

**VARIAÇÕES NO SISTEMA OXITOCINA-VASOPRESSINA EM PRIMATAS E  
SEU SIGNIFICADO FUNCIONAL E EVOLUTIVO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da UFRGS como requisito parcial para Doutorado.

**PEDRO VARGAS PINILLA**

Orientadora: Maria Cátira Bortolini

Porto Alegre, abril de 2018.

Os estudos foram realizados no Laboratório de Evolução Humana e Molecular (LEHM) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Este trabalho foi subsidiado por recursos do PPGBM (PROEX/CAPES) e CNPq. A bolsa de doutorado foi concedida pelo CNPq.

*A los que aunque no conocen la palabra, te dejan con saudades todos los días.*

*A los que crecen en la lejanía, en tu corazón y te hacen fuerte cada día.*

*A los que se han ido, y te acompañan desde arriba.*

*A las que no te dan su mitocondria, pero si toda su energía.*

*A los que mantienen su puerta, así como su mente, abierta y dispuesta a recibir  
compañía.*

*A los otros adoptados, que te acompañan en el PCR y en la algarabía, haciendo el gel y  
defendiendo la maestría, tomando un té y comiendo porquería.*

*A los que caminan contigo día a día, te acompañan sentado, corriendo o volando, y  
hasta de ser necesario, en la policía.*

*A los que te abrazan con una poesía, con tiempo y sin monotonía.*

*A los que de tus pensamientos reclaman autoría, y los amas, como si te hubieran hecho  
brujería.*

## **Agradecimentos**

Ao Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ-FEEMA) e à Estação Ecológica Estadual Paraíso (ESEC/ FEEMA), por disponibilizarem material científico para a pesquisa;

Ao Ministério Público Federal e Estadual, ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ (Proc. N° E-26/171.573/2000 e E-26/171.185/2004), a Greater Los Angeles Zoo Association (GLAZA), a The Zoological Society of Philadelphia, a American Society of Primatologist (ASP) e a Conservation Internacional (CI), pela constante cooperação com o programa de reprodução de primatas do neotrópico.

Aos órgãos que financiaram essa pesquisa e a todos aqueles que a tornaram possível.

## Lista de siglas e abreviaturas

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico  
ADPRc: ADP ribose cíclica  
Ala8OXT – Oxitocina, alanina 8  
AMPc: Adenosin monofosfato cíclico  
AVP – Vasopressina  
AVPR1a – Receptor da vasopressina 1a  
AVPR1b – Receptor da vasopressina 1b  
AVPR2 – Receptor da vasopressina 2  
CaM: Calmodulina  
DAG: diacilglicerol  
ECL: Alça extracelular  
ERP – Elementos de Resposta à Progesterona  
FES: Energia de superfície livre  
GP: Glicopeptídeo  
GPCRs – Receptores acoplados as proteínas G  
GRK: GPCR quinases  
ICL: Alça intracelular  
IP3: inositol-1,4,5-trifosfato  
LH: Ligações de hidrogenio  
MAPK – Proteínas quinase ativadas por mitógenos  
NAD: Dinucleotídeo Nicotinamida Adenina  
NP: Neurofisina  
ns: nanosegundos  
OXT – Oxitocina  
OXTR – Receptor da oxitocina  
PCA: Análise de componentes principais  
Phe2OXT – Oxitocina, fenilalanina 2  
PKC: Proteína Quinase C  
PLC: Fosfolipase C  
pNM: Primatas do Novo Mundo  
Pro8OXT – Oxitocina, Prolina 8

PVN – Núcleo paraventricular

RG: Raio de giro

RMSD: desvio da raiz quadrada média

RP: Receptores de Progesterona

SON - Núcleo supra - óptico

SP: Peptídeo sinal

Thr4Gly7OXT: Oxitocina Treonina4, Glicina 7

Thr4OXT: Oxitocina Treonina4

Thr8OXT – Oxitocina, treonina 8

TRH – Hormônio liberador de tireotrofina

Val3Pro8OXT – Oxitocina , Valina 3- Prolina 8

VT : Vasotocina

## Lista de Tabelas

Tabela 1 . Oxitocina e peptídeos relacionados.....	17
Tabela 2 . Relação e estrutura dos genes do sistema <i>OXT-AVP</i> .....	20
Tabela 3 . Aminoácidos importantes de OXTR .....	23
Tabela 4 . Características ecológicas de primatas analisados neste trabalho.....	28
Tabela 5 . Parâmetros das principais variáveis consideradas na simulação das formas de OXT e AVP.....	67
Tabela 6 . Distribuição de receptores OXT e AVPR1a no cérebro de primatas.....	76
Tabela 7 . Trabalhos realizados em pNM correlacionando comportamentos sociais diante de diferentes níveis dos neuropeptídeos e/ou presença de antagonistas.....	77
Tabela 8 . Mutações achadas nos primatas nas posições ou regiões estruturalmente importantes de OXTR, AVPR1a e AVPR1b.....	84

## Lista de Figuras

Figura 1 . <i>As Três Idades da Mulher</i> , obra de 1905 do pintor austríaco Gustav Klimt... 15	15
Figura 2 . Diagrama dos genes de oxitocina e vasopressina ..... 16	16
Figura 3 . Homólogos de oxitocina e vasopressina..... 17	17
Figura 4 . Esquema gráfico do gene OXTR..... 20	20
Figura 5 . Modelo esquemático da estrutura da OXT e de OXTR..... 22	22
Figura 6 . Primatas que apresentam cuidado paterno direto ..... 32	32
Figura 7 . Gráfico de energia de superfície livre ..... 62	62
Figura 8 . Valores de RMSD para as formas de OXT e AVP..... 63	63
Figura 9 . Boxplot dos valores de RMSD dos últimos 50 ns da simulação ..... 64	64
Figura 10 . Boxplot dos valores de Raio de Giro dos últimos 50 ns da simulação ..... 65	65
Figura 11 . Boxplot dos valores de Raio de Giro da cauda carboxiterminal ..... 66	66
Figura 12 . Boxplot dos valores de Raio de Giro da parte cíclica ..... 67	67
Figura 13 . Boxplot dos valores de hidrofobicidade dos últimos 50 ns da simulação ..... 69	69
Figura 14 . Gráfico de espinhos de formas naturais e sintéticas de OXT e AVP. .... 70	70
Figura 15 . PCA que considera os parâmetros apresentados na Tabela 5 ..... 71	71
Figura 16 . Reconstrução filogenética baseada nos dados de OXT nos primatas..... 75	75
Figura 17 . Weblogo ilustrando o múltiplo alinhamento da região extracelular (EC1; 94-108) e da região intracelular 3 (IC3; 244-256) de AVPR1b..... 83	83
Figura 18 . Representação esquemática das principais mudanças que se apresentam no sistema OXT-AVP..... 88	88

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	13
1.1 Introdução.....	13
1.2 Evolução do sistema OXT/OXTR e proteínas relacionadas.....	16
1.3 Receptores.....	18
1.4 Algumas característica da interação ligante-receptor.....	21
1.5 Expressão.....	23
1.6 Ordem Primates.....	24
1.6.1 Parvordem Catarrhini.....	25
1.6.2 Parvordem Platyrrhini.....	25
1.6.3 Organização social.....	31
1.6.4 Cuidado parental.....	31
1.7 Conservação da OXT em mamíferos placentários.....	33
CAPÍTULO II.....	34
2.1 Objetivos.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
CAPÍTULO III.....	35
3.1 Evolução do Sistema OXT-AVP.....	35
CAPÍTULO IV.....	42
4.1 Novas formas de OXT, novas funções.....	42
CAPÍTULO V.....	49
5.1 Evolução da região regulatória.....	49
CAPÍTULO VI.....	61
6.1 Bioinformática.....	61
6.2 Comparação das dinâmicas.....	62
CAPÍTULO VII.....	72
7.1 Discussão.....	72

7.1.1 Variantes de OXT-OXTR.....	72
7.1.2 Nível regulatório.....	75
7.1.3 Comportamento.....	77
7.2.1 Sistema AVP e algumas particularidades em pNM.....	81
7.2.2 AVPR1a e alguns achados em pNM.....	81
7.2.3 AVPR1b e alguns achados em pNM.....	82
7.3 Questionamentos adicionais.....	84
CAPÍTULO VIII.....	89
8.1 Considerações Finais.....	89
REFERÊNCIAS.....	90

## RESUMO

Um dos maiores desafios que as Ciências Biomédicas têm na atualidade é conseguir conectar variações em nível do genoma com aquelas observadas em nível de fenótipos. Utilizando a estratégia de genes candidatos e abordagens interdisciplinares, temos obtido sucesso nessa empreitada desafiadora, ajudando, inclusive, a quebrar paradigmas, pelo menos no que diz respeito a características táxon-específicas. Tivemos como foco os neuropeptídeos Oxitocina (OXT) e Vasopressina (AVP), dois neuro-hormônios parálogos que, ao interagirem com seus receptores (OXTR, AVPR1a, AVPR1b e AVPR2), promovem funções fisiológicas e comportamentais. Demonstramos que a postulada conservação da sequência de aminoácidos de OXT em todos os mamíferos placentários não se confirma, visto serem encontradas pelo menos 7 formas (Leu<sup>8</sup>OXT, Pro<sup>8</sup>OXT, Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT, Ala<sup>8</sup>OXT, Thr<sup>8</sup>OXT, Phe<sup>2</sup>OXT e Val<sup>3</sup>OXT) em espécies de primatas do Novo Mundo (pNM). Conectamos, ainda, pelo menos algumas dessas variantes com traços complexos em clados de macacos do Novo Mundo, tal como parto gemelar, monogamia social e cuidado paterno, o que indica sua possível relevância evolutiva, detectada também por testes específicos para seleção positiva e coevolução entre ligante e receptor. Para avançar no conhecimento funcional das potencialmente adaptativas variantes, conduzimos testes e experimentos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, comparando-as com a forma mais comum de OXT (Leu<sup>8</sup>OXT) e AVP. Demonstramos a capacidade reduzida das variantes *Cebidae* Pro<sup>8</sup>OXT e *Saguinus* Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT no recrutamento das  $\beta$ -arrestinas, com consequente impacto na internalização de receptores e na dessensibilização de todo o sistema *OXT-AVP*. Ainda, conseguimos avaliar a capacidade de ambas as variantes estimularem o cuidado paterno em ratos, mostrando, pela primeira vez, um modelo natural para o conceito de agonismo com seletividade funcional, com prováveis implicações evolutivas. Além disso, investigamos a região regulatória do gene *OXTR* e identificamos que o número de elementos de resposta de progesterona (PREs) no promotor do referido gene é significativamente correlacionado com a presença de cuidado paterno no clado dos pNM. Com isso, buscamos delinear um cenário completo sobre a emergência de fenótipos adaptativos em macacos do Novo Mundo.

## ABSTRACT

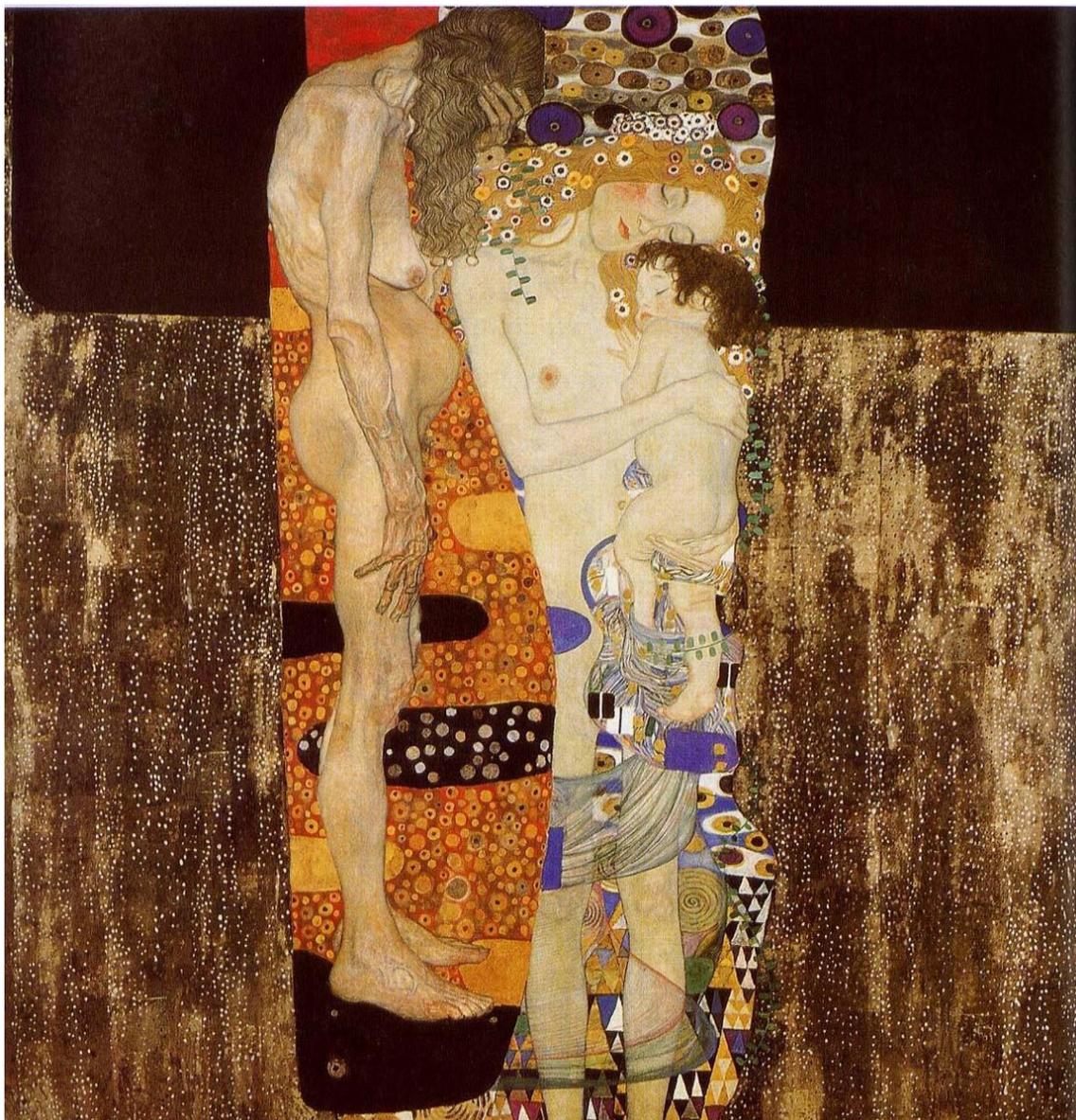
One of the greatest challenges that the Biomedical Sciences has at present is to be able to connect variations at genome level with those observed at phenotype level. Using the strategy of candidate genes and interdisciplinary approaches we have succeeded in this challenging endeavor and even helped to break paradigms, at least considering taxon-specific characteristics. We focused on the oxytocin (OXT) and Vasopressin (AVP) nonapeptides, two paralog neurohormones that interact with their receptors (OXTR, AVPR1a, AVPR1b and AVPR2) promoting physiological and behavioral functions. We demonstrated that the postulated conservation of the amino acid sequence of OXT in all placental mammals is not true since at least 7 forms (Leu<sup>8</sup>OXT, Pro<sup>8</sup>OXT, Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT, Ala<sup>8</sup>OXT, Thr<sup>8</sup>OXT, Phe<sup>2</sup>OXT and Val<sup>3</sup>OXT) were found in New World primate species (NWm). We also connected at least some of these variants with complex features in clades of NWm, such as twin birth, social monogamy and paternal care, indicating their possible evolutionary relevance, also detected by specific tests for positive selection and co-evolution between ligand and receptor. To understand the functional knowledge of the potentially adaptive variants we conducted *in silico*, *in vitro* and *in vivo* tests and experiments comparing them with the most common form of OXT (Leu<sup>8</sup>OXT) and AVP. We demonstrated the reduced capacity of the Cebidae Pro<sup>8</sup>OXT and Saguinus Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT variants in the recruitment of  $\beta$ -arrestins, with a consequent impact on receptor internalization and desensitisation of the entire OXT-AVP system. Furthermore, we were able to evaluate the ability of both variants to stimulate paternal care in rats, showing, for the first time, a natural model for the concept of agonism with functional selectivity, with probable evolutionary implications. In addition, we investigated the regulatory region of the *OXTR* gene and identified that the number of progesterone response elements (PREs) in the promoter of the above mentioned gene is significantly correlated with the presence of parental care in the NWm clade. With this, we aimed to delineate a complete scenario on the emergence of adaptive phenotypes in the New World monkeys.

# CAPÍTULO I

## 1.1 Introdução

De frente e em primeiro plano, aparece, jovem e bela, a mãe, com a filha no colo, apoiando sobre a criança a cabeça de cabelo luminoso, enfeitado com flores. Com os olhos fechados, sua expressão é de fruição e regozijo, similar à da pequena, que tem seu corpo aconchegado ao da mãe. Ao lado delas, uma mulher idosa oculta o rosto com a mão de pele envelhecida. Esse é o cenário retratado em *As Três Idades da Mulher* (Figura 1), obra de 1905 do pintor austríaco Gustav Klimt. O quadro pode ter várias interpretações, mas uma delas pode remeter ao “*amor*”, um vocábulo com múltiplos significados e óticas de apreciação, desde a religião, a filosofia, as ciências humanas e, claro, as ciências biológicas.

No caso das ciências biológicas, o amor pode ser explicado como um conjunto de ações iniciadas por processos neuroquímicos que ocorrem na superfície medial do cérebro dos mamíferos (sistema límbico), derivando em emoções e comportamentos sociais presentes nestes animais. Para tal, múltiplos neurotransmissores estão envolvidos: dopamina, serotonina, adrenalina, além de dois que são o alvo de estudo do nosso trabalho, a oxitocina (OXT) e a vasopressina (AVP). E, por derradeiro (e nada romântico), pode-se dizer que o amor, tal qual o conhecemos, é nada mais e nada menos do que um conjunto de ações moldadas pela evolução biológica para promover a sobrevivência e reprodução. E é justamente sobre este tema absolutamente instigante que trata a presente Tese.

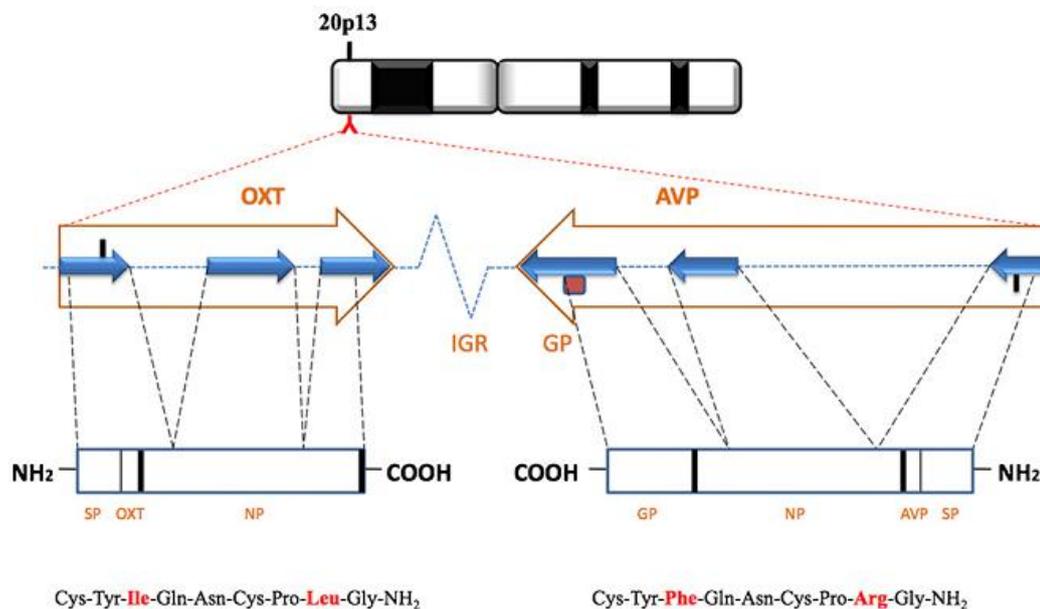


**Figura 1.** *As Três Idades da Mulher*, obra de 1905 do pintor austríaco Gustav Klimt.

No cérebro dos mamíferos, são descritos mais de 100 neuropeptídeos, sendo a maioria deles sintetizada e liberada do hipotálamo. Muitos atuam em sistemas periféricos, longe do cérebro, por isso agem também como hormônios endócrinos (Insel 2010). Alguns desses elementos em sua forma funcional apresentam somente nove aminoácidos; são os chamados nonapeptídeos. Desses, os mais estudados são a oxitocina (OXT) e a vasopressina (AVP), parálogos que provavelmente surgiram a partir da duplicação de um gene ancestral, a vasotocina (VT), há 600 milhões de anos (mya; Gruber & Muttenthaler 2012).

Em mamíferos placentários, OXT é um nonapeptídeo composto por Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-**Pro**-Leu-Gly. Sua estrutura é similar à da AVP (Cys-Tyr-**Phe**-Gln-

Asn-Cys-Pro-Arg-Gly). Como pode ser visto, OXT e AVP diferem em apenas duas posições, 3 e 8 (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama dos genes de oxitocina e vasopressina (respectivamente, *OXT* e *AVP*, representados pelas setas grandes); pré-pró-hormônios ilustrados pelas caixas. A sequência de aminoácidos de cada um dos nonapeptídeos aparece abaixo, e a localização destes no cromossomo 20 humano é ilustrada acima. Os éxons são mostrados como setas azuis pequenas, e os íntrons como linhas pontilhadas. IGR representa a região intergênica; SP, peptídeo sinalizador; NP, neurofisina; GP, glicopeptídeo. Os resíduos de aminoácidos que diferem entre as moléculas estão representados em vermelho. Lee et al. (2009).

Seus respectivos genes (*OXT* e *AVP*) são conservados através de inúmeras espécies de diferentes *taxa* (Hoyle 1998; Tessmar-Raible et al. 2007). A formação de uma ponte dissulfeto entre as cisteínas das posições 1 e 6 resulta em uma parte cíclica de 6 aminoácidos e uma parte carboxiterminal de 3 (Barberis et al, 1998).

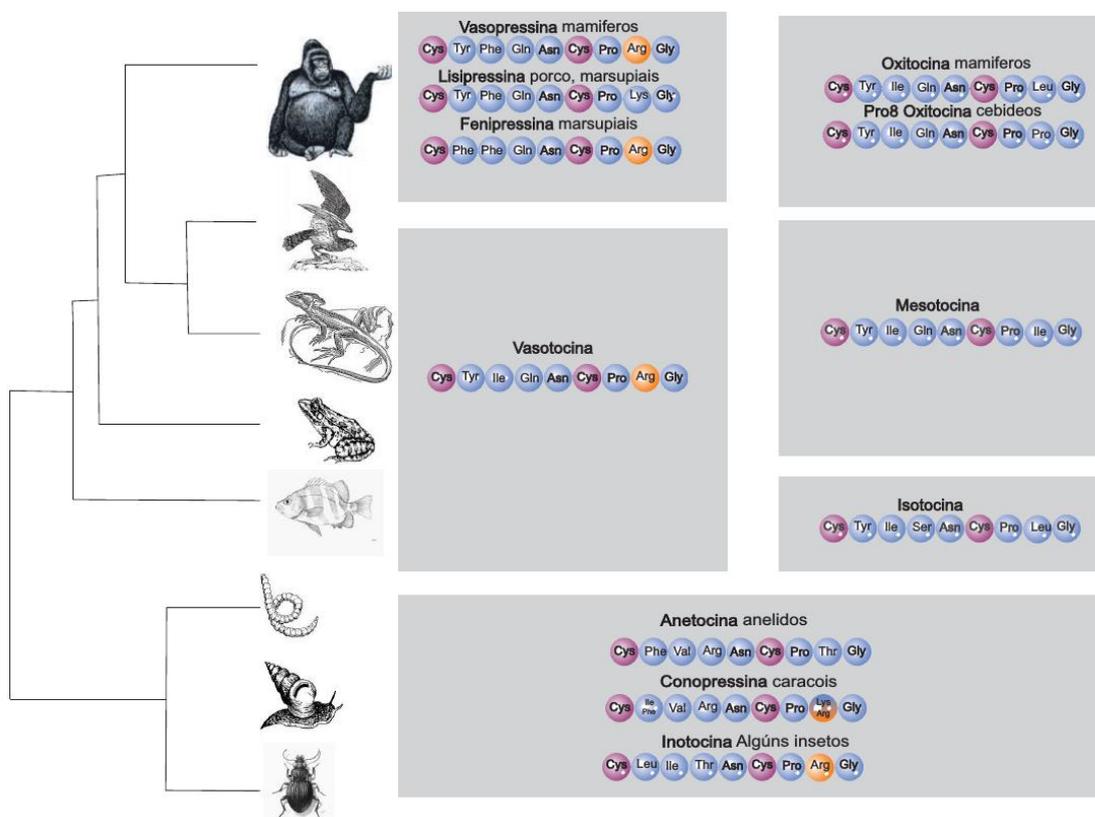
Na Figura 2, observa-se que o gene *OXT* está localizado no mesmo cromossomo, onde também se localiza o gene *AVP*, mas ambos estão orientados em uma direção transcricional contrária (cromossomo 2 em camundongos, e 20 em humanos). Esse fenômeno é visto ainda em outros mamíferos. Ambos os genes possuem três éxons e dois íntrons com alta identidade e estão separados por uma região intergênica que varia em todas as espécies (1,1 kb em ratos e humanos, e 3,6 kb em camundongos). Essa porção, normalmente conservada, possui sequências reguladoras (Gainer et al. 2001).

A Figura 2 também mostra que o chamado pré-hormônio é formado pela sequência da *OXT*, da neurofisina (NP) e do peptídeo sinal (SP), enquanto o outro pré-

hormônio relacionado envolve a sequência da AVP, da NP e do SP, acrescida da sequência de um glicopeptídeo (GP).

## 1.2 Evolução do sistema OXT/OXTR e proteínas relacionadas

Virtualmente, todas as espécies de vertebrados possuem sistemas como o da OXT e da AVP ou proteínas similares a essas, contabilizando um total de 13 nonapeptídeos (Tabela 1). A vasotocina, por exemplo, similar à AVP e à OXT, foi encontrada nos Ciclostomados (lampreias) e em peixes ósseos. A diferença entre AVP e vasotocina é a presença de uma Ile (na vasotocina) ou Phe (na AVP) na terceira posição; por outro lado, a diferença entre a OXT e vasotocina é uma Arg (na vasotocina) ou uma Leu (na OXT) na oitava posição (Figura 3). A mesotocina, por sua vez, difere da OXT pela presença de uma Ile na oitava posição (Leu em OXT) e pode ser observada em peixes pulmonados africanos e australianos, anfíbios, répteis e aves, encontrando-se também em marsupiais, particularmente em duas espécies que apresentam, além da mesotocina, a OXT (Tabela 1).



**Figura 3.** Homólogos de oxitocina e vasopressina. Donaldson & Young (2008), com modificações.

Tabela 1. Oxitocina e peptídeos relacionados.

Hormônio	Aminoácidos <sup>a</sup>				Animais onde se faz(em) presente(s)
	2	3	4	8	
<b>Oxitocina</b>	Tyr	Ile	Gln	Leu	Mamíferos placentários, alguns marsupiais
<b>Mesotocina</b>	*	*	*	Ile	Marsupiais, tretrápodos não mamíferos <sup>b</sup>
<b>Isotocina</b>	*	*	Ser	Ile	Osteíctios (peixes ósseos)
<b>Aspargtocina/ Valitocina</b>	*	*	Asp/*	*/Val	Condrietes (peixes cartilagosos)
<b>Asvatocina/ Phasvatocina</b>	*	*/Phe	Asp	Val	Condrietes (peixes cartilagosos)
<b>Oxitocina</b>	*	*	*	*	Quimera (peixes cartilagosos)
<b>Cephalotonina</b>	*	Phe	Arg	Ile	Moluscos ( <i>Octopus vulgaris</i> )
<b>Annetocina</b>	Phe	Val	Arg	Thr	Anelídeos
<b>Vasotocina</b>	*	*	*	Arg	Vertebrados não mamíferos, ciclóstomos
<b>Vasopressina</b>	*	Phe	*	Arg	Mamíferos
<b>Lysipressina</b>	*	Phe	*	Lys	Porco, alguns marsupiais
<b>Fenipressina</b>	Phe	Phe	*	Arg	Macropodidos (Marsupiais)
<b>Locupressina</b>	Leu	*	Thr	Arg	Insetos ( <i>Locusta migratoria</i> )
<b>Conopressina</b>	Ile/Phe	*	Arg	Arg/Lys	Moluscos

<sup>a</sup> Os aminoácidos 1Cys, 5Asn, 6Cys, 7Pro e 9Gly (NH<sub>2</sub>) são conservados.

<sup>b</sup> Inclui peixes pulmonados.

\* Aminoácidos iguais aos presentes em OXT (Acher et al. 1995).

Tanto OXT quanto AVP são sintetizadas no Núcleo Supraóptico (SON) e no Núcleo Paraventricular (PVN), regiões hipotalâmicas do cérebro, e são transportadas pela neurofisina até a neuro-hipófise (Insel 2010).

Por se comportarem tanto como neurotransmissor quanto como hormônio, ambos os nonapeptídeos – OXT e AVP – apresentam um amplo espectro de atuação, seja em humanos, seja em outros mamíferos. As ações periféricas de OXT, por exemplo, envolvem a estimulação para a dilatação cervical, a contração uterina durante o parto, a liberação do leite em mães lactantes e o orgasmo durante a atividade sexual. No cérebro, tanto OXT quanto AVP atuam como poderosos neurotransmissores, estando envolvidos em complexos comportamentos sociais e reprodutivos, tais como cuidado parental, escolha do parceiro, modulação do estresse e ansiedade (Ebstein et al. 2012). Uma revisão de Lucion & Bortolini (2014) traz detalhes sobre abordagens adotadas para o entendimento dos mecanismos envolvidos no cuidado parental, dentre estes, aspectos fisiológicos e genéticos, nos quais os sistemas OXT-AVP têm papel de destaque.

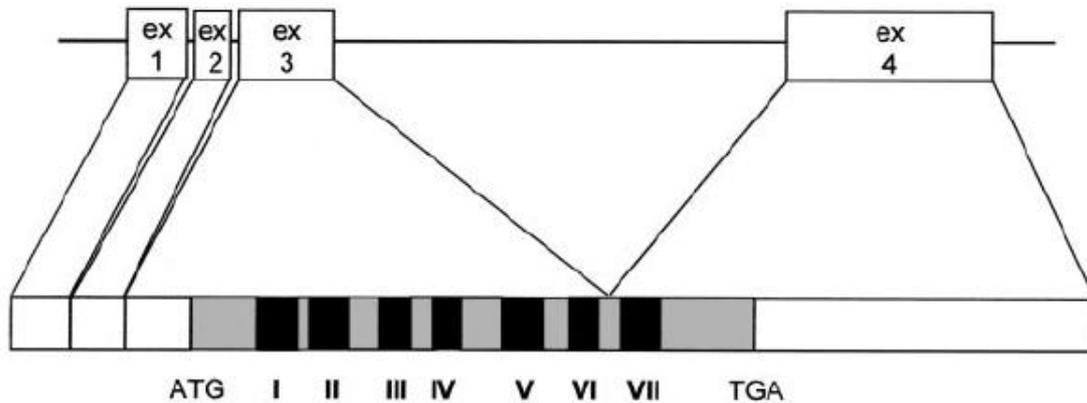
Considerando unicamente comportamentos sociais, esses neuropeptídeos são descritos como elementos fundamentais em ações ligadas a comportamentos reprodutivos, dentre os quais escolha de parceiros e cuidado parental. Também são importantes moduladores da resposta ao estresse (Neumann & van den Burg 2013).

### **1.3 Receptores**

Em humanos e outras espécies de mamíferos, a ação dos nonapeptídeos OXT e AVP está diretamente relacionada a interações com seus respectivos receptores: um único receptor de oxitocina (OXTR) e 3 receptores de vasopressina (AVPR1a, AVPR1b e AVPR2) são encontrados (Tabela 2). OXT pode se ligar com os receptores de AVP, assim como AVP pode se ligar a OXTR, porém com diferentes níveis de afinidade. Todos pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), caracterizados por possuírem sete domínios transmembrana. Localização, tamanho, funções, entre outras características encontram-se na Tabela 2. Uma característica que se destaca nesses receptores é a consistente interrupção da sequência codificante entre os domínios transmembranais 6 e 7 por um íntron conservado (Koshimizu et al. 2012). Esse aspecto mostra-se mais interessante quando se considera que a maioria de

receptores acoplados à proteína G (GPCR) não apresentam íntrons; isto é, sua estrutura gênica se compõe apenas de um éxon (Siehler & Milligan 2011).

No genoma humano, o gene *OXTR* está localizado na região 3p25–3p26.2 (Kimura et al. 1992) e apresenta 17 kb, tendo 4 éxons e 3 íntrons. No entanto, somente os éxons 3 e 4, os quais estão separados por um íntron de 12 kb, são traduzidos. O quarto éxon codifica o último domínio transmembrana, como ilustra a Figura 4.



**Figura 4.** Esquema gráfico do gene *OXTR*. As áreas escuras, numeradas por algarismos romanos, correspondem aos domínios transmembrana de *OXTR*. Gimpl & Fahrenholz 2001.

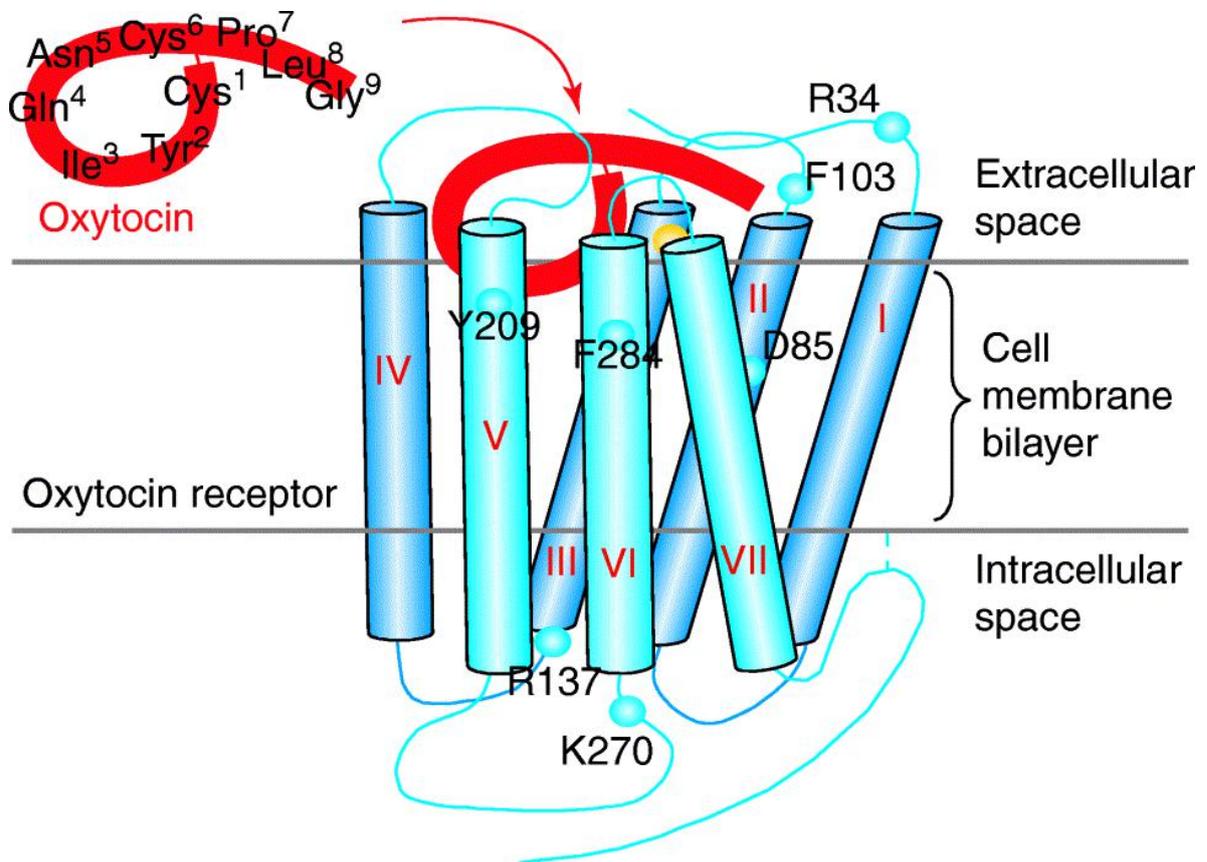
Tabela 2. Relação e estrutura dos genes do sistema *OXT-AVP*.

GENE	Função (Uniprot)	Exons	pb	Cod. (pb)	Prot (aa)	SNP (Cod; OMIM)	OMIM	CRO	Camundongo nocaute (MGI)	Estrutura (pb)	
<b>AVP</b>	<i>Arginine vasopressin</i>	A vasopressina tem uma ação anti-diurética direta nos rins, mas também provoca vasoconstricção dos vasos periféricos	3	2.169	619	164	rs121964882, rs121964884, rs121964886, rs121964888, rs121964890, rs121964892, rs121964893, rs121964883, rs121964885, rs121964887, rs121964889, rs121964891, rs74315383, rs28934878,	125700 - Diabetes insipidus, neurohipofisial	20	-	E1=170, E2=202, E3=247,
<b>AVPR1a</b>	<i>Arginine vasopressin receptor 1a</i>	Receptor de vasopressina. A atividade desse receptor é mediada pelas proteínas G, que activam um sistema de segundo mensageiro fosfatidil-inositol-cálcio. Está envolvido em comportamentos sociais, incluindo filiação e apego	2	7.574	1.525	418	-	-	12	Esquizofrenia	E1= 1.076, E2= 2.221
<b>AVPR1b</b>	<i>Arginine vasopressin receptor 1b</i>	Receptor de vasopressina. A atividade desse receptor é mediada pelas proteínas G, que activam um sistema de segundo mensageiro fosfatidil-inositol-cálcio.	2	7.664	2.237	424	-	-	1	Comportamental/ neurológico	E1=1.400, E2= 832
<b>AVPR2</b>	<i>Arginine vasopressin receptor 2</i>	Receptor de vasopressina. A atividade desse receptor é mediada pelas proteínas G que activam a adenilato-ciclase. Envolvidos na reabsorção renal de água.	3	4.636	1.622	371	rs104894748, rs104894750, rs104894751, rs104894753, rs104894755, rs104894757, rs104894759, rs104894749, rs28935496, rs104894752, rs104894754, rs104894756, rs104894758, rs104894760,	304800 - Diabetes insipidus, nefrogênica, 300539 - Síndrome nefrogênica de antidiurese imprópria	X	-	E1=96, E2=885, E3=641
<b>OXT</b>	<i>Oxytocin/neurophysin I prepropeptide</i>	A oxitocina provoca a contracção do músculo liso do útero e da glândula mamária.	3	898	513	125	-	-	20	-	E1=156, E2=202, E3=155
<b>OXTR</b>	<i>Oxytocin receptor</i>	Receptor da oxitocina. A atividade desse receptor é mediada pelas proteínas G, que ativam um sistema de segundo mensageiro fosfatidilinositol-cálcico	4	19.221	4.364	389	-	-	3	-	E1=387, E2=96, E3=1.064, E4=2.817

pb= pares de base; Cod= região codificadora; aa= aminoácidos; SNP= *Single nucleotide polymorphism*; OMIM= *Online Mendelian Inheritance in Man*; CRO= cromossomo; E1= éxon 1; E2= éxon 2; E3= éxon 3; E4= éxon 4; E5= éxon 5; E6= éxon 6; E7=éxon 7; E8= éxon 8; E9= éxon 9; E10= éxon 10; Dados coletados do Ensemble (<http://www.ensembl.org/>); Gene Cards (<http://www.genecards.org/>); e OMIM (<http://www.http://omim.org/>).

#### 1.4 Algumas características da interação ligante-receptor

Vários estudos (Chini et al. 1995; Slusarz et al. 2006b) mostraram que a parte cíclica da OXT interage com o terço superior do receptor, especificamente com os domínios transmembrana 3, 4 e 6 (Figura 5). Por outro lado, a parte carboxiterminal da OXT permanece mais na maior parte do tempo em contato com os domínios 2 e 3 na superfície e com o primeiro *loop* do receptor OXTR (Zingg & Laporte 2003).



**Figura 5.** Modelo esquemático da estrutura da OXT e de OXTR. A oxitocina encontra-se representada no canto superior esquerdo, em vermelho, com seus resíduos de aminoácidos numerados de 1 a 9. O receptor, em azul, mostra a interação do hormônio quando o complexo está ativado. Os sete domínios intermembrana de OXTR estão indicados por números romanos. Zingg & Laporte (2003).

Através de construtos quiméricos e truncados, demonstrou-se que a região N terminal do receptor é fundamental para a união à OXT. Dentro dessa região, a arginina, na posição 34 da cadeia de aminoácidos do OXTR (Arg34-OXTR), teria um papel fundamental, já que é conservada nas posições correspondentes nos receptores de

hormônios de diferentes *taxa*, como é o caso da mesotocina, isotocina, vasotocina, bem como nos três receptores da vasopressina (Wesley et al. 2002).

Chini e colaboradores (1996), por sua parte, demonstraram que a fenilalanina na posição 103 da cadeia de aminoácidos do OXTR (Phe103-OXTR), localizada na região da primeira alça extracelular, é muito importante para a efetivação da ligação com OXT, especificamente com o oitavo aminoácido, a leucina (Tabela 3). Vale lembrar que é nesse sítio da cadeia de aminoácidos da oxitocina que está localizada uma das diferenças entre esse hormônio e a vasopressina; na posição 8, há uma leucina na oxitocina e uma arginina na vasopressina (Arg-8-AVP; Figuras 2 e 3).

Um ano antes, os mesmos autores (Chini et al, 1995), descreveram a possível interação entre AVP e a tirosina 115 do receptor AVPR1a (Tyr115-AVPR1a). Curiosamente, Tyr115 no AVPR1a está localizado na primeira alça extracelular do receptor, sendo homóloga à posição Phe103 do OXTR, mostrando uma interação significativa ao substituir esse aminoácido (Tyr) pelo equivalente no OXTR (Phe). Evidencia-se, desse modo, o papel importante desse sítio na afinidade e na seletividade do receptor (Tabela 3).

Estudos adicionais mostraram que os aminoácidos Tyr209 e Phe284 do OXTR apresentavam papel importante na interação com o hormônio, interagindo possivelmente com o segundo resíduo aromático (Tyr) e o terceiro hidrofóbico (Ile) da OXT (Figura 5). É interessante notar que a Ile na posição 3 (Ile3-OXT) é o resíduo que diferencia a oxitocina da vasopressina (Phe3-AVP) na parte circular da molécula (Figura 2). Essas diferenças poderiam estar contribuindo ao reconhecimento específico da molécula com seu receptor (Chini et al, 1996; Tabela 3). Vale lembrar ainda que a AVP pode agir como um agonista completo ou parcial do receptor OXTR humano (Chini et al, 1996).

Deve-se considerar, também, que os aminoácidos Arg137-OXTR e Asp85-OXTR, entre outros, foram objeto de estudos através de mutações induzidas em organismos modelos e simuladas computacionalmente (Fanelli et al, 1999). Mutações Arg137Ala e Asp85Ala levaram a um receptor constitutivamente ativo e inativo, respectivamente. Com isso, é possível inferir seus papéis na ativação do complexo, no reconhecimento do agonista, bem como na interação com a proteína G (Fanelli et al, 1999).

**Tabela 3.** Aminoácidos importantes de OXTR que interagem direta ou indiretamente na ativação do complexo.

<b>Aminoácido</b>	<b>Posição (aa)</b>	<b>Provável função</b>	<b>Referência</b>
<b>Arg</b>	34	União ao hormônio	(Wesley et al. 2002)
<b>Asp</b>	85	Ativação, reconhecimento do agonista, interação com a proteína G	(Fanelli et al. 1999)
<b>Phe</b>	103	União ao hormônio; Leu <sup>8</sup> OXT	(Chini, 1996)
<b>Arg</b>	137	Ativação, reconhecimento do agonista, interação com a proteína G	(Fanelli et al, 1999)
<b>Tyr</b>	209	União ao hormônio; Iso <sup>3</sup> OXT	(Chini, et al, 1996)
<b>Phe</b>	284	União ao hormônio; Iso <sup>3</sup> OXT	(Chini et al, 1996)
<b>Trp</b>	288	Ativação	(Fanelli et al, 1999)
<b>Glu</b>	307	Ativação	(Fanelli et al, 1999)

Ao redor de 100 aminoácidos (25%) são conservados entre os receptores humanos AVPR1a, AVPR1b, AVPR2 e OXTR. A maior homologia entre esses receptores se dá nas alças extracelulares e nas regiões transmembranais. A parte amino-terminal e carboxiterminal são as mais dissimiles (Gimpl et al. 2001).

### **1.5 Expressão**

A expressão dos receptores pode ser tecido-específica, possibilitando a formação do complexo neuropeptídeo-receptor. Por exemplo, AVPR1a é sintetizado numa variedade de tecidos vasculares, artérias, arteríolas e veias, sendo responsável pela vasoconstrição. Já AVPR1b é sintetizado na pituitária anterior, mediando a secreção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), enquanto AVPR2 é encontrado em túbulos distais renais e dutos coletores, estimulando a absorção da água. OXTR, como já

comentado, quanto interligado com OXT, medeia em mamíferos placentários a contração uterina e a ejeção do leite, entre outras ações periféricas ao sistema nervoso central (Koshimizu et al, 2012).

## 1.6 Ordem Primates

Os membros da ordem Primates são reconhecidos por várias características tais como rosto curto, órbitas oculares frontais associadas à visão estereoscópica, capacidade craniana relativamente grande e polegares oponíveis (Myers 2000) São também caracterizados por apresentarem uma variedade de comportamentos sociais complexos. Os primatas estão entre os animais mais sociais, vivendo em grupos familiares, pares, haréns com um único macho e em grupos multimachos/multifêmeas (Grueter et al. 2012). Neste trabalho, algumas dessas características comportamentais e morfológicas serão consideradas em maiores detalhes, visto serem alvo de nossa investigação. Além disso, como veremos abaixo, o foco serão os primatas do Novo Mundo ou clado Platyrrhini.

O registro fóssil mais antigo dos primatas corresponde ao Eoceno (54-55 mya). Tavaré e colaboradores sugerem, a partir de dados moleculares, a presença de um ancestral comum para esse grupo, cuja existência poderia ter ocorrido há 81,5 mya (Tavaré et al. 2002).

Dentro dos primatas, dois grandes grupos são encontrados: Strepsirrhini e Haplorrhini; os primeiros apresentam nariz longo e desprotegido pela ausência de uma estrutura cartilaginosa, e os dentes incisivos inferiores em forma de pente, e não dispõem de uma placa óssea que separe a órbita da fossa temporal. Esse clado encontra-se dividido em Lemuriformes e Lorisiformes. A maioria das espécies são arbóreas, mas, ao mesmo tempo, algumas possuem uma especialização extrema para hábitos particulares de vida (Goodman et al. 1998).

A infraordem anthropoidea inclui as parvordens Catarrhini, ou primatas do Velho mundo (pVM), e Platyrrhini, também chamada primatas do Novo Mundo (pNM). Em linhas gerais, os dois grupos se diferenciam anatomicamente dos strepsirrhinos e, em certos casos, dos tarsiiiformes (Kowalewski et al. 2016).

### 1.6.1 Parvordem Catarrhini

A designação “primatas do Velho Mundo (pVM)” é devida à sua distribuição atual nos continentes africano e asiático. O nome catarrino (do grego *kata*, para baixo, e *rhinos*, nariz) descreve a forma do nariz, com aspecto estreito e aberturas nasais para baixo (Kowalewski et al. 2016).

Dentro dos catarrinos são descritas as superfamílias Cercopithecoidea e Hominoidea. Nos cercopitecoideos se encontram os comumente chamados “macacos”, já os hominoideos agrupa os coloquialmente chamados “símios”, isto é, os atuais gorila (*Gorilla gorilla*), chimpanzé e bonobo (*Pan troglodytes* e *Pan paniscus*), orangotango (*Pongo pygmaeus*), gibão (gêneros *Hylobates*, *Symphalangus*, *Nomascus* e *Hoolock*) e os humanos (*Homo sapiens*) (Kowalewski et al. 2016).

### 1.6.2 Parvordem Platyrrhini

A distribuição geográfica no continente Americano (região Neotropical) é o elemento determinante na denominação dos primatas do Novo Mundo (pNM). Os pNM atravessaram um processo de irradiação adaptativa, produzindo mais de uma centena de gêneros conhecidos. Porém, há discussões acaloradas entre os especialistas sobre os agrupamentos taxonômicos neste clado. Não sendo o foco do nosso trabalho, as controvérsias a respeito não serão comentadas aqui. No entanto, reconhecemos a importância da classificação taxonômica para a discussão de vários achados presentes na Tese. Desse modo, consideraremos *a priori* e como base a classificação proposta por Pelerman et al. (2011). Os referidos autores identificam três famílias: Pitheciidae, Atelidae e Cebidae.

#### Pitecídeos

Dentro dos pitecídeos encontram-se os gêneros *Pithecia*, *Chiropotes*, *Cacajao* e *Callicebu*, que se caracterizam por possuírem adaptações ao salto, dentição particular com incisivos procumbentes, caninos enormes e molares extremamente baixos, que ajudam no consumo de frutos duros e sementes, principal elemento nutritivo da sua dieta (Kowalewski et al. 2016).

Seus sistemas sociais são diversos, embora a maioria viva em sistemas fluidos tipo fissão-fusão ou em pequenos grupos de alimentação (Norconk & Kinzey 1994; DeFler et al. 2003; Bowler & Bodmer 2009). Interessa destacar que o *Callicebus* forma grupos coesivos pequenos de casais com padrão monogâmico social clássico (Kappeler & Van Schaik 2002; Norconk & Veres 2011).

### **Atelídeos**

Os atelídeos caracterizam-se por serem os maiores platirrinos, a exemplo dos bugios (gênero *Alouatta*) e dos muriquis (*Brachyteles*). Também possuem formas especializadas de braquiação (forma de locomoção arborícola em que os animais se deslocam de galho em galho), sendo exemplo o macaco-aranha (*Ateles*), com sua redução de modo extremo ou total do dedo polegar da mão (Kowalewski et al. 2016).

Nessa família descreve-se uma ampla variedade de sistemas de organização social, encontrando-se estrutura de casais, harém e grupos multimacho-multifêmea. Os macacos-aranha, por sua vez, possuem um característico sistema de fissão-fusão, similar ao intensamente estudado em chimpanzés (Symington 1990; Asensio et al. 2009), constituindo grupos grandes que se subdividem em pequenos grupos de forrageio, que mantêm contato auditivo entre si (Kowalewski et al. 2016).

### **Cebídeos**

Dentro dos cebídeos encontram-se dois grupos ligeiramente divergentes considerando sua morfologia, comportamento e genética: as subfamílias Cebinae (*Cebus*) e Saimirinae (*Saimiri*) que possuem, proporcionalmente, em relação ao peso corporal, um maior tamanho cerebral entre todos os antropóides. Recentemente foi proposta uma divisão do gênero *Cebus*, em *Sapajus* e *Cebus*, considerando evidências biogeográficas, comportamentais e genéticas, sendo os *Sapajus*, da Mata Atlântica, o grupo dos macacos-prego “robustos”, e os *Cebus*, os não robustos, localizados na Bacia Amazônica (Lynch Alfaro et al. 2012a; Lynch Alfaro et al. 2012b; Alfaro et al. 2012). Porém, ainda não existe um consenso absoluto entre os taxonomistas (Rylands & Anzenberger 2012). Para uma recente revisão sobre a classificação taxonômica dos *Cebus/Sapajus*, ver Lima et al. (2018). Os *Sapajus* possuem algumas adaptações na dentição para abrir nozes; são de tamanho médio (até 3,5 kg) e sexualmente dimórficos (machos com peso aproximadamente 25% superior ao das fêmeas), e, em geral,

apresentam hierarquias lineares de dominância importantes com machos e fêmeas alfa (Kowalewski et al, 2016).

Os macacos-de-cheiro (*Saimiri*) são primatas que vivem em grupos multifêmea-multimacho de até 300 indivíduos, embora formem uniões temporárias de múltiplos grupos (Boinski 2005; Sussman et al. 2005).

Outra subfamília dentro dos Cebídeos, a dos Callithrichinae, é uma das mais importantes para o presente trabalho. Dentro dos calitriquinos encontram-se os gêneros *Callithrix*, *Cebuella*, *Leontopithecus*, *Saguinus* e *Callimico*. Mais recentemente, os gêneros *Mico* e *Callibella* foram reconhecidos, porém seus *status* taxonômicos ainda são bastante controversos. É importante salientar as características dos calitriquinos, como tamanho corporal reduzido (sendo os menores do Neotrópico), duas crias por parto, presença de garras em lugar de unhas planas e a perda do terceiro molar (à exceção do gênero *Callimico*, que apresenta uma cria por parto e conserva seu terceiro molar). Os calitriquinos se alimentam principalmente de frutas, resinas, exsudatos, seiva, néctar, insetos e pequenos vertebrados (Corrêa et al. 2000; Digby et al. 2010).

Outras características interessantes deste clado que gostaríamos de destacar dentro deste trabalho são a ovulação pós-parto e a ajuda cooperativa na criação de filhotes – incluindo a do pai e de outros machos – e a monogamia social (Digby et al. 2010).

Os saguis (*Callithrix*) se caracterizam por viverem em habitats com menor disponibilidade de frutos, de modo que estão adaptados para explorar o exsudato das plantas (Rylands 1993), habilidade que não possuem os tamarinos (*Saguinus*). Tal como os bugios (*Alouatta*; família Atelidae), os saguis têm a capacidade de viver em ambientes limítrofes e moderadamente perturbados, convertendo-se em alguns casos, em espécies invasoras (*Callithrix jacchus*), enquanto outras encontram-se criticamente em perigo de extinção (*Saguinus bicolor*; Berrada et al. 2008).

Pelerman et al. (2011) identifica ainda a subfamília Aotinae, onde se encontram os únicos macacos noturnos do mundo (gênero *Aotus*), de modo que também são conhecidos como macacos-da-noite. São de um tamanho mediano, não apresentando dimorfismo sexual, e possuindo pernas e caudas relativamente longas. Possivelmente, uma adaptação aos seus hábitos noturnos são suas grandes órbitas oculares. São considerados monogâmicos sociais (Schneider 2000; Fernandez-Duque 2016), e os machos participam do cuidado das crias, com um padrão similar ao encontrado em *Callicebus* (Wright 1990).

As características comentadas aqui, além de algumas outras, estão presentes na Tabela 4.

**Tabela 4.** Características ecológicas de primatas analisados neste trabalho.

Espécie	Peso (g)	Período de gestação (anos)	Intervalo entre partos (anos)	Tamanho da ninhada	Tamanho do grupo	Expectativa de vida (anos)	Ciclo de atividade	Habitat	Locomoção	Dieta	Caçador	Estrutura social	Sistema de acasalamento
<i>Homo sapiens</i>	67100	0,8	3,7	1,0	150,0	80,0	DI	DV	BP	OM	Y	MFPB	Non-MGY
<i>Pan troglodytes</i>	47795	0,6	5,0	1,0	85,0	50,0	DI	TF	KN	OM	Y	FF	Non-MGY
<i>Pan paniscus</i>	39100	0,7	4,7	1,0	4,5	41,0	DI	TF	KN	HB	Y	FF	Non-MGY
<i>Gorilla gorilla</i>	135000	0,5	3,9	1,0	10,0	50,0	DI	TF	KN	HB	N	OMMF	Non-MGY
<i>Pongo abelii</i>	55000	0,7	8,1	1,0	1,5	55,0	DI	TF	AB	HB	N	SOL	Non-MGY
<i>Nomascus leucogenys</i>	5700	0,6	2,5	1,0	5,0	28,0	DI	TF	AB	HB	N	MFPB	MGY
<i>Papio anubis</i>	19500	0,5	2,1	1,0	68,0	25,2	DI	DV	TQ	OM	Y	MMMF	Non-MGY
<i>Cercocebus atys</i>	9125	0,5	1,0	1,0	75,0	26,8	DI	TF	TQ	HB	N	MMMF	Non-MGY
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	18250	0,5	1,4	1,0	22,5	28,6	DI	TF	AB	OM	N	MMMF	Non-MGY
<i>Macaca nemestrina</i>	9075	0,5	1,1	1,0	27,5	27,0	DI	TF	AB	OM	Y	MMMF	Non-MGY
<i>Macaca fascicularis</i>	4700	0,4	1,1	1,0	30,0	38,0	DI	TF	AB	OM	N	MMMF	Non-MGY
<i>Macaca mulatta</i>	7375	0,5	1,1	1,0	90,0	36,0	DI	DV	AB	OM	Y	MMMF	Non-MGY
<i>Chlorocebus sabaeus</i>	5125	0,4	1,0	1,0	43,5	30,0	DI	DV	TQ	HB	N	MMMF	Non-MGY
<i>Rhinopithecus roxellana</i>	11690	0,6	1,8	1,0	65,0	26,0	DI	TE	AB	HB	N	OMMF	Non-MGY
<i>Nasalis larvatus</i>	15000	0,5	2,0	1,0	12,6	21,0	DI	TF	AB	HB	N	OMMF	Non-MGY
<i>Colobus angolensis</i>	8600	0,4	1,2	1,0	25,0	30,0	DI	TF	AB	HB	N	OMMF	Non-MGY
<i>Aotus nancymaeae</i>	787	0,4	0,5	1,0	3,5	20,0	NT	TF	AB	HB	N	MFPB	MGY
<i>Aotus azarae</i>	1000			1,0			NT	TF	AB	OM		MFPB	MGY
<i>Callithrix jacchus</i>	330	0,4	0,4	2,0	7,5	16,0	DI	TF	AB	OM	Y	MFPB	MGY
<i>Callithrix geoffroyi</i>	240	0,4	0,6	2,0	9,0	10,0	DI	TF	AB	OM	Y	MFPB	MGY
<i>Callithrix humilis</i>	167	0,4	0,5	1,0	7,0	25,0	DI	TF	AB	HB	N	MMMF	MGY
<i>Callithrix humeralifer</i>	473,5	0,4	0,5	2,0	9,5	12,5	DI	TF	AB	OM	Y	OFMM	MGY
<i>Callithrix melanura</i>	400	0,4	0,5	2,0	9,0	16,0	DI	TF	AB	OM	Y	OFMM	MGY
<i>Callithrix saterei</i>	435	0,4	0,5	2,0	10,0	12,0	DI	TF	AB	OM	Y	OFMM	MGY
<i>Callimico goeldii</i>	626	0,4	0,5	1,0	5,0	17,9	DI	TF	AB	OM	Y	MFPB	Non-MGY
<i>Cebuella pygmaea</i>	124	0,4	0,5	2,0	7,0	18,6	DI	TF	AB	OM	Y	MFPB	MGY
<i>Leontopithecus rosalia</i>	654	0,4	0,5	2,0	8,5	22,0	DI	TF	AB	OM	Y	MFPB	MGY
<i>Leontopithecus chrysomela</i>	646,5	0,4	0,7	2,0	8,0	21,3	DI	TF	AB	OM	Y	MFPB	MGY
<i>Saguinus martinsi</i>	475	0,4	0,5	2,0	7,5	18,0	DI	TF	AB	OM	Y	OFMM	MGY
<i>Saguinus niger</i>	450	0,4	0,7	2,0	7,5	7,5	DI	TF	AB	OM	Y	OFMM	MGY

Espécie	Peso (g)	Período de gestação (anos)	Intervalo entre partos (anos)	Tamanho da ninhada	Tamanho do grupo	Expectativa de vida (anos)	Ciclo de atividade	Habitat	Locomoção	Dieta	Caçador	Estrutura social	Sistema de acasalamento
<i>Saguinus bicolor</i>	430	0,4	0,5	2,0	8,5	19,0	DI	TF	AB	OM	Y	OFMM	MGY
<i>Saguinus midas</i>	470	0,4	0,6	2,0	6,0	21,0	DI	TF	AB	OM	Y	OFMM	MGY
<i>Sapajus apella</i>	4800			1,0	11,5		DI	DV	AB	OM	Y	MMMF	Non-MGY
<i>Sapajus robustus</i>	2800	0,5	1,0	1,0	9,0	44,0	DI	TF	AB	OM	Y	MMMF	Non-MGY
<i>Sapajus xanthosternos</i>	2725	0,5	1,8	1,0	19,0	30,0	DI	TF	AB	OM	Y	MMMF	Non-MGY
<i>Saimiri boliviensis</i>	700	0,4	2,0	1,0	45,0	18,0	DI	TF	AB	OM	Y	MMMF	Non-MGY
<i>Brachyteles arachnoides</i>	13500	0,6	2,8	1,0	7,5	30,0	DI	TF	AB	HB	N	FF	Non-MGY
<i>Alouatta guariba</i>	5500	0,5	1,7	1,0	10,0	20,0	DI	TF	AB	HB	N	OMMF	Non-MGY
<i>Callicebus donacophilus</i>	950			1,0	4,5	25,0	DI	TF	AB	OM		MFPB	MGY
<i>Callicebus coimbrai</i>	1317,5	0,4	1,0	1,0	4,0	25,0	DI	TF	AB	HB	N	MFPB	MGY
<i>Cacajao melanocephalus</i>	2960	0,5	2,0	1,0	25,0	18,0	DI	TF	AB	HB	N	MMMF	Non-MGY
<i>Cebus capucinus</i>	3500			1,0	19,0		DI	TF	AB	OM		MMMF	Non-MGY
<i>Chiropotes albinasus</i>	2800	0,4	2,0	1,0	22,0	15,0	DI	TF	AB	HB	N	MMMF	Non-MGY
<i>Chiropotes utahicki</i>	2850	0,4	2,0	1,0	24,0	15,0	DI	TF	AB	HB	N	MMMF	Non-MGY
<i>Pithecia pithecia</i>	1871			1,0	3,0	15,0	DI	TF	AB	HB			Non-MGY
<i>Carlito syrichta</i>	128	0,5	0,5	1,0	3,0	14,0	NT	TF	AB	CN	Y	MFPB	Non-MGY
<i>Microcebus murinus</i>	60	0,2	1,0	2,0	3,5	15,0	NT	TF	AB	OM	Y	OMMF	Non-MGY
<i>Propithecus coquereli</i>	4000	0,4	1,0	1,0	6,5	27,5	DI	TF	AB	HB	N	MMMF	Non-MGY
<i>Otolemur garnettii</i>	764	0,4	0,6	1,0	4,0	15,0	NT	TF	AB	HB	N	MMMF	Non-MGY

Peso: Peso médio por espécie em gramas, considerando macho e fêmea. Período de gestação: Período de gestação em anos. Intervalo entre partos: Média do tempo entre partos em anos. Tamanho da ninhada: Número médio de crias por parto. Tamanho do grupo: Tamanho médio de grupos. Ciclo de atividade: DI = diurna, NT = noturna. Habitat: Principal habitat para a espécie - DV = Diversa/cosmopolita, TF = Floresta tropical, TE = climas temperados. Locomoção: Principal locomoção - BP = Bípede, KN = apóiam-se sobre os nós dos dedos, AB = Arbórea, TQ = Quadrúpede terrestre. Dieta: Principal dieta para a espécie - OM = Onívoro, HB = Herbívoro, CN = Carnívoro. Caçador Y= Sim, N=Não. Estrutura social: Principal estrutura social - MFPB = casal macho fêmea, FF = fissão-fusão, SOL = solitário, OMMF = um macho múltiplas fêmeas, OFMM = uma fêmea múltiplos machos, MMMF = múltiplas fêmeas múltiplos machos. Sistema de acasalamento: MGY = Monógamo, Non-MGY = Não monógamo. Para simplificar a estrutura, classificamos todos os sistemas poliândricos/poligínicos/poliginândricos como não monógamos. Espaço vazio = Sem informação.

### **1.6.3 Organização social**

A ordem Primates constitui um clado de mamíferos em que a ocorrência de monogamia social é notável. Convém destacar que a incidência de monogamia social entre os pNM é excepcionalmente alta – mais de 62% das ~177 espécies são classificadas como socialmente monogâmicas (Kleiman & Malcolm 1981; Lukas & Clutton-Brock 2013).

A organização social em Platyrrhini é muito mais diversificada do que a encontrada nos outros primatas. Muitos dos pNM vivem em grupos sociais monógamos, como é o caso dos calitriquinos, embora também sejam descritos casos de poliginia, poliandria ou poliginandria (Fleagle, 2013). Como veremos em outros momentos da presente Tese, a estrutura social monogâmica está diretamente correlacionada com outros comportamentos adaptativos que são determinantes na estratégia reprodutiva das espécies em questão, tal como o cuidado paternal.

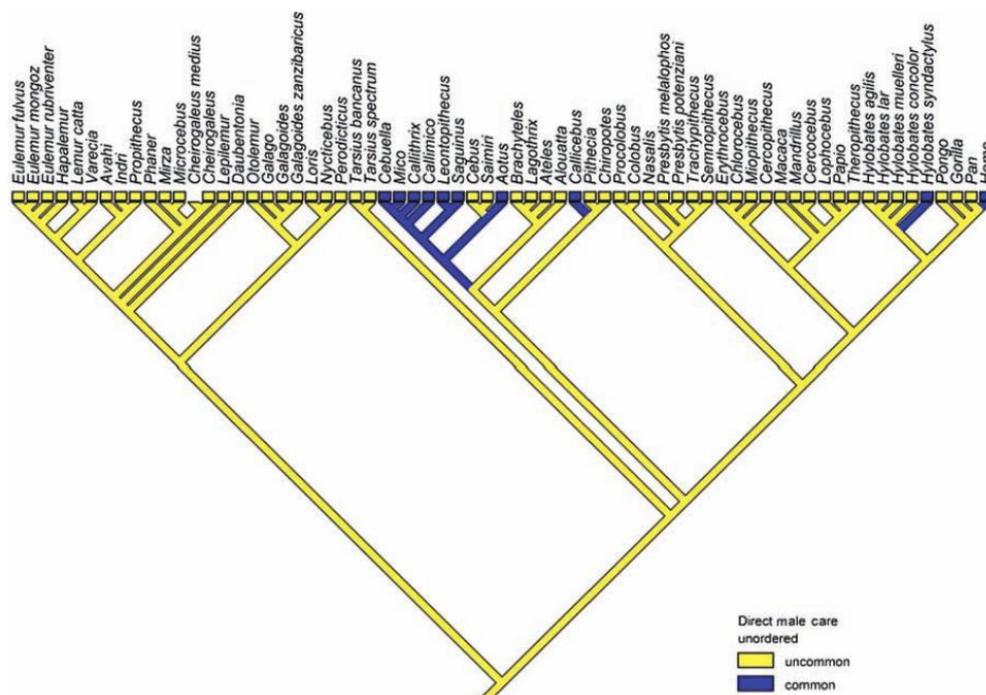
### **1.6.4 Cuidado parental**

O cuidado parental é definido como qualquer comportamento dos pais que aumenta o valor adaptativo dos descendentes. São um conjunto de atividades que geralmente envolve o gasto de tempo, energia e recursos por parte dos pais (Royle et al. 2012). Na maioria dos vertebrados, é uma atividade realizada unicamente pela fêmea, isto é, através do cuidado materno. Porém, se encontra também o cuidado biparental que envolve ambos os pais. É interessante notar que o cuidado paternal (que, por sua vez, determina o cuidado biparental) tem evoluído repetidas vezes em vertebrados e invertebrados; é um carácter relativamente raro em mamíferos, mas é muito comum em alguns clados de primatas, mais do que nas demais ordens (Storey & Ziegler 2016).

Existem diversas teorias que explicam o surgimento da monogamia social e o cuidado paterno nos primatas; uma delas apresenta-os como ferramentas fundamentais para incrementar o cuidado cooperativo das crias, relativamente imaturas aos nascer (Hrady 2010). Lukas e Clutton (Lukas & Clutton-Brock 2013) sugerem que a monogamia social surge nos mamíferos quando as fêmeas ocupam espaços discretos que não se sobrepõem aos espaços das outras fêmeas; dessa maneira, os machos não podem monopolizar mais de uma fêmea. O risco de infanticídio emerge como uma

variável determinante, que é minimizada no momento em que emerge a monogamia social e o cuidado paterno.

Na maioria dos primatas, os machos podem tolerar as crias ou podem ocasionalmente interagir de uma maneira afiliativa com elas sem um claro cuidado paterno envolvido (Fernández-Duque et al. 2009). Esse é o caso de babuínos machos (*Papio cynocephalus*), que, em disputas agonísticas por território, fêmea, etc, protegem seus filhotes. Porém interagem pouco com os filhotes em outras circunstâncias. O cuidado paterno direto, por sua vez, pode ser definido como o conjunto de comportamentos desempenhados por um macho adulto que têm efeitos positivos sobre o desenvolvimento, sobrevivência ou bem-estar dos filhotes. Este comportamento está relacionado, dentre outros fatores, a alterações hormonais que também estão envolvidas no parto e na lactação, ou seja, flutuações de estrógeno e de progesterona (Saltzman & Maestriperi 2011); também as bases hormonais do cuidado paterno aludem, entre outros neuro-hormônios, a OXT, AVP, prolactina e testosterona, como fundamentais para a emergência deste fenótipo (Wynne-Edwards & Reburn 2000).



**Figura 6.** Primatas que apresentam cuidado paterno direto (em azul). Fonte: Fernandez-Duque et al. 2009.

A Figura 6 ilustra que o cuidado paterno pode ter se derivado paralelamente em 4 ramos na ordem Primates. Entre os pNM, encontramos nos calitriquíneos (família Cebidae), além do cuidado paterno, a forma mais comum, o cuidado aloparental (também denominado cuidado cooperativo), no qual mãe, pai, irmãos e outros membros do grupo cuidam dos gêmeos que nascem duas vezes por ano. Já nos gêneros *Aotus* (também gênero da família Cebidae) e *Callicebus* (família Pitheciidae), que vivem em grupos pequenos (2-4 indivíduos), as fêmeas têm um único parto por ano. O macho é o principal transportador das crias durante cerca de 90% do tempo logo depois do parto, sendo a cria transferida para a mãe em pequenos intervalos somente para a amamentação. Os irmãos interagem pouco no transporte das crias. Curiosamente, as crias de *Callicebus* desenvolvem uma acentuada preferência pelo pai, demonstrada por meio de um forte estresse quando são separadas dele, o que não ocorre quando são separadas da mãe (Fernández-Duque et al. 2009). Por outro lado, provavelmente *Cebus* e *Saimiri*, gêneros da família Cebidae, voltaram a apresentar um comportamento considerado ancestral.

### 1.7 Conservação da OXT em mamíferos placentários

Revisões publicadas na última década sobre evolução e estrutura de nonapeptídeos indicavam que a estrutura da OXT estava conservada em todas as espécies de mamíferos placentários investigadas até então (Donaldson & Young 2008; Lee et al. 2009; Insel 2010). Porém, no ano de 2011, Lee e colaboradores sequenciaram as regiões codificantes do gene *OXT* em cinco espécies de pNM: *Cebus apella*, *Saimiri sciureus*, *Aotus nancymae*, *Callithrix jacchus* e *Callicebus cupreus*. Encontraram uma substituição nucleotídica não sinônima no códon que codifica o oitavo aminoácido do nonapeptídeo (CTG→CCG; Leu8→Pro8) em todas as espécies de pNM analisadas, exceto no *Callicebus cupreus*, descrevendo, assim, pela primeira vez, a forma Pro<sup>8</sup>OXT nos mamíferos eutérios.

A quebra do paradigma da conservação da OXT num ramo com ampla diversidade de comportamentos, bem como o conhecimento do papel desse neuropeptídeo em funções fisiológicas e comportamentais complexas levaram-nos a traçar os objetivos da presente Tese, que serão apresentados no Capítulo II.

## CAPÍTULO II

### 2.1 Objetivos

Identificar variantes táxon-específicas nos genes dos sistemas da oxitocina (*OXT-OXTR*) e da vasopressina (*AVP-AVPR1a*, *AVPR1b* e *AVPR2*) em primatas e avaliar seu potencial significado funcional e evolutivo.

### 2.2 Objetivos Específicos

Constituem objetivos específicos deste estudo:

- a) Identificar variações espécie ou grupo específicas em *OXT*, *OXTR*, *AVP*, *AVPR1a*, *AVPR1b* e *AVPR2* em primatas;
- b) Determinar os padrões evolutivos no sistema *OXT* e *AVP* nos primatas;
- c) Detectar processos coevolutivos intra e intermoleculares nos sistemas *OXT* e *AVP* em primatas;
- d) Identificar modificações em regiões estruturais importantes em sítios de interação ligante-receptor no sistema *OXT* e *AVP* nos primatas;
- e) Avaliar computacionalmente alterações estruturais nos neuropeptídeos (*OXT* e *AVP*) e
- f) Sugerir relações entre as mudanças nos sistema neuropeptídeo-receptor e características reprodutivas e comportamentais nos primatas investigados.

## CAPÍTULO III

### 3.1 Evolução do Sistema OXT-AVP

Conforme comentado anteriormente, até o início da década atual, acreditava-se que OXT não variava em mamíferos placentários. Buscando ampliar os conhecimentos sobre a variante Pro<sup>8</sup>OXT descrita por Lee et al. (2011), sequenciamos e analisamos a região codificadora do gene *OXT* de 29 espécies de pNM. Deste conjunto de espécies, 21 foram também investigadas com relação à porção codificadora do gene *OXTR*.

Os resultados podem ser vistos no primeiro artigo que compõe a presente Tese: “Vargas-Pinilla P, Paixão-Côrtes VR, Pará P, Tovo-Rodrigues L, Vieira CM, Xavier A, Comas D, Pissinatti A, Sinigaglia M, Rigo MM et al. (2015). Evolutionary pattern in the OXT-OXTR system in primates: coevolution and positive selection footprints. Proc Natl Acad Sci U S A 112:88–93.”

O material suplementar encontra-se no seguinte link:

[www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1419399112/-/DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1419399112/-/DCSupplemental).

## CAPÍTULO IV

### 4.1 Novas formas de OXT, novas funções

Os achados aos quais o Capítulo III desta Tese faz referência estimularam a busca por uma abordagem funcional interdisciplinar. Os resultados de testes *in silico*, *in vitro* e *in vivo* estão presentes no próximo artigo que compõe a presente Tese: “Parreiras-e-Silva LT, Vargas-Pinilla P, Duarte DA, Longo D, Espinoza Pardo GV, Dolor Finkler A, Paixão-Côrtes VR, Paré P, Rovaris DL, Oliveira EB et al. (2017). Functional New World monkey oxytocin forms elicit an altered signaling profile and promotes parental care in rats. Proc Natl Acad Sci 114:9044–9049.”

O material suplementar encontra-se no seguinte link:

[www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1711687114/-/DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1711687114/-/DCSupplemental).

Pag 43 a 48 não disponíveis nesse versão

## CAPÍTULO V

### 5.1 Evolução da região regulatória

Para entender os mecanismos moleculares que regem o sistema OXT-AVP, não é suficiente somente o estudo da porção codificadora dos genes. É importante desvendar os elementos regulatórios associados a cada gene, que podem explicar seus diferentes padrões de expressão. A região promotora de *OXTR* humano está bem caracterizada (Gimpl, 2001). Sabe-se, por exemplo, que elementos de resposta a interleucinas ou a estrógenos são comuns tanto na região 5' do gene *OXTR* humano quanto na do gene do rato. Porém, nenhuma descrição mais ampla havia sido feita nesta região considerando espécies de pNM, o que motivou nosso estudo, cujos achados podem ser vistos no terceiro artigo que compõe a presente Tese: “Vargas-Pinilla P, Babb P, Nunes L, Paré P, Rosa G, Felkl A, Longo D, Salzano FM, Paixão-Côrtes VR, Gonçalves GL et al. (2016). Progesterone Response Element Variation in the OXTR Promoter Region and Paternal Care in New World Monkeys. *Behav Genet* 1–11.”

Pags 50 a 60 não disponíveis nesse versão

## CAPÍTULO VI

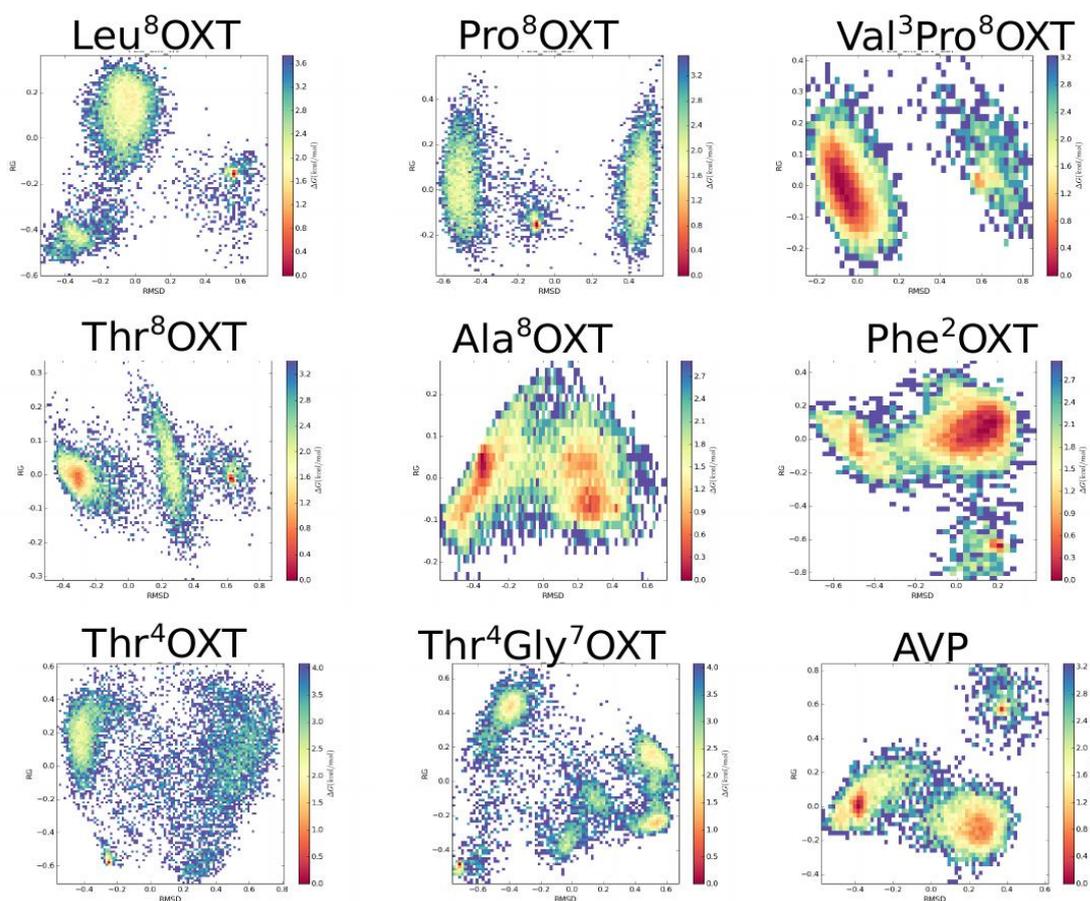
Além dos resultados já mencionados (Capítulos III, IV e V), a seguir serão mostrados alguns achados ainda não publicados e/ou que não entraram em sua totalidade nos artigos acima referidos.

### 6.1 Bioinformática

Em nossas análises exploratórias, através de simulações de dinâmica molecular, além das formas de oxitocina encontradas nos pNM (Leu<sup>8</sup>OXT, Pro<sup>8</sup>OXT, Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT, Ala<sup>8</sup>OXT, Thr<sup>8</sup>OXT, Phe<sup>2</sup>OXT; Figura 7), aqui chamadas de formas naturais, foram incluídas também variantes sintéticas nunca encontradas na natureza (Thr<sup>4</sup>OXT e Thr<sup>4</sup>Gly<sup>7</sup>OXT).

Alguns estudos mostram que Thr<sup>4</sup>OXT é duas vezes mais eficiente na ativação de OXTR, mas perde cerca de 10% a 25% da sua habilidade para ativar os receptores de AVP quando se compara com Leu<sup>8</sup>OXT. Somada a Thr<sup>4</sup>, Gly<sup>7</sup> resulta em uma atividade reduzida a menos de um terço da atividade de OXTR, enquanto sua atividade com receptores de AVP é nula (Lowbridge et al. 1977; Yedvabny et al. 2015).

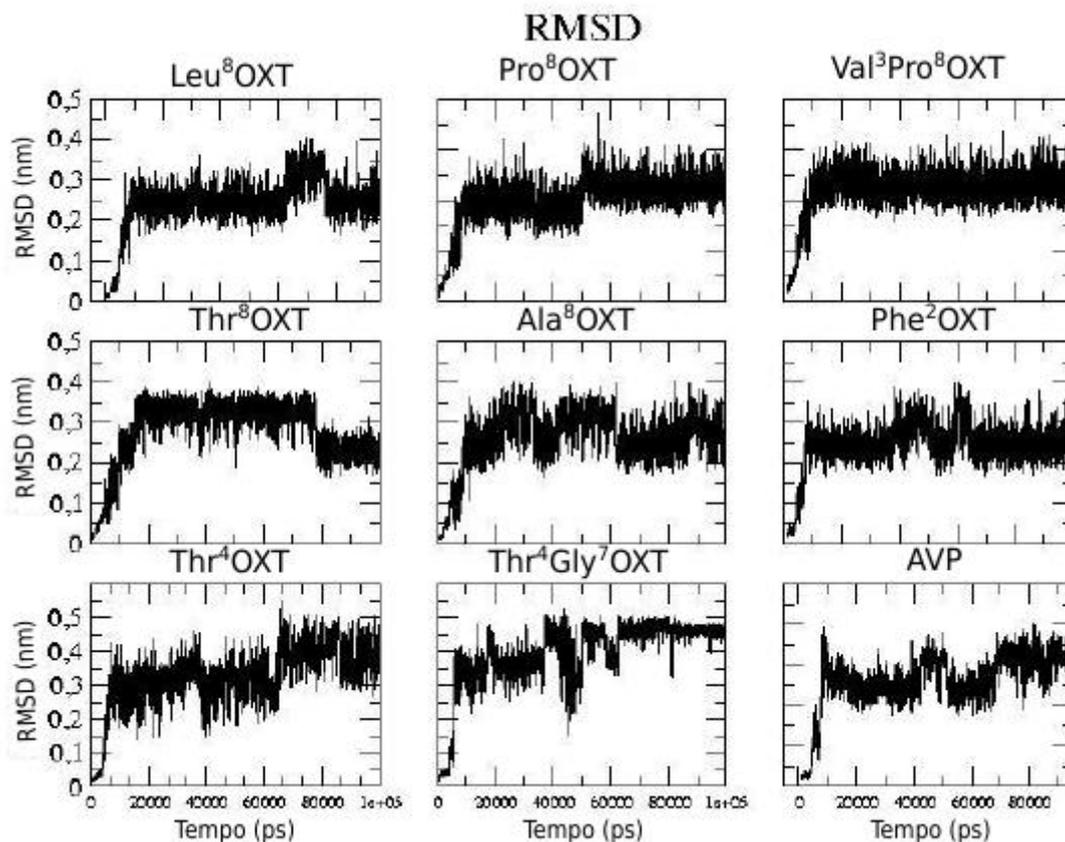
A análise de componente principal para cada forma de OXT mostra três conformações de baixa energia em todas as formas naturais (Leu<sup>8</sup>OXT, Pro<sup>8</sup>OXT, Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT, Ala<sup>8</sup>OXT, Thr<sup>8</sup>OXT, Phe<sup>2</sup>OXT; Figura 7). É interessante observar que esse padrão não se confirma nas formas sintéticas, que apresentam as estruturas Thr<sup>4</sup>OXT e Thr<sup>4</sup>Gly<sup>7</sup>OXT. Essas conformações diferentes presentes nas formas sintéticas poderiam influenciar sua funcionalidade e a sua capacidade de ativar receptores (Lowbridge et al. 1977), como é observado em trabalhos já publicados (Glembo et al. 2012).



**Figura 7.** Gráfico de energia de superfície livre (FES; *Free Energy Surface*) para as formas de OXT e AVP, considerando-se os valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*), no eixo X, e Raio de Giro (RG), no eixo Y. A energia livre é representada no gradiente que vai de cores quentes, para valores elevados, a cores frias, para valores baixos.

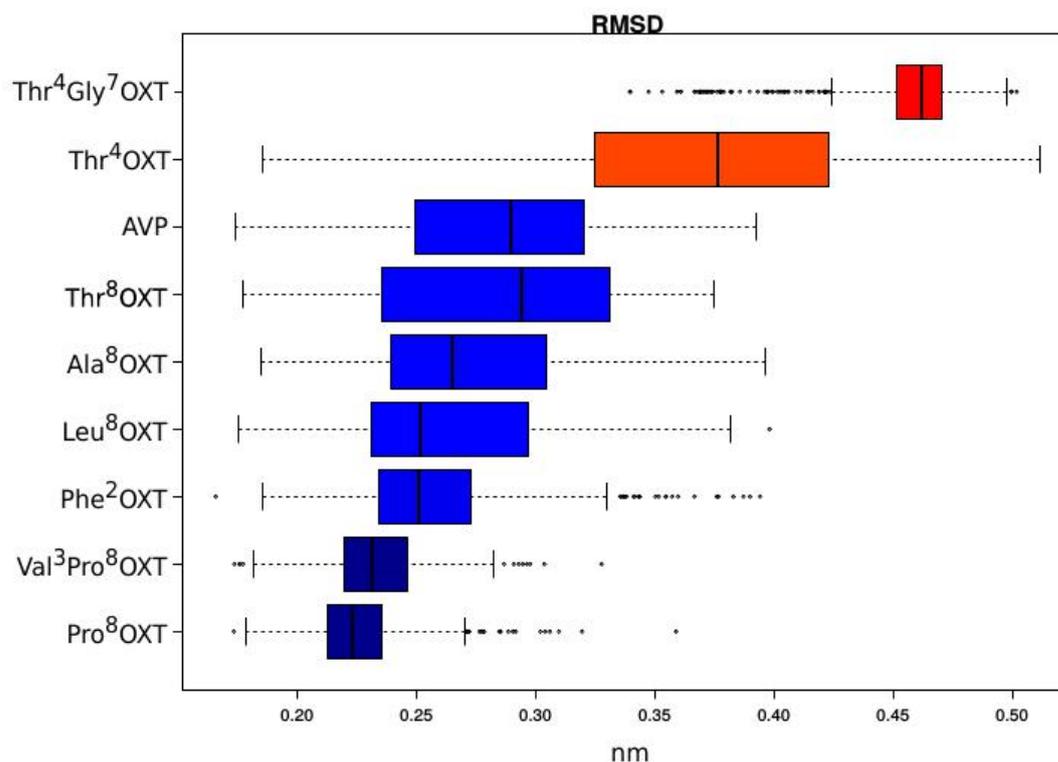
## 6.2 Comparação das dinâmicas

Para compararmos as formas naturais de OXT, analisamos diferentes parâmetros estruturais ao longo da dinâmica. Dentro da análise estatística, consideramos os valores dos últimos 50 nanossegundos (ns) da dinâmica, dada a estabilização que se dá na maioria dos parâmetros analisados (Figura 8). Isso permitiu determinar diferenças significativas entre as variadas formas ou grupos de formas, representados nos gráficos 9 a 13, nos quais um gradiente de cores frias para quentes representa os valores mais baixos e os mais elevados, respectivamente, agrupando-se na mesma cor as formas que não possuem diferenças significativas entre si.



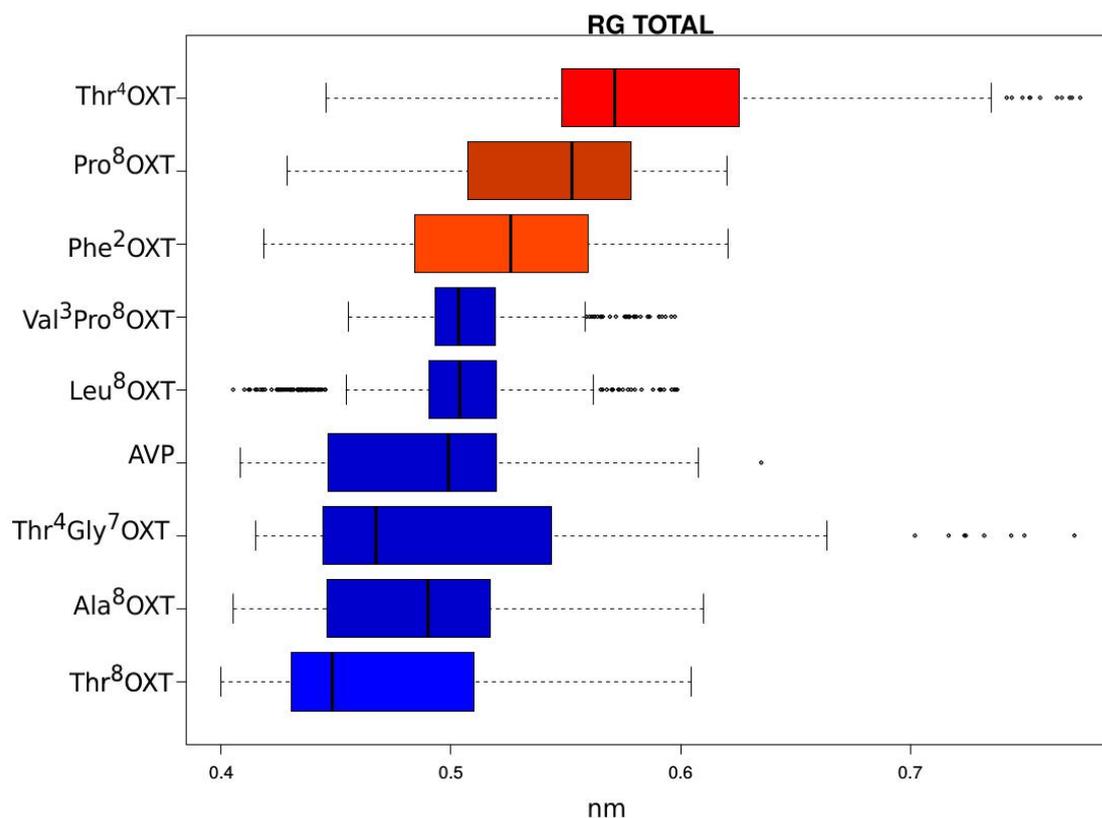
**Figura 8.** Valores de RMSD para as formas de OXT e AVP ao longo dos 100 ns da simulação.

Na Figura 9, na representação de RMSD (*Root Mean-Square Deviation*), os valores mais baixos pertencem a Pro<sup>8</sup>OXT e Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT, diferenciando-se significativamente ( $p < 0,001$ ; azul escuro) das outras formas naturais (azul claro). Essas últimas, por sua vez, diferenciam-se das formas sintéticas Thr<sup>4</sup>OXT (laranja) e Thr<sup>4</sup>Gly<sup>7</sup>OXT (vermelho), confirmando valores descritos em outros trabalhos (Yedvabny et al, 2015).



**Figura 9.** Boxplot dos valores de RMSD dos últimos 50 ns da simulação da dinâmica molecular para cada forma de oxitocina e vasopressina. O teste de Dunn identificou 4 grupos significativamente diferentes: 1: Thr<sup>4</sup>Gly<sup>7</sup>OXT; 2: Thr<sup>4</sup>OXT; 3: AVP, Thr<sup>8</sup>OXT, Ala<sup>8</sup>OXT, Leu<sup>8</sup>OXT e Phe<sup>2</sup>OXT; e 4: Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT e Pro<sup>8</sup>OXT ( $p < 0,001$ ).

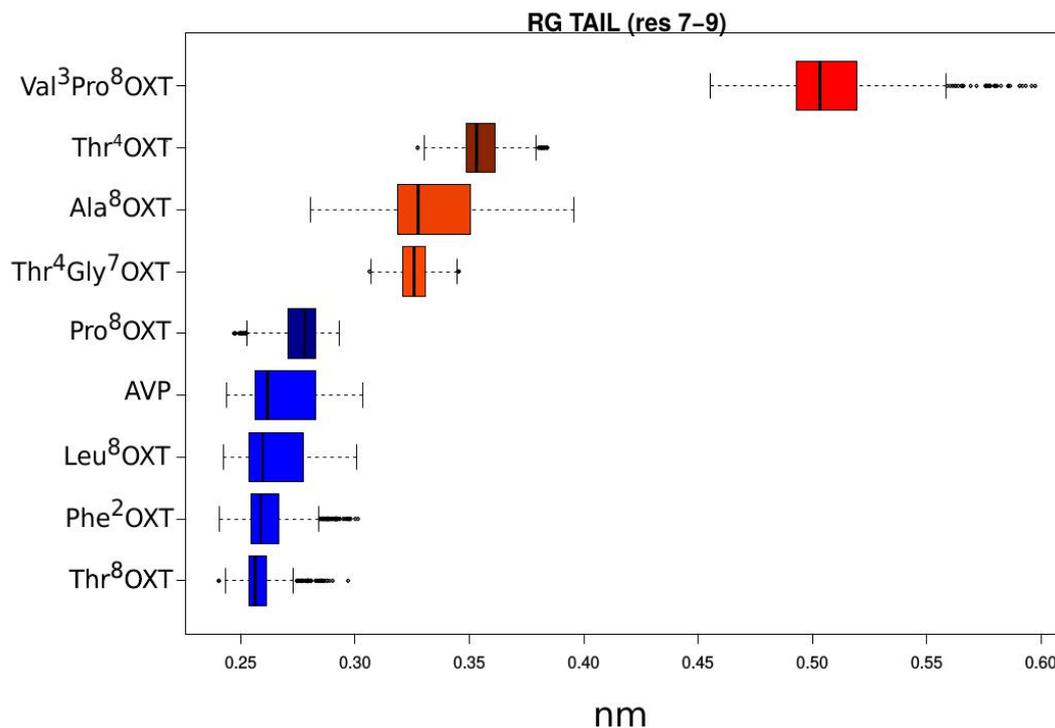
Outro parâmetro considerado é o Raio de Giro (RG). A forma sintética Thr<sup>4</sup>OXT apresenta os maiores valores (Figura 10), diferenciando-se significativamente das formas naturais e de Thr<sup>4</sup>Gly<sup>7</sup>OXT. Justamente essa última forma permite inferir o impacto da mudança na sétima posição; Pro>Gly parece ser determinante para a diminuição dos valores do RG, dado que Thr<sup>4</sup>Gly<sup>7</sup>OXT parece ser uma estrutura mais compacta. Essa mudança influenciando o RG poderia ser determinante na ativação do receptor, considerando que, como se mencionou anteriormente, Thr<sup>4</sup>Gly<sup>7</sup>OXT apresenta valores reduzidos na ativação de OXTR e AVPRs.



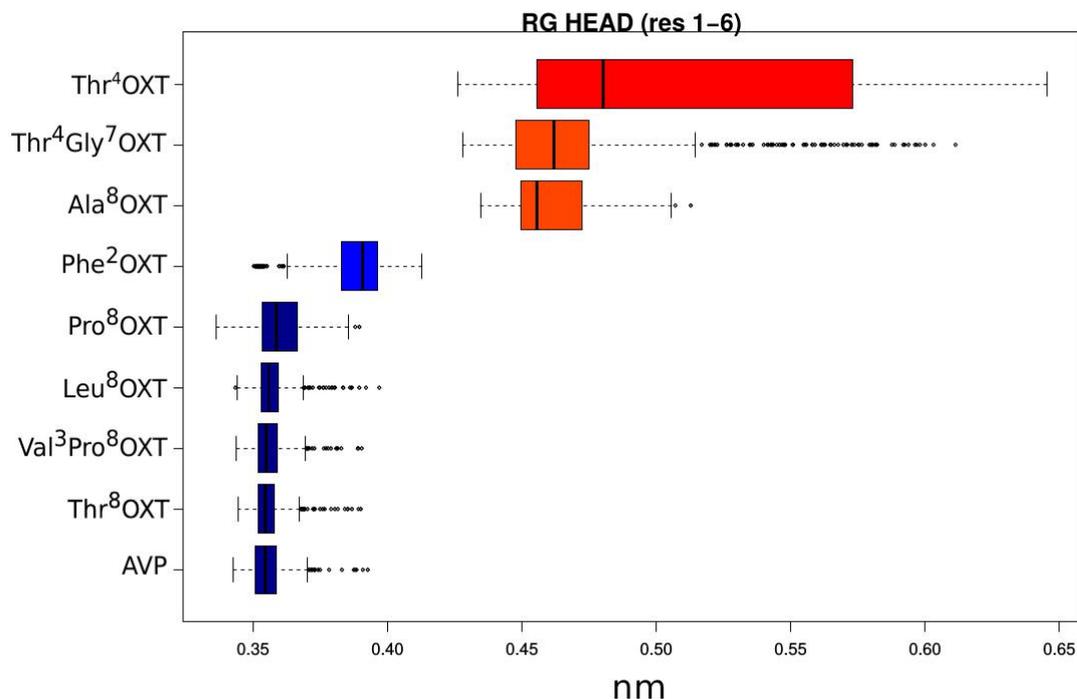
**Figura 10.** Boxplot dos valores de Raio de Giro dos últimos 50 ns da simulação da dinâmica molecular para cada forma de OXT e AVP. O teste de Dunn identificou 4 grupos significativamente diferentes: 1: Thr<sup>4</sup>OXT; 2: Pro<sup>8</sup>OXT; 3: Phe<sup>2</sup>OXT; e 4: Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT, Leu<sup>8</sup>OXT, AVP, Thr<sup>4</sup>Gly<sup>7</sup>OXT, Ala<sup>8</sup>OXT e Thr<sup>8</sup>OXT ( $p < 0,001$ ).

No Capítulo I foi descrita a estrutura secundária de OXT, que se caracteriza por possuir um anel de 6 aminoácidos e uma cauda de 3 aminoácidos na parte carboxiterminal. Comentaremos abaixo alguns dos resultados mais interessantes que surgem quando são analisadas cada parte independentemente.

A análise da cauda carboxiterminal de 3 aminoácidos (7-9) evidencia que Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT apresenta valores superiores de RG ( $p < 0,001$ ; Figura 11) aos das demais formas comparadas; a mesma análise, considerando a estrutura cíclica (aminoácidos 1-6), evidencia que a forma sintética Thr<sup>4</sup>OXT apresenta os maiores valores (Figura 12).



**Figura 11.** Boxplot dos valores de Raio de Giro da cauda carboxiterminal (aminoácidos 7-9) dos últimos 50 ns da simulação da dinâmica molecular para cada forma de oxitocina e vasopressina. O teste de Dunn identificou 6 grupos significativamente diferentes: 1: Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT; 2: Thr<sup>4</sup>OXT; 3: Ala<sup>8</sup>OXT e Thr<sup>4</sup>Gly<sup>7</sup>OXT; 4: Pro<sup>8</sup>OXT; 5: Leu<sup>8</sup>OXT, AVP e Phe<sup>2</sup>OXT; e 6: Thr<sup>8</sup>OXT ( $p < 0,001$ ).



**Figura 12.** Boxplot dos valores de Raio de Giro da parte cíclica (aminoácidos 1-6) dos últimos 50 ns da simulação da dinâmica molecular para cada forma de oxitocina e vasopressina. O teste de Dunn identificou 4 grupos significativamente diferentes: 1: Thr<sup>4</sup>OXT; 2: Ala<sup>8</sup>OXT e Thr<sup>4</sup>Gly<sup>7</sup>OXT; 3: Phe<sup>2</sup>OXT; e 4: Leu<sup>8</sup>OXT, AVP, Pro<sup>8</sup>OXT, Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT e Thr<sup>8</sup>OXT ( $p < 0,001$ ).

Análises similares evidenciam que a cauda tripeptídica é mais flexível do que a parte cíclica (Bhaskaran et al. 1992). Isso é evidente para todas as estruturas analisadas, mas especificamente Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT apresenta valores de RG mais elevados, ultrapassando as formas sintéticas. Vale a pena salientar que, a partir do fato, observado em nossa análise, de que a forma Pro<sup>8</sup>OXT apresenta valores similares aos das outras formas analisadas, é possível inferir que a mudança na terceira posição (Ile>Val na parte cíclica) é determinante nos valores elevados da cauda carboxiterminal. Esse resultado é coerente com os resultados que se apresentaram na análise seguinte, na qual foram avaliadas as ligações de hidrogênio dentro das estruturas ao longo da dinâmica.

As ligações de hidrogênio (LH) foram calculadas através do pacote HB em Gromacs. Aqui, pôde-se observar que Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT apresenta o menor número de ligações de hidrogênio (23); Thr<sup>4</sup>OXT, por sua vez, apresenta o maior número (64; Tabela 5). Todos os neuropeptídeos apresentam três LH; o primeiro, entre o carboxilo (CO) da Tirosina (Tyr) 2 e o grupo amino (NH) da Asparagina (Asn) 5; o segundo, entre o grupo NH da Tirosina 2 e o grupo CO da Asn5; o terceiro, entre o grupo NH da Cisteína (Cys)

6 e o CO de Tyr2. Uma ligação também frequente ocorre em todas as formas menos em Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT e Pro<sup>8</sup>OXT: é a que se dá entre o grupo NH da Glicina (Gly) 9 e o grupo CO da (Cys) 6. Curiosamente, como se comentou anteriormente, Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT apresenta os mais valores de RG na parte carboxiterminal, o que poderia corresponder a um menor número de ligações de hidrogênio intermolecular, permitindo uma maior flexibilidade dentro da molécula.

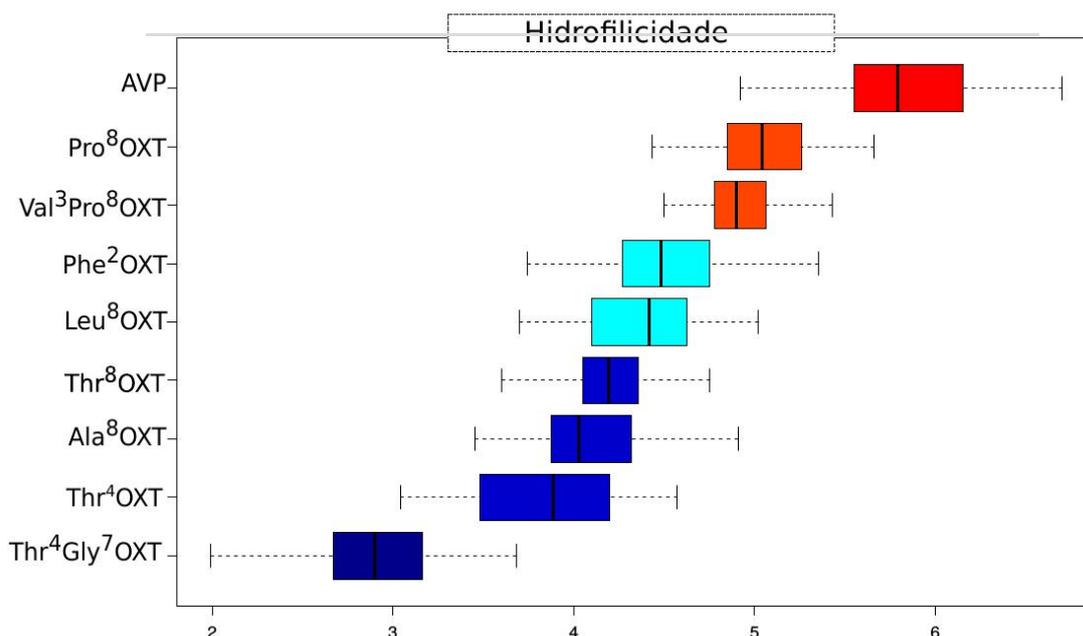
**Tabela 5.** Parâmetros das principais variáveis consideradas na simulação das formas de OXT e AVP.

FATOR	Leu <sup>8</sup> OXT	Pro <sup>8</sup> OXT	Val <sup>3</sup> Pro <sup>8</sup> O	Thr <sup>8</sup> OXT	Ala <sup>8</sup> OXT	Phe <sup>2</sup> OXT	Thr <sup>4</sup> OXT	Thr <sup>4</sup> Gly <sup>7</sup> O	AVP
RMSD	0,2658	0,2265	0,2328	0,2847	0,2732	0,2568	0,3710	0,4539	0,2846
RG Total	0,5042	0,5436	0,5100	0,4740	0,4886	0,5212	0,5866	0,4905	0,4911
RG parte cíclica	0,3571	0,3604	0,3560	0,3557	0,4602	0,3869	0,5111	0,4732	0,3556
RG cauda tripeptídica	0,2650	0,2747	0,5100	0,2585	0,3342	0,2629	0,3552	0,3258	0,2690
Ligações de H	35	35	23	37	34	39	64	59	53

Esses movimentos diferentes relativos a Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT poderiam representar mudanças na sua afinidade com o ligante e/ou efeitos na cascata de sinalização, incluindo a capacidade de recrutamento de  $\beta$ -arrestinas, como já demonstrado experimentalmente no Capítulo IV.

É conhecido que a isoleucina (Ile) na terceira posição da OXT e a arginina (Arg) na oitava da AVP são determinantes para a ativação do OXTR e dos AVPRs, respectivamente. Sabe-se que as interações dos neuropeptídeos com seus respectivos receptores são determinadas pela polaridade dessas posições (Slusarz et al. 2006a), de modo que é importante estudar as mudanças na polaridade nas OXTs presentes nos pNM. Duas mudanças na polaridade são registradas nas formas naturais; por um lado, nos pitecídios, a treonina (Thr; aminoácido polar) na oitava posição substitui uma leucina (Leu; aminoácido não polar) originando a forma Thr<sup>8</sup>OXT. Por outro lado, a forma presente no gênero *Alouatta*, Phe<sup>2</sup>OXT, descrita por Ren et al. 2015 (ver mais detalhes no Capítulo VII), apresenta uma fenilalanina (Phe) na segunda posição (não polar), substituindo uma tirosina (aminoácido polar; Figura 3).

A hidrofobicidade ao longo da dinâmica foi também estudada nas diferentes formas de oxitocina. O achado mais interessante é o fato de que Pro<sup>8</sup>OXT e Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT apresentam valores intermediários entre AVP e Leu<sup>8</sup>OXT; as outras formas apresentam valores menores de hidrofobicidade que Leu<sup>8</sup>OXT (Figura 13).



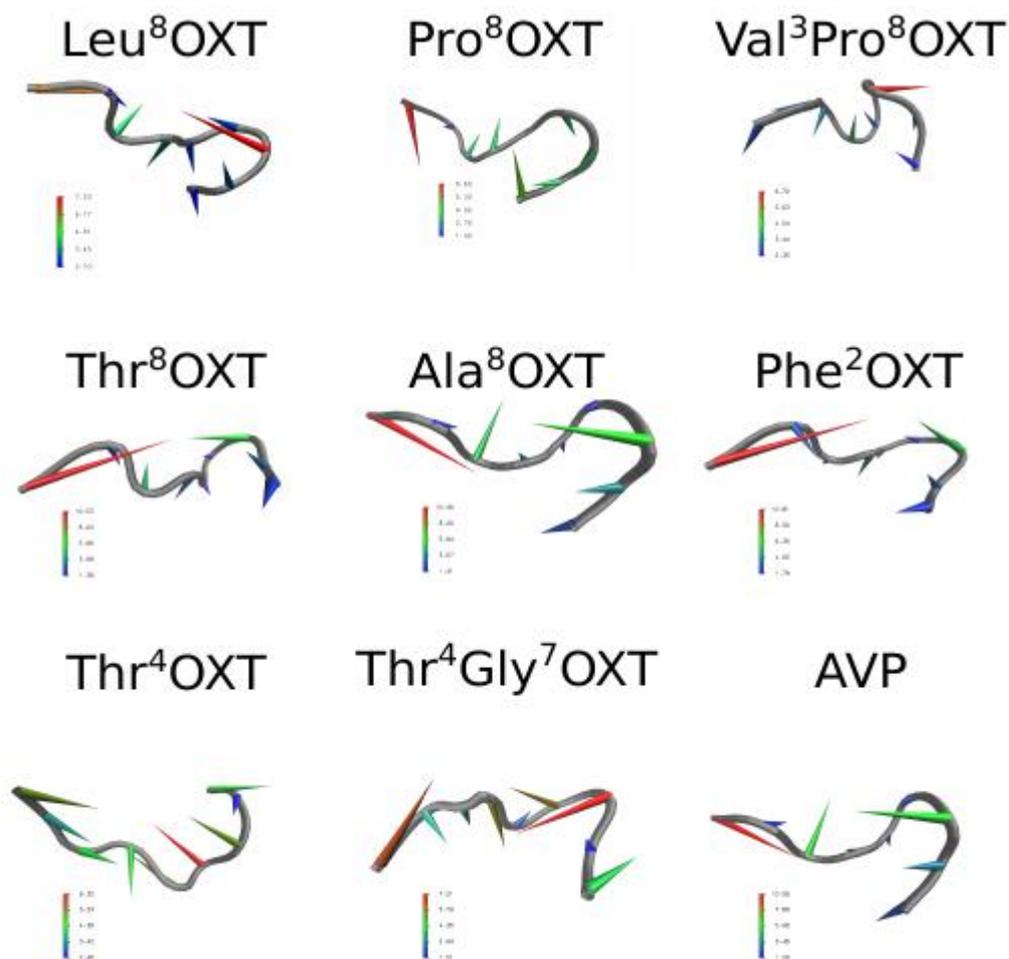
**Figura 13.** Boxplot dos valores de hidrofilicidade dos últimos 50 ns da simulação da dinâmica molecular para cada forma de oxitocina e vasopressina. O teste de Dunn identificou 5 grupos significativamente diferentes: 1: AVP; 2: Pro<sup>8</sup>OXT e Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT; 3: Phe<sup>2</sup>OXT; Leu<sup>8</sup>OXT; 4: Thr<sup>8</sup>OXT, Ala<sup>8</sup>OXT e Thr<sup>4</sup>OXT; e 5: Thr<sup>4</sup>Gly<sup>7</sup>OXT ( $p < 0,001$ ).

Deve-se considerar que a hidrofilicidade é uma propriedade fundamental na interação ligante-receptor, pois ela define os aminoácidos aí envolvidos, a ativação e a internalização do receptor, bem como a sinalização gerada. Ela determina também a profundidade na qual o ligante consegue chegar em um ambiente hidrofóbico como o da membrana na qual se vê imerso o receptor.

Outro fato que chama a atenção é o de que a maioria de formas descritas apresenta modificações na terceira e oitava posições, o que permitiria pensar, portanto, que tais modificações impactam não só as interações com o receptor nativo, como também as interações com o receptor de vasopressina. Conforme estudo referido no Capítulo IV, pelo menos as variantes Pro<sup>8</sup>OXT e Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT impactam a internalização de AVPR1a.

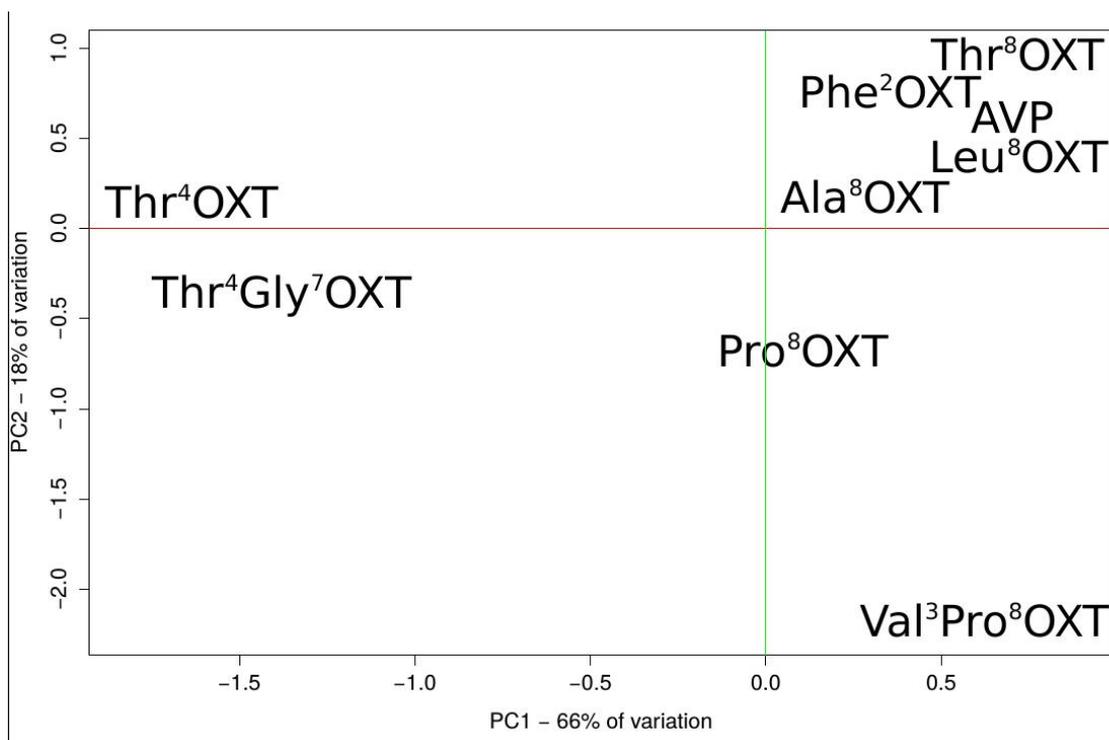
O gráfico de espinhos (Figura 14), onde cada espinho representa a intensidade e distância de cada carbono alfa dos nonapeptídeos analisados, permite identificar visualmente os padrões dos movimentos de cada aminoácido. Assim, por exemplo, pode-se visualizar como o terceiro aminoácido (terceiro espinho da esquerda para a direita) na maioria de formas apresenta movimento direcionado ao interior da estrutura;

já na forma Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT (na primeira linha, terceira coluna da Figura 14), justamente a posição que apresenta a mudança, Ile<sup>3</sup>Val, descreve um movimento pronunciado direcionado ao exterior da estrutura.



**Figura 14.** Gráfico de espinhos de formas naturais e sintéticas de OXT e AVP. Cada espinho representa a intensidade e o sentido do movimento do carbono alfa de cada aminoácido: a Cys1, à direita e a Gly9, à esquerda.

Finalmente, dentro das análises realizadas incluiu-se um PCA (Análise de Componentes Principais, na sigla em inglês para *Principal Component Analysis*), que considerou os diferentes parâmetros analisados na dinâmica de todas as formas naturais e sintéticas (Figura 15). No PCA, o que primeiro se evidencia é uma separação entre as formas sintéticas e as naturais; um primeiro *cluster*, formado por Thr<sup>4</sup>OXT e Thr<sup>4</sup>Gly<sup>7</sup>OXT (formas sintéticas) está separado pelo primeiro componente principal (66%) das formas naturais; já o segundo componente principal (18%) separa as formas de oxitocina presentes nos cebídeos, Pro<sup>8</sup>OXT, Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT, das restantes (Leu<sup>8</sup>OXT, Ala<sup>8</sup>OXT, Thr<sup>8</sup>OXT, Phe<sup>2</sup>OXT e AVP).



**Figura 15.** PCA que considera os parâmetros apresentados na Tabela 5 para cada uma das formas naturais e sintéticas de OXT e AVP estudadas.

Vale a pena salientar que as formas que apresentam a prolina na oitava posição (Pro<sup>8</sup>OXT e Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT) possuem uma modificação significativa na estrutura do ligante, pois, devido à limitada flexibilidade da sua cadeia lateral, a prolina impõe limitações na estrutura rotacional do peptídeo. A sequência em tandem de duas prolinas na sétima e oitava posições produz uma hélice de poliprolinas, característica que, por restringir ainda mais a flexibilidade das proteínas, altera significativamente os perfis de interação ligante-membrana celular (Geisler & Chmielewski 2009).

Como um todo, a simulação da dinâmica molecular possibilitou identificar padrões estruturais e de comportamento molecular nas formas naturais de oxitocina; dentro destas, possibilitou, ainda, determinar os elementos que diferenciam a Pro<sup>8</sup>OXT e a Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT. Propriedades como hidrofobicidade ou movimentos do terceiro aminoácido permitem sugerir a hipótese de interações diferenciadas desses hormônios com seus receptores cognatos. Essa informação estrutural, somada aos resultados dos estudos apresentados nos Capítulos anteriores, define de maneira bastante robusta o potencial funcional e evolutivo das variantes presentes nos clados de pNM.

É importante considerar também as mutações achadas nos receptores, descritas nos trabalhos prévios para OXTR (Capítulo III; Vargas-Pinilla et al. 2015). A maioria das substituições nos receptores encontra-se nas regiões aminoterminal, intracelular 3 e carboxiterminal; esses mesmos resultados se aplicam para AVPR1a (Ren et al. 2014) e AVPR1b (Fam et al. 2018). A maioria das posições importantes para as interações com os ligantes são conservadas, com algumas exceções, como Phe103Tyr em *Saimiri sciureus* (Vargas-Pinilla et al. 2015; Ren et al. 2015). Sua posição homóloga no AVPR1b será discutida no Capítulo VII.

## CAPÍTULO VII

### 7.1 Discussão

Tendo em vista que discussões específicas já foram mencionadas nos Capítulos II, IV e V, aqui, somente aspectos mais gerais serão comentados e discutidos.

#### 7.1.1 Variantes de OXT-OXTR

Concomitantemente ao desenvolvimento de nossa pesquisa, Ren e colaboradores (2015) publicaram um trabalho que confirmou os achados descritos em nosso estudo (Vargas-Pinilla et al. 2015). Os referidos pesquisadores analisaram um conjunto similar de espécies através de diferentes métodos, e descreveram também mais uma variante de oxitocina, Phe<sup>2</sup>OXT, em *Alouatta caraya* (família Atelidae). Outro dado interessante foi a descrição dentro dessa família do que parece ser uma convergência com a forma Cebidae Pro<sup>8</sup>OXT, especificamente em *Ateles geoffroyi* e *Ateles belzebuth*. Além disso, na família Pitheciidae, eles também descrevem a forma Thr<sup>8</sup>OXT em *Pithecia pithecia*, que já havia sido descrita para e *Chiropotes albinasus* (Capítulo III; Vargas-Pinilla et al. 2015). Já em *Chiropotes chiropotes*, observaram a forma Ala<sup>8</sup>OXT, forma por nós descrita em *Chiropotes utahickae* e *Cacajao melanocephalus* (Capítulo III; Vargas-Pinilla et al. 2015). Mais recentemente, Campbell e Cortés-Ortiz descrevem uma sétima forma, Val<sup>3</sup>OXT, presente em *Alouatta seniculus* (Mustoe et al. 2018).

Conclusões similares foram obtidas nos dois trabalhos. A Figura 16 apresenta o resumo gráfico dos achados de ambos os estudos, que quebram de maneira marcante o paradigma de que Leu<sup>8</sup>OXT estaria presente em todos os mamíferos placentários.

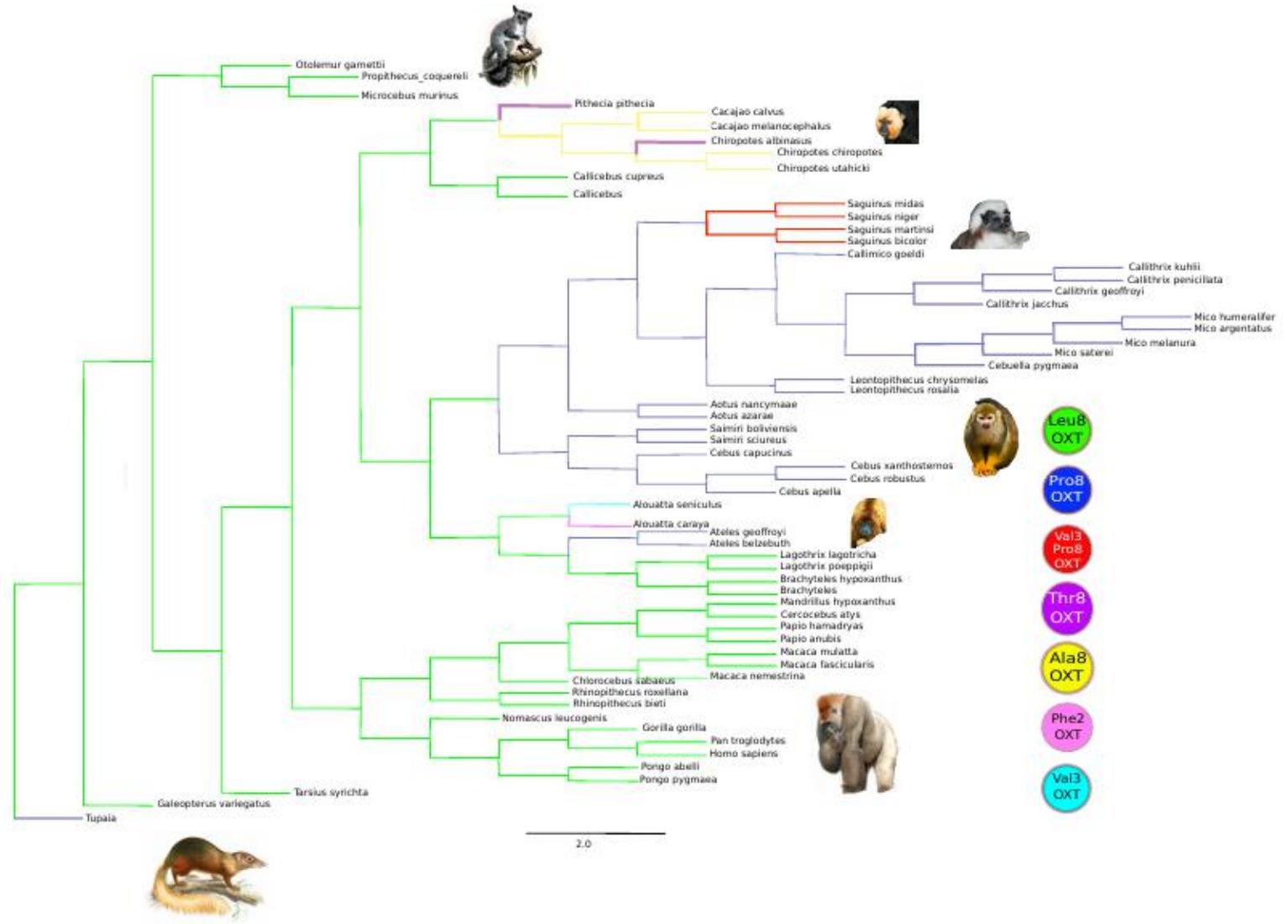
Traçando-se um panorama amplo, pode-se dizer que Pitheciidae emergiu há cerca de 23,5 mya (Perelman et al. 2011) e apresenta três formas de oxitocina (Leu<sup>8</sup>OXT, Thr<sup>8</sup>OXT e Ala<sup>8</sup>OXT), sendo que as últimas duas variantes apareceram há pelo menos 14 mya (French et al. 2016).

No ramo dos cebídeos, a mutação que gerou a forma Pro<sup>8</sup>OXT provavelmente aconteceu há ~23 mya, e uma mutação mais recente dos últimos ~11 mya originou a substituição por uma valina na terceira posição no gênero *Saguinus*, criando a forma Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT.

Dentro dos Atelídeos, ao menos três mutações independentes aconteceram: duas no gênero *Alouatta*, há pelo menos 16 mya, produzindo as formas Phe<sup>2</sup>OXT e Val<sup>3</sup>OXT; a terceira, há pelo menos 11 mya, gerando, por convergência, a forma Pro<sup>8</sup>OXT no gênero *Ateles* (French et al. 2016).

É provável que o ancestral do pNM expressasse Leu<sup>8</sup>OXT, visto que essa forma é expressa em dois dos três clados do ramo e em todos os catarrinos com sequências disponíveis (French et al. 2016).

Um ponto de divergência nos trabalhos comentados deve-se à forma apresentada no gênero *Saguinus*. Ren et al. (2015) descrevem em *Saguinus midas* a forma Pro<sup>8</sup>OXT; porém, em nosso trabalho (Vargas-Pinilla et al. 2015), como se mencionou anteriormente, é descrita em *S. bicolor*, *S. Martinsi* e *S. niger* a forma Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT. Análises transcriptômicas, por sua vez, realizadas em *S. midas* já indicavam a presença da Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT nessa espécie (George et al. 2011), porém sem qualquer destaque. Desse modo, mais estudos são necessários para confirmar se houve mutação reversa em *S. midas*, o que teria pelo menos parte dos indivíduos dessa espécie perderem a valina na posição 3, tornando esse sítio, pelo menos nessa espécie, variável.



**Figura 16.** Reconstrução filogenética baseada nos dados de OXT nos primatas, considerando uma árvore consenso de acordo com Perelman et al. (2011).

Ferramentas similares foram utilizadas nos dois artigos para analisar os processos coevolutivos entre o ligante e o receptor. A filogenia de OXTR corresponde em geral à filogenia molecular convencional dos primatas, com uma clara separação dos primatas do Velho Mundo, Novo Mundo e prossímios. Ren et al.(2015) descrevem um processo coevolutivo interessante, no qual a única exceção à filogenia convencional, considerando os dados de *OXTR*, foi o gênero *Ateles*; seu *OXTR* é agrupado junto com os cebídeos, e não com seus congêneres dentro da família Atelidae. Vale a pena salientar que *Ateles* apresenta a mesma forma de OXT que os cebídeos, isto é, Pro<sup>8</sup>OXT.

Ren e colaboradores encontraram ainda clara associação de Pro<sup>8</sup>OXT com monogamia social, um traço reprodutivo comum em espécies de pNM com pequeno tamanho corporal, partos gemelares comuns e que também apresentam cuidado paterno (Vagas-Pinilla et al. 2015). De modo geral, os trabalhos de nosso grupo e de outros autores reforçam a funcionalidade e o valor adaptativo de pelo menos algumas das variantes de OXT em pNM.

É surpreendente a ausência de mutações não sinônimas no gene *OXT* dentro dos mamíferos placentários, concomitante com a grande variabilidade em pNM, colocando em evidência que um gene muito conservado pode deixar de sê-lo, em ramos específicos e derivados de uma dada filogenia, à medida que pressões seletivas particulares são impostas. Nesse trabalho a relevância funcional e evolutiva dessas variantes de OXT em pNM, no que diz respeito a traços reprodutivos (parto gemelar, monogamia social e cuidado paterno), foi claramente demonstrada.

Igualmente interessante, tendo em vista estudos futuros, é desvendar o impacto dessas mesmas variantes em traços fisiológicos importantes que caracterizam os mamíferos placentários, como contração uterina e ejeção do leite materno.

### 7.1.2 Nível regulatório

No Capítulo V, sugerimos que a progesterona e o seu receptor, unidos, agem como elementos-chave na maquinaria de transcrição, reconhecendo e se ligando aos chamados Elementos de Resposta à Progesterona (PREs, na sigla em inglês) presentes na região 5' do gene *OXTR*. Sugerimos que pode haver um impacto na regulação de

OXTR tanto em fêmeas quanto em machos que experimentam a paternidade. Desse modo, a presença desses elementos faria parte do repertório genético ligado ao comportamento biparental característico de clados de pNM. Mas, tão importante quanto a pergunta *quando* é expresso, é aquela que busca saber *onde* é expresso. Embora não seja o foco desta Tese, teceremos, a seguir, comentários a respeito de alguns pontos importantes a serem considerados sobre a ação do sistema OXT-AVP e que podem enriquecer a presente discussão.

Produzidas no Núcleo Paraventricular (NPV) e no Núcleo Supraóptico (NS), a OXT e a AVP devem se conectar com seus receptores nos órgãos e tecidos que deverão manifestar a ação correspondente esperada. Desse modo, a distribuição do receptor varia em vários níveis; por exemplo, sugeriu-se que nos roedores a distribuição de OXTR é mais frequente em áreas relacionadas ao reconhecimento olfativo, como o bulbo olfativo, a amígdala central, a estria terminal, o septo lateral e o hipocampo. Nos primatas, por sua vez, o OXTR é expresso em regiões envolvidas no processamento visual, o colículo superior, núcleo pulvinar e o córtex visual primário. Pode-se explicar a diferença na distribuição ao se observar a importância do olfato, para os roedores, e da visão, para os primatas, sentidos indispensáveis para a comunicação social e identidade individual nesses animais (Freeman et al. 2016).

Os estudos de expressão realizados em primatas se concentram basicamente em 4 espécies: *Callithrix jacchus*, *Callicebus cupreus*, *Macaca mulatta* e *Homo sapiens*. Na Tabela 6, são apresentadas, de forma resumida, algumas investigação realizadas sobre a distribuição dos receptores no cérebro dessas espécies. A partir dessa informação, pode-se dizer que *Callithrix* e *Callicebus*, embora apresentem estruturas sociais similares, sendo monogâmicos e apresentando cuidado biparental, mostram diferenças marcantes nos padrões de expressão de OXTR e AVPR1a. Isso evidencia que diferentes repertórios genéticos foram cooptados evolutivamente, resultando em fenótipos comportamentais adaptativos similares, o que é demonstrado também pelo fato de *Callithrix* possuir a forma Pro<sup>8</sup>OXT e *Callicebus* a forma Leu<sup>8</sup>OXT, sendo que ambos os gêneros apresentam um número alto de PREs (em *Callithrix*: 5, e em *Callicebus*: 4).

**Tabela 6.** Distribuição de receptores OXT e AVPR1a no cérebro de primatas.

Receptor	Gênero	Neurohypo-physéal		Social behavior network					Mesolimbic reward system					Social/cognitive processing				Sensory processing							
		PVN	SON	POA	AH	VMH	PAG	LS	BNST	MeA	Str	Nacc	VP	blA	HIP	VTA	CeA	CC	IC	PFC	NTS	SC	NBM	V1	OB
OXTR	Callithrix <sup>K</sup>	-	-								xx			-								x	x <sup>D</sup>		
	Callicebus <sup>G</sup>						x				-			xx		-					x	x	x	x	
	Macaca <sup>A,F</sup>			x <sup>a</sup>			x <sup>b</sup>			x <sup>a</sup>												x <sup>b</sup>	x <sup>b</sup>	-	
	Homo <sup>B,I,J</sup>			x	x	x			x					-	x	x					x	x	x		x
AVPR1a	Callithrix <sup>K,L</sup>	x	-		x	x		xx	xx	x		x		x	-		x				xx				
	Callicebus <sup>G</sup>						xx				xx			xx			x	x	x			x	x	x	xx
	Macaca <sup>N</sup>		x	x		x			x	xx	x						x	x	x			-		x	
	Homo <sup>I</sup>								x	x							x	x	x			-	-		

Legenda: x detecção do receptor; xx detecção densa do receptor; - nenhuma detecção do receptor, células brancas ausência de informação. Abreviaturas: BNST: Estria terminalis; CC: Cortex cingulate; CeA, central amygdala; HP: Hipocampus; LS: Septum lateral; NBM, nucleus basalis of Meynert; OB: Bulbo Olfatório; POA: Área preóptica; PCC: Cingulate posterior; PVN Núcleo Paraventricular; PPT, pedunculopontine tegmental nucleus; SON: Núcleo Supraóptico; V1, primary visual cortex.

Referências A: Boccia et al (2001) . B: Boccia et al (2013). C: Caffé et al (1989) . D: Fliers et al (1986). E: Fliers et al (1985). F: Freeman et al (2014a). G: Freeman et al (2014b). H: Ishunina & Swaab (1999) . I: Loup et al (1991). J: Loup et al (1989) . K: Schorscher-Petcu et al (2009). L: Wang et al (1997a). M: Wang et al (1997b) . N: Young et al (1999).

### 7.1.3 Comportamento

Alguns dos principais trabalhos relacionando os neuropeptídeos com comportamentos sociais em primatas, tal como comportamento sócio-sexual, proximidade, limpeza da pele (*grooming*), partilha dos alimentos, entre outros, encontram-se resumidos na Tabela 7. Note-se que na compilação aí apresentada, *Saguinus* foi considerado um gênero que expressa Pro<sup>8</sup>OXT, o que não foi corroborado por nosso estudo (ver discussão no item “7.1.1 Variantes de OXT-OXTR” da presente sessão), de modo que os achados presentes na Tabela 7, no que diz respeito a este gênero, devem ser considerados com cautela.

**Tabela 7.** Trabalhos realizados em pNM correlacionando comportamentos sociais diante de diferentes níveis dos neuropeptídeos e/ou presença de antagonistas.

Comportamento social	Espécie	Pro <sup>8</sup> -OXT	Leu <sup>8</sup> -OXT	OXTant	OXT-peri	AVP	AVPR 1aAnt	Efeitos específicos
Proximidade social	<i>Callithrix</i>		↑	↓				OXT reduz a proximidade e incrementa o comportamento de agregação. <sup>a</sup>
	<i>Callithrix</i>	↑/↓	0	0				OXT reduz a proximidade com indivíduos estranhos do sexo oposto e em fêmeas, incrementa a proximidade com seu parceiros. Efeito específico no tratamento com Pro8OXT. <sup>b</sup>
	<i>Callithrix</i>	↑	↑	0				Indivíduos tratados com OXT são alvo de maior proximidade por parte dos seus parceiros. <sup>c</sup>
	<i>Callithrix</i>				↑			Dentro de casais se encontra uma correlação da concentração de OXT. <sup>d</sup>
	<i>Saguinus</i>				↑			Descreve-se uma concentração dentro de pares que apresentam um maior comportamento de agregação. <sup>e</sup>
	<i>Cebus</i>		↓					OXT incrementa a distância social entre parceiros na divisão de comida. <sup>f</sup>
	<i>Callicebus</i>					↑		AVP aplicado em machos incrementa o contato social com suas parceiras. <sup>g</sup>
Grooming	<i>Callithrix</i>	↑	↑	0				Os indivíduos tratados com OXT recebem maior <i>grooming</i> (limpeza de pele) dos seus parceiros. <sup>c</sup>
	<i>Saguinus</i>				↑			Correlações positivas entre níveis de OXT são descritas dentro de casais que apresentaram comportamento de agregação. <sup>e</sup>
Comportamento sexual	<i>Callithrix</i>	↓	0	0				OXT incrementa os intervalos de tempo entre as interações com indivíduos diferentes do parceiro. Nenhum efeito na interação com os próprios parceiros. <sup>b</sup>
	<i>Saguinus</i>				↑			Concentrações elevadas de OXT foram descritas dentro dos pares que apresentaram comportamentos sexuais. <sup>e</sup>

Comportamento social	Espécie	Pro <sup>8</sup> -OXT	Leu <sup>8</sup> -OXT	OXTant	OXT-peri	AVP	AVPR1aAnt	Efeitos específicos
Social buffering	<i>Callithrix</i>	0	0	↓				O antagonista de OXT gerou uma redução da proximidade entre casais durante a presença de um agente estressante.
Cuidado parental	<i>Callithrix</i>	↑		0		↑	0	OXT nos machos, diminuiu os intervalos de tempo em resposta a estímulos do infantes. AVP teve o mesmo efeito nas fêmeas. <sup>i</sup>
	<i>Callithrix</i>		↑	0				alimentos. <sup>j</sup>
Partilha de alimentos	<i>Callithrix</i>		0	↓				O antagonista de OXT gerou uma redução na partilha de alimentos entre casais. <sup>a</sup>
	<i>Callithrix</i>	↓	0	0				OXT gerou uma redução na partilha de alimentos com indivíduos diferentes do parceiro. Efeito específico de Pro <sup>8</sup> OXT. <sup>k</sup>
	<i>Callithrix</i>	0	0	0				OXT não altera os hábitos de partilha de alimentos com parceiros ou indivíduos diferentes deste. <sup>l</sup>
	<i>Cebus</i>		↓					OXT gerou uma redução na partilha de alimentos entre parceiros e entre estranhos. <sup>h</sup>
	<i>Callithrix</i>	↑				↑		OXT diminui a partilha de machos aloparentais com infantes. Pais tratados com AVP partilham menos alimentos dos que os tratados com OXT. <sup>m</sup>

OXTant: antagonista de OXT. OXT-peri: Concentrações periféricas de OXT. AVPR1aAnt: Antagonista de AVPR1a. a: Smith (Smith et al. 2010) et al (2010); b: Cavanaugh (Cavanaugh et al. 2014) et al (2014). c: Cavanaugh et al (Mustoe et al. 2015) (2015). d: Finkenwirth (Finkenwirth et al. 2015) et al (2015). e: Snowdon (Snowdon et al. 2010) et al (2010). f: Brosnan (Leverett et al. 2015) et al (2015). g: Jarcho et al (Jarcho et al. 2011) (2011). h: Cavanaugh et al (Cavanaugh et al. 2016) (2016) i: Taylor & French (Taylor & French 2015) (2015). j: Saito & Nakamura (Saito & Nakamura 2011) (2011). k: Mustoe et al (Mustoe et al. 2015) (2015). l: Mustoe et al (Mustoe et al. 2016) (2016). m: Taylor, et al (Taylor et al. 2017) (2017). Tomado e modificado de French et al. (2016). Seta para cima (↑) indica aumento do comportamento social; seta para baixo (↓), diminuição do comportamento social; o número 0 (zero) indica nenhuma alteração significativa no comportamento social. Por exemplo, na primeira linha, em *Callithrix*, a administração de Leu<sup>8</sup>OXT aumentou o comportamento de agregação, enquanto que tal comportamento é reduzido na presença de um antagonista de OXT.

A maioria dos estudos tem focado em *Callithrix* e *Saguinus*, e menos frequentes têm sido os estudos sobre *Saimiri*, *Cebus* e *Callicebus*. Um resultado geral dos estudos apresentados na Tabela 7 é que os neuropeptídeos modulam o comportamento social em pNM através da manutenção ou do aumento das relações sociais dentro das espécies. Por exemplo, o tratamento com o neuropeptídeo (OXT, no caso de *Callithrix*, e AVP, no caso de *Callicebus*) aumenta o contato e a interação social e a ligação com o parceiro, mas diminui o contato com indivíduos do sexo oposto diferentes do parceiro.

Embora tenha sido descrita a associação entre as formas de OXT e a presença de monogamia social, cuidado paterno e tamanho de ninhada (Vargas-Pinilla et al. 2015; Ren et al. 2015), deve-se considerar que esta não é uma associação completa. Por exemplo, *Callicebus* é um gênero com espécies consideradas socialmente monógamas, com cuidado paterno, que expressam Leu<sup>8</sup>OXT, enquanto *Saimiri* é um gênero com espécies polígamas e sem cuidado paterno, que expressam Pro<sup>8</sup>OXT. Mais uma vez, nota-se que diferentes repertórios genéticos foram cooptados evolutivamente para a emergência de fenótipos comportamentais adaptativos que variam de acordo com as pressões ecológicas e ambientais impostas.

Além disso, o comportamento cuidador nos machos também é afetado pela Leu<sup>8</sup>OXT, dado que aumenta o comportamento de provedor de alimentos nos machos do *Callithrix* (Saito & Nakamura 2011) e incrementa as respostas destes aos estímulos dos infantes (Taylor & French 2015). Em humanos, a Leu<sup>8</sup>OXT aumenta o contato paterno e o contato visual pai-filho (Weisman et al. 2012).

As fêmeas são as principais provedoras no desenvolvimento através da lactação, mas, nos calitriquíneos (família Cebidae, subfamília Callitrichinae), mães, pais e aloparentes participam no provisãoamento de comida durante e depois do desmame. Justamente nesse período, foi descrita uma relação positiva entre o aumento da OXT na urina e o provisãoamento de recursos (Finkenwirth et al. 2016).

Existe também evidência de que a experiência parental influencia a sinalização dos neuropeptídeos. Ao se comparar a expressão de AVPR1a entre pais e não pais, os primeiros apresentam uma maior densidade do receptor no córtex pré-frontal (Kozorovitskiy et al. 2006); da mesma maneira, essa densidade é negativamente associada à idade da prole. Evidência similar existe dos níveis de OXT em *Callithrix*, mais elevados em pais do que em machos não experientes (Woller et al. 2012).

Conforme trabalho referido no Capítulo IV (Parreiras-e-Silva et al. 2017), as formas *Cebidae Pro<sup>8</sup>OXT* e *Saguinus Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT* induzem comportamento afiliativo em rato machos, indicando a capacidade dessas variantes de alterar comportamentos em espécies diferentes daquelas em que são encontradas de maneira endógena.

Além disso, utilizamos nos experimentos farmacológicos (Parreiras-e-Silva et al. 2017) receptores OXT e AVPR1a humanos, o que levanta a pergunta: O efeito das variantes *Cebidae Pro<sup>8</sup>OXT* e *Saguinus Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT* seria ainda mais diferenciado diante dos receptores táxon-específicos presentes nesses clados de primatas? A resposta a essa pergunta já está sendo por nós investigada (dados não publicados), bem como por outros autores. Por exemplo, Mustoe e colaboradores (2018) reportam que estão trabalhando na definição do perfil farmacológico, considerando a variante *Pro<sup>8</sup>OXT* e o receptor OXTR de *Callithrix jacchus*.

Cabe ainda salientar o destaque dado por Mustoe e colaboradores (2018) aos nossos estudos (Capítulo IV; Parreiras-e-Silva et al. 2017), que mostraram, pela primeira vez, como as variantes *Cebidae Pro<sup>8</sup>OXT* e *Saguinus Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT* produzem efeitos diferenciais na dessensibilização e internalização do OXTR e AVPR1a.

### **7.2.1 Sistema AVP e algumas particularidades em pNM**

Diante das descobertas da diversidade de formas de OXT em pNM, é surpreendente a conservação de AVP (Ren et al. 2014; Vargas-Pinilla et al. 2015). Quanto aos receptores de AVP, AVPR1a foi um dos primeiros a serem estudados, enquanto AVPR1b somente recebeu atenção mais recentemente, com os estudos de nosso grupo de pesquisa (Fam et al. 2018; dados não publicados). Vamos a seguir descrever alguns desses achados, considerando, como visto no Capítulo I da presente Tese (item “1.4 Algumas características da interação ligante-receptor”), alguns sítios com possível importância na interação com o neuropeptídeo (OXT ou AVP).

### **7.2.2 AVPR1a e alguns achados em pNM**

A análise da variação molecular do AVPR1a nos primatas com ênfase nos pNM foi realizada por Ren et al. (2014), mostrando a região aminoterminal e a terceira alça intracelular como as regiões mais variáveis. Entre as posições 382 e 384 (carboxiterminal), encontra-se um motivo na proteína que é alvo de fosforilação, sendo

importante observar que todos os pNM apresentam a mutação Arg384Lys. E, no caso dos calitriquíneos, estes apresentam uma mutação na posição Lys409Arg, uma região importante na interação do receptor com as quinases (Ren et al. 2014).

Com base em dados publicados por Ren e colaboradores, realizamos análise que nos levou a achados instigantes. Um deles é a mutação reportada como conservativa, mas nem por isso, pouco importante. Trata-se da posição 213 de AVPR1a, que nos pNM apresenta uma troca de um serina por uma prolina (Ser213Pro; Tabela 8). Curiosamente, essa posição é um ponto importante para o reconhecimento do ligante por parte do receptor. Rodrigo et al. (2007) realizaram testes funcionais com a mesma mutação descrita nos pNM, Ser213Pro, e descreveram que não havia um aumento significativo da afinidade por AVP, mas, sim, um aumento significativo da quantidade de inositol trifosfato liberado após a ligação com seu ligante, o que significa que a presença da prolina nessa posição influencia diretamente a cascata de sinalização, após ativação por AVP. Lamentavelmente, OXT não foi testado nesse trabalho.

Um dado interessante é que a prolina está presente na posição homóloga de OXTR (Pro197) e no AVPR1b (Pro196; Tabela 8), mas, nos calitriquíneos, a prolina dá lugar a uma serina.

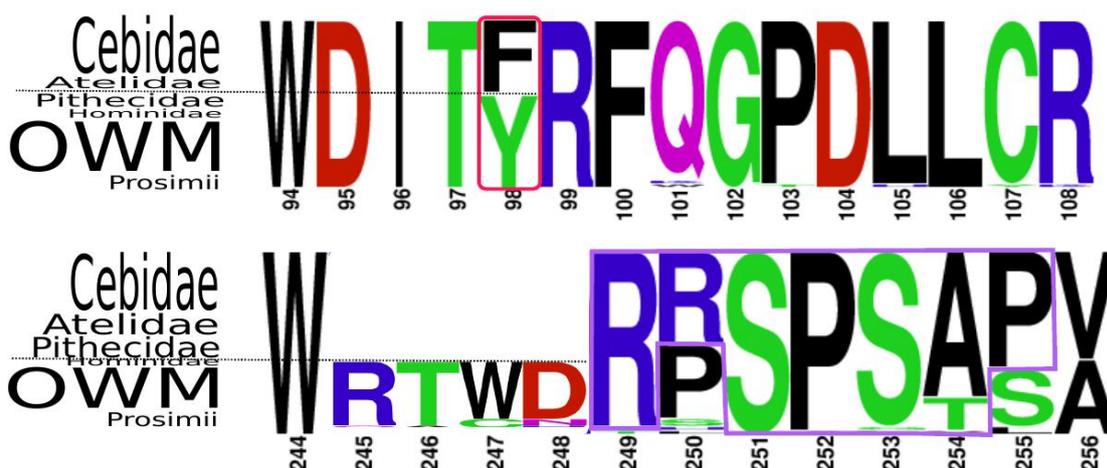
### **7.2.3 AVPR1b e alguns achados em pNM**

Citaremos os elementos mais importantes da análise evolutiva do gene AVPR1b dentro dos pNM (Fam et al. 2018) que permitem ampliar nosso conhecimento sobre o cenário evolutivo do sistema OXT-AVP nesse clado de primatas.

Na posição 98 do AVPR1b, todos os Cebidae e Atelidae portam uma fenilalanina, enquanto uma tirosina é encontrada na família Pitheciidae (Tabela 8), assim como no resto dos mamíferos. Na posição homóloga no OXTR (posição 103), assim como a maioria dos mamíferos, os Cebidae também carregam uma fenilalanina, com exceção de *Saimiri* e *Aotus*, ambos portadores de tirosina (Babb et al. 2015; Vargas-Pinilla et al. 2015). Na posição homóloga no AVPR1a (posição 115), uma tirosina é encontrada na maioria dos mamíferos (Vargas-Pinilla et al. 2015; French et al. 2016). Esta região nos três receptores é conhecida por interagir com a posição 8 do nonapeptídeo, que apresenta uma prolina (Pro<sup>8</sup>OXT) na família Cebidae (Tabela 8).

Extrapolando os dados reportados por Chini et al. (1995), a substituição presente nas famílias Cebidae e Pitheciidae, Tyr98Phe, poderia representar uma aumento na afinidade do AVPR1b por OXT .

Duas particularidades próximas à terceira alça intracelular no AVPR1b são instigantes: a presença de uma deleção entre os aminoácidos 245-248 e o motivo de ligação SH3 que se dá pela presença de determinados aminoácidos (Arg-Arg-Ser-Pro-Ser-Ala-Pro) entre as posições 249-255 (Figura 17).



**Figura 17.** Weblogo ilustrando o múltiplo alinhamento da região extracelular (EC1; 94-108) e da região intracelular 3 (IC3; 244-256) de AVPR1b. Em EC1, a caixa vermelha salienta mutação Tyr98Phe presente nas famílias Cebidae e Atelidae. Em IC3, o espaço em branco representa a deleção presente nos pNM (245-248), e a caixa roxa ilustra o motivo SH3 presente nos pNM.

O motivo SH3 possui um papel fundamental em diversos processos biológicos; nesse caso, a sua localização na terceira alça intracelular permite inferir o tipo de participação que possui no processo de sinalização intracelular (Mayer et al. 2001). Em trabalhos prévios, demonstrou-se que a eliminação do motivo SH3 afeta a internalização dos GPCRs (Oldenhof et al. 1998). O motivo SH3 também foi descrito como um adaptador para a ligação da  $\beta$ -arrestina e de outras proteínas que são recrutadas para a internalização do receptor (Cao et al. 2000). Isso nos leva a pensar que a presença do SH3 poderia induzir uma internalização mais rápida do AVPR1b, o que levaria a uma hipotativação do eixo HPA (Caldwell et al. 2008), derivando em menores níveis de estresse e agressividade. Porém, a significância funcional desses achados ainda precisa ser investigada.

### 7.3 Questionamentos adicionais

Nos itens e sessões anteriores, foram descritas e comentadas as mudanças encontradas tanto no ligante OXT, quanto nos receptores de pNM. Para algumas delas, já temos alguma informação referente à cascata de sinalização, à dessensibilização recrutamento de cálcio e  $\beta$ -arrestinas, bem como referente à afinidade ligante-receptor. Na Figura 18, é descrito um conjunto de mutações, as quais permitem criar uma possível hipótese que sustente a emergência das formas de OXT presente nos pNM.

**Tabela 8.** Mutações achadas nos primatas nas posições ou regiões estruturalmente importantes de OXTR, AVPR1a e AVPR1b, com evidência funcional de mudança na afinidade ou com efeito na cascata de sinalização. As cores iguais identificam posições homólogas nos genes parálogos. 1: representa a presença da variante (aminoácido à direita do número), 0: representa a ausência da variante e presença de aminoácido supostamente ancestral. O aminoácido ancestral foi definido como aquele mais conservado nas demais espécies de mamíferos, cujos dados estão disponíveis. ?: falta informação, - : não apresenta região homóloga. Dados de AVPR1b, originalmente apresentados em Fam et al. (2018).

Familia	Espécie	Receptor	OXTR						AVPR1a				AVPR1b				
		Mutação/el elemento	Arg33Gln	Phe103Tyr	Pro197Ser	Ala218Thr	Leu345Met	Ser368Leu	Tyr115Phe	Ser213Pro	Arg384Lys	Lys409Arg	Leu33Val	Tyr98Phe	Pro196Leu	GAP	SH3
		OXT															
Hominidae	<i>Homo sapiens</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Pan paniscus</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Pan troglodytes</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Gorilla gorilla</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Pongo abelii</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hylobatidae	<i>Nomas leucogenys</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cercopithecidae	<i>Chlorocebus sabaeus</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Macaca fascicularis</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Macaca mulatta</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Macaca nemestrina</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Cercocebus atys</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Rhinopithecus roxellana</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Cebidae	<i>Callimico goeldii</i>	Pro8	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0
	<i>Callithrix geoffroyi</i>	Pro8	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
	<i>Callithrix jacchus</i>	Pro8	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
	<i>Callithrix pygmaea</i>	Pro8	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
	<i>Leontopithecus rosalia</i>	Pro8	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
	<i>Saguinus midas</i>	Val3Pro8	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
	<i>Saguinus bicolor</i>	Val3Pro8	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
	<i>Saimiri boliviensis</i>	Pro8	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
	<i>Saimiri sciureus</i>	Pro8	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
	<i>Aotus nancymaae</i>	Pro8	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
Atelidae	<i>Sapajus apella</i>	Pro8	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
	<i>Alouatta caraya</i>	Phe2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0
	<i>Ateles geoffroyi</i>	Pro8	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	?	?	?	?	?
Pitheciidae	<i>Callicebus cupreus</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
	<i>Pithecia pithecia</i>	Thr8	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	?	?	?	?	?
	<i>Chiropotes chiropotes</i>	Ala8	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
	<i>Cacajao calvus</i>	Ala8	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
Prosimi	<i>Otolemur gamettii</i>	Leu8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Microcebus murinus</i>	Leu8	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Tupaia belangeri</i>	Pro8	-	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

As mudanças nas vias de sinalização, internalização e dessensibilização (Parreiras-e-Silva et al. 2017), bem como outros achados de nossas pesquisas (coevolução entre as variantes táxon-específicas de OXT e de OXTR em pNM; Vargas-Pinilla et al. 2015), nos permitem especular sobre alguns possíveis cenários funcionais, parcialmente já comentados na discussão presente nos artigos, mas que merecem destaque também aqui.

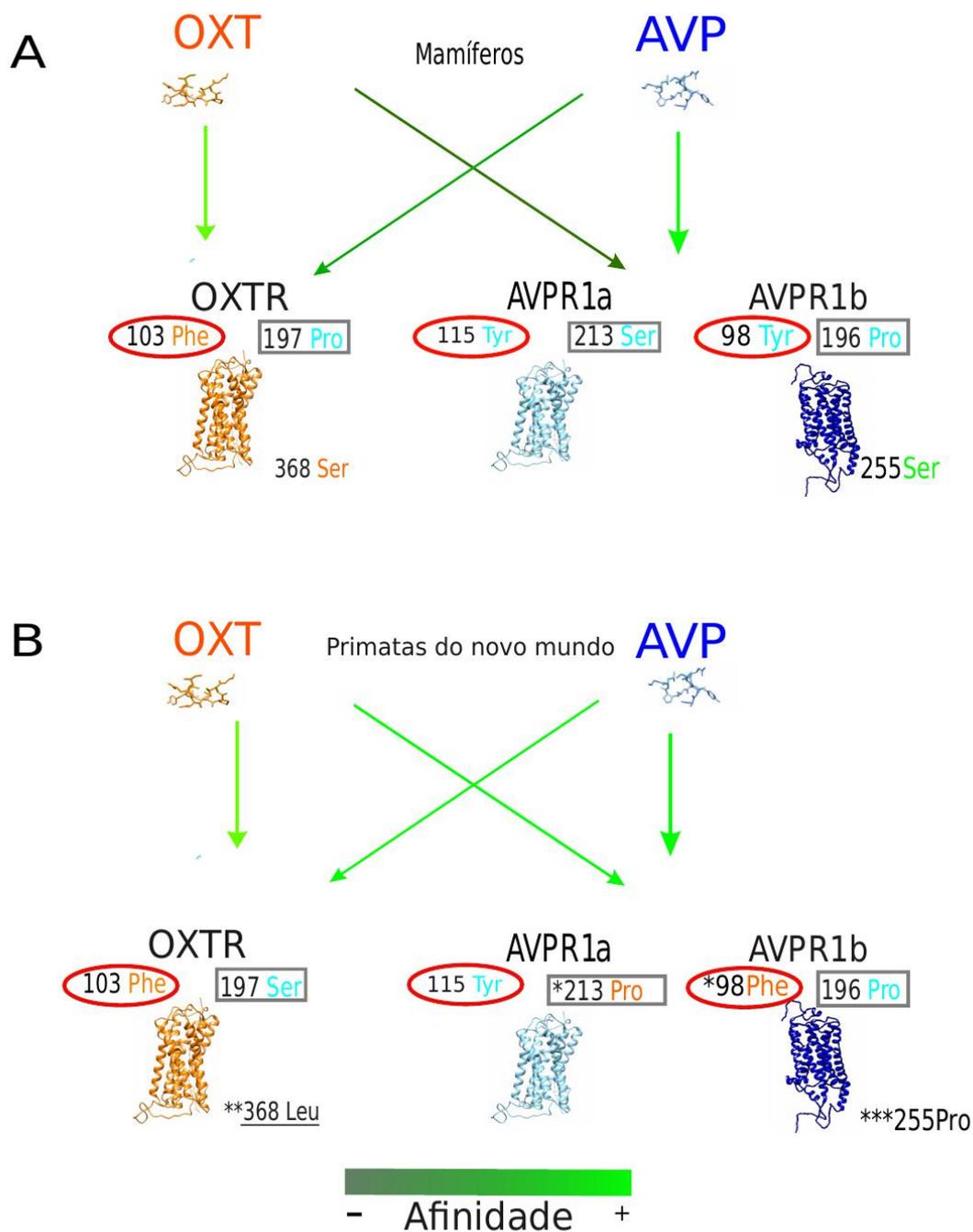
Na Tabela 8, podem-se observar as posições homólogas representadas por cores, como é o caso da 103 para OXTR, que tem uma fenilalanina (Phe) como aminoácido consenso dentro dos mamíferos. As posições homólogas em AVPR1a e AVPR1b, por sua vez, são 115 e 98, respectivamente, sendo o aminoácido consenso uma tirosina (Tyr) nos dois receptores. Algumas espécies apresentam a mutação OXTR Phe103Tyr, como é o caso de *Saimiri*, *Aotus*, similar a *Tupaia* (gênero da ordem Scandentia). Na posição 98 do AVPR1b, encontra-se Tyr98Phe nos Cebídeos e nos Atelídeos. Dentro dos pNM, por outro lado, unicamente os Pitecídeos possuem uma tirosina, como os demais mamíferos. Conforme já comentado, a extrapolação dos dados apresentados por Chini et al. (1995) leva-nos a pensar que a mutação Tyr98Phe em AVPR1b poderia influenciar sua afinidade por OXT.

Um processo similar é encontrado no AVPR1a. Nesse caso, o aminoácido a ser observado encontra-se na posição 213, conforme mencionado anteriormente (Ser213Pro; Tabela 8) encontra-se presente nos pNM (famílias Cebidae, Atelidae e Pitheciidae), exceto no *Ateles geoffroyi* (Atelidae). Sendo uma posição importante para o reconhecimento do ligante por parte do receptor, a substituição Ser213Pro foi descrita com um aumento significativo da quantidade de inositol trifosfato liberado após a ligação com seu ligante (Rodrigo et al. 2007), o que sugere que a presença da prolina nessa posição influencia diretamente a cascata de sinalização quando da ativação por AVP. Como se observa na Figura 18 e na Tabela 8, as posições homólogas da 213 no AVPR1a são as posições 197 e 196 em OXTR e AVPR1b, respectivamente, que apresentam nas mesmas espécies uma prolina, exceto pela presença de uma serina em OXTR dos calitriquíneos. Isso sugere que a mutação presente no AVPR1a dos pNM, Ser213Pro, poderia modificar a cascata de sinalização quando ativada por AVP e/ou OXT.

No sistema OXT-AVP dentro dos pNM, parece haver uma tendência à presença de certos aminoácidos que, de uma forma “compensatória e/ou complementar”,

aparecem em certas posições homólogas nos receptores: presença de uma fenilalanina (Phe) ou tirosina (Tyr) nas posições 103 de OXTR, 115 de AVPR1a e 98 de AVPR1b; e prolina (Pro) ou serina (Ser) nas posições 197 de OXTR, 213 de AVPR1a e 196 de AVPR1b.

Dentro dos Cebídeos, por exemplo, é descrito um sistema cruzado de ligação com OXT e AVP, em que o OXTR apresenta, em posições-chave, aminoácidos dos receptores de AVP (AVPR1a e AVPR1b), e os receptores de AVP, por sua vez, apresentam também em posições-chave aminoácidos que regularmente se encontram no OXTR dos demais mamíferos. Isso indica um complexo cenário, favorecendo, além das conexões dos neuropeptídeos ligantes (OXT e AVP) com seus respectivos receptores, as interações cruzadas (OXT ligando-se com os receptores de AVP, e AVP ligando-se com OXTR), com provável relevância funcional e evolutiva. A Figura 18 mostra um resumo dos pontos mais importantes e sua potencial relevância na afinidade entre ligante e o receptor.



**Figura 18.** Representação esquemática das principais mudanças que se apresentam no sistema OXT-AVP. A. Aminoácidos que estão conservados na maioria dos mamíferos estudados até hoje. B. Mudanças nos primatas do Novo Mundo ou ramos específicos dentro desse grupo. \* Mudança que pode afetar a afinidade com OXT e/ou AVP. \*\* Mudança que poderia aumentar ou influenciar a velocidade de reintegração do receptor à membrana após sua internalização. \*\*\* Mudança que pode influenciar uma rápida internalização do receptor. As elipses e retângulos representam posições homólogas nos receptores.

A hipótese que surge é de que o conjunto de mutações no sistema em posições fundamentais poderia gerar mudanças nas afinidades (ou processos de sinalização). Isso significaria um relaxamento na pressão seletiva em OXT, mantendo, ao mesmo tempo,

uma pressão seletiva no AVP, considerando que este último possui um outro receptor, o AVPR2, expresso fora do sistema nervoso central (no rim), com funções fisiológicas determinantes como a homeostase.

## **CAPÍTULO VIII**

### **8.1 Considerações Finais**

O cenário molecular, comportamental e evolutivo relacionado ao sistema OXT-AVP nos primatas, em particular nos pNM, é complexo e instigante, de modo que é desafiador estudá-lo. Não obstante, na presente Tese conseguimos demonstrar a validade do esforço em implementar e executar abordagens interdisciplinares.

Finalmente, queremos deixar claro que nossa intenção não é estabelecer um conceito determinista e pretencioso, indicando que o sistema OXT-AVP pode explicar em sua totalidade a natureza complexa da emergência dos fenótipos adaptativos em pNM. Pretendemos somente contribuir com alguns tijolos na construção do conhecimento na área, estimulando outros estudos, com outros sistemas genéticos, proteicos, endócrinos e comportamentais, e, ao mesmo tempo, abrir caminhos para novos entendimentos e aprofundamento sobre o que aqui foi descrito, na certeza de que há um vasto e promissor campo de investigação.

## REFERÊNCIAS

- Acher R, Chauvet J and Chauvet MT (1995) Man and the chimaera. Selective versus neutral oxytocin evolution. *Adv Exp Med Biol* 395:615–27.
- Alfaro JW, Matthews L, Boyette AH, Macfarlan SJ, Phillips KA, Falótico T, Ottoni E, Verderane M, Izar P, Schulte M et al. (2012) Anointing variation across wild capuchin populations: a review of material preferences, bout frequency and anointing sociality in *Cebus* and *Sapajus*. *Am J Primatol* 74:299–314. doi: 10.1002/ajp.20971
- Asensio N, Korstjens AH and Aureli F (2009) Fissioning minimizes ranging costs in spider monkeys: a multiple-level approach. *Behav Ecol Sociobiol* 63:649–659. doi: 10.1007/s00265-008-0699-9
- Babb PL, Fernandez-Duque E and Schurr TG (2015) Oxytocin receptor gene sequences in owl monkeys and other primates show remarkable interspecific regulatory and protein coding variation. *Mol Phylogenet Evol* 91:160–177. doi: 10.1016/j.ympev.2015.05.006
- Berrada K, Machado A, Drummond G and Paglia A (2008) Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília
- Bhaskaran R, Chuang LC and Yu C (1992) Conformational properties of oxytocin in dimethyl sulfoxide solution: NMR and restrained molecular dynamics studies. *Biopolymers* 32:1599–1608. doi: 10.1002/bip.360321203
- Boccia ML, Panicker AK, Pedersen C and Petrusz P (2001) Oxytocin receptors in non-human primate brain visualized with monoclonal antibody. *Neuroreport* 12:1723–6.
- Boccia ML, Petrusz P, Suzuki K, Marson L and Pedersen CA (2013) Immunohistochemical localization of oxytocin receptors in human brain. *Neuroscience* 253:155–164. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.048
- Boinski S (2005) Dispersal Patterns among Three Species of Squirrel Monkeys (*Saimiri oerstedii*, *S. boliviensis* and *S. sciureus*): III. Cognition. *Behaviour* 142:679–699. doi: 10.2307/4536262
- Bowler M and Bodmer R (2009) Social behavior in fission-fusion groups of red uakari monkeys (*Cacajao calvus ucayalii*). *Am J Primatol* 71:976–987. doi: 10.1002/ajp.20740
- Caffé AR, Van Ryen PC, Van Der Woude TP and Van Leeuwen FW (1989) Vasopressin and oxytocin systems in the brain and upper spinal cord of *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol* 287:302–325. doi: 10.1002/cne.902870304
- Caldwell HK, Wersinger SR and Young WS (2008) The role of the vasopressin 1b

receptor in aggression and other social behaviours. *Prog Brain Res* 170:65–72. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00406-8

Cao W, Luttrell LM, Medvedev A V., Pierce KL, Daniel KW, Dixon TM, Lefkowitz RJ and Collins S (2000) Direct Binding of Activated c-Src to the  $\beta_3$ -Adrenergic Receptor Is Required for MAP Kinase Activation. *J Biol Chem* 275:38131–38134. doi: 10.1074/jbc.C000592200

Cavanaugh J, Carp SB, Rock CM and French JA (2016) Oxytocin modulates behavioral and physiological responses to a stressor in marmoset monkeys.

*Psychoneuroendocrinology* 66:22–30. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.12.027

Cavanaugh J, Mustoe AC, Taylor JH and French JA (2014) Oxytocin facilitates fidelity in well-established marmoset pairs by reducing sociosexual behavior toward opposite-sex strangers. *Psychoneuroendocrinology* 49C:1–10. doi:

10.1016/j.psyneuen.2014.06.020

Chini B, Mouillac B, Ala Y, Balestre MN, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Elands J, Hibert M, Manning M and Jard S (1995) Tyr115 is the key residue for determining agonist selectivity in the V1a vasopressin receptor. *EMBO J* 14:2176–2182.

Chini B, Mouillac B, Balestre M-NN, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Hibert M, Andriolo M, Pupier S, Jard S and Barberis C (1996) Two aromatic residues regulate the response of the human oxytocin receptor to the partial agonist arginine vasopressin.

*FEBS Lett* 397:201–206. doi: S0014-5793(96)01135-0 [pii]

Corrêa HKM, Coutinho PEG and Ferrari SF (2000) Between - year differences in the feeding ecology of highland marmosets (*Callithrix aurita* and *Callithrix flaviceps*) in south - eastern Brazil. *J Zool* 252:421–427. doi: 10.1111/J.1469-7998.2000.TB01224.X

Defler TR, Nash SD, Landazábal Mendoza C, Nieto Díaz M, Rodríguez-Mahecha JV and Conservation International. (2003) *Primates de Colombia. Conservación Internacional Colombia*

Digby L, F Ferrari S and Saltzman W (2010) *Callitrichines: The Role of Competition in Cooperatively Breeding Species.*

Donaldson ZR and Young LJ (2008) Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* (80- ) 322:900–904. doi: 322/5903/900 [pii]

10.1126/science.1158668

Ebstein RP, Knafo A, Mankuta D, Chew SH and Lai PS (2012) The contributions of oxytocin and vasopressin pathway genes to human behavior. *Horm Behav* 61:359–379.

doi: 10.1016/j.yhbeh.2011.12.014

Fam B, Vargas-Pinilla P, Paré P, Viscardi L, Reales G, Felkl A, Franco A, Lucion A, Costa-Neto C, Pissinatti A et al. (2018) AVPR1b variation and the emergence of adaptive phenotypes in platyrrhine monkeys. *Am. J. Primatol.* Submitted:

Fanelli F, Barbier P, Zanchetta D, de Benedetti PG and Chini B (1999) Activation mechanism of human oxytocin receptor: a combined study of experimental and computer-simulated mutagenesis. *Mol Pharmacol* 56:214–225.

Fernandez-Duque E (2016) Social monogamy in wild owl monkeys (*Aotus azarae*) of Argentina: the potential influences of resource distribution and ranging patterns. *Am J Primatol* 78:355–71. doi: 10.1002/ajp.22397

Fernandez-Duque E, Valeggia CR and Mendoza SP (2009) The Biology of Paternal Care in Human and Nonhuman Primates. *Annu Rev Anthr* 38:115–130.

Fernández-Duque E, Valeggia CR and Mendoza SP (2009) The Biology of Paternal Care in Human and Nonhuman Primates. *Annu Rev Anthropol* 38:115–130. doi: 10.1146/annurev-anthro-091908-164334

Finkenwirth C, Martins E, Deschner T and Burkart JM (2016) Oxytocin is associated with infant-care behavior and motivation in cooperatively breeding marmoset monkeys. *Horm Behav* 80:10–18. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.01.008

Finkenwirth C, van Schaik C, Ziegler TE and Burkart JM (2015) Strongly bonded family members in common marmosets show synchronized fluctuations in oxytocin. *Physiol Behav* 151:246–251. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.07.034

Fleagle JG (2013) *Primate Adaptation and Evolution: 3rd Edn.* Academic Press

Fliers E, Guldenaar SE, van de Wal N and Swaab DF (1986) Extrahypothalamic vasopressin and oxytocin in the human brain; presence of vasopressin cells in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 375:363–7.

Fliers E, Swaab DF, Pool CW and Verwer RW (1985) The vasopressin and oxytocin neurons in the human supraoptic and paraventricular nucleus; changes with aging and in senile dementia. *Brain Res* 342:45–53.

French JA, Taylor JH, Mustoe AC and Cavanaugh J (2016a) Neuropeptide diversity and the regulation of social behavior in New World primates. *Front Neuroendocr.* doi: 10.1016/j.yfrne.2016.03.004

French JA, Taylor JH, Mustoe AC and Cavanaugh J (2016b) Neuropeptide diversity and the regulation of social behavior in New World primates. *Front Neuroendocr.* doi: 10.1016/j.yfrne.2016.03.004

- Gainer H, Fields RL and House SB (2001) Vasopressin gene expression: experimental models and strategies. *Exp Neurol* 171:190–199. doi: S0014-4886(01)97769-6 [pii] 10.1006/exnr.2001.7769
- Geisler I and Chmielewski J (2009) Cationic Amphiphilic Polyproline Helices: Side-Chain Variations and Cell-Specific Internalization. *Chem Biol Drug Des* 73:39–45. doi: 10.1111/j.1747-0285.2008.00759.x
- George RD, McVicker G, Diederich R, Ng SB, MacKenzie AP, Swanson WJ, Shendure J and Thomas JH (2011) Trans genomic capture and sequencing of primate exomes reveals new targets of positive selection. *Genome Res* 21:1686–1694. doi: 10.1101/gr.121327.111
- Gimpl G and Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81:629–683.
- Gimpl G, Fahrenholz F and Gene C (2001) The Oxytocin Receptor System : Structure , Function , and Regulation. *Physiol Rev* 81:629–683.
- Glembo TJ, Farrell DW, Gerek ZN, Thorpe MF and Ozkan SB (2012) Collective dynamics differentiates functional divergence in protein evolution. *PLoS Comput Biol* 8:e1002428. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002428
- Goodman M, Porter C a, Czelusniak J, Page SL, Schneider H, Shoshani J, Gunnell G and Groves CP (1998) Toward a phylogenetic classification of Primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. *Mol Phylogenet Evol* 9:585–598. doi: 10.1006/mpev.1998.0495
- Gruber CW and Muttenthaler M (2012) Discovery of defense- and neuropeptides in social ants by genome-mining. *PLoS One* 7:1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0032559
- Grueter CC, Chapais B and Zinner D (2012) Evolution of Multilevel Social Systems in Nonhuman Primates and Humans. *Int J Primatol* 33:1002–1037. doi: 10.1007/s10764-012-9618-z
- Hoyle CH (1998) Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Regul Pept* 73:1–33. doi: S0167011597010732 [pii]
- Hrdy SB (2010) Mothers and others : the evolutionary origins of mutual understanding.
- Insel TR (2010) The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. *Neuron* 65:768–779. doi: 10.1016/j.neuron.2010.03.005
- Ishunina TA and Swaab DF (1999) Vasopressin and Oxytocin Neurons of the Human

- Supraoptic and Paraventricular Nucleus; Size Changes in Relation to Age and Sex. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4637–4644. doi: 10.1210/jcem.84.12.6187
- Jarcho MR, Mendoza SP, Mason WA, Yang X and Bales KL (2011) Intranasal vasopressin affects pair bonding and peripheral gene expression in male *Callicebus cupreus*. *Genes, Brain Behav* 10:375–383. doi: 10.1111/j.1601-183X.2010.00677.x
- Kappeler PM and Van Schaik CP (2002) Evolution of primate social systems. *Int J Primatol* 23:707–740. doi: 10.1023/A:1015520830318
- Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ and Okayama H (1992) Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356:526–529. doi: 10.1038/356526a0
- Kleiman DG and Malcolm JR (1981) The Evolution of Male Parental Investment in Mammals. *Parental Care in Mammals*. Springer US, Boston, MA, pp 347–387
- Koshimizu TA, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H and Tanoue A (2012) Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev* 92:1813–1864. doi: 10.1152/physrev.00035.2011
- Kowalewski M, Urbani B, Tejedor M and Oklander L (2016) Explorando al orden primates: La primatología como disciplina Bioantropológica.
- Kozorovitskiy Y, Hughes M, Lee K and Gould E (2006) Fatherhood affects dendritic spines and vasopressin V1a receptors in the primate prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 9:1094–1095. doi: 10.1038/nn1753
- Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH and Young WS (2009) Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol* 88:127–151. doi: S0301-0082(09)00046-X [pii] 10.1016/j.pneurobio.2009.04.001
- Leverett K, Heyler C, Flemming T, Talbot CF, Zak PJ, Essler JL, Dougall P and Brosnan SF (2015) Oxytocin reduces food sharing in capuchin monkeys by modulating social distance. *Behaviour* 152:941–961. doi: 10.1163/1568539X-00003268
- Lima MGM, Silva-Júnior J de S e, Černý D, Buckner JC, Aleixo A, Chang J, Zheng J, Alfaro ME, Martins A, Di Fiore A et al. (2018) A phylogenomic perspective on the robust capuchin monkey (*Sapajus*) radiation: First evidence for extensive population admixture across South America. *Mol Phylogenet Evol* 124:137–150. doi: 10.1016/j.ympev.2018.02.023
- Loup F, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Pizzolato G and Dreifuss JJ (1989) Localization of oxytocin binding sites in the human brainstem and upper spinal cord: an autoradiographic study. *Brain Res* 500:223–30.
- Lowbridge J, Manning M, Haldar J and Sawyer WH (1977) Synthesis and some

pharmacological properties of [4-threonine, 7-glycine]oxytocin, [1-(L-2-hydroxy-3-mercaptopropanoic acid), 4-threonine, 7-glycine]oxytocin (hydroxy[Thr4, Gly7]oxytocin), and [7-Glycine]oxytocin, peptides with high oxytocic-antidiuretic . *J Med Chem* 20:120–123.

Lucion AB and Bortolini MC (2014) Mother-Pup Interactions: Rodents and Humans. *Front Endocrinol* 5:17. doi: 10.3389/fendo.2014.00017

Lukas D and Clutton-Brock TH (2013) The evolution of social monogamy in mammals. *Science* (80- ) 341:526–530. doi: 10.1126/science.1238677

Lynch Alfaro J, Silva JJ and Rylands A (2012a) How different are robust and gracile capuchin monkeys? An argument for the use of *Sapajus* and *Cebus*. *Am J Primatol* 74:273–286.

Lynch Alfaro JW, Boubli JP, Olson LE, Di Fiore A, Wilson B, Gutiérrez-Espeleta GA, Chiou KL, Schulte M, Neitzel S, Ross V et al. (2012b) Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. *J Biogeogr* 39:272–288. doi: 10.1111/j.1365-2699.2011.02609.x

Mayer BJ, Abdul-Manan N, Aghazadeh B, Liu GA, Majumdar A, Ouerfelli O, Siminovitch KA, Rosen MK, Adler CE, Miyoshi-Akiyama T et al. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* 114:1253–63. doi: 10.1038/20726

Mustoe A, Taylor JH and French JA (2018) Oxytocin Structure and Function in New World Monkeys: From Pharmacology to Behavior. *Integr Zool*. doi: 10.1111/1749-4877.12318

Mustoe AC, Cavanaugh J, Harnisch AM, Thompson BE and French JA (2015) Do marmosets care to share? Oxytocin treatment reduces prosocial behavior toward strangers. *Horm Behav* 71:83–90. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.04.015

Mustoe AC, Harnisch AM, Hochfelder B, Cavanaugh J and French JA (2016) Inequity aversion strategies between marmosets are influenced by partner familiarity and sex but not by oxytocin. *Anim Behav* 114:69–79. doi: 10.1016/j.anbehav.2016.01.025

Myers P (2000) “Primates” (On-line), Animal Diversity Web.

Neumann ID and van den Burg EH (2013) Oxytocin and vasopressin release and their receptor-mediated intracellular pathways that determine their behavioral effects. In: Pfaff DW, Choleris E and Kavaliers M (eds) *Oxytocin, Vasopressin and Related Peptides in the Regulation of Behavior*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 27–43

Norconk MA and Kinzey WG (1994) Challenge of neotropical frugivory: Travel

- patterns of spider monkeys and bearded sakis. *Am J Primatol* 34:171–183. doi: 10.1002/ajp.1350340208
- Norconk MA and Veres M (2011) Physical Properties of Fruit and Seeds Ingested by Primate Seed Predators with Emphasis on Sakis and Bearded Sakis. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol* 294:2092–2111. doi: 10.1002/ar.21506
- Oldenhof J, Vickery R, Anafi M, Oak J, Ray A, Schoots O, Pawson T, von Zastrow M and Van Tol HH (1998) SH3 binding domains in the dopamine D4 receptor. *Biochemistry* 37:15726–36. doi: 10.1021/bi981634+
- Parreiras-e-Silva LT, Vargas-Pinilla P, Duarte DA, Longo D, Espinoza Pardo GV, Dolor Finkler A, Paixão-Côrtés VR, Pará P, Rovaris DL, Oliveira EB et al. (2017) Functional New World monkey oxytocin forms elicit an altered signaling profile and promotes parental care in rats. *Proc Natl Acad Sci* 114:9044–9049. doi: 10.1073/pnas.1711687114
- Perelman P, Johnson WE, Roos C, Seuánez HN, Horvath JE, Moreira MA, Kessing B, Pontius J, Roelke M, Rumpler Y et al. (2011) A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 7:e1001342. doi: 10.1371/journal.pgen.1001342
- Ren D, Chin KR and French JA (2014) Molecular Variation in AVP and AVPR1a in New World Monkeys (Primates, Platyrrhini): Evolution and Implications for Social Monogamy. *PLoS One* 9:e111638. doi: 10.1371/journal.pone.0111638
- Ren D, Lu G, Moriyama H, Mustoe AC, Harrison EB and French JA (2015) Genetic diversity in oxytocin ligands and receptors in New World monkeys. *PLoS One* 10:e0125775. doi: 10.1371/journal.pone.0125775
- Rodrigo J, Pena A, Murat B, Trueba M, Durroux T, Guillon G and Rognan D (2007) Mapping the Binding Site of Arginine Vasopressin to V<sub>1a</sub> and V<sub>1b</sub> Vasopressin Receptors. *Mol Endocrinol* 21:512–523. doi: 10.1210/me.2006-0202
- Royle NJ, Smiseth PT and Kölliker M (2012) The evolution of parental care. Oxford University Press
- Rylands AB (1993) Marmosets and tamarins : systematics, behaviour, and ecology. Oxford University Press
- Rylands AB and Anzenberger G (2012) Introduction: New World Primates. *Int Zoo Yearb* 46:4–10. doi: 10.1111/j.1748-1090.2012.00182.x
- Saito A and Nakamura K (2011) Oxytocin changes primate paternal tolerance to offspring in food transfer. *J Comp Physiol A* 197:329–337. doi: 10.1007/s00359-010-0617-2

- Saltzman W and Maestriperi D (2011) The neuroendocrinology of primate maternal behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:1192–1204. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.09.017
- Schneider H (2000) The current status of the New World monkey phylogeny. *An Acad Bras Cienc* 72:165–172.
- Siehl S and Milligan G (2011) G protein-coupled receptors : structure, signaling, and physiology. Cambridge University Press
- Slusarz MJ, Giełdoń A, Slusarz R and Ciarkowski J (2006a) Analysis of interactions responsible for vasopressin binding to human neurohypophyseal hormone receptors-molecular dynamics study of the activated receptor-vasopressin-G(alpha) systems. *J Pept Sci* 12:180–189. doi: 10.1002/psc.714
- Slusarz MJ, Slusarz R and Ciarkowski J (2006b) Molecular dynamics simulation of human neurohypophyseal hormone receptors complexed with oxytocin-modeling of an activated state. *J Pept Sci* 12:171–179. doi: 10.1002/psc.713
- Smith AS, Ågmo A, Birnie AK and French JA (2010) Manipulation of the oxytocin system alters social behavior and attraction in pair-bonding primates, *Callithrix penicillata*. *Horm Behav* 57:255–262. doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.12.004
- Snowdon CT, Pieper BA, Boe CY, Cronin KA, Kurian A V and Ziegler TE (2010) Variation in oxytocin is related to variation in affiliative behavior in monogamous, pairbonded tamarins. *Horm Behav* 58:614–618. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.06.014
- Storey AE and Ziegler TE (2016) Primate paternal care: Interactions between biology and social experience. *Horm Behav* 77:260–271. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.07.024
- Sussman RW, Garber PA and Cheverud JM (2005) Importance of cooperation and affiliation in the evolution of primate sociality. *Am J Phys Anthropol* 128:84–97. doi: 10.1002/ajpa.20196
- Symington MM (1990) Fission-fusion social organization in *Ateles* and *Pan*. *Int J Primatol* 11:47–61. doi: 10.1007/BF02193695
- Tavaré S, Marshall CR, Will O, Soligo C and Martin RD (2002) Using the fossil record to estimate the age of the last common ancestor of extant primates. *Nature* 416:726–729. doi: 10.1038/416726a
- Taylor JH and French JA (2015) Oxytocin and vasopressin enhance responsiveness to infant stimuli in adult marmosets. *Horm Behav* 75:154–159. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.10.002
- Taylor JH, Intorre AA and French JA (2017) Vasopressin and Oxytocin Reduce Food

- Sharing Behavior in Male, but Not Female Marmosets in Family Groups. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:181. doi: 10.3389/fendo.2017.00181
- Tessmar-Raible K, Raible F, Christodoulou F, Guy K, Rembold M, Hausen H and Arendt D (2007) Conserved sensory-neurosecretory cell types in annelid and fish forebrain: insights into hypothalamus evolution. *Cell* 129:1389–1400. doi: S0092-8674(07)00605-8 [pii] 10.1016/j.cell.2007.04.041
- Vargas-Pinilla P, Paixão-Côrtes VR, Pará P, Tovo-Rodrigues L, Vieira CM, Xavier A, Comas D, Pissinatti A, Sinigaglia M, Rigo MM et al. (2015) Evolutionary pattern in the OXT-OXTR system in primates: coevolution and positive selection footprints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:88–93. doi: 10.1073/pnas.1419399112
- Wang Z, Moody K, Newman JD and Insel TR (1997a) Vasopressin and oxytocin immunoreactive neurons and fibers in the forebrain of male and female common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Synapse* 27:14–25. doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(199709)27:1<14::AID-SYN2>3.0.CO;2-G
- Wang Z, Toloczko D, Young LJ, Moody K, Newman JD and Insel TR (1997b) Vasopressin in the forebrain of common marmosets (*Callithrix jacchus*): studies with in situ hybridization, immunocytochemistry and receptor autoradiography. *Brain Res* 768:147–56.
- Weisman O, Zagoory-Sharon O and Feldman R (2012) Oxytocin Administration to Parent Enhances Infant Physiological and Behavioral Readiness for Social Engagement. *Biol Psychiatry* 72:982–989. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.06.011
- Wesley VJ, Hawtin SR, Howard HC and Wheatley M (2002) Agonist-specific, high-affinity binding epitopes are contributed by an arginine in the N-terminus of the human oxytocin receptor. *Biochemistry* 41:5086–5092. doi: bi015990v [pii]
- Woller MJ, Sosa ME, Chiang Y, Prudom SL, Keelty P, Moore JE and Ziegler TE (2012) Differential hypothalamic secretion of neurocrines in male common marmosets: parental experience effects? *J Neuroendocrinol* 24:413–21. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02252.x
- Wright PC (1990) Patterns of paternal care in primates. *Int J Primatol* 11:89–102. doi: 10.1007/bf02192783
- Wynne-Edwards KE and Reburn CJ (2000) Behavioral endocrinology of mammalian fatherhood. *Trends Ecol Evol* 15:464–468.
- Yedvabny E, Nerenberg PS, So C and Head-Gordon T (2015) Disordered structural ensembles of vasopressin and oxytocin and their mutants. *J Phys Chem B* 119:896–905.

doi: 10.1021/jp505902m

Young LJ (1999) Frank A. Beach Award. Oxytocin and vasopressin receptors and species-typical social behaviors. *Horm Behav* 36:212–221. doi: S0018506X99915489 [pii] 10.1006/hbeh.1999.1548

Zingg HH and Laporte SA (2003) The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab* 14:222–227. doi: S1043276003000808 [pii]