Sapajus nigrinus* provenientes de seis localidades do estado do Rio de Janeiro e de cinco do estado de São Paulo, em comparação com sequências *Sapajus* spp. da literatura, verificando a sustentação da divergência já observada entre amostras do estado do Rio de Janeiro para o restante da distribuição de *S. nigrinus*. Hipótese: as amostras obtidas serão agrupadas com sequências de *S. nigrinus* do GenBank®, sendo observada divergência entre aquelas do estado do Rio de Janeiro com as demais na distribuição de *S. nigrinus*.

Avaliar a diversidade haplotípica intraespecífica, analisando as amostras de *S. nigrinus* obtidas neste estudo em comparação com outras da literatura para a espécie. Hipótese: serão confirmados parâmetros de diversidade e divergência genética maiores que os observados para outras espécies de *Sapajus* na literatura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de *Sapajus nigrinus* utilizadas nas análises

Foram analisadas sequências dos genes mitocondriais citocromo c oxidase I (*MT-COI*) e II (*MT-CO2*) e citocromo b (*MT-CYB*) de indivíduos de *S. nigrinus* de todas as localidades de vida livre amostradas no estado do Rio de Janeiro: Parque Nacional do Itatiaia (PNI), Ilha da Marambaia (IM), Parque Nacional da Tijuca (PNT), Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO) e Reserva Biológica de Poço das Antas (RBPA), além daqueles de cativeiro, provenientes do bairro de Guaratiba (Gua), cidade do Rio de Janeiro, e de cinco de cidades do estado de São Paulo, capital (cSP), São José dos Campos (SJC), Paraibuna (PB), Campos do Jordão (CJ) e São Sebastião (SS).

As descrições dos locais de estudo *in situ* do estado do Rio de Janeiro, das instituições onde foram obtidas as amostras *ex situ*, os procedimentos de captura, sedação, identificação individual, retorno da sedação, soltura dos animais e licenças estão descritos nos itens 2.1, 2.2 e 2.4 do capítulo I. A coleta das amostras de sangue está descrita no item 2.2 do capítulo II.

2.2 Extração do DNA

A obtenção de DNA a partir de sangue total foi realizada através da extração por Fenol-Clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989), com modificações. Esta técnica tem, por procedimento inicial, a utilização de tampão de digestão (composto por 500 µL de TNE 1X, 50 µL de Tris-HCl 1M pH 8,0, 24 µL de SDS 25% e 10 µL de Proteinase K 10 mg/mL) para promover a lise celular e digestão enzimática das proteínas, em microtubos plásticos de 1,5 mL, no qual foram adicionados 150 µL de sangue total. Os microtubos foram levados ao banho-maria a 37°C *overnight*, para solubilização da membrana plasmática e remoção de proteínas celulares. Após esse período, 500 µL de Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (na proporção 25:24:1) foram adicionados, e o conteúdo agitado, formando uma emulsão leitosa. Nesta etapa são desnaturadas as proteínas presentes no material genético, além de removidos lipídeos e boa parte dos polissacarídeos. Os tubos foram centrifugados a 13200 xg, por 5 min. O sobrenadante, contendo o DNA, foi removido para um microtubo limpo e identificado de 1,5 mL, no qual foram adicionados 500 µL de clorofórmio, seguido de agitação. Esta etapa permite remover traços de fenol restantes no DNA, além de polissacarídeos não removidos na etapa anterior. Uma nova centrifugação a 13200 xg por 5 min foi realizada e o sobrenadante

removido para um novo tubo identificado de 1,5 mL. Neste, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado, e o frasco foi invertido cuidadosamente, para que o material genético fosse desidratado e aglutinado. Após nova centrifugação a 13200 xg por 10 min foi retirado o etanol absoluto e adicionado 1 mL de etanol 70%, também gelado, a fim de hidratar o DNA. Os tubos foram invertidos cuidadosamente e nova centrifugação a 13200 xg por 5 min foi efetuada. Os procedimentos com etanol absoluto e 70% foram repetidos por mais duas vezes, de modo a minimizar a contaminação por fenol. Após a última centrifugação, o álcool 70% foi descartado e os tubos foram mantidos de cabeça para baixo, em toalha de papel limpa, até ficarem completamente secos. Por fim, 50 µL de tampão TE 1X (Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM), que inativa cátions essenciais para a atividade de enzimas DNAses, como Ca²⁺ e Mg²⁺, foram adicionados e os tubos foram levados ao banho-maria à 37 °C para dissolução do DNA, sendo posteriormente armazenados em freezer a -20 °C.

O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (10 mg/mL). Foi aplicado 1 µL de cada amostra de DNA com 0,5 µL de tampão de arrasto (6X *Loading Buffer* - Promega[®]), além de soluções de DNA *Lambda* (Promega[®]) com concentrações conhecidas de 12,5, 25 e 50 ng/µL para quantificação. O gel foi submetido à eletroforese a 76 V por 40 min e o resultado foi analisado em transiluminador *L.Pix Locus* (Biotecnologia[®]) e fotografado utilizando o *software* do aparelho.

2.3 Amplificação de fragmentos de DNA mitocondrial por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

2.3.1 Gene Citocromo c Oxidase I (*MT-COI*)

As reações de PCR para amplificação do gene mitocondrial *MT-COI* foram realizadas utilizando-se o conjunto de *primers* Fish1SapF (5'TCAACTAACCATAAGGATATTGGTAC3') e Fish1SapR (5'TATACCTCTGGGTGACCAAAAATCA3'), descritos por Lima *et al.* (2017). Parte das amostras (da IM e do PNI) foram geradas pela Dr^a Denise Nogueira, durante seu projeto de Pós-Doutorado, realizado no laboratório do Departamento de Ecología, Genética y Evolución, da Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina, utilizando o mesmo conjunto de *primers*.

As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo tampão 2X *Master Mix* (Promega[®]) em concentração final de 1X, *primers* em concentração final de 0,5 µM cada, DNA com concentrações variando de 10 a 30 ng/µL e completado o volume com água ultrapura. Para todas as reações foram incluídos um controle positivo, com uma amostra que já havia amplificado anteriormente, e um controle negativo, com água ao invés de DNA, para avaliar possíveis contaminações dos reagentes.

A amplificação ocorreu em um termociclador (*ProFlexTM PCR System* - Applied Biosystems[®] ThermoFisher Inc.) utilizando-se os ciclos de temperatura descritos por Lima *et al.* (2017): temperatura inicial de 95°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 45 s para desnaturação das fitas de DNA, 60°C por 45 s para anelamento dos *primers* com a região flanqueadora da sequência-alvo, e 72°C por 1 min para extensão da amplificação, pela *Taq* DNA polimerase; além de uma temperatura de 72°C por 5 min para extensão final.

2.3.2 Gene Citocromo c Oxidase II (*MT-CO2*)

As reações de PCR para amplificação do gene mitocondrial *MT-CO2* foram realizadas utilizando-se o conjunto de *primers* L7552 (5'-AACCATTTTCATAACTTTGTCAA-3') e H8321 (5'-CTCTTAATCTTTAACTTAAAAG-3'), descritos por Ruvolo *et al.* (1991).

As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo tampão 2X *Master Mix* (Promega®) em concentração final de 1X, *primers* em concentração final de 0,5 µM cada, DNA com concentrações variando de 10 a 30 ng/µL e completado o volume com água ultrapura. Para todas as reações foram incluídos um controle positivo e um negativo.

A amplificação ocorreu em um termociclador (*ProFlex™ PCR System* - Applied Biosystems® ThermoFisher Inc.) utilizando-se os ciclos de temperatura descritos por Ruiz-García *et al.* (2012), com modificações: temperatura inicial de 95°C por 5 min; 35 ciclos de 95°C por 1 min para desnaturação das fitas de DNA, 50°C por 1 min para anelamento dos *primers* com a região flanqueadora da sequência-alvo, e 72°C por 1 min para extensão da amplificação, pela *Taq* DNA polimerase; além de uma temperatura de 72°C por 5 min para extensão final.

2.3.3 Gene Citocromo b (*MT-CYB*)

As reações de PCR para amplificação do gene mitocondrial *MT-CYB* foram realizadas utilizando-se o conjunto de *primers* MonkeyGluF1 (5'-CCATGACTAATGATATGAAAARCC-3') e MonkeyProR1 (5'-AGAATSTCAGCTTTGGGTGTTG-3'), descritos por Boubli *et al.* (2018).

As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL, da mesma forma que para o gene COII, contendo tampão 2X *Master Mix* (Promega®) em concentração final de 1X, *primers* em concentração final de 0,5 µM cada, DNA com concentrações variando de 10 a 30 ng/µL e completado o volume com água ultra pura. Para todas as reações foram incluídos um controle positivo e um negativo.

A amplificação ocorreu em um termociclador (*ProFlex™ PCR System* - Applied Biosystems® ThermoFisher Inc.) utilizando-se os ciclos de temperatura descritos por Hoyos *et al.* (2016), com temperatura inicial de 94°C por 2 min; 34 ciclos de 94°C por 30 s para desnaturação das fitas de DNA, 50°C por 30 s para anelamento dos *primers* com a região flanqueadora da sequência-alvo, e 72°C por 2 min para extensão da amplificação, pela *Taq* DNA polimerase; além de uma temperatura de 72°C por 10 min para extensão final.

2.4 Análise dos produtos de PCR em gel de agarose

Todos os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), de modo a verificar o sucesso nas amplificações. Foi aplicado 1 µL de cada amostra de produto de PCR com 0,5 µL de tampão de arrasto (6X *Loading Buffer* - Promega®), além de DNA *ladder* (100 pb Ludwig Biotec LTDA.) para avaliação do tamanho dos fragmentos amplificados e possíveis contaminações. Os géis foram submetido à eletroforese a 100 V por 1h e 30 min e o resultado foi analisado em transiluminador *L.Pix Loccus* (Biotecnologia®) e fotografado utilizando o *software* do aparelho.

2.5 Sequenciamento e análise de eletroferogramas

Parte dos *amplicons* do gene *MT-CO1* foram sequenciados na MacroGen Inc. (Coréia do Sul) e do gene *MT-CO2* no Laboratório de Genética Marinha do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, na Universidade do Estado do Rio de Janeiro. O restante dos sequenciamentos dos genes mitocondriais *MT-CO1*, *MT-CO2* e *MT-CYB*, foi realizado na ACTGene Análises Moleculares Ltda.

A análise dos eletroferogramas foi realizada no *software Chromas v2.6.6* (Technelysium Pty Ltd) e as sequências foram checadas manualmente.

2.6 Análises filogenéticas

Utilizando o *software* Mega v10.1.7 (Kumar *et al.* 2018) as sequências foram alinhadas através do método de *ClustalW* e as relações filogenéticas inferidas com o método de Máxima Verossimilhança, seguindo o modelo *Kimura-2-parameter* (Kimura, 1980). O suporte para cada clado foi estimado pelo método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), com base em 1000 replicações.

Para comparação com os dados obtidos, foram utilizadas sequências disponíveis na literatura, a maioria depositadas no GenBank® e algumas cedidas por Dr. Manuel Ruiz-García, da Pontifícia Universidade Javeriana, Colômbia. Dos genes mitocondriais *MT-CO1* e *MT-CYB* foram utilizadas sequências de todas as espécies de *Sapajus* (*S. nigrinus*, *S. robustus*, *S. xanthosternos*, *S. cay*, *S. macrocephalus*, *S. libidinosus*, *S. flavius* e *S. apella*) e do gene *MT-CO2* estavam disponíveis apenas sequências de *S. nigrinus*, *S. xanthosternos* e *S. cay*. Foi incluída, ainda, uma sequência de espécies de *Cebus* como grupo externo em cada análise. A identificação das sequências, espécie correspondente, origem geográfica, códigos GenBank® e referências estão organizadas no Anexo II.

2.7 Análises de diversidade genética, redes de haplótipos e divergência entre grupos

Índices de diversidade genética foram estimados para as sequências de *S. nigrinus* obtidas neste estudo em comparação com aquelas da literatura para esta espécie (Anexo II). Utilizando os *software* DnaSP v.6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017) e Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2005), foram calculados: número de haplótipos (h) e de sítios polimórficos (S); além da diversidade haplotípica (*Hd*), que estima a probabilidade de serem amostrados dois haplótipos diferentes em um conjunto de sequências; e diversidade nucleotídica (π), que representa o número médio de diferenças entre duas sequências por sítio.

A relação entre as sequências de *S. nigrinus* foi analisada através das redes de haplótipos geradas pelo método *Median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) no *software* Network (*Fluxus Technology* Ltd).

Foi feita ainda a estimativa de distância genética (d) entre grupos de *S. nigrinus*, através do modelo *p-distance*, considerando todas as substituições nucleotídicas, utilizando o *software* Mega v10.1.7 (Kumar *et al.* 2018).

3 RESULTADOS

Foram sequenciados aproximadamente 655 pb do gene mitocondrial *MT-COI* para 27 amostras, sendo 24 do estado do Rio de Janeiro: 11 da IM, três do PNI, três do PNT, três do PARNASO, três da RBPA e uma de Gua; além de três do estado de São Paulo: uma de SJC, uma da cSP e uma de CJ. Do gene *MT-CO2* foram sequenciados entre 554 e 731 pb para 23 amostras, sendo 21 do Rio de Janeiro: oito da IM, três do PNI, três do PNT, três do PARNASO, três da RBPA e uma de Gua; além de duas de São Paulo: uma de SJC e outra de CJ. Para o gene *MT-CYB* foram sequenciados entre 709 e 859 pb de 22 amostras, sendo 17 do Rio de Janeiro: quatro da IM, três do PNI, três do PNT, três do PARNASO, três da RBPA e uma de Gua; além de cinco de São Paulo: uma de cSP, uma de SJC, uma de CJ, uma de SS, e uma de PB.

3.1 Análises filogenéticas com base em genes mitocondriais em *Sapajus* spp.

As árvores de Máxima Verossimilhança obtidas a partir dos alinhamentos das sequências dos três genes mitocondriais (*MT-COI*, *MT-CO2* e *MT-CYB*) demonstraram, dentre as amostras de *S. nigritus*, dois ou três grupamentos distintos, cada, todos de forma parafilética.

Com o gene *MT-COI* (Figura 30), formaram-se dois cladogramas distintos de *S. nigritus*, um deles com amostras de São Paulo (cSP, CJ, SJC, S_nigritus_01_SP, S_nigritus_02_SP e S_nigritus_03_PR) e três do PNI, sendo chamado de clado “*S. nigritus* oeste”. A maioria das sequências de *S. nigritus* do estado do Rio de Janeiro (uma do PNT, três da RBPA, a de Gua, três do PARNASO e 11 da IM) foi agrupada em um segundo clado, denominado “*S. nigritus* leste”, sendo mais próximo a *S. xanthosternos*, ainda que sem sustentação de *bootstrap* (<50). Outro clado foi formado com o restante das sequências de *S. cay*, *S. apella*, *S. macrocephalus*, *S. libidinosus*, *S. robustus* e *S. flavius*, na maioria em politomia, incluindo duas do PNT. Somente *S. flavius* teve agrupamento mais consistente (*bootstrap* = 84) entre as suas sequências.

Com o gene *MT-CO2* (Figura 31), formaram-se três grupamentos distintos de *S. nigritus*. Um dos cladogramas foi formado com amostras do Rio de Janeiro obtidas neste estudo (oito da IM, uma de Gua, três do PARNASO, uma do PNT e três da RBPA), denominado “*S. nigritus* leste”. Um segundo clado, denominado “*S. nigritus* oeste”, foi formado com duas amostras de São Paulo (CJ e SJC) e três do PNI, todas também obtidas neste estudo. Ambos os grupamentos foram proximamente relacionados, embora com baixa sustentação de *bootstrap* (55). Um terceiro grupo foi formado em parafilía, com três amostras de *S. nigritus* da Argentina (S_nigritus_01_Arg, S_nigritus_02_Arg e S_nigritus_03_Arg), além de uma sequência de *S. cay*. Diferente do que foi observado com o gene *MT-COI*, não houve agrupamento com *S. xanthosternos*. Novamente, duas amostras do PNT não agruparam com *S. nigritus*, estando mais próximas a *S. cay*.

Com o gene *MT-CYB* (Figura 32), houve o agrupamento de todas as sequências de *S. xanthosternos* em um clado único. Em seguida, foram agrupadas amostras de *S. nigritus* provenientes do estado do Rio de Janeiro (quatro da IM, uma de Gua, três do PARNASO, uma do PNT, três da RBPA e uma de Angra dos Reis = S_nigritus_04_RJ), sendo o clado denominado “*S. nigritus* leste”. Outro agrupamento foi formado com as três sequências do PNI, oito de São Paulo (cSP, CJ, SS, SJC, PB, S_nigritus_02_SP, S_nigritus_06_SP e S_nigritus_07_SP), três do Paraná (S_nigritus_08_PR, S_nigritus_09_PR e S_nigritus_10_PR) e uma da Argentina (S_nigritus_05_Arg), sendo o clado denominado “*S.*

nigritus oeste”. Um último clado, em politomia, foi formado por sequências de *S. cay*, *S. apella*, *S. macrocephalus*, *S. libidinosus*, *S. robustus* e *S. flavius*, além de duas sequências do PNT e duas de *S. nigritus* (*S_nigritus_01_SP* e *S_nigritus_03_MG*).

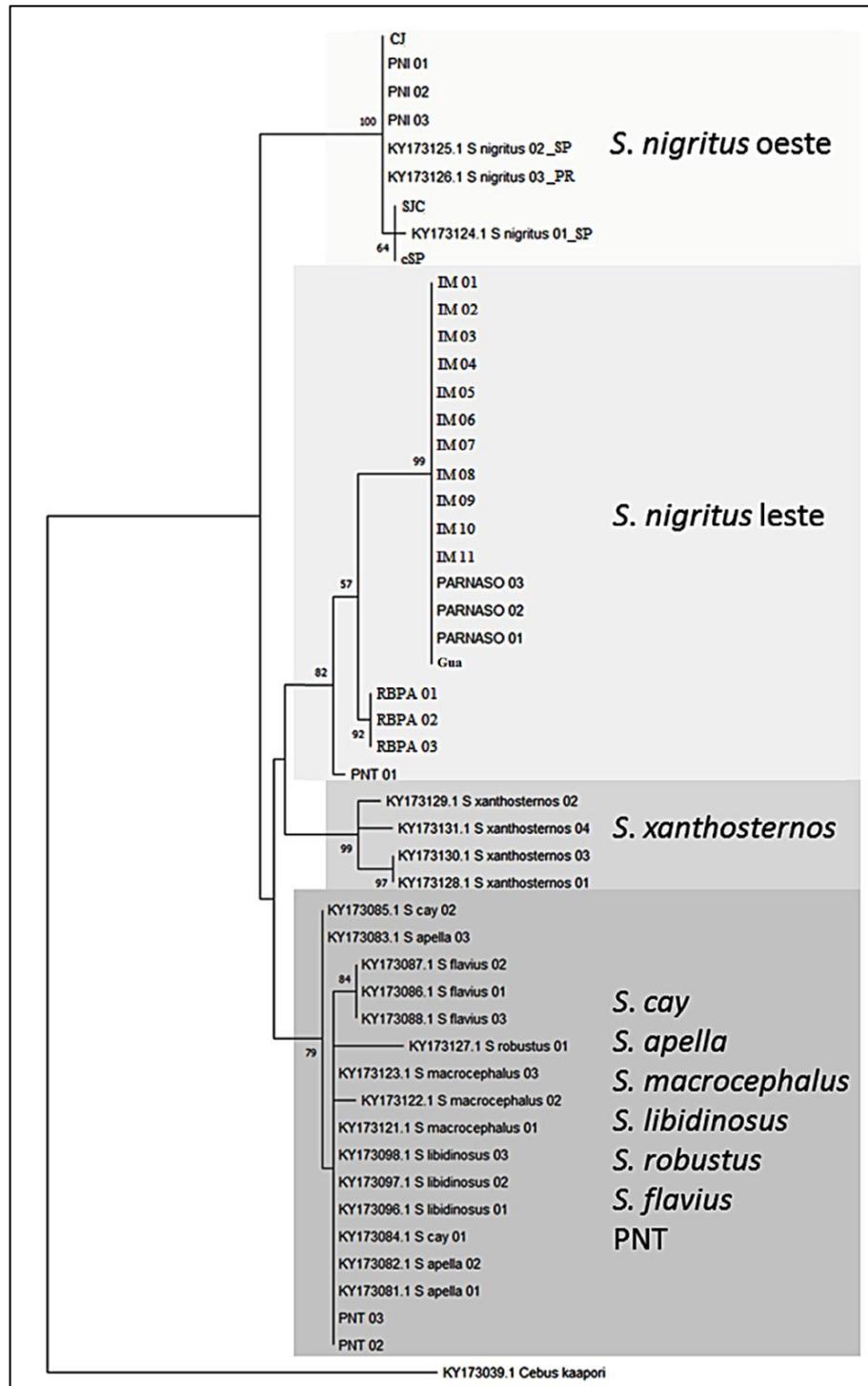


Figura 30: Árvore filogenética construída através do método de Máxima Verossimilhança, segundo o modelo *Kimura-2-parameter* (Kimura, 1980), pela comparação de sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (*MT-COI*). Estão demonstradas as relações das amostras de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae), provenientes dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, com sequências do GenBank® para esta e outras espécies. Os

números nas ramificações correspondem a valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), com base em 1000 replicações, estando representados apenas aqueles maiores que 50.

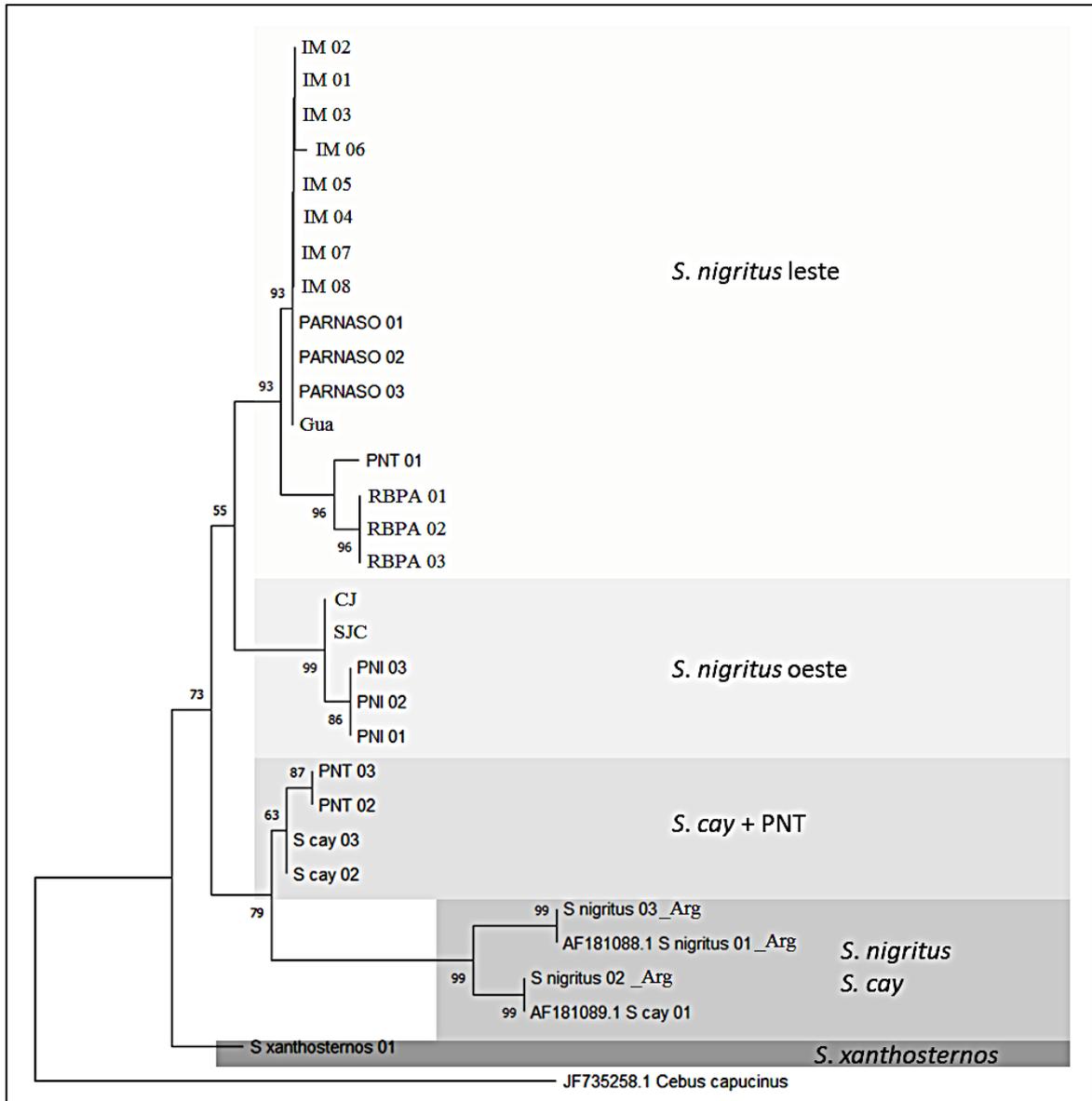


Figura 31: Árvore filogenética construída através do método de Máxima Verossimilhança, segundo o modelo *Kimura-2-parameter* (Kimura, 1980), pela comparação de sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase II (*MT-CO2*). Estão demonstradas as relações das amostras de *Sapajus nigratus* (Platyrrhini, Cebidae), provenientes dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, com sequências do GenBank® e fornecidas por Dr. Manuel Ruiz-García (com. pess.) para esta espécie, *S. cay* e *S. xanthosternos*. Os números nas ramificações correspondem a valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), com base em 1000 replicações, estando representados apenas aqueles maiores que 50.

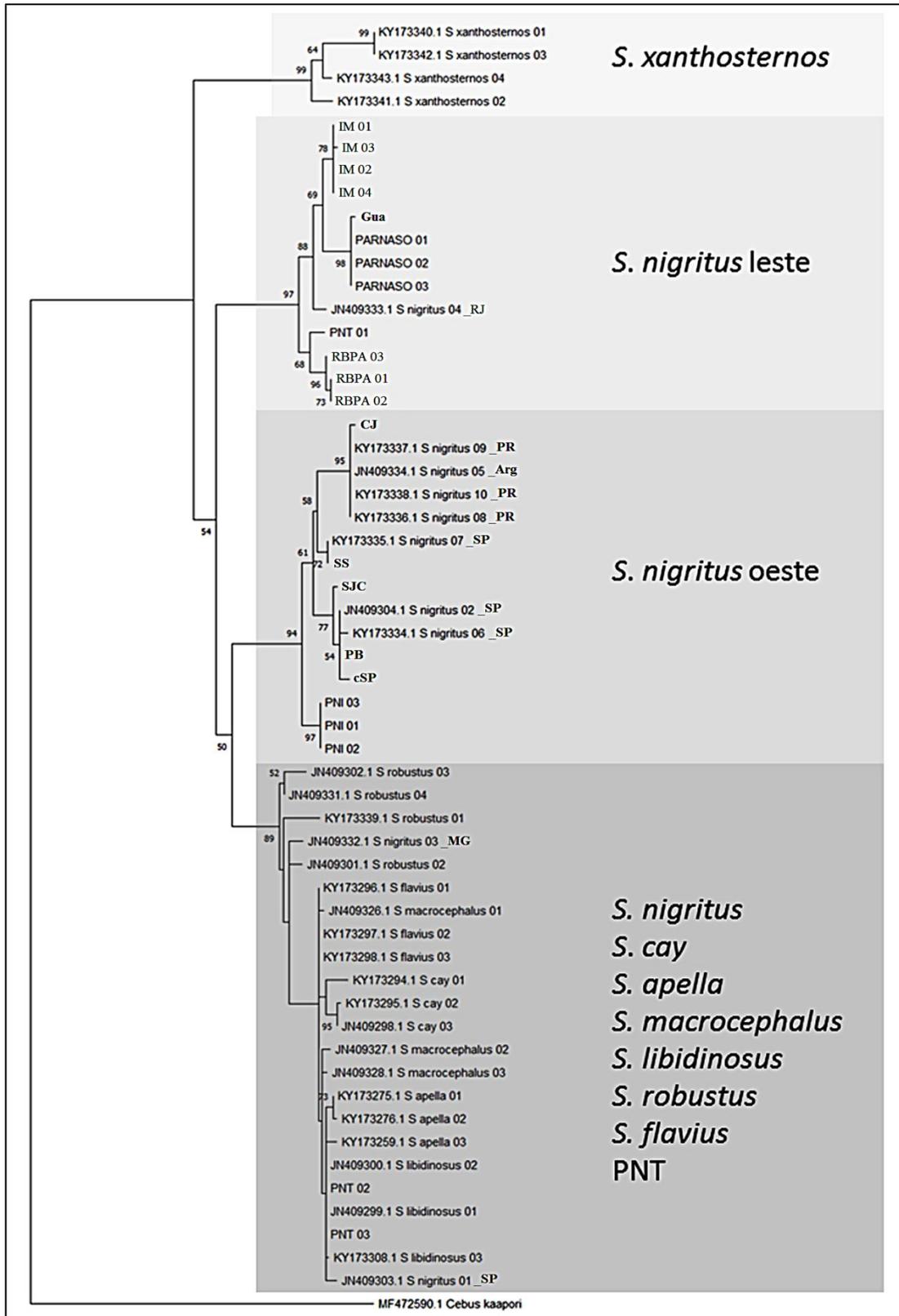


Figura 32: Árvore filogenética construída através do método de Máxima Verossimilhança, segundo o modelo *Kimura-2-parameter* (Kimura, 1980), pela comparação de seqüências do gene mitocondrial citocromo b (*MT-CYB*). Estão demonstradas as relações das amostras de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini, Cebidae), provenientes dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, com seqüências do GenBank® para esta e outras espécies. Os números

nas ramificações correspondem a valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), com base em 1000 replicações, estando representados apenas aqueles maiores que 50.

3.2 Divergência entre grupos e diversidade genética de *S. nigritus*

As análises de divergência entre os grupos e a diversidade haplotípica em *S. nigritus* foram realizadas somente com sequências desta espécie, incluindo as amostras obtidas neste estudo e aquelas da literatura. Foram excluídas as sequências de dois indivíduos do PNT (PNT_02 e PNT_03) para os três genes, por não terem agrupado nos clados de *S. nigritus* nas análises filogenéticas, além de duas sequências do GenBank®, referentes ao gene *MT-CYB* (S_nigritus_01_SP e S_nigritus_03_MG), por terem agrupado no clado em politomia.

3.2.1 Redes de haplótipos

As redes de haplótipos evidenciaram os mesmos agrupamentos entre sequências de *S. nigritus* identificados através das relações filogenéticas obtidas pelo método de Máxima Verossimilhança.

Por meio da análise das sequências do gene *MT-COI*, em cada um dos grupamentos, “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* oeste”, foram identificados três haplótipos, e a separação entre esses grupos se deu por pelo menos 17 mutações (Figura 33). No grupamento leste, IM, Gua e PARNASO compartilham o mesmo haplótipo, que diferiu do obtido para RBPA por sete e do PNT por nove mutações. No grupamento oeste, PNI, CJ, S_nigritus_02_SP e S_nigritus_03_PR compartilham o mesmo haplótipo, assim como foi observado para SJC e cSP. A sequência S_nigritus_01_SP representou um haplótipo distinto dos demais. Os haplótipos deste grupamento foram separados por no máximo duas mutações.

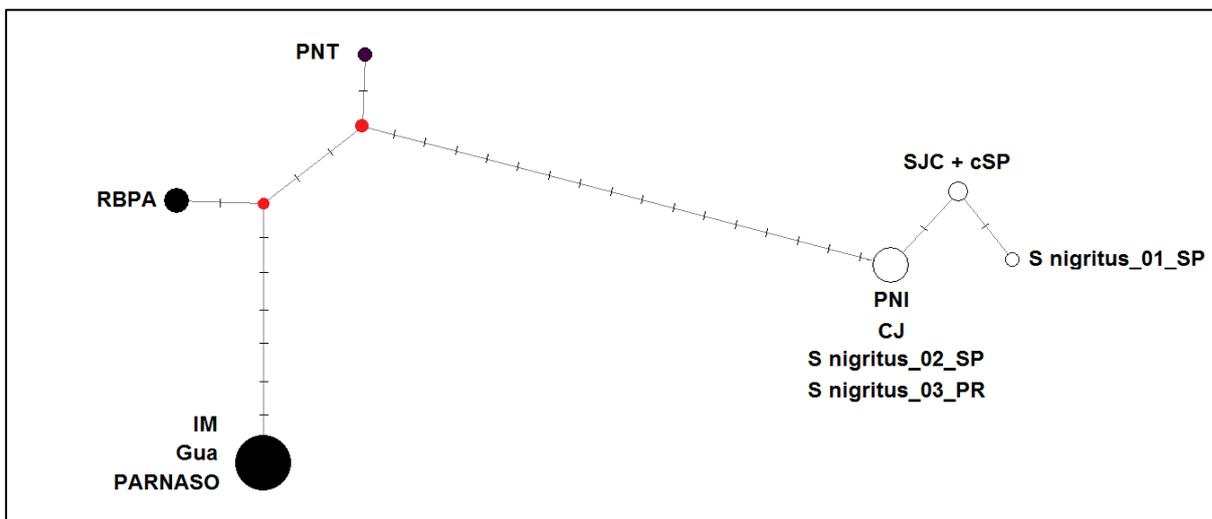


Figura 33: Rede de haplótipos gerada pelo método *Median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) através da comparação de sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (*MT-COI*) de *Sapajus nigritus*, demonstrando dois grupamentos distintos. Os círculos pretos e brancos correspondem aos grupamentos “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* oeste”, respectivamente. Pontos vermelhos representam haplótipos hipotéticos. O tamanho dos círculos pretos e brancos é proporcional ao número de sequências de cada haplótipo. Os traços representam o número de passos mutacionais entre haplótipos.

Através da análise das sequências do gene *MT-CO2*, os três grupamentos de haplótipos, “*S. nigritus* oeste”, “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* Argentina” foram identificados com dois, seis e dois haplótipos, respectivamente (Figura 34). Os agrupamentos formados pelas amostras obtidas neste estudo, de São Paulo e do Rio de Janeiro, foram separados daquele formado com sequências da Argentina por pelo menos 27 mutações, e entre si por ao menos 11 mutações. Assim como obtido com o gene *MT-CO1*, no grupamento “*S. nigritus* leste”, IM, Gua e PARNASO compartilham um haplótipo. Entretanto, na IM foram identificados outros três haplótipos, divergindo por uma mutação cada. A distância genética entre os haplótipos deste grupo para aqueles da RBPA e do PNT se deu pelo menos, por sete mutações cada. No grupamento “*S. nigritus* oeste”, CJ e SJC compartilham um haplótipo, que diferiu do PNI por apenas duas mutações. Dentre as sequências da Argentina, foram identificados dois haplótipos, separados por 10 mutações.

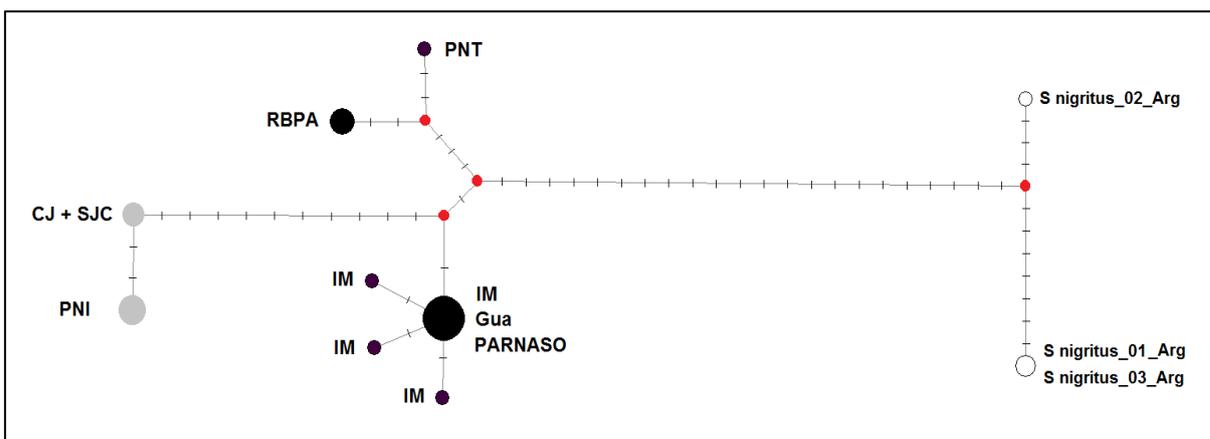


Figura 34: Rede de haplótipos gerada pelo método *Median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) através da comparação de sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase II (*MT-CO2*) de *Sapajus nigritus*, demonstrando três grupamentos. Os círculos em cinza, preto e branco correspondem aos grupamentos “*S. nigritus* oeste”, “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* Argentina”, respectivamente. Pontos vermelhos representam haplótipos hipotéticos. O tamanho dos círculos cinza, preto e branco é proporcional ao número de sequências de cada haplótipo. Os traços representam o número de passos mutacionais entre haplótipos.

Pela análise das sequências do gene *MT-CYB*, nos grupamentos “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* oeste” foram identificados seis e cinco haplótipos, respectivamente, com pelo menos 14 mutações entre os grupos (Figura 35). No grupo “*S. nigritus* leste”, apenas PARNASO e Gua compartilharam um haplótipo, enquanto na RBPA foram observados dois e na IM e PNT somente um cada. Neste grupo, as distâncias genéticas variaram de uma a sete mutações. No grupamento “*S. nigritus* oeste”, três haplótipos foram compartilhados: um deles por cSP, PB, S_nigritus_02_SP e S_nigritus_06_SP; outro por SS e S_nigritus_07_SP; e o terceiro por CJ, S_nigritus_05_Arg, S_nigritus_08_PR, S_nigritus_09_PR e S_nigritus_10_PR. As sequências de SJC e do PNI representaram haplótipos únicos. As distâncias, neste grupamento, variaram entre uma e seis mutações.

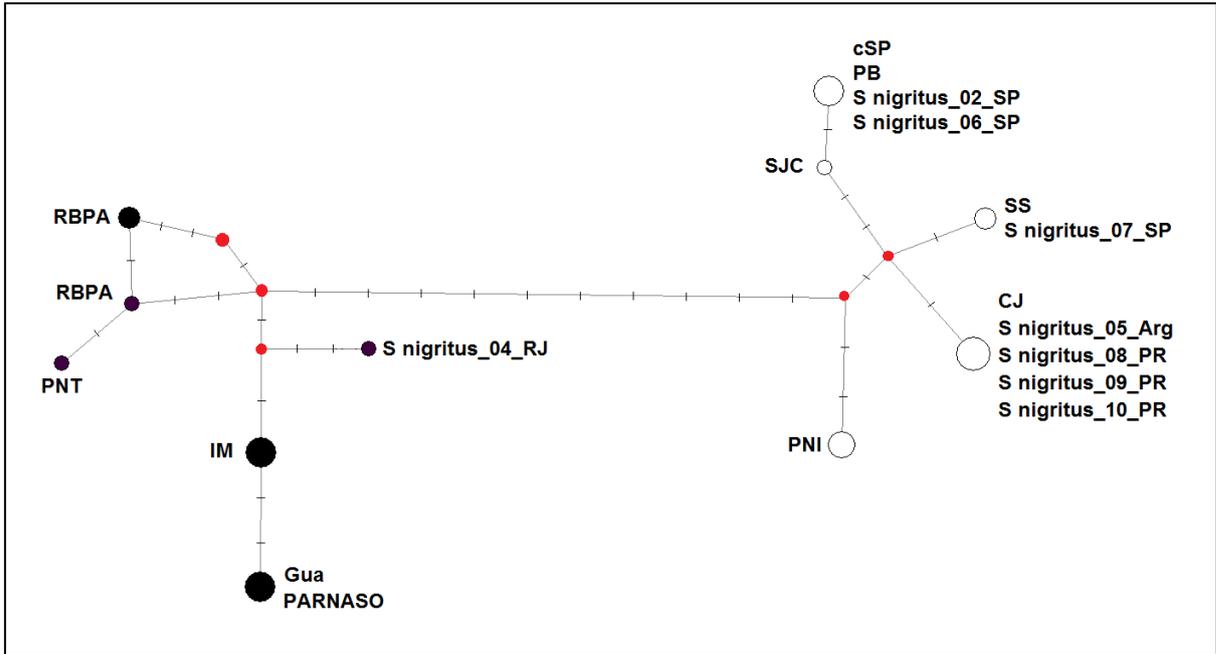


Figura 35: Rede de haplótipos gerada pelo método *Median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) através da comparação de seqüências do gene mitocondrial citocromo b (*MT-CYB*) de *Sapajus nigritus*, demonstrando dois grupamentos distintos. Os círculos pretos e brancos correspondem aos grupamentos “*S. nigritus leste*” e “*S. nigritus oeste*”, respectivamente. Pontos vermelhos representam haplótipos hipotéticos. O tamanho dos círculos pretos e brancos é proporcional ao número de seqüências de cada haplótipo. Os traços representam o número de passos mutacionais entre haplótipos.

3.2.2 Estimativas de distância genética entre grupos

As estimativas de distância genética foram realizadas entre os distintos grupos de *S. nigritus* identificados pelas análises filogenéticas e confirmadas pelas redes de haplótipos. Utilizando os genes *MT-CO1* e *MT-CYB* foram feitas as estimativas entre os grupamentos “*S. nigritus leste*” e “*S. nigritus oeste*”, enquanto para o gene *MT-CO2* as distâncias foram estimadas entre os três grupos, “*S. nigritus leste*”, “*S. nigritus oeste*” (PNI, CJ e SJC) e “*S. nigritus Argentina*”.

O valor de distância genética obtido entre os grupamentos “*S. nigritus leste*” x “*S. nigritus oeste*” com o gene *MT-CO1* foi o menor dentre os três genes analisados ($0,0032 \pm 0,0022$). Com o gene *MT-CYB*, também na comparação entre “*S. nigritus leste*” x “*S. nigritus oeste*”, foi obtido $d = 0,0421 (\pm 0,0098)$. Dentre os três grupamentos com o gene *MT-CO2*, a comparação “*S. nigritus leste*” x “*S. nigritus oeste*” resultou em $d = 0,0263 (\pm 0,0068)$, “*S. nigritus leste*” x “*S. nigritus Argentina*” em $d = 0,0605 (\pm 0,0103)$ e “*S. nigritus oeste*” x “*S. nigritus Argentina*” em $d = 0,0638 (\pm 0,0109)$, sendo estes dois últimos valores os maiores obtidos nas comparações realizadas (Tabela 13).

Tabela 13: Valores de distância genética obtidos para grupamentos de *Sapajus nigrítus* utilizando os genes *MT-CO1*, *MT-CO2* e *MT-CYB*.

Comparações	<i>MT-CO1</i> (d±DP)	<i>MT-CYB</i> (d±DP)
<i>S. nigrítus</i> leste x <i>S. nigrítus</i> oeste	0,0032 ±0,0022	0,0421 ±0,0098
Comparações	<i>MT-CO2</i> (d±DP)	
<i>S. nigrítus</i> leste x <i>S. nigrítus</i> oeste	0,0263 ±0,0068	
<i>S. nigrítus</i> leste x <i>S. nigrítus</i> Argentina	0,0605 ±0,0103	
<i>S. nigrítus</i> oeste x <i>S. nigrítus</i> Argentina	0,0638 ±0,0109	

d – valor de distância genética; DP – desvio padrão.

3.2.3 Diversidade haplotípica

Dentre as 28 sequências do gene *MT-CO1* de *S. nigrítus* analisadas, foram identificados seis haplótipos e 27 sítios polimórficos. Nas 24 sequências do gene *MT-CO2*, foram observados 10 haplótipos e 51 sítios polimórficos. Em relação ao gene *MT-CYB*, foram obtidos 11 haplótipos e 26 sítios polimórficos. Os dados de diversidade haplotípica e nucleotídica obtidos a partir das sequências de cada um dos três genes constam na tabela 14.

Tabela 14: Índices de diversidade genética obtidos para *Sapajus nigrítus* utilizando os genes *MT-CO1*, *MT-CO2* e *MT-CYB*.

Gene	NS	h	<i>Hd</i> (DP)	π (DP)	S
<i>MT-CO1</i>	28	6	0,6720 (±0,0793)	0,0176 (±0,0092)	27
<i>MT-CO2</i>	24	10	0,8406 (±0,0617)	0,0236 (±0,0123)	51
<i>MT-CYB</i>	28	11	0,9127 (±0,0241)	0,0250 (±0,0131)	26

NS – número de sequências utilizadas, h – número de haplótipos, *Hd* – diversidade haplotípica, π – diversidade nucleotídica, DP – desvio padrão, S – sítios polimórficos.

4 DISCUSSÃO

As relações filogeográficas observadas através da análise de 27 sequências do gene *MT-CO1*, 23 de *MT-CO2* e 22 de *MT-CYB*, nas localidades de São Paulo e Rio de Janeiro em comparação com aquelas disponíveis na literatura, demonstraram agrupamentos parafiléticos em *S. nigrítus*. Os clados observados, “*S. nigrítus* oeste” e “*S. nigrítus* leste” (*MT-CO1* e *MT-CYB*) e “*S. nigrítus* oeste”, “*S. nigrítus* leste”, e “*S. nigrítus* Argentina” (*MT-CO2*), não parecem estar relacionados com as áreas de ocorrência descritas para *S. n. nigrítus* e *S. n. cucullatus*, pois a região onde foi observada a divergência, no Rio de Janeiro, não corresponde ao limite da distribuição entre as subespécies, que ocorre em São Paulo (Groves, 2001a; Rylands *et al.*, 2005; Lynch Alfaro *et al.*, 2014).

De forma geral nas árvores filogenéticas, os agrupamentos formados pelas sequências de *S. nigritus* foram representados de forma mais proximamente relacionada a *S. xanthosternus*, correspondendo aos achados que demonstram estas espécies como as primeiras a surgirem na história evolutiva de *Sapajus* (Lima *et al.*, 2017; Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Lynch Alfaro *et al.*, 2012b; Martins-Jr *et al.*, 2018; Ruiz-García *et al.*, 2012).

As demais espécies, *S. cay*, *S. apella*, *S. macrocephalus*, *S. libidinosus*, *S. robustus* e *S. flavius*, foram agrupadas em politomia (*MT-COI* e *MT-CYB*), como observado anteriormente (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Lima *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2018; Martins-Jr *et al.*, 2018). Somente *S. flavius*, através da análise do gene *MT-COI*, foi demonstrada como um grupo monofilético. As duas sequências do PNT que agruparam no clado em politomia (*MT-COI* e *MT-CYB*) ou com *S. cay* (*MT-CO2*), podem corresponder a indivíduos híbridos de *S. nigritus*, com base no padrão de pelagem (capítulo I). As inclusões das sequências S_nigritus_01_SP e S_nigritus_03_MG também no clado em politomia (*MT-CYB*), já haviam sido identificadas, correspondendo a indivíduos provavelmente híbridos, por serem provenientes de localidades onde a distribuição de *S. nigritus* faz contato com outras espécies (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a).

Os distintos agrupamentos em *S. nigritus*, demonstrados nas árvores filogenéticas, foram confirmados pelas análises de redes de haplótipos, que evidenciaram uma distância maior entre “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* oeste” nos resultados com *MT-COI* e *MT-CYB*, e destes grupos com “*S. nigritus* Argentina”, considerando o *MT-CO2*.

Pela comparação dos haplótipos, foi possível identificar ainda a diversidade contida em cada grupamento. Ao serem analisados os genes *MT-COI* e *MT-CYB*, houve maior variabilidade genética no clado “*S. nigritus* leste”, considerando a relação entre a quantidade de haplótipos e número de mutações entre estes, com o tamanho de cada área amostrada. Com o gene *MT-COI*, o clado “*S. nigritus* oeste” acumula menor número de mutações do que o clado “*S. nigritus* leste” e no gene *MT-CYB* o número destes eventos foi aproximadamente o mesmo. Além disso, em ambos os genes, no clado “*S. nigritus* oeste”, um mesmo haplótipo foi compartilhado por localidades distantes, como PNI e Paraná (*MT-COI*) e CJ e Argentina (*MT-CYB*), que são áreas com 480 Km e 900 Km de distância, respectivamente. Desse modo, as populações do Rio de Janeiro podem ser consideradas mais diversas, pois em uma área de distribuição menor, foram observadas quantidades iguais ou maiores de haplótipos e passos mutacionais do que nas demais. Através da análise do gene *MT-CO2*, a rede de haplótipos também demonstrou o grupamento “*S. nigritus* leste” como mais diverso, principalmente pela população da IM, que apresentou a mesma quantidade de haplótipos dos grupamentos “*S. nigritus* oeste” e “*S. nigritus* Argentina” somados. Nestes cladogramas, a baixa quantidade de haplótipos provavelmente se deu pelo também baixo número de sequências analisadas.

O valor de divergência entre os grupos “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* oeste”, estimados com o gene *MT-COI*, foi o mais baixo dentre as comparações deste estudo ($d = 0,0032$), estando dentro do esperado entre populações de uma mesma espécie ($d = 0,0089 \pm 0,0016$), segundo a estimativa para grupos animais utilizando este gene, e a consideração entre subespécies somente se daria a partir de $d = 0,0378 (\pm 0,0118 - \text{Kartavtsev, 2011})$.

A divergência obtida por meio da análise do gene *MT-CO2* entre “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* oeste” ($d = 0,0263$), está próxima à estimativa mínima, que varia entre 0,02 e 0,04, para subespécies em primatas neotropicais (Ascunce *et al.*, 2003; Collins & Dubach, 2000; Ruiz-García *et al.*, 2016). Entre espécies de um mesmo gênero, a estimativa seria em média $d = 0,0582$, menor do que o observado na comparação entre os cladogramas “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* Argentina” ($d = 0,0605$) e entre “*S. nigritus* oeste” e “*S. nigritus* Argentina” ($d = 0,0638$). O valor obtido entre “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* oeste” é maior

que o publicado, com o mesmo gene, entre *S. macrocephalus* e *S. cay*, com $d = 0,002$, entre *S. macrocephalus* e *S. apella*, com $d = 0,007$ (Ruiz-García *et al.*, 2012) e entre *S. nigritus* e *S. cay*, com $d = 0,0175$ (Martinez *et al.*, 2002). Os valores obtidos entre os clados “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* Argentina” e entre “*S. nigritus* oeste” e “*S. nigritus* Argentina” são maiores que o publicado entre *S. macrocephalus* e *S. nigritus*, com $d = 0,035$ (Ruiz-García *et al.*, 2012). Comparando a dados publicados para outros gêneros, os valores obtidos pelas comparações das amostras de *S. nigritus* de São Paulo e Rio de Janeiro com aquelas da Argentina são próximos ao observado entre subespécies de *Cebus albifrons*, com $d = 0,061$ (Ruiz-García *et al.*, 2012) e maiores do que o observado entre espécies de macacos-aranha (*Ateles*), com $d = 0,0470$ (Collins & Dubach, 2000), de mico-de-cheiro (*Saimiri*), com $d = 0,031$ e de macaco-da-noite (*Aotus*), com $d = 0,06$ (Ascunce *et al.*, 2003).

Assim como foi observado com o gene *MT-CO1*, a distância genética obtida entre os grupamentos “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* oeste” com o gene *MT-CYB* ($d = 0,0421$) é maior que a estabelecida entre populações de espécies animais, que seria de aproximadamente $d = 0,0138 (\pm 0,003)$, mas é menor que o valor para consideração entre subespécies, que se daria a partir de $d = 0,0510 (\pm 0,0091)$ para esse gene (Kartavtsev, 2011). O valor obtido é maior que o publicado entre haplótipos de *S. cay*, variando de $d = 0,001$ a $0,01$ e entre *S. cay* e *S. apella*, com diferença média de $d = 0,013$ (Casado *et al.*, 2010). O valor também é maior quando comparado a distâncias obtidas entre espécies de outros gêneros de Platyrrhini, como em sagui (*Callithrix*), com $d = 0,01$ (Cezar *et al.*, 2017) e em guigó (*Callicebus*), com $d = 0,040$ (Casado *et al.*, 2007).

A divergência observada entre os grupos “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* oeste” pode estar relacionada à área de descontinuidade filogeográfica, relatada em espécies da Mata Atlântica nessa mesma região, decorrente de refúgios florestais ocorridos no Pleistoceno (Grazziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2007; Carnaval *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009). Essa descontinuidade corresponde, também, ao observado na transição dos fenótipos preto e marrom e dos polimorfismos de HC extra-centromérica no par 11 (capítulos I e II). É possível que a divergência observada entre os grupos tenha sofrido influência também do Rio Paraíba do Sul, considerado o principal rio da região sudeste em termos geológicos (Dias & Kjerfve, 2009), que se estende entre os paralelos $20^{\circ}26'$ e $23^{\circ}38'$ sul e os meridianos $41^{\circ}00'$ e $46^{\circ}30'$ oeste, com nascentes formadas pela confluência dos rios Paraitinga e Paraibuna, na serra da Bocaina, Estado de São Paulo (Teixeira *et al.*, 2005). O principal indício deste rio como barreira para a diferença observada entre os clados de *S. nigritus* foi o agrupamento das sequências do PNI com aquelas de São Paulo, Paraná e Argentina, todas a partir da margem esquerda desse rio, enquanto as demais sequências do estado do Rio de Janeiro (Angra dos Reis, IM, Gua, PNT, PARNASO e RBPA) estão a partir da margem direita. Embora evidências biogeográficas já tenham demonstrado que rios podem não ser barreiras efetivas para dispersão em diversas espécies de primatas (Goldani *et al.*, 2006; Rabelo *et al.*, 2014), seja pela capacidade de nadar, dispersão antes do estabelecimento do rio ou mudanças no seu curso, por exemplo (Goldani *et al.*, 2006), outras evidências sugerem que rios foram os responsáveis por impedir a dispersão de primatas. Alguns exemplos são o estabelecimento do Rio Amazonas, fundamental no evento de vicariância entre os ancestrais de *Sapajus* e *Cebus* (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a), a ocorrência de duas linhagens de sauá-de-colar (*Callicebus lugens*), identificadas com grande divergência em margens diferentes do Rio Negro, estado do Amazonas (Casado *et al.*, 2006), assim como o observado entre populações de sagui-una (*Saguinus niger*), com divergência entre populações em diferentes margens do Rio Tocantins, estado do Pará (Vallinoto *et al.*, 2006). Os exemplos não se restringem aos primatas neotropicais, já tendo sido demonstrada a efetividade de rios como barreiras para dispersão em diversos grupos de primatas africanos, por exemplo (Harcourt & Wood, 2012). A análise

de populações de *S. nigritus* ao longo do Rio Paraíba do Sul, em ambas as margens, poderá confirmar sua influência na divergência observada.

Na história evolutiva de *Sapajus*, Lynch Alfaro *et al.* (2012a) sugerem que a primeira divergência se deu na porção sul da distribuição de *S. nigritus*, separando as localidades da Argentina até o Rio de Janeiro daquelas ao norte da distribuição da espécie, e que estas estariam mais próximas a *S. robustus* e *S. xanthosternos*. Os resultados obtidos através da comparação de sequência dos genes *MT-CO1*, *MT-CO2* e *MT-CYB* em distintas localidades da distribuição da espécie demonstraram que a divergência inicial provavelmente não inclui as populações do Rio de Janeiro, e que estas devem estar mais próximas a *S. xanthosternos*, assim como observado por Martins-Jr *et al.* (2018).

Os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica obtidos para *S. nigritus*, considerando todos os grupamentos em conjunto, foram maiores para o gene *MT-CYB* ($Hd = 0,9127$; $\pi = 0,0250$; $h = 11$; $S = 26$), seguido do gene *MT-CO2* ($Hd = 0,8406$; $\pi = 0,0236$; $h = 10$; $S = 51$) e, de forma menos diversa, do gene *MT-CO1* ($Hd = 0,6720$; $\pi = 0,0176$; $h = 6$; $S = 27$). Os valores de Hd foram menores que o encontrado por Ruiz-García *et al.* (2012) em amostras de *S. nigritus* da Argentina, utilizando o gene *MT-CO2* ($Hd = 1,000 \pm 0,500$). Entretanto, o valor máximo obtido por esses autores provavelmente está sob influência do baixo número amostral ($n = 2$), o que é refletido no elevado desvio padrão apresentado. A diversidade nucleotídica, por outro lado, foi maior para todos os genes neste estudo, quando comparados com o valor obtido por esses autores ($\pi = 0,0169 \pm 0,00847$), o que também pode ter relação com o número amostral, uma vez que é esperado identificar maior variabilidade genética em um número maior de sequências. A análise de um número maior de amostras, provenientes de mais áreas ao longo da distribuição de *S. nigritus* e empregando três genes mitocondriais, tornam os dados de diversidade genética aqui obtidos mais representativos para a espécie em comparação com o publicado anteriormente.

Os valores de diversidade genética obtidos para *S. nigritus*, com os genes *MT-CO2* e *MT-CYB*, foram maiores que os encontrados para *S. xanthosternos* ($Hd = 0,7029$; $h = 9$; $S = 29$), obtidos a partir de 24 amostras, analisando a região D-loop (Oliveira *et al.*, 2011). A comparação dos valores obtidos para ambas as espécies, embora com genes mitocondriais diferentes, sugerem uma maior diversidade de *S. nigritus* em relação a *S. xanthosternos*, como previamente descrito (Ruiz-García *et al.*, 2012).

A área amostrada entre São Paulo e Rio de Janeiro parece ser uma região de descontinuidade filogeográfica e alta diversidade em *S. nigritus*, tanto pela ocorrência de ambos os padrões de pelagem e de polimorfismo cromossômico no par 11 (capítulos I e II), como pela distância genética demonstrada pela análise das sequências dos genes mitocondriais citocromo c oxidase I, II e citocromo b. De forma geral, na origem da biodiversidade neotropical, não é possível assumir que a diversificação das espécies tenha se dado apenas por um ou poucos processos evolutivos, mas sim por um complexo conjunto de forças seletivas (Batalha-Filho & Miyaki, 2014), estando intimamente relacionadas às dependências ecológicas e requerimentos de habitats de cada grupo (Batalha-Filho *et al.* 2012). Embora a ocorrência de refúgios florestais e a presença do Rio Paraíba do Sul possam ter contribuído para diversidade fenotípica, cromossômica e de DNA mitocondrial de *S. nigritus*, é preciso investigar quais outros mecanismos estão guiando a evolução desta espécie.

Os clados “*S. nigritus* leste” e “*S. nigritus* oeste” podem representar diferentes unidades evolutivamente significativas (UES), que correspondem a linhagens com patrimônios genéticos distintos (Ryder, 1986; Moritz, 1994). A determinação de UES permite a conservação das espécies respeitando os processos históricos à que elas estiveram sujeitas

em sua evolução (Galetti Jr *et al.*, 2008). No Brasil, já foram descritas UES para arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*), com base em dados de marcadores microsatélite e da região controle do DNA mitocondrial (Faria *et al.*, 2008) e para o lobo-marinho sul-americano (*Arctocephalus australis*), com base em dados morfométricos e de marcadores microsatélites (Oliveira *et al.*, 2008), representando dois importantes exemplos do estabelecimento de UES para conservação das espécies (Galetti Jr *et al.*, 2008). Assim, o reconhecimento dos agrupamentos “*S. nigrinus* leste” e “*S. nigrinus* oeste” como UES pode contribuir na conservação de ambas as heranças evolutivas, visando à preservação da diversidade genética de *S. nigrinus*, considerada “Quase ameaçada”, com populações em declínio, segundo a União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN - Martins *et al.*, 2019).

5 CONCLUSÕES

As árvores filogenéticas, redes de haplótipos e valores de distância genética, obtidos a partir de sequências de três genes mitocondriais, demonstraram que *Sapajus nigrinus* não forma um grupo monofilético, podendo apresentar duas linhagens evolutivas, representadas pelos grupamentos “*S. nigrinus* leste” (Ilha da Marombaia, Guaratiba, Parque Nacional da Tijuca, Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Reserva Biológica de Poço das Antas, RJ) e “*S. nigrinus* oeste” (Parque Nacional do Itatiaia, RJ, estados de São Paulo e Paraná, e região de Misiones, Argentina).

Os valores de distância genética obtidos pelas análises das sequências dos genes *MT-CO1*, *MT-CO2* e *MT-CYB*, entretanto, não correspondem ao esperado para designar os agrupamentos de *S. nigrinus* como subespécies, os quais podem representar distintas unidades evolutivamente significativas.

A divergência entre os grupamentos “*S. nigrinus* leste” e “*S. nigrinus* oeste” reforçam a região da Mata Atlântica entre São Paulo e Rio de Janeiro como uma importante área de descontinuidade para grupos dependentes de ambientes florestais.

O Rio Paraíba do Sul, que parece ter contribuído para a divergência observada, deve ser investigado como uma barreira geográfica para o fluxo gênico em *S. nigrinus*, incluindo nas análises um número maior de populações em toda sua extensão.

Devem ser analisadas populações de *S. nigrinus* em pontos da distribuição com deficiência de amostragem, como nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com o objetivo de se verificar a diversidade da espécie em toda sua distribuição.

CONCLUSÕES GERAIS

As análises fenotípicas, citogenéticas e de genética molecular em *Sapajus nigrinus* demonstraram, através dos distintos padrões de pelagem, polimorfismos cromossômicos e diferenças entre haplótipos, uma área de descontinuidade filogeográfica na região entre São Paulo e Rio de Janeiro.

A variação na pelagem de forma intrapopulacional foi confirmada em um número maior de amostras na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, e demonstrada também em indivíduos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Teresópolis, e na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, RJ.

Nas demais localidades onde não foi observada variação intrapopulacional da coloração da pelagem, como Parque Nacional do Itatiaia e Parque Nacional da Tijuca, deve ser analisado um número maior de indivíduos visando verificar se ocorrem ambos padrões descritos para *S. nigrinus*.

A predominância dos padrões de pelagem preto e marrom, no sentido sul-norte da distribuição de *S. nigrinus*, parece ter seu limite entre São Paulo e Rio de Janeiro, não estando associada às subespécies.

A associação entre as medidas comprimento do corpo, massa corporal e tamanho do canino foi eficiente na separação das faixas etárias de machos e fêmeas de *S. nigrinus* e devem ser associadas às características de pelagem na identificação da faixa etária de indivíduos em vida livre.

Foi demonstrada a ocorrência do par cromossômico 11 com duas formas distintas, representadas por um pequeno acrocêntrico, na maioria das populações estudadas, e o maior par cromossômico com grande bloco de heterocromatina constitutiva terminal, sendo a única espécie relatada até o momento a apresentar ambos em sua distribuição.

A distribuição observada nas distintas formas do par cromossômico 11 pode indicar que o surgimento do pequeno acrocêntrico tenha se dado na região entre São Paulo e Rio de Janeiro, radiando ao leste, nas populações do estado do Rio de Janeiro, e ao sul, até a Argentina.

Analisando 27 sequências do gene citocromo c oxidase I, 23 do gene citocromo c oxidase II e 22 do gene citocromo b foi demonstrada uma provável divergência evolutiva entre populações de *S. nigrinus* no estado do Rio de Janeiro (exceto Parque Nacional do Itatiaia) para o restante da distribuição.

Os distintos agrupamentos observados pelas análises dos haplótipos podem ser resultado de sucessivos eventos de isolamento e recolonização de refúgios florestais ocorridos no Pleistoceno, bem como da influência do Rio Paraíba do Sul, que os separa.

A diversidade de *S. nigrinus*, observadas através das análises fenotípicas, citogenéticas e moleculares, com a possível existência de unidades evolutivamente significativas, deve ser considerada em programas de manejo conservacionista, visando à manutenção do patrimônio genético da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L.M. **Os primatas do corredor do Alto Rio Paraná (região de Porto Rico, estados do Paraná e Mato Grosso do Sul): ocorrência, georreferenciamento e parâmetros populacionais.** (Dissertação de Mestrado). Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2006.
- AMARAL, P.J.S.; FINOTELO, L.F.M.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; PISSINATTI, A.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C. Phylogenetic studies of the genus *Cebus* (Cebidae: Primates) using chromosome painting and G-banding. **BMC Evolutionary Biology**, 8(1): 169. 2008.
- AMARO, R.C.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; CARNAVAL, A.C. Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 62(3): 880-888. 2012.
- AQUINO, R. & ENCARNACIÓN, F. Population structure of *Aotus nancymai* (Cebidae: Primates) in Peruvian Amazon Lowland Forest. **American Journal of Primatology**, 11(1): 1-7. 1986.
- ARGÜELLES, C.F.; SUÁREZ, P.; GIMÉNEZ, M.D.; BIDAU, C.J. Intraspecific chromosome variation between different populations of *Ctenomys dorbignyi* (Rodentia, Ctenomyidae) from Argentina. **Acta Theriologica**, 46(4): 363-373. 2001.
- ARÍSTIDE, L.; SOTO, I.M.; MUDRY, M.D.; NIEVES, M. Intra and interspecific variation in cranial morphology on the southernmost distributed *Cebus* (Platyrrhini, Primates) species. **Journal of Mammalian Evolution**, 21(1): 349-355. 2013.
- ARMADA, J.L.A.; BARROSO, C.M.L.; LIMA, M.M.C.; MUNIZ, J.A.P.C.; SEUÁNEZ, H.N. Chromosome Studies in *Alouatta belzebul*. **American Journal of Primatology**, 13(3): 283-296. 1987.
- ASCUNCE, M.S.; HASSON, E.; MUDRY, M.D. Description of the cytochrome c oxidase subunit II gene in some genera of New World monkeys (Primates, Platyrrhini). **Genetica**, 114(3): 253-267. 2002.
- ASCUNCE, M.S.; HASSON, E.; MUDRY, M.D. COII: a useful tool for inferring phylogenetic relationships among New World monkeys (Primates, Platyrrhini). **Zoologica Scripta**, 32(5): 397-406. 2003.
- AXIMOFF, I.; CRONEMBERGER, C.; PEREIRA, F.A. Amostragem de longa duração por armadilhas fotográficas dos mamíferos terrestres em dois parques nacionais no estado do Rio de Janeiro. **Oecologia Australis**, 19(1): 215-231. 2015.
- BACALHAO, M.B.M.; FIRMINO, M.O.; SIQUEIRA, R.A.S.; RAMALHO, A.C.; CAVALCANTE, T.A.; NERY, T.F.L.; GUERRA, R.R. Descrição morfológica de duas espécies de *Sapajus* encontradas na Paraíba: *S. libidinosus* e o recém redescoberto e já criticamente ameaçado *S. flavius*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36(4): 317-321. 2016.

- BALCELLS, C.D. & BARÓ, J.J.V. Developmental stages in the howler monkey, subspecies *Alouatta palliata mexicana*: a new classification using age-sex categories. **Neotropical Primates**, 16(1): 1-8. 2009.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16(1): 37-48. 1999.
- BARROS, R.M.S.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; RODRIGUES, L.R.R.; NEUSSER, M.; DE OLIVEIRA, E.H.; WIENBERG, J.; MUNIZ, J.A.P.C.; RISSINO, J.D.; MULLER, S. Chromosomal studies in *Callicebus donacophilus pallescens*, with classic and molecular cytogenetic approaches: Multicolour FISH using human and *Saguinus oedipus* painting probes. **Chromosome Research**, 11(4): 327-334. 2003.
- BEHRINGER, V.; DESCHNER, T.; MURTAGH, R.; STEVENS, J.M.G.; HOHMANN, G. Age-related changes in Thyroid hormone levels of bonobos and chimpanzees indicate heterochrony in development. **Journal of Human Evolution**, 66(1): 83-88. 2014.
- BEZERRA, B.M.; BASTOS, M.; SOUTO, A.; KEASEY, M.P.; EASON, P.; SCHIEL, N.; JONES, G. Camera trap observations of nonhabituated critically endangered wild blonde capuchins, *Sapajus flavius* (formerly *Cebus flavius*). **International Journal of Primatology**, 35(5): 895-907. 2014.
- BOUBLI, J.P.; SILVA, M.N.F.; RYLANDS, A.B.; NASH, S.D.; BERTOUL, F.; NUNES, M.; MITTERMEIER, R.A.; BYRNE, H.; SILVA, F.E.; RÖHE, F.; SAMPAIA, I.; SCHNEIDER, H.; FARIAS, I.P.; HRBEK, T. How many pygmy marmoset (*Cebuella* Gray, 1870) species are there? A taxonomic re-appraisal based on new molecular evidence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 120(1): 170-182. 2018.
- BOUCHET, H.; BLOIS-HEULIN, C.; LEMASSON, A. Age- and sex-specific patterns of vocal behavior in De Brazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*). **American Journal of Primatology**, 74(1): 12-28. 2012.
- BRAGAGNOLO, C. & PINTO-DA-ROCHA, R. Diversidade de opiliões do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, Brasil (Arachnida: Opiliones). **Biota Neotropica**, 3(1): 1-20. 2003.
- BROWN, K.S. & AB'SÁBER, A. N. Ice-ages forest refuges and evolution in the Neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological, and pedological data with modern biological endemism. **Paleoclimas**, 5(1): 1-30. 1979.
- BROWN, W.M.; PRAGER, E.M.; WANG, A.; WILSON, A.C. Mitochondrial DNA sequences of Primates: tempo and mode of evolution. **Journal of Molecular Evolution**, 18(4): 225-239. 1982.
- CABANNE, G.S.; SANTOS, F.R.; MIYAKI, C.Y. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, 91(1): 73-84. 2007.
- CABANNE, G.S.; D'HORTA, F.M.; SARI, E.H.R.; SANTOS, F.R.; MIYAKI, C.Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic Forest endemic *Xiphorhynchus fuscus*

(Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematic implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49(3): 760-773. 2008.

CABRERA, A. Catalogo de los mamíferos de América Del Sur. **Revista do Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia**. 1: 1–307. 1957.

CARNAVAL, A.C.; HICKERSON, M.J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, 323(5915): 785-789. 2009.

CARVALHO, F.A.; NASCIMENTO, M.T.; BRAGA, J.M.A.; RODRIGUES, P.J.F.P. Estrutura da comunidade arbórea da Floresta Atlântica de baixada periodicamente inundada na Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, 57(3): 503-518. 2006.

CARVALHO, A.L.G.; DE ARAÚJO, A.F.B.; DA SILVA, H.R. Lagartos da Marambaia, um remanescente insular de Restinga e Floresta Atlântica no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Biota Neotropica**, 7(2): 221-226. 2007.

CASADO, F.; BONVICINO, C.R.; SEUÁNEZ, H.N. Phylogeographic analyses of *Callicebus lugens* (Platyrrhini, primates). **Journal of Heredity**, 98(1): 88-92. 2007.

CASADO, F.; BONCIVINO, C.R.; NAGLE, C.; COMAS, B.; MANZUR, T.D.; LAHOZ, M.M.; SEUÁNEZ, H.N. Mitochondrial Divergence Between 2 Populations of the Hooded Capuchin, *Cebus (Sapajus) cay* (Platyrrhini, Primates). **Journal of Heredity**, 101(3): 261-269. 2010.

CEZAR, A.M.; PESSÔA, L.M.; BONVICINO, C.R. Morphological and genetic diversity in *Callithrix* hybrids in an anthropogenic area in southeastern Brazil (Primates: Cebidae: Callitrichinae). **Zoologia**, 34(1): 1-9. 2017.

CHALK, J.; WRIGHT, B.W.; LUCAS, P.W.; SCHUHMACHER, K.D.; VOGEL, E.R.; FRAGASZY, D.; VISALBERGHI, E.; IZAR, P.; RICHMOND, B.G. Age-related variation in the mechanical properties of foods processed by *Sapajus libidinosus*. **American Journal of Physical Anthropology**, 159(2): 199-209. 2015.

CLEMENTE, I.C.; GARCIA, M.; PONSÀ, M.; EGOZCUE, J. High-Resolution Chromosome Banding Studies in *Cebus apella*, *Cebus albifrons*, and *Lagothrix lagothricha*: Comparison With the Human Karyotype. **American Journal of Primatology**, 13(1): 23-26. 1987.

COLLINS, A.C. & DUBACH, J.M. Phylogenetic relationships of spider monkeys (*Ateles*) based on mitochondrial DNA variation. **International Journal of Primatology**, 21(3): 381–420. 2000.

CONDE, M.M.S.; LIMA, H.R.P.; PEIXOTO, A.L. Aspectos florísticos e vegetacionais da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. In: MENEZES, L.F.T.; PEIXOTO, A.L.; ARAUJO, D.S.D. (Orgs.). **História Natural da Marambaia**. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, p.15-38. 2005.

COSTA, D.P. & YANO, O. Hepáticas talosas do Parque Nacional da Tijuca, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 1(2): 73-82. 1988.

CRACRAFT, J. Species concepts and speciation analysis. In: JOHNSON, R.F. (Org.). **Current Ornithology**. Plenum Press, New York, p. 159-187. 1983.

CRACRAFT, J. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In: OTTE, D., ENDLER, J.A. (Orgs.). **Speciation and Its Consequences**. Sinauer Associates, Sunderland, p. 28-59. 1989.

DIAS, G.T.M. & KJERFVE, B. Barrier and Beach Ridge Systems of the Rio de Janeiro Coast. In: DILLENBURG, S.R. & HESP, P. (Orgs.). **Geology and Geomorphology of Holocene Coastal Barriers of Brazil**. 1.ed. Springer, Heidelberg, p.225-248. 2009.

DIAS, M.A. & NETTO, A.L.C. Distribuição de manchas de gramínea em um fragmento de floresta atlântica urbana montanhosa – Maciço da Tijuca, RJ. **Revista de Geografia**, 27(2): 148-164. 2010.

DÍAZ, M.M.; FLORES, D.A.; BARQUEZ, R.M. A new species of gracile mouse opossum, genus *Gracilinanus* (Didelphimorphia: Didelphidae), from Argentina. **Journal of Mammalogy**, 83(3): 824-833. 2002.

DUMAS, F. & MAZZOLENI, S. Neotropical primate evolution and phylogenetic reconstruction using chromosomal data. **The European Zoological Journal**, 84(1): 1-18, 2017.

ENDLER, J.A. **Geographic variation, speciation, and clines**. Princeton: University Press, 246p. 1977.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, 1(1): 47-50. 2005.

FARIA, P.J.; GUEDES, N.M.; YAMASHITA, C.; MARTUSCELLI, P.; MIYAKI, C.Y. Genetic variation and population structure of the endangered Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*): implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, 17(4): 765-779. 2008.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, 39(4): 783-791. 1985.

FILHO, H.B. & MIYAKI, CY. Filogeografia da Mata Atlântica. **Revista da Biologia**, 7(1): 31-34. 2011.

FRAGASZY, D.M.; VISALBERGHI, E.; FEDIGAN, L.M. **The complete capuchin**. 1ª ed. New York: Cambridge University Press, 345p. 2004.

FRAGASZY, D.M.; IZAR, P.; LIU, Q.; ESHCHAR, Y.; YOUNG, L.A.; VISALBERGHI, E. Body Mass in Wild Bearded Capuchins, (*Sapajus libidinosus*): Ontogeny and Sexual Dimorphism. **American Journal of Primatology**, 78(4): 473-484. 2015.

FREITAS, L. & SEUÁNEZ, H. Chromosome heteromorphisms in *Cebus apella*. **Journal of Human Evolution**, 10(2): 173-180. 1982.

- FREITAS, S.R.; NEVES, C.L.; CHERNICHARO, P. Tijuca National Park: two pioneering restorationist initiatives in Atlantic Forest in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 66(4): 975-982. 2006.
- FREITAS, M.F. & CARRIJO, T.T. A família Myrsinaceae nos contrafortes do Maciço da Tijuca e entorno do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, 59(4): 813-828. 2008.
- GALBANY, J.; ROMERO, A.; MAYO-ALESÓN, M.; ITSOMA, F.; GAMARRA, B.; PÉREZ-PÉREZ, A.; WILLAUME, E.; KAPPLER, P.M.; CHARPENTIER, M.J.E. Age-related tooth wear differs between forest and savanna primates. **Plos One**, 9(4): 1-7. 2014.
- GALBANY, J.; TUNG, J.; ALTMANN, J.; ALBERTS, S.C. Canine length in wild male baboons: maturation, aging and social dominance rank. **Plos One**, 10(5): 1-16. 2015.
- GALETTI JR, P.M.; RODRIGUES, F.P.; SOLÉ-CAVA, A.; MIYAKI, C.Y.; CARVALHO, D.; EIZIRIK, E.; VEASEY, E.A.; SANTOS, F.R.; FARIAS, I.P.; VIANNA, J.A.; OLIVEIRA, L.R.; WEBER, L.I.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FRANCISCO, M.R.; REDONDO, R.A.F.; SICILIANO, S.; DEL LAMA, S.N.; FREITAS, T.R.O.; HRBEK, T.; MOLINA, W.F. Genética da conservação na biodiversidade brasileira. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A (Orgs.). **Fundamentos de Genética da Conservação**. Editora SBG, Ribeirão Preto, 290p. 2008.
- GALVIS, N.; LINK, A.; DI FIORE, A. A novel use of camera traps to study demography and life history in wild animals: a case study of spider monkeys (*Ateles belzebuth*). **International Journal of Primatology**, 35(1): 908-918. 2014.
- GARCIA, M.; MIRÓ, R.; ESTOP, A.; PONSÀ, M.; EGOZCUE, J. Constitutive Heterochromatin Polymorphism in *Lagothrix lagothricha cana*, *Cebus apella*, and *Cebus capucinus*. **American Journal of Primatology**, 4(2): 117-126. 1983.
- GARCIA, F.; RUIZ-HERRERA, A.; EGOZCUE, J.; PONSÀ, M.; GARCIA, M. Chromosomal Homologies Between *Cebus* and *Ateles* (Primates) Based on ZOO-FISH and G-Banding Comparisons. **American Journal of Primatology**, 57(4): 177-188. 2002.
- GOLDANI, A.; CARVALHO, G.S.; BICCA-MARQUES, J.C. Distribution patterns of Neotropical primates (Platyrrhini) based on Parsimony Analysis of Endemicity. **Brazilian Journal of Biology**, 66(1): 61-74. 2006.
- GONÇALVES, C.S. **Distribuição e conservação do macaco-prego (*Cebus nigrilus* – Goldfuss 1809) e documentação do conhecimento ecológico local na região do Parque Estadual de Itapeva e arredores, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil**. (Dissertação de Mestrado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006.
- GRAPHODATSKY, A.S.; TRIFONOV, V.A.; STANYON, R. The genome diversity and karyotype evolution of mammals. **Molecular cytogenetics**, 4(1): 1-16. 2011.
- GRAZZIOTIN, F.G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATO, S.L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, 15(13): 3969-3982. 2006.

- GREWAL, S.I.S. & MOAZED, D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. **Science**, 301(5634):798–802. 2003.
- GROVES, C.P. Primate Taxonomy. 1^a ed. Washington DC: **Smithsonian Institution Press**. 350p. 2001a.
- GROVES, C.P. Why taxonomic stability is a bad idea, or why are there so few species of primates (or are there?). **Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews**, 10(6): 192-198. 2001b.
- GROVES, C.P. Species concept in primates. **American journal of primatology**, 74(8): 687-691. 2012.
- GROVES, C.P. Primate taxonomy: inflation or real? **Annual Review of Anthropology**, 43(1): 27-36. 2014.
- GUIMARÃES, R.F.; GOMES, R.A.T.; CARVALHO JR, O.A.; MARTINS, E.S.; OLIVEIRA, S.N.; FERNANDES, N.F. Análise temporal das áreas susceptíveis a escorregamentos rasos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (RJ) a partir de dados pluviométricos. **Revista Brasileira de Geociências**, 39(1): 190-198. 2009.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, 165(3889): 131-137. 1969.
- HARCOURT, A.H. & WOOD, M.A. Rivers as barriers to primate distributions in Africa. **International Journal of Primatology**, 33(1): 168-183. 2012.
- HERSHKOVITZ, P. **Mammals of northern Colombia**. Preliminary report no. 4: monkeys (Primates), with taxonomic revisions of some forms. Proceedings of the U.S. National Museum. Washington: Smithsonian Institution. 98:323–427. 1949.
- HERSHKOVITZ, P. Metachromism or the Principle of evolutionary change in mammalian tegumentary colors. **Evolution**, 22(3): 556-575. 1968.
- HILL, W.C.H. **Comparative Anatomy and Taxonomy**. Volume 4. Cebidae. Edinburgh: University press, 523p. 1960.
- HOORN, C.; WESSELINGH, F.P.; TER STEEGE, H.; BERMUDEZ, M.A.; MORA, A.; SEVINK, J.; SANMARTÍN, I.; SANCHEZ-MESEGUER, A.; ANDERSON, C.L.; FIGUEIREDO, J.P.; JARAMILLO, C.; RIFF, D.; NEGRI, F.R.; HOOGHMSTRA, H.; LUNDBERG, J.; STADLER, T.; SÄRKINEN, T.; ANTONELLI, A. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. **Science**, 330(6006): 927-931. 2010.
- HOYOS, M.; BLOOR, P.; DEFLER, T.; VERMEER, J.; RÖHE, F.; FARIAS, I. Phylogenetic relationships within the *Callicebus cupreus* species group (Pitheciidae: Primates): Biogeographic and taxonomic implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 102(1): 208-219. 2016.
- HUTTERER, R.; RIEGERT, J.; SEDLÁČEK, O. A tiny new species of *Sylvisorex* (Mammalia: Soricidae) from the Bamenda Highlands, Cameroon. **Bonner zoologische Beiträge**, 56(3): 151-157. 2009.

IN DEN BOSCH, H.A.J.; ODIERNA, G.; APREA, G.; BARUCCA, M.; CANAPA, A.; CAPRIGLIONE, T.; OLMO, E. Karyological and genetic variation in Middle Eastern lacertid lizards, *Lacerta laevis* and the *Lacerta kulzeri* complex: a case of chromosomal allopatric speciation. **Chromosome Research**, 11(2): 165-178. 2003.

IUGHETTI, C.G. **Evolução cromossômica: estudo da variabilidade cariotípica em Platyrrhini e das homeologias e sintenias com cromossomos humanos**. (Tese de Doutorado). São Paulo: Universidade de São Paulo. 2008.

IZAR, P.; VERDERANE, M.P.; PETERNELLI-DOS-SANTOS, L.; MENDONÇA-FURTADO, O.; PRESOTTO, A.; TOKUDA, M.; VISALBERGHI, E.; FRAGASZY, D. Flexible and conservative features of social systems in tufted capuchin monkeys: comparing the socioecology of *Sapajus libidinosus* and *Sapajus nigritus*. **American Journal of Primatology**, 74(4): 315-331. 2012.

IZAWA, K. Social behavior of the wild black-capped capuchin (*Cebus apella*). **Primates**, 21(4): 443-467. 1980.

JACOBINA, U.P.; PAIVA, E.; DERGAM, J.A. Pleistocene karyotypic divergence in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) populations in southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 9(2): 325-333. 2011.

KARTAVTSEV, Y.P. Divergence at Cyt-b and Co-1 mtDNA genes on different taxonomic levels and genetics of speciation in animals. **Mitochondrial DNA**, 22(3): 55-65. 2011.

KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados**. 1ª ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 160p. 2009.

KEY, C & ROSS, C. Sex differences in energy expenditure in non-human primates. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 266(1437): 2479-2485. 1999.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16(2): 111-120. 1980.

KOIFFMANN, C.P. & SALDANHA, P.H. Cytogenetics of Brazilian monkeys. **Journal of Human Evolution**, 3(4): 275-282. 1974.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, 35(1): 1547-1549. 2018.

LEÃO, A.C.; NETO, A.D.D.; SOUSA, M.B.C. New developmental stages for common marmosets (*Callithrix jacchus*) using mass and age variables obtained by K-means algorithm and self-organizing maps (SOM). **Computers in Biology and Medicine**, 39(10): 853-859. 2009.

LEFEVRE, C.E.; WILSON, V.A.D.; MORTON, F.B.; BROSANAN, S.F.; PAUKNER, A.; BATES, T.C. Facial width-to-height ratio relates to alpha status and assertive personality in capuchin monkeys. **Plos One**, 9(4): 1-8. 2014.

- LIMA, H.C.; PESSOA, S.V.A.; GUEDES-BRUNI, R.R.; MORAES, L.F.D.; GRANZOTTO, S.V.; IWAMOTO, S.; DI CIERO, J. Caracterização fisionômico-florística e mapeamento da vegetação da Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, 57(3): 369-389. 2006.
- LIMA, M.G.M.; BUCKNER, J.C.; SILVA JR, J.S.; ALEIXO, L.; MARTINS, A.B.; BOUBLI, J.P.; LINK, A.; FARIAS, I.P.; SILVA, M.N.; RÖLE, F.; QUEIROZ, H.; CHIOU, K.L.; DI FIORI, A.; ALFARO, M.E.; LYNCH ALFARO, J.W. Capuchin monkey biogeography: understanding *Sapajus* Pleistocene range expansion and the current sympatry between *Cebus* and *Sapajus*. **Journal of Biogeography**, 44(4): 810-820. 2017.
- LIMA, M.G.; SILVA JR, J.S., ČERNÝ, D.; BUCKNER, J.C.; ALEIXO, A.; CHANG, J.; ZHENG, J.; ALFARO, M.E.; MARTINS, A.; DI FIORE, A.; BOUBLI, J.P.; LYNCH ALFARO, J.W. A phylogenomic perspective on the robust capuchin monkey (*Sapajus*) radiation: First evidence for extensive population admixture across South America. **Molecular phylogenetics and evolution**, 124(1): 137-150. 2018.
- LYNCH ALFARO, J.W.; BOUBLI, J.P.; OLSON, L.E.; DI FIORE, A.; WILSON, B.; GUTIÉRREZ- SPELETA, G.A.; CHIOU, K.L.; SCHULTE, M.; NEITZEI, S.; ROSS, V.; SCHWOCHOW, D.; NGUYEN, M.T.T.; FARIAS, I.; JANSON, C.H.; ALFARO, M.E. Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. **Journal of Biogeography**, 39(2): 272-288. 2012a.
- LYNCH ALFARO, J.W.; SILVA JR, J.S.; RYLANDS, A.B. How different are robust and gracile capuchin monkeys? An argument for the use of *Sapajus* and *Cebus*. **American Journal of Primatology**, 74(4):273-286. 2012b.
- LYNCH ALFARO, J.W.; IZAR, P.; FERREIRA, R.G. Capuchin monkey research priorities and urgent issues. **American Journal of Primatology**, 76(8): 705-720. 2014.
- LYNCH ALFARO, J.W.; CORTÉS-ORTIZ, L.; DI FIORE, A.; BOUBLI, J.P. Comparative biogeography of Neotropical primates. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 82(2): 518-529. 2015.
- LUNT, D.H.; ZHANG, D.X.; SZYMURA, J.M.; HEWLTT, O.M. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. **Insect molecular biology**, 5(3): 153-165. 1996.
- MACKINNON, K.C. Ontogeny of social behavior in the genus *Cebus* and the application of an integrative framework for examining plasticity and complexity in evolution. In: CLANCY, K.B.H.; HINDE, K.; RUTHERFORD, J.N. (Orgs.). **Building babies: primate development in proximate and ultimate perspective**. Springer, New York, p. 387-408. 2013.
- MARTINEZ, R.A.; GIUDICE, A.; SZAPKIEVICH, V.B.; ASCUNCE, M.; NIEVES, M.; ZUNINO, G.; MUDRY, M.D. Parameters modeling speciation processes in *Cebus apella* (Primates: Platyrrhini) from Argentina. **Mastozoologia Neotropical**, 9(2): 171-186. 2002.
- MARTINS, F.M.; TEMPLETON, A.R.; PAVAN, A.C.O.; KOHLBACH, B.C.; MORGANTE, J.S. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and *mtDNA* markers. **BMC Evolutionary Biology**, 9(1): 294-306. 2009.

MARTINS, W.P.; MIRANDA, J.M.D.; LYNCH ALFARO, J.W.; ALONSO, A.C.; LUDWIG, G.; MARTINS, J.N. Avaliação do risco de extinção de *Sapajus nigritus cucullatus* (Spix, 1823) no Brasil. **Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira**. ICMBio. 2015a. Disponível em www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade. Acesso em 04 de Janeiro de 2020.

MARTINS, M.A.; CARVALHO, W.D.; DIAS, D.; FRANÇA, D.S.; OLIVEIRA, M.B.; PERACCHI, A.L. Bat species richness (Mammalia, Chiroptera) along an elevational gradient in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. **Acta Chiropterologica**, 17(2):401-409. 2015b.

MARTINS, J.N.; DOS SANTOS, M.; LYNCH ALFARO, J.; MARTINS, W.P.; LUDWIG, G.; MELO, F.; MIRANDA, J.; ALONSO, A.C.; RÍMOLI, J. 2019. *Sapajus nigritus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019. Disponível em: www.iucnredlist.org/species. Acesso em 12 de Janeiro de 2020.

MARTINS-JR, A.M.G.; CARNEIRO, F.; SMAPAIO, I.; FERRARI, S.F.; SCHNEIDER, H. Phylogenetic relationships among Capuchin (Cebidae, Platyrrhini) lineages: An old event of sympatry explains the current distribution of *Cebus* and *Sapajus*. **Genetics and Molecular Biology**, 41(3): 699-712. 2018.

MATAYOSHI, T.; HOWLIN, E.; NASAZZI, N.; NAGLE, C.; GADOW, E.; SEUÁNEZ, H.N. Chromosome studies in *Cebus apella*: the standard karyotype of *Cebus apella paraguayanus* Fischer, 1829. **American Journal of Primatology**, 10(2): 185-193. 1986.

MATAYOSHI, T.; SEUANEZ, H.N.; NASAZZI, N.; NAGLE, C.; ARMADA, J.L.A.; FREITAS, L.; ALVES, G.; BARROSO, C.M.; HOWLIN, E. Heterochromatic variation in *Cebus apella* (Cebidae: Platyrrhini) of different geographic regions. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 44(2-3): 158-162. 1987.

MAYDEN, R.L., & WOOD, R.M. Systematics, species concepts, and the evolutionarily significant unit in biodiversity and conservation biology. In: Nielsen, J.L. (Org.). **Evolution and the Aquatic Ecosystem: Defining Unique Units in Population Conservation**. American Fisheries Society, Bethesda, p. 58–113. 1995.

MAYR, E. Systematics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York. 1942.

MEYER, A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. **Trends in Ecology & Evolution**, 9(8): 278-280. 1994.

MIRÓ, R.; CLEMENTE, I.C.; FUSTER, C.; EGOZCUE, J. Fragile sites, chromosome evolution, and human neoplasia. **Human Genetics**, 75(4): 345-349. 1987.

MOORHEAD, P.S.; NORWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, 20(3): 613-615. 1960.

MORATELLI, R. & WILSON, D.E. A new species of *Myotis* Kaup, 1829 (Chiroptera, Vespertilionidae) from Ecuador. **Mammalian Biology**, 76(5): 608-614. 2011.

- MORIM, M.P. Leguminosae arbustivas e arbóreas da floresta atlântica do Parque Nacional do Itatiaia, Sudeste do Brasil: padrões de distribuição. **Rodriguésia**, 57(1): 27-45. 2006.
- MORITZ, C. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, 9(10): 373-375. 1994.
- MOTA, S.M.; FERREIRA, A.F.; AZEVEDO, J.; NERY, T.L.; ZERMIANI, F.; QUEIROGA, F.L. Biometric values, C-reactive protein, and proteinogram of healthy blonde capuchin (*Sapajus flavius*) kept in northeast of Brazil. **Journal of Medical Primatology**, 45(6): 318-323. 2016.
- MUDRY DE PARGAMENT, M. & SLAVUTSKY, I.R. Banding patterns of the chromosomes of *Cebus apella*: comparative studies between specimens from Paraguay and Argentina. **Primates**, 28(1): 111-117. 1987.
- MUDRY, M.D. Cytogenetic variability within and across population of *Cebus apella* in Argentina. **Folia Primatologica**, 54(3): 206-216. 1990.
- MUDRY, M.; SLAVUTSKY, I.; ZUNINO, G.; DELPRAT, A.; BROWN, A. A new karyotype of *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini) from Argentina. **Revista Brasileira de Genética**, 14(3): 729-738. 1991.
- MUNDY, N.I. & KELLY, J. Evolution of a pigmentation gene, the Melanocortin-1 receptor, in Primates. **American Journal of Physical Anthropology**, 121(1): 67-80. 2003.
- NASCIMENTO, F.F.; LAZAR, A.; SEUÁNEZ, H.N.; BONVICINO, C.R. Reanalysis of the biogeographical hypothesis of range expansion between robust and gracile capuchin monkeys. **Journal of Biogeography**, 42(7): 1349-1357. 2015.
- NETO, M.F.; VICARI, M.R.; CAMARGO, E.F.D.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). **Genetics and Molecular Biology**, 32(4): 792-796. 2009.
- NEVES, A.C.S.A.; COUTINHO, L.C.; OLIVEIRA, M.B.; PESSÔA, L.M. First report of partial albinism in genus *Thrichomys* (Rodentia: Echimyidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, 54(9): 107-110. 2014.
- NIEVES, M.; MÜHLMANN, M.; MUDRY, M.D. Heterochromatin and chromosome evolution: a FISH probe of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) developed by chromosome microdissection. **Genetics and Molecular Research**, 4(4): 675-683. 2005a.
- NIEVES, M.; ASCUNCE, M.F.; RAHN, M.I.; MUDRY, M.D. Phylogenetic relationship among some *Ateles* species: the use of chromosomal and molecular characters. **Primates**, 46(3): 155-164. 2005b.
- NIEVES, M. **Heterocromatina y Evolución Cromosómica en Primates Neotropicales**. (Tese de Doutorado). Buenos Aires: Universidade de Buenos Aires. 2007.
- NIEVES, M.; MENDEZ, G.; ORTIZ, A.; MÜHLMANN, M.; MUDRY, M.D. Karyological diagnosis of *Cebus* (Primates, Platyrrhini) in captivity: Detection of hybrids and management program applications. **Animal Reproduction Science**, 108(1-2): 66-78. 2008.

- NIEVES, M.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; AMARAL, P.J.S.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; MÜHLMANN, M.C.; MUDRY, M.D. Analysis of the heterochromatin of *Cebus* (Primates, Platyrrhini) by micro-FISH and banding pattern comparisons. **Journal of Genetics**, 90(1): 111-117. 2011.
- NIEVES, M.; FANTINI, L.; MUDRY, M.D. What do we know about the heterochromatin of capuchin monkeys (*Cebus*: Platyrrhini)? **Biological Journal of the Linnean Society**, 123(1): 113-124. 2017.
- NIXON, K.C., & WHEELER, Q.D. An amplification of the phylogenetic species concept. **Cladistics**, 6(3): 211-223. 1990.
- NOVAES, R.L.M.; SOUZA, R.F.; MORATELLI, R. *Myotis riparius* (Chiroptera: Vespertilionidae). **Mammalian Species**, 49(946): 51-56. 2017.
- OLIVEIRA, L.R.; HOFFMAN, J.I.; HINGST-ZAHER, E.; MAJLUF, P.; MUELBERT, M.M.; MORGANTE, J.S.; AMOS, W. Morphological and genetic evidence for two evolutionarily significant units (ESUs) in the South American fur seal, *Arctocephalus gazella*. **Conservation Genetics**, 9(6): 1451-1466. 2008.
- OLIVEIRA, C.G.; GAIOTTO, F.A.; COSTA, M.A.; MARTINEZ, R. A. Molecular genetic analysis of the yellow-breasted capuchin monkey: recommendations for *ex situ* conservation. **Genetics and Molecular Research**, 10(3): 1471-1478. 2011.
- ORR, M.R., & SMITH, T.B. Ecology and speciation. **Trends in Ecology & Evolution**, 13(12): 502-506. 1998.
- PAPESCHI, A.G.; LIPKO, P.; AMAT, F.; COHEN, R.G. Heterochromatin variation in *Artemia* populations. **Caryologia**, 61(1): 53-59. 2008.
- PAULA, R.R.; PEREIRA, M.G.; MENEZES, L.F.T. Aporte de nutrientes e decomposição da serapilheira em três fragmentos florestais periodicamente inundados na Ilha da Marambaia, RJ. **Ciência Florestal**, 19(2): 139-148. 2009.
- PEBSWORTH, P.A.; BARDI, M.; HUFFMAN, M.A. Geophagy in chacma baboons: patterns of soil consumption by age class, sex, and reproductive State. **American Journal of Primatology**, 74(1): 48-57. 2012.
- PENEDO, D.M.; ARMADA, J.L.A.; DA SILVA, J.F.S.; NEVES, D.M.; PISSINATTI, A.; NOGUEIRA, D.M. C-banding patterns and phenotypic characteristics in individuals of *Sapajus* (Primates: Platyrrhini) and its application to management in captivity. **Caryologia**, 67(4): 314-320. 2014.
- PENEDO, D.M. **Análise genética e fenotípica de macacos-prego da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, Rio de Janeiro**. (Dissertação de Mestrado). Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2016.
- PENEDO, D.M.; ARMADA, J.L.A.; NIEVES, M.; VERONA, C.E.S.; OLIVEIRA, A.M.; SANTOS, E.J.S.; NOGUEIRA, D.M. Genetic analysis of an insular population of *Sapajus nigritus* (Primates: Cebidae) in Rio de Janeiro state, Brazil. **Primates**, submetido para publicação.

PEREIRA, L.A.; XEREZ, R.; PEREIRA, A.J. Ilha da Marambaia (baía de Sepetiba, RJ): resumo fisiográfico, histórico e importância ecológica atual. **Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, 42(5/6): 384-389. 1990.

PEREIRA, M.G.; MENEZES, L.F.T.; SCHULTZ, N. Aporte e decomposição de serapilheira na floresta atlântica, Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. **Ciência Florestal**, 18(4): 443-454. 2008a.

PEREIRA, T.S.; COSTA, M.L.M.N.; MORAES, L.F.D.; LUCHIARI, C. Fenologia de espécies arbóreas em Floresta Atlântica da Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia**, 63(2): 329-339. 2008b.

PERELMAN, P.; JOHNSON, W.E.; ROOS, C.; SEUÁNEZ, H.N.; HORVATH, J.E.; MOREIRA, M.A.M.; KESSING, B.; PONTIUS, J.; ROELKE, M.; RUMPLER, Y.; SCHNEIDER, M.P.C.; SILVA, A.; O'BRIEN, S.J.; PECON-SLATTERY, J. A molecular phylogeny of living primates. **PLoS Genet**, 7(3): 1-17. 2011.

PONSÀ, M.; GARCÍA, M.; BORELL, A.; GARCIA, F.; EGOZCUE, J.; GOROSTIAGA, M.A.; DELPRAT, A.; MUDRY, M. Heterochromatin and Cytogenetic Polymorphisms in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini). **American Journal of Primatology**, 37(4): 325-331. 1995.

RABELO, R.M.; SILVA, F.E.; VIEIRA, T.; FERREIRA-FERREIRA, J.; PAIM, F.P.; DUTRA, W.; SILVA-JÚNIOR, J.S.; VALSECCHI, J. Extension of the geographic range of *Ateles chamek* (Primates, Atelidae): evidence of river-barrier crossing by an amazonian primate. **Primates**, 55(2): 167-171. 2014.

RAPOSO, A.C.S.; OFRI, R.; SCHAFFER, D.P.H.; GOMES JÚNIOR, D.C.; LIBÓRIO, F.A.; MARTINS FILHO, E.F.; ORIÁ, A.P. Evaluation of ophthalmic and hemodynamic parameters in capuchin monkeys (*Sapajus* sp.) submitted to dissociative anesthetic protocols. **Journal of Medical Primatology**, 44(6): 381-389. 2015.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.D.; BATISTA, C.B.; ROSA, G.L.M. **Primates do Brasil: guia de campo**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Technical Books, 328p. 2015.

RICCOMINI, C. & ASSUMPCÃO, M. (1999). Quaternary tectonics in Brazil. **Episodes**, 22(3): 221-225. 1999.

RICHARD, A.F.; DEWAR, R.E.; SCHWARTZ, M.; RATSIRARSON, J. Mass change, environmental variability and female fertility in wild *Propithecus verreauxi*. **Journal of Human Evolution**, 39(4): 381-391. 2000.

RIDGWAY, R. **Color Standards and Color Nomenclature**. 1ª ed. Washington: DC, 44p. 1912.

RIO DE JANEIRO. Decreto nº 9.802, de 12 de Março de 1987. Cria a Área de Proteção Ambiental de Mangaratiba. **Diário Oficial** (do Rio de Janeiro), Rio de Janeiro, 12 mar. 1987.

RONCARATI, H. & MENEZES, L.F.T. Marambaia, Rio de Janeiro: origem e evolução. In: MENEZES, L.F.T; PEIXOTO, A.L.; ARAUJO, D.S.D. (Orgs.). **História Natural da**

Marambaia. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, p.15-38. 2005.

ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C.; GUIRAO-RICO, S.; LIBRADO, P.; RAMOS-ONSINS, S.E.; SÁNCHEZ-GARCIA, A. DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. **Molecular biology and evolution**, 34 (12): 3299-3302. 2017.

RUIZ-GARCÍA, M.; VÁSQUEZ, C.; CAMARGO, E.; LEGUIZAMÓN, N.; GÁLVEZ, H.; VALLEJO, A.; PINEDO, M.; CASTELLANOS-MORA, L.; SHOSTELL, J.; ALVAREZ, D. Molecular phylogenetics of *Aotus* (Platyrrhini, Cebidae). **International Journal of Primatology**, 32(5): 1218. 2011.

RUIZ-GARCÍA, M.; CASTILLO, M.I.; LICHILÍN-ORTIZ, N.; PINEDO-CASTRO, M. Molecular relationship and classification of several tufted capuchin lineages (*Cebus apella*, *Cebus xanthosternos* and *Cebus nigritus*, Cebidae), by means of mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequences. **Folia Primatologica**, 83(2):100-125. 2012.

RUIZ-GARCÍA, M.; CASTILLO, M.I.; LUENGAS-VILLAMIL, K. It is misleading to use *Sapajus* (robust capuchins) as a genus? A review of the evolution of the capuchins and suggestions on their systematics. In: RUIZ-GARCÍA, M & SHOSTELL, M. (Orgs.). **Phylogeny, Molecular Population Genetics, Evolutionary Biology and Conservation of the Neotropical Primates**. Nova Science Publisher Inc., New York, p.209-268. 2016.

RUIZ-HERRERA, A.; GARCÍA, F.; AGUILERA, M.; GARCIA, M.; PONSÀ, M. New polymorphisms in a *Cebus* (Platyrrhini, Primates) species. The case of *Cebus nigrivittatus*. **Caryologia**, 57(2): 206-209. 2004.

RUVOLO, M.; DISOTELL, T.R.; ALLARD, M.W.; BRONW, W.M.; HONEYCUTT, R.L. Resolution of the African hominoid trichotomy by use of a mitochondrial gene sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 88(4): 1570-1574. 1991.

RYDER, O.A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends in Ecology & Evolution**, 1(1): 9-10, 1986.

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

RYLANDS, A.B.; MITTERMEIER, R.A.; SILVA Jr., J.S. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. **International Zoo Yearbook**, 46(1): 11-24. 2012.

RYLANDS, A.B. & MITTERMEIER, R.A. Primate taxonomy: species and conservation. **Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews**, 23(1): 8-10. 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2^a ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press – CHS. 1989.

SEABRIGHT, M. A rapid technique for human chromosomes. *Lancet*, 298(7731): 971-972. 1971

SEUÁNEZ, H.N.; ARMADA, J.L.; FREITAS, L.; SILVA, R.R.; PISSINATTI, A.; COIMBRA-FILHO, A. Intraspecific Chromosome Variation in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini): The Chromosomes of the Yellow Breasted Capuchin *Cebus apella xanthosternos* Wied, 1820. *American Journal of Primatology*, 10(3): 237-247. 1986.

SEUÁNEZ, H.N.; BONVICIO, C.R.; MOREIRA, M.A.M. The primates of the Neotropics: genomes and chromosomes. *Cytogenet Genome Research*, 108(1-3): 38-46. 2005.

SICHERITZ-PONTÉN, T.; KURLAND, C.H.; ANDERSSON, G.E. A phylogenetic analysis of the cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes supports an origin of mitochondria from within the Rickettsiaceae. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1365(3): 545-551. 1998.

SILVA JR, J.S. **Especiação nos macacos-prego e caiararas, gênero *Cebus* Erxleben, 1777 (Primates, Cebidae)**. (Tese de Doutorado). Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2001.

SILVA, T.C.F. **Estudo da variação na pelagem e da distribuição geográfica em *Cebus flavius* (Schreber, 1774) e *Cebus libidinosus* (Spix, 1823) do Nordeste do Brasil**. (Dissertação de Mestrado). João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba. 2010.

SILVEIRA, G.; MALTA, A.J.R.; PONTES, A.R.M. Gênero *Cebus* Erxleben 1777. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; ANDRADE, F.R. **Primates Brasileiros**. 1ª ed. Londrina: Technical Books, 260p. 2008.

SIMON, C.; BUCKLEY, T.R.; FRATI, F.; STEWART, J.B.; BECKENBACH, A.T. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37(1): 545-579. 2006.

SMITH, T.B.; WAYNE, R.K.; GIRMAN, D.J.; BRUFORD, M.W. A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science*, 276(5320): 1855-1857. 1997.

STEINBERG, E.R.; NIEVES, M.; FANTINI, L.; MUDRY, M.D. Primates karyological diagnosis and management programs applications. *Journal of Medical Primatology*, 43(6): 455-467. 2014.

STRUM, S.C. Weight and age in wild olive baboons. *American Journal of Primatology*, 25(4): 219-237. 1991.

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

SUMNER, P. & MOLLON, J.D. Colors of primate pelage and skin: objective assessment of conspicuousness. *American Journal of Primatology*, 59(2): 67-91. 2003.

TEIXEIRA, T.P.; PINTO, B.C.; TERRA, B.D.F.; ESTILIANO, E.O.; GRACIA, D.; ARAÚJO, F.G. Diversidade das assembléias de peixes nas quatro unidades geográficas do rio Paraíba do Sul. *Iheringia, Série Zoologia*, 95(4): 347-357. 2005.

- THOMÉ, M.T.C.; ZAMUDIO, K.R.; GIOVANELLI, J.G.R.; HADDAD, C.F.B.; BALDISSERA Jr, F.A.; ALEXANDRINO, J.M.B. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 55(3): 1018-1031. 2010.
- TOKUDA, M.; MARTINS, M.M.; IZAR, P. Socio-genetic correlates of unbiased sex dispersal in a population of black capuchin monkeys (*Sapajus nigritus*). **Acta Ethologica**, 21(1): 1-11. 2017.
- THORP, J.H.; ROGERS, D.C.; DIMMICK, W.W. Introduction to Invertebrates of Inland Waters. In: THORP, J.H., & ROGERS, D.C. (Orgs.). **Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates**. Elsevier, Londres, p. 1-19. 2015.
- VALLINOTO, M.; ARARIPE, J.; REGO, P.S.D.; TAGLIARO, C.H.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. Tocantins river as an effective barrier to gene flow in *Saguinus niger* populations. **Genetics and Molecular Biology**, 29(2): 215-219. 2006.
- VAN ROOSMALEN, M.G.M. & VAN ROOSMALEN, T. On the origin of allopatric primate species. **Biodiversity Journal**, 7(1): 117-198, 2016.
- VANZOLINI, P.E. & WILLIAMS, E.E. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria: Iguanidae). **Arquivos de Zoologia de São Paulo**, 19(1): 1-298. 1970.
- VERONA, C.E.S. **Parasitas em sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) no Rio de Janeiro**. (Tese de Doutorado). Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. 2008.
- VIEIRA, A.G. & OLIVEIRA, L.W. Levantamento dos fenótipos de *Sapajus nigritus* (Goldfuss, 1809) no Parque Ecológico da Cidade da Criança de Presidente Prudente - SP. **Agrarian Academy**. 1(2): 72-91. 2014.
- VIEIRA, C.C. Os símios do estado de São Paulo. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 4(1): 1-31. 1944.
- VILANOVA, R.; SILVA JR, J.S.; GRELE, C.E.V.; MARROIG, G.; CERQUEIRA, R. Limites climáticos e vegetacionais das distribuições de *Cebus nigritus* e *Cebus robustus* (Cebinae, Platyrrhini). **Neotropical Primates**, 13(1): 14-19. 2005.
- WILEY, E.O. **Phylogenetics: The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics**. Wiley, New York. 1981.

ANEXOS

ANEXO I – Identificação individual das amostras *in situ*, *ex situ* e exemplares do Museu Nacional do Rio de Janeiro

Indivíduos <i>in situ</i>				
Localidade	Código individual	Identificação	Data da coleta	Sexo
Ilha da Marambaia	IM01	1*	06/11/2014	Macho
	IM02	2*	06/11/2014	Macho
	IM03	3*	02/03/2015	Fêmea
	IM04	4*	23/04/2015	Macho
	IM05	5*	23/04/2015	Macho
	IM06	6*	23/04/2015	Macho
	IM07	7*	23/04/2015	Macho
	IM08	8*	24/04/2015	Fêmea
	IM09	9*	01/10/2015	Macho
	IM10	10*	01/10/2015	Fêmea
	IM11	11*	02/10/2015	Macho
	IM12	12*	02/10/2015	Fêmea
	IM13	939000004096169	24/05/2017	Fêmea
	IM14	939000004096165	25/05/2017	Fêmea
	IM15	939000004096160	27/05/2017	Fêmea
	IM16	991001001436241	12/08/2018	Macho
	IM17	991001001436238	13/08/2018	Macho
	IM18	991001001436233	13/08/2018	Macho
	IM19	991001001436248	14/08/2018	Macho
	IM20	991001001436249	14/08/2018	Macho
	IM21	934000011723439	14/11/2019	Macho
	IM22	934000011723438	15/11/2019	Macho
	IM23	934000011723425	15/11/2019	Macho
	IM24	934000011723424	16/11/2019	Macho
	IM25	934000011723421	07/02/2020	Macho
	IM26	934000011723434	07/02/2020	Fêmea
Parque Nacional do Itatiaia	PNI01	939000004096039	23/07/2017	Fêmea
	PNI02	939000004095984	23/07/2017	Macho
	PNI03	939000004095961	23/07/2017	Fêmea
	PNI04	991001001436239	22/11/2018	Fêmea
	PNI05	991001001436243	23/11/2018	Fêmea
Parque Nacional da Tijuca	PNT01	934000011723441	07/09/2019	Macho
	PNT02	934000011723442	07/09/2019	Fêmea
	PNT03	934000011723443	08/09/2019	Macho
	PNT04	934000011723444	08/09/2019	Macho
Parque Nacional da Serra dos Órgãos	PNSO01	991001001436244	01/11/2018	Macho
	PNSO02	934000011723412	19/10/2019	Fêmea
	PNSO03	934000011723416	19/10/2019	Macho
	PNSO04	934000011723431	21/01/2020	Macho
	PNSO05	934000011723432	21/01/2020	Fêmea
	PNSO06	934000011723433	21/01/2020	Fêmea

*Identificação feita com tatuagem na face interna da coxa esquerda.

ANEXO I – continuação

Indivíduos <i>in situ</i>				
Localidade	Código individual	Identificação	Data da coleta	Sexo
Reserva Biológica de Poço das Antas	RBPA01	991001001436242	27/09/2018	Fêmea
	RBPA02	934000011723415	29/09/2018	Macho
	RBPA03	934000011723429	17/01/2019	Macho
	RBPA04	934000011723428	17/01/2019	Macho
	RBPA05	934000011723427	17/01/2019	Macho
	RBPA06	934000011723414	18/01/2019	Fêmea
	RBPA07	934000011723411	18/01/2019	Macho
	RBPA08	934000011723413	18/01/2019	Macho
Amostras <i>ex situ</i>				
Localidade	Código individual	Identificação	Data da coleta	Sexo
Bairro de Guaratiba, cidade do Rio de Janeiro	Gua01	Sem identificação	30/01/2017	Macho
São Paulo, capital	cSP01	963008000684937	13/12/2018	Fêmea
São José dos Campos	SJC01	963008000261125	13/12/2018	Macho
Campos do Jordão	CJ01	963008000236867	13/12/2018	Fêmea
São Sebastião	SS01	963008000684932	13/12/2018	Macho
Paraibuna	PB01	963008000684930	13/12/2018	Fêmea
Museu Nacional do Rio de Janeiro				
Localidade	Código individual	Número de registo	Sexo	
Paraty	MNPT01	23364	Fêmea	
	MNPT02	8341	Fêmea	
	MNPT03	8342	Fêmea	
Angra dos Reis	MNAR01	8516	Macho	
Itatiaia	MNIT01	21171	Macho	
	MNIT02	41973	Macho	
	MNIT03	41970	Macho	
Teresópolis	MNTE01	2955	Fêmea	

ANEXO II – Identificação das sequências dos genes mitocondriais citocromo c oxidase I (MT-CO1) e II (MT-CO2) e citocromo b (MT-CYB) do GenBank®, utilizadas neste estudo

Gene mitocondrial MT-CO1				
Espécie	Identificação	Origem Geográfica	Códigos GenBank®	Fonte
<i>Sapajus nigritus</i>	S nigritus_01_SP	São Paulo, Brasil	KY173124	Lima <i>et al.</i> (2017)
	S nigritus_02_SP		KY173125	
	S nigritus_03_PR	Paraná, Brasil	KY173126	
<i>S. robustus</i>	S robustus_01	Sem informação	KY173127	
<i>S. xanthosternos</i>	S xanthosternos_01	Bahia, Brasil	KY173128	
	S xanthosternos_02		KY173129	
	S xanthosternos_03		KY173130	
	S xanthosternos_04		KY173131	
<i>S. cay</i>	S cay_01	Mato Grosso, Brasil	KY173084	
	S cay_02		KY173085	
<i>S. macrocephalus</i>	S macrocephalus_01	Rondônia, Brasil	KY173121	
	S macrocephalus_02		KY173122	
	S macrocephalus_03	Amazonas, Brasil	KY173123	
<i>S. libidinosus</i>	S libidinosus_01	Goiás, Brasil	KY173096	
	S libidinosus_02		KY173097	
	S libidinosus_03		KY173098	
<i>S. flavius</i>	S flavius_01	Paraíba, Brasil	KY173086	
	S flavius_02		KY173087	
	S flavius_03		KY173088	
<i>S. apella</i>	S apella_01	Rondônia, Brasil	KY173081	
	S apella_02		KY173082	
	S apella_03		KY173083	
<i>Cebus kaapori</i>	Cebus kaapori	Brasil	KY173039	
Gene mitocondrial MT-CO2				
Espécie	Identificação	Origem Geográfica	Códigos GenBank®	Fonte
<i>Sapajus nigritus</i>	S nigritus_01_Arg	Argentina	AF181088	Ascunce <i>et al.</i> , 2002
	S nigritus_02_Arg	Argentina	*	Ruiz-García <i>et al.</i> (2012a)
	S nigritus_03_Arg	Argentina	*	
<i>S. cay</i>	S cay_01	Paraguai	AF181089	Ascunce <i>et al.</i> , 2002
	S cay_02	Paraguai	*	Ruiz-García <i>et al.</i> (2012a)
	S cay_03	Brasil	*	
<i>S. xanthosternos</i>	S xanthosternos_01	Brasil	*	
<i>Cebus capucinus</i>	Cebus capucinus	Costa Rica	JF735258	Ruiz-García <i>et al.</i> (2011)

* Cedidas por Dr. Manuel Ruiz-García, da Pontifícia Universidade Javeriana, Colômbia.

ANEXO II – continuação

Gene mitocondrial <i>MT-CYB</i>				
Espécie	Identificação	Origem Geográfica	Códigos GenBank®	Fonte
<i>Sapajus nigritus</i>	<u>S nigritus_01_SP</u>	Mococa, SP, Brasil	JN409303	Lynch Alfaro <i>et al.</i> (2012)
	<u>S nigritus_02_SP</u>	Fernandópolis, SP, Brasil	JN409304	
	<u>S nigritus_03_MG</u>	Mathias Barbosa, MG, Brasil	JN409332	
	<u>S nigritus_04_RJ</u>	Angra Dos Reis, RJ, Brasil	JN409333	
	<u>S nigritus_05_Arg</u>	Iguaçu, Argentina	JN409334	Lima <i>et al.</i> (2017)
	<u>S nigritus_06_SP</u>	São Paulo, Brasil	KY173334	
	<u>S nigritus_07_SP</u>		KY173335	
	<u>S nigritus_08_PR</u>		KY173336	
	<u>S nigritus_09_PR</u>	Paraná, Brasil	KY173337	
	<u>S nigritus_10_PR</u>		KY173338	
<i>S. robustus</i>	<u>S robustus_01</u>	Sem informação	KY173339	Lima <i>et al.</i> (2017)
	<u>S robustus_02</u>	Conceição da Barra, ES, Brasil	JN409301	Lynch Alfaro <i>et al.</i> (2012)
	<u>S robustus_03</u>	São Domingos, ES, Brasil	JN409302	
	<u>S robustus_04</u>	Teófilo Otoni, MG, Brasil	JN409331	
<i>S. xanthosternos</i>	<u>S xanthosternos_01</u>	Bahia, Brasil	KY173340	Lima <i>et al.</i> (2017)
	<u>S xanthosternos_02</u>		KY173341	
	<u>S xanthosternos_03</u>		KY173342	
	<u>S xanthosternos_04</u>		KY173343	
<i>S. cay</i>	<u>S cay_01</u>	Mato Grosso, Brasil	KY173294	Lima <i>et al.</i> (2017)
	<u>S cay_02</u>		KY173295	
	<u>S cay_03</u>	Paraguai	JN409298	Lynch Alfaro <i>et al.</i> (2012)
<i>S. macrocephalus</i>	<u>S macrocephalus_01</u>	Rio Galvez, San J. Loreto, Peru	JN409326	Lynch Alfaro <i>et al.</i> (2012)
	<u>S macrocephalus_02</u>	Rio Curanja, Balta, Loreto, Peru	JN409327	
	<u>S macrocephalus_03</u>	Yuraccyacu, Ayacucho, Peru	JN409328	
<i>S. libidinosus</i>	<u>S libidinosus_01</u>	Brasilândia, GO, Brasil	JN409299	Lynch Alfaro <i>et al.</i> (2012)
	<u>S libidinosus_02</u>	Paracatu, MG, Brasil	JN409300	
	<u>S libidinosus_03</u>	Goiás, Brasil	KY173308	Lima <i>et al.</i> (2017)
<i>S. flavius</i>	<u>S flavius_01</u>	Paraíba, Brasil	KY173296	Lima <i>et al.</i> (2017)
	<u>S flavius_02</u>		KY173297	
	<u>S flavius_03</u>		KY173298	
<i>S. apella</i>	<u>S apella_01</u>	Pará, Brasil	KY173275	Lima <i>et al.</i> (2017)
	<u>S apella_02</u>		KY173276	
	<u>S apella_03</u>		KY173259	
<i>Cebus kaapori</i>	Cebus kaapori	Brasil	MF472590	Martins <i>et al.</i> (2018)

ANEXO III – Folha de aprovação de banca não presencial

TERMO Nº 237 / 2020 - PPGBA (12.28.01.00.00.42)

Nº do Protocolo: 23083.046326/2020-68

Seropédica-RJ, 15 de setembro de 2020.

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

DIEGO MATTOS PENEDO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Biologia Animal**, no **Programa de Pós Graduação em Biologia Animal**, Área de Concentração em **Biodiversidade Animal**.

TESE APROVADA EM 30/07/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese/dissertação.

Dra. Denise Monnerat Nogueira - UFRRJ
(Orientadora)

Dr. Hélio Ricardo da Silva - UFRRJ

Dra. Lena Geise - UERJ

Dr. Carlos Eduardo da Silva Verona - TRÍADE

Dra. Andréa Maria de Oliveira - UERJ

Dra. Mariela Nieves - Universidade de Buenos Aires

Dr. Rodrigo Salles de Carvalho - PREA

(Assinado digitalmente em 15/09/2020 10:27)

DENISE MONNERAT NOGUEIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptG (12.28.01.00.00.50)
Matrícula: 1539011

(Assinado digitalmente em 18/09/2020 20:42)

HELIO RICARDO DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.45)
Matrícula: 2289640

(Assinado digitalmente em 15/09/2020 19:19)

ANDRÉA MARIA DE OLIVEIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 893.830.367-53

(Assinado digitalmente em 15/09/2020 14:50)

CARLOS EDUARDO DA SILVA VERONA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 139.910.588-47

(Assinado digitalmente em 15/09/2020 12:08)

MARIELA NIEVES
ASSINANTE EXTERNO
Passaporte: AAA328586

(Assinado digitalmente em 15/09/2020 16:29)

RODRIGO SALLES DE CARVALHO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 009.064.087-09

ANEXO III – Continuação

(Assinado digitalmente em 15/09/2020 22:20)

LENA GEISE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 749.572.287-87

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrjr.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **237**, ano: **2020**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **15/09/2020** e o código de verificação: **5d6e0fb315**