



Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul



**Instituto de Biociências**

**Programa De Pós-Graduação Em Genética e Biologia Molecular**

RESGATANDO A HISTÓRIA DEMOGRÁFICA E EVOLUTIVA DOS PRIMATAS  
PLATYRRHINI ATRAVÉS DE DADOS DO SISTEMA OXITOCINÉRGICO

**Bibiana Sampaio de Oliveira Fam**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cátira Bortolini

Porto Alegre, abril de 2022.

## **Instituições e fontes financiadoras**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Evolução Humana e Molecular do Departamento de Genética da Universidade federal do Rio Grande do Sul sob financiamento do Conselho Federal de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## **Agradecimentos**

Agradeço à UFRGS e às agências de fomento (CNPq e CAPES) pela oportunidade de me qualificar e desenvolver meu projeto de pesquisa.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cátira Bortolini agradeço por me receber em seu laboratório e por compartilhar seu conhecimento de maneira tão dedicada e inspiradora.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Paixão-Cortes, à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreia Tuchetto e ao Prof. Dr. Renan Maestri agradeço por compartilharem seu conhecimento e seu tempo, contribuições valiosas ao longo deste processo.

Aos colegas do LEHM, do DeGen e do PPGBM agradeço pela convivência agradável e pelas ricas trocas de conhecimento e experiências que tanto contribuem para nossa jornada acadêmica.

Ao Dr. Alcides Pissinatti, veterinário-chefe do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro pela inestimável colaboração e pelo acolhimento de espécies raras e ameaçadas.

Ao Dr. Tiago Falótico que organizou expedições de campo, na Serra da Capivara, para obtenção de amostras biológicas de indivíduos da população da Pedra Furada de *Sapajus libidinosus*, bem como pelo acesso aos dados comportamentais por ele coletados dos indivíduos deste grupo de primatas tão especial.

Aos meus familiares e amigos agradeço por todo apoio tão necessário, estiveram sempre presente ao meu lado.

## **Sumário**

### **CAPÍTULO I**

1. Introdução.....	10
1.1 Considerações gerais.....	10
1.2 O sistema oxitocinérgico.....	15
1.3 GPCRs: Os receptores do sistema oxitocinérgico.....	18
1.4 A emergência de fenótipos comportamentais adaptativos em Platyrrhini.....	22
1.5 Enzima Leucil-cistinil aminopeptidase (LNPEP) e seu papel no sistema oxitocinérgico.....	24

### **CAPÍTULO II**

2. Justificativa.....	27
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28

### **CAPÍTULO III**

3. Resultados. Considerações gerais.....	29
--	----

### **CAPÍTULO IV**

4. Resultados. Variabilidade do receptor AVPR1b e a emergência de fenótipos adaptativos em primatas Platyrrhini.....	31
--	----

### **CAPÍTULO V**

5. Resultados. O papel do receptor AVPR2 na osmorregulação e sua variabilidade em primatas Platyrrhini (primeira versão do manuscrito).....	43
---	----

## **CAPÍTULO VI**

6. Resultados. Processos coevolutivos no sistema oxitocinérgico.....	95
--	----

## **CAPÍTULO VII**

7. Considerações finais e perspectivas.....	147
---	-----

## **CAPÍTULO VIII**

8. Referência Bibliográficas.....	152
-----------------------------------	-----

## **CAPÍTULO IX**

9. Anexo I: Evolutionary and demographic history of the most skilled tool-handling Platyrrhini monkey: <i>Sapajus libidinosus</i> from Serra da Capivara National Park, Brazil (manuscrito a ser submetido para a revista PNAS).....	156
--	-----

## **CAPÍTULO X**

10. Anexo II: Molecular evolutionary insights from PRLR in mammals.....	196
---	-----

## **CAPÍTULO X**

11. Anexo III: Evolutionary analysis of the antiviral <i>STAT2</i> gene os primates and rodents signature of different stages of an arm race.....	198
--	-----

## **CAPÍTULO XII**

12. Anexo IV. ACE2 diversity in placental mammals reveals the evolutionary strategy of SARS-CoV2.....	200
--	-----

## **CAPÍTULO XIII**

13. Anexo V: Evolutionary history of the SARS-Cov2 Gamma variant of concern (P.1: a perfect storm).....	211
--	-----

## **Lista de siglas e abreviaturas**

Ala<sup>8</sup>OXT - Oxitocina Alanina 8

AVP - Vasopressina

AVPR1a - Receptor de Vasopressina 1a

AVPR1b- Receptor de Vasopressina 1b

AVPR2 - Receptor de Vasopressina 2

DIN - Diabetes insípida nefrogênica

ECL - Alça extracelular

GPCRs - Receptores acoplados as proteínas

ICL - Alça intracelular

MAPK - Proteínas quinase ativadas por mitógenos

OXT - Oxitocina

OXTR - Receptor da Oxitocina

Phe<sup>2</sup>OXT - Oxitocina Fenilalanina 2

pNM- Primatas do Novo Mundo

Pro<sup>8</sup>OXT - Oxitocina Prolina 8

PVN - Núcleo paraventricular

SNC - Sistema Nervoso Central

SDI - Síndrome da Diurese Inapropriada

SON - Núcleo Supra Óptico

Thr<sup>8</sup>OXT - Oxitocina Treonina 8

Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT - Oxitocina Valina 3 Prolina 8

VT - Vasotocina

VTR - Receptor de Vasotocina

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1.** Representação da composição dos diferentes peptídeos do sistema, nas primeiras linhas os do tipos OT (MT- mesotocina, IT- isotocina e OXT oxitocina e suas variantes) e nas últimas linhas os tipos VT (VT- vasotocina, AVP- vasopressina Lys-AVP- Lisina vasopressina).

## **Lista de figuras**

**Figura 1.** Sistema OXT-AVP em metazoários.

**Figura 2.** Representação gráfica do número de genomas de primatas em seus diferentes clados disponíveis em bancos de dados públicos ao longo das últimas duas décadas.

## **Resumo**

A presente Tese apresenta um panorama sobre a história evolutiva e demográfica de primatas Platyrrhini através da investigação do sistema oxitocinérgico. Primatas dessa parvorder formam um grupo monofilético que divergiram a aproximadamente 40Ma, ocupando uma diversidade de nichos ecológicos e comportamentais, apresentando uma alta taxa de comportamentos sociais complexos que não são comuns em primatas ou mamíferos em geral, como monogamia social ou cuidado paterno da prole. O presente estudo ampliou o conhecimento sobre genes do sistema oxitocinérgico (OXT, AVPR1b, AVPR2 e LNPEP) nas três famílias de primatas Platyrrhini: Cebidae, Pitheciidae e Atelidae, aumentando a representatividade em espécies sem informações genômicas em bancos de dados. A partir desta abordagem de análises coevolutivas e genômica comparativas podemos inferir sobre como a variabilidade do sistema nestas espécies de primatas influenciou nos diferentes padrões de comportamentos sociais encontrados. A presente Tese traz ainda manuscritos adicionais envolvendo temas relevantes como a evolução gene-cultura e outras abordagens evolutivas em co-autoria como a corrida armamentista entre patógenos e hospedeiros.

## **Abstract**

This Thesis presents an overview of the evolutionary and demographic history of Platyrrhini primates through the investigation of the oxytocinergic system. Primates of this parvorder form a monophyletic group that diverged at approximately 40 Ma, occupying a diversity of ecological and behavioral niches, presenting a high rate of complex social behaviors that are not common in primates or mammals in general, such as social monogamy or paternal care of offspring. The present study expanded the knowledge about genes involved with the oxytocinergic system (OXT, AVPR1b, AVPR2 and LNPEP) in the three families of Platyrrhini primates: Cebidae, Pitheciidae and Atelidae, increasing the representativeness in species without genomic information in databases. From comparative genomic and coevolutionary analyzes we can infer about how the variability of the oxytocinergic system of these primate species influenced their different patterns of social behavior. This Thesis also brings additional manuscripts involving relevant topics like gene-culture evolution and other evolutionary approaches in co-authorship such as pathogen and host arms race.

## CAPÍTULO I

### 1. Introdução

#### 1.1 Considerações gerais

A parvordem Platyrrhini divergiu dos Catarrhini entre ~43 e ~25 milhões de anos antes do presente (Ma) (Perelman et al., 2011; Aristides et al., 2015; Silvestro et al., 2019). A tese mais aceita é que esses primatas chegaram no continente Americano vindo, via Atlântico, da África (em um intervalo de tempo após a dissolução de Gondwana) através de eventos chamados de “transatlantic rafting”, tendo uma origem monofilética (Herlyn, 2016; Seiffert et al., 2020 e referência lá contidas). Silvestro et al. (2019) sugeriram que a forma ancestral era de fato pequena (pesando  $\pm 0,4$  kg) em comparação com as maiores espécies modernas, uma vez que alguns Atelideos podem chegar a 15 kg. O tamanho provavelmente foi um fator chave que possibilitou a sobrevivência dos indivíduos que atingiram a costa da América do Sul a partir da África, já que os recursos em uma ilha flutuante seriam escassos e um tamanho menor seria uma vantagem na economia destes recursos. Por serem encontrados apenas no continente Americano, os Platyrrhini também são conhecidos como primatas do Novo Mundo (pNM) ou primatas neotropicais.

O registro fóssil mais antigo de um Platyrrhini, descrito como *Perupithecus*, foi descoberto recentemente na localidade de Santa Rosa, Peru, sua datação remete ao Eoceno tardio e é considerado como uma forte evidência de origem africana apoiada pela semelhança morfológica com o gênero *Talhapithecus* descrito no norte da África, datado também no Eoceno tardio, reforçando a hipótese de um evento de dispersão transatlântica (Bond et al., 2015; Silvestro et al., 2019).

O registro fóssil de pNM também mostra diversidade, com cerca de 33 gêneros extintos, porém é considerado relativamente escasso quando comparado a outros grupos de mamíferos que ocorrem nas mesmas regiões (Perez et al., 2013; Silvestro et al., 2019). Os fósseis mais antigos de Platyrrhini incluem registros do Oligoceno na Bolívia (gênero *Branisella*) datados de ~26 Ma, e o recém descrito *Perupithecus* do Peru com ~36 Ma

(Bond et al., 2015). Já os espécimes encontrados na região Patagônica e no Chile são datadas do Mioceno entre 20-15,8 Ma, enquanto aqueles da região fossilífera de La Venta na Colômbia, datam do Mioceno médio ~13 Ma. Estes últimos apresentam uma morfologia extremamente semelhante às formas das espécies de primatas atuais (Silvestro et al., 2019). Vale destacar que La Venta é um dos locais fossilíferos mais informativo da América do Sul para mamíferos do Mioceno Médio, representando uma janela entre 11,8 a 13,5 Ma, e fornece diversas informações paleo ecológicas. Atualmente a região é um local semiárido pois está em uma sombra de chuva na cordilheira Oriental, mas no Mioceno a área era uma região tropical de planície com florestas e savanas dispersas (Aristide et al., 2015).

Dentro do grupo de Platyrrhini vivos existem pelo menos 18 gêneros e três famílias (Atelidae, Pitheciidae e Cebidae; Perelman et al., 2011; Schneider e Sampaio, 2015). Na América do Sul, 199 espécies de Platyrrhini são encontradas em diversos biomas, incluindo regiões úmidas como a Amazônia, a Floresta Atlântica, além de outros biomas mais sazonais ou secos como o Cerrado e Caatinga (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019). Lynch-Alfaro et al., (2015) propuseram que a maioria dos primatas que atualmente habitam ambientes mais abertos e secos são provenientes de eventos de ocupação relativamente recentes, tendo se expandido a partir de florestas tropicais no Pleistoceno (de 2,5 Ma até cerca de 112 mil anos antes do presente). Mas como veremos abaixo, a radiação adaptativa desses primatas ainda é alvo de controvérsias, com relação ao tempo estimado e relativo aos fatores por trás de sua dispersão e diversidade ao longo dos biomas do continente americano.

Os padrões de diversificação pós-colonização do continente Americano permitem compreender como ocorreu a evolução morfológica e comportamental destes organismos. É consenso entre os pesquisadores que a região tropical é o centro de diversidade, evolução e dispersão de primatas na América do Sul e que as expansões latitudinais se deram de acordo com as condições ambientais. Kay et al., (2015) propuseram que os Platyrrhini teriam ocupado primeiro as regiões tropicais da América do Sul expandindo sua distribuição para o sul em direção à região Patagônica através do Portal do Paraná no início do Mioceno (o que teria ocorrido provavelmente não uma mas algumas vezes e de forma independente). Atualmente a distribuição de primatas não chega a latitudes tão altas, os clados que ocuparam a região patagônica foram posteriormente extintos durante o Mioceno

Médio provavelmente devido a alterações climáticas e geológicas (Kay et al., 2015; Silvestro et al., 2019).

Silvestro et al., (2019) também demonstram que as altas latitudes ocupadas pelos clados ancestrais chegam a uma expansão máxima no início do Mioceno, uma tendência que foi descrita de maneira geral para outras espécies de vertebrados. O desaparecimento das espécies do sul da América do sul no Mioceno Médio coincide também com a expansão das espécies na América Central (Silvestro et al., 2019). Vale destacar que a classificação das espécies fósseis de Platyrrhini encontradas ao longo da América Central e também ao longo das ilhas nas Antilhas por muito tempo intrigou pesquisadores por causa da incerteza de seu posicionamento na filogenia. Rosenberger et al., (2014) posicionaram estas espécies em ramos mais basais, argumentando que de uma perspectiva funcional e morfológica o fóssil cubano *Paralouatta* teria uma afinidade filogenética mais próxima ao gênero atual *Alouatta* enquanto os fósseis jamaicanos *Antillothrix* e *Xenothrix* seriam mais próximos à família Pitheciidae (Rosenberger, 2002). Kay et al., (2015), por sua vez, argumentou que os primatas chegaram nas Antilhas via América do Sul através da dispersão sobre a água no início do Mioceno e foram posteriormente extintos juntamente com cerca de 90% das espécies de mamíferos terrestres.

Aristide et al., (2015) sugeriram que o melhor modelo para a evolução do clado Platyrrhini seria de uma rápida diversificação inicial dos táxons ao longo de uma nicho multidimensional baseado na composição da dieta e tipo de locomoção em vez de outros modelos como o modelo neutro baseado no tamanho corporal correspondentes aos três principais clados onde houve desaceleração na taxa evolutiva ficando com diferentes padrões de tamanho corporal. Esse achado contrasta com Hodgson et al., (2009), que realizaram um estudo filogenético utilizando genomas mitocondriais e não encontraram estase, mas evolução dinâmica entre pNM, pelo menos até 12 Ma.

Informações importantes sobre a evolução de Platyrrhini podem ser também obtidas a partir da massa corporal de táxons extintos, que é fortemente ligada à área molar, o que permite uma estimativa confiável da massa corporal de primatas extintos, mesmo quando o registro fóssil é extremamente escasso. O registro fóssil demonstra que os táxons extintos são responsáveis pelo maior (> 20 kg) e alguns dos menores (~0,4 kg) táxons do clado em comparação com a faixa atual que abrange aproximadamente 0,08 a 15 kg. Por

exemplo, um adulto de espécie atual *Cebuella pygmaea* (família Cebidae) tem apenas ~0,08 kg, enquanto um macho adulto do gênero *Brachyteles* pode ter ~15 kg (família Atelidae) (Nishimura et al., 1988; Hawes e Peres, 2014), uma diferença de mais de 180 vezes, mas ainda menor do que pode ter existido no passado.

A evolução do tamanho corporal em Platyrrhini demonstra a rápida radiação adaptativa, enquanto algumas espécies de Atelidae e Pitheciidae atingiram tamanhos corporais de mais de 10kg, os calitriquídeos (Saguís e Micos) mantiveram uma pequena massa corporal ao longo de sua história evolutiva (Montgomery e Mundy, 2013; Kamilar e Cooper, 2013), desafiando assim a hipótese do nanismo filético como uma explicação para suas características adaptativas. Eles mantêm uma massa corporal menor que 1 kg em uma distribuição que abrange florestas tropicais da região Amazônica para a América do Sul e Central, cujo registro fóssil é escasso (Aristide et al., 2015; Silvestro et al., 2019). O processo de evolução do tamanho corporal foi heterogêneo entre os diferentes ramos de pNM e não seguiu uma evolução neutra simples. Silvestro et al., (2019) identificaram que a taxa de evolução da massa corporal é mais alta em nível de família, e menor na maioria das subfamílias, sugerindo rápida mudança no período de divergência das três famílias atuais entre o fim do Oligoceno e o início do Mioceno (Silvestro et al., 2019).

Interessantemente, a expansão geográfica latitudinal deste grupo coincide temporalmente com um aumento significativo no tamanho da população de Platyrrhini (Aristide et al., 2015), com condições climáticas mais quentes do Mioceno e com a elevação mais baixa dos Andes. O papel do rio Amazonas e seus principais afluentes é considerado um fator chave na formação da diversidade de Platyrrhini, definindo como e quando primatas da Amazônia chegaram à Floresta Atlântica e como se deram os padrões de colonizações e extinções de primatas na América Central, nos Andes e nos biomas similares a savanas (Llanos, Caatinga e Cerrado).

Os maiores pNMs são encontrados principalmente em florestas de galerias, enquanto os menores são encontrados em densas florestas secundárias. Possivelmente, tempos de seca e de regiões florestais reduzidas e amplamente separadas, em conjunto com o perturbações normais do ambiente tropical, podem ter causado a limitações de recursos, o que teria favorecido espécies menores que dependem de menos comida e territórios, permitindo então que a população de calitriquídeos cresça após a reposição desses recursos

(Bucket et al., 2015). A exceção é *Cebuella pygmaea*, que como já visto, tem massa corporal extremamente pequena. Tal fato seria ligado a um atraso na taxa de crescimento pré e pós-natal, sugerindo que a maturação sexual acelerada em relação ao restante de seu desenvolvimento poderia ter desempenhado um papel na evolução dessa espécie (Montgomery e Mundy, 2012).

Kiesling et al., (2014) propuseram também que a diversificação em nível de gênero e espécies tenha ocorrido não por vicariância, onde ocorre divergência através de barreiras naturais, mas por simpatria na região tropical amazônica que é rica em ecossistemas complexos, havendo posterior dispersão para a Floresta Atlântica, Cerrado e Caatinga. Rios e corpos de água são considerados fatores chaves no processo de especiação de primatas, sendo descrito como barreiras para algumas espécies dos gêneros *Alouatta*, *Cebus*, *Sapajus* e *Callicebus* (Kiesling et al., 2014) mas não para o gênero *Ateles* (que tem a divergência dos demais Atelidae estimada entre 6.7- 4 Ma). Os estudos sobre a divergência da família Pitheciidae também são controversos. Estima-se que a divergência entre os gêneros *Cacajao*, *Chiropotes* e *Pithecia* tenha ocorrido há aproximadamente 15 Ma, entre *Cacajao* e *Chiropotes* há 8 Ma. Estudos sobre a divergência das espécies de Cebidae, por sua vez, indicam que o ancestral comum entre *Callithrix*, *Sagui*, *Mico* teria uma ampla distribuição, habitando tanto Floresta Amazônica quanto de Floresta Atlântica. Já a divergência de *Leontopithecus* ocorreu por vicariância no Mioceno, na floresta Atlântica há aproximadamente 13 Ma enquanto em *Callithrix* a divergência se dá há aproximadamente 6 Ma (Buckner et al., 2015). Estima-se que a colonização da floresta Atlântica pelo gênero *Callithrix* seja mais recente, há aproximadamente 5 Ma em uma segunda onda de expansão do gênero (Buckner et al., 2015).

Diferenças marcantes também foram encontradas em termos de comportamento, hábitos alimentares e ambientes em que vivem, indicando sucesso adaptativo desses primatas em todo o continente americano (Simpson, 1953), o que prevê ação da seleção natural a partir de condições ecológicas e outras circunstâncias que exerceram ou exercem pressões seletivas vigorosas (Gavrilets e Losos, 2009; Aristides et al., 2015). Mais, Moorjani et al. (2016) analisaram genomas completos de 10 espécies de primatas, incluindo macacos do Velho Mundo, pNMe grande macacos. Os autores constataram que

os genomas nucleares de Platyrrhini tinham, em média, uma taxa mutacional 1,64 vezes mais rápida que os demais primatas (Moorjani et al., 2016).

Outras características podem ser elencadas. Por exemplo, o clado que compreende os gêneros *Cebus* e *Sapajus* (família Cebidae; Perelman et al., 2011; Schneider e Sampaio, 2015) apresentam um positivo e alto índice de inteligência geral, que emergiu de forma independente em somente quatro eventos dentro da ordem Primatas (Reader et al., 2011): Além dos clado *Cebus/Sapajus* da parvordem Platyrrhini, alguns gêneros vivos da família Cercopithecidae, como *Papio* e *Macaca*, bem como nas linhagens evolutivas de grandes macacos/hominíneos (van Schaik et al., 1999; Reader e Laland, 2011), todos Catarrhini. Os exemplos acima ilustram o quanto primatas Platyrrhini apresentam particularidades que refletem sua bem sucedida trajetória adaptativa no continente americano e o quanto pode ser desafiador tentar desvendar os mecanismos genéticos e evolutivos envolvidos.

Como veremos nos itens abaixo, na presente Tese investigamos o sistema oxitocinérgico com o propósito de contribuir para o entendimento da história adaptativa dos Platyrrhini. Vale ressaltar que recentemente uma nova nomenclatura dos genes e seus produtos do sistema oxitocinérgico foi proposto (Theofanopoulou et al., 2021; Figura 1). No entanto, na presente Tese será utilizada a nomenclatura convencional, já que a nova nomenclatura ainda não está consolidada.

## **1.2 O sistema oxitocinérgico**

O sistema da Oxitocina (*OXT*) e da Vasopressina (*AVP*), também conhecido como sistema oxitocinérgico, compreende além dos dois nona-peptídeos acima mencionados, seus quatro receptores (OXTR, AVPR1a, AVPR1b e AVPR2). Devido a sua atuação como neurohormônios, através da interação com os receptores, tanto OXT quanto AVP exercem um papel chave na modulação de uma série de comportamentos sociais complexos como o reconhecimento social, memória social, afetividade, formação de pares, cuidado parental e, controle do estresse e da agressividade (Young et al., 2012; Koehbach et al., 2013; French et al., 2016). Seu papel em processos fisiológicos fundamentais para a reprodução de mamíferos placentários compreende características que são consideradas básicas em

mamíferos placentários como a contração uterina, a ejaculação e a ejeção do leite (Koshimizu et al., 2012; Koehbach et al., 2013). Além disso, outras funções básicas da biologia dos organismos são atribuídas a este sistema, como a regulação da pressão osmótica e a contração de vasos periféricos (Gimpl e Farenholz, 2001; Koshimizu et al., 2012).

Os genes *OXT* e *AVP* são parálogos e estão localizados no mesmo cromossomo, em humanos na posição 20p13, porém, são transcritos em direções opostas, apresentando uma região intergênica que é bastante variável entre as diferentes espécies de mamíferos placentários. Ambos neuro-hormônios são produzidos no sistema nervoso central (SNC), nos neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico (SON) e núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, sendo liberados na corrente sanguínea através da glândula pituitária posterior (Koshimizu et al, 2012; Yamashita e Kitano, 2013). Em mamíferos placentários os peptídeos OXT e AVP diferem em apenas dois resíduos nas posições 3 e 8 (OXT: Cys-Tyr-Ile-Glu-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly e AVP: Cys-Tyr-Phe-Glu-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly) e é interessante observar que esta família gênica possui uma história evolutiva antiga em que encontramos pelo menos uma versão de peptídeo homólogo a estes neuro-hormônios, como a Mesotocina, a Vasotocina e a Isotocina em outras classes de vertebrado e até mesmo em invertebrados como por exemplo a Inotocina e Conotocina (Di Giglio, 2017). Análises genômicas recentes propõem inclusive uma nova nomenclatura mais abrangente para a família gênica (Theofanopoulou et al., 2021) considerando o alto grau de similaridade entre os peptídeos (Tabela 1) e seus receptores (Figura 1) considerando a homologia e unificando em peptídeos do tipo OT (Isotocina, Mesotocina e Oxitocina) e do tipo VT (Vasotocina, Vasopressina, Lisipressina, Fenipressina), indicando uma história evolutiva antiga e diversa desta família gênica que evoluiu através de mais de um evento de duplicação gênica desde a era pré-cambriana há aproximadamente 600 milhões de anos (Archer et al., 1995; Koehbach et al., 2013; Di Giglio et al., 2017).

**Tabela 1.** Representação da composição dos diferentes peptídeos do sistema, nas primeiras linhas os do tipos OT (MT- mesotocina, IT- isotocina e OXT acitocina e suas variantes) e nas últimas linhas os tipos VT (VT- vasotocina, AVP- Arginina vasopressina, Lys-AVP- Lisina vasopressina).

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>MT</b>	C	Y	I	Q	N	P	I	G	G
<b>IT</b>	C	Y	I	S	N	P	I	G	G
<b>OXT</b>	C	Y	I	Q	N	C	P	L	G
	C	Y	I	Q	N	C	P	P	G
	C	Y	V	Q	N	C	P	P	G
	C	Y	I	Q	N	C	P	A	G
	C	Y	I	Q	N	C	P	T	G
	C	Y	V	Q	N	C	P	L	G
	C	F	I	Q	N	C	P	L	G
<b>VT</b>	C	Y	I	Q	N	C	P	R	G
<b>AVP</b>	C	Y	F	Q	N	C	P	R	G
<b>Lys-AVP</b>	C	Y	F	Q	N	C	P	L	G

Enquanto a sequência de 8 aminoácidos de AVP é relativamente bem conservada em mamíferos placentários, tendo apenas uma variação (Lys<sup>3</sup>AVP) em Suidae, a OXT revelou recentemente uma maior variabilidade, não dentro de mamíferos em geral, mas dentro de um grupo restrito de primatas, mais especificamente em primatas do Novo Mundo. A forma mais comum presente em mamíferos placentários é descrita aqui como Leu<sup>8</sup>OXT e é amplamente encontrada em primatas. A partir de 2011 modificações nas posições 2, 3, e 8 de OXT começaram a ser descritas para as 3 famílias de Platyrrhini: Cebidae, Atelidae e Pitheciidae. Lee et al., (2011) descreveram a variante Pro<sup>8</sup>OXT para os gêneros *Aotus*, *Callithrix*, *Cebus*, e *Saimiri* da família Cebidae e também para o grupo externo Scandentia *Tupaia belangeri*. Ainda, os autores descreveram o gênero *Callicebus*

da família Pitheciidae como tendo Leu<sup>8</sup>OXT. Em 2015 nosso grupo de pesquisa ampliou o conhecimento da diversidade de variantes de OXT demonstrando abrangência da variante Pro<sup>8</sup>OXT em outros gêneros da família Cebidae (*Mico*, *Callimico*, *Cebuella* e *Leontopithecus*) (Vargas-Pinilla et al., 2015). Foi descrita a variante Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT para o gênero *Saguinus*. Na família Pitheciidae duas novas variantes foram também descritas, a Ala<sup>8</sup>OXT para *Cacajao melanocephalus* e *Chiropotes utahickae*, e a variante Thr<sup>8</sup>OXT para *Chiropotes albinasus* (Vargas-Pinilla et al., 2015), demonstrando assim uma ampla diversidade dentro de um grupo de espécies. Ren et al., (2015) demonstraram ainda a diversidade dentro da família Atelidae descrevendo a forma Leu<sup>8</sup>OXT para os gêneros *Brachyteles* e *Lagothrix*, Phe<sup>2</sup>OXT para o gênero *Alouatta* e Pro<sup>8</sup>OXT para o gênero *Ateles*. Em 2020, Campbell e Córtez-Ortiz aprofundaram o estudo da variabilidade na família Atelidae e descrevem a variante Val<sup>3</sup>OXT para a espécie *Alouatta sara* e substituições sinônimas com a variante Leu<sup>8</sup>OXT para *Alouatta palliata* e *Alouatta pigra*. Os autores encontraram ainda a variante Pro<sup>8</sup>OXT em *Ateles geoffroyi* e *Ateles fusciceps*.

### 1.3 GPCRs: Os receptores do sistema oxitocinérgico

Como visto, em mamíferos placentários, existem quatro tipos de receptores no sistema oxitocinérgico, o receptor de Oxitocina (OXTR), e três receptores de Vasopressina (AVPR1a, AVPR1b e AVPR2). Devido ao grau de homologia entre os receptores há possibilidade de ligação cruzada, ou seja, OXT é capaz de se ligar aos receptores de AVP assim como AVP é capaz de se ligar ao OXTR, porém com diferentes graus de afinidade e resposta na cascata de sinalização intracelular. Todos os quatro receptores do sistema são do tipo GPCR, uma das maiores famílias de receptores de proteínas ligadas à membrana no genoma humano (Grimmelikhujzn e Hauser, 2012; Koehbach et al., 2013). OXTR, AVPR1a, AVPR1b e AVPR2 mais especificamente pertencem à subclasse das  $\beta$  rodopsinas (Classe A), que até recentemente não possuíam uma estrutura de cristal bem definida. Receptores do tipo GPCR em geral são amplamente estudados por serem alvo de diversos fármacos e desempenharem importante papel na sinalização celular (Wacker et al., 2017). Possuem uma conformação padrão mas de tamanho variável, com uma região amino-terminal extracelular, sete domínios transmembranares (TM1-TM7), três alças

intracelulares (ICL1- ICL3) e três extracelulares (ECL1- ECL3) e uma alça carboxi-terminal intracelular (Rosenbaum et al., 2009). A cascata de sinalização celular destes receptores funciona de acordo com um modelo de ativação onde a partir da ativação do receptor pela ligação ao agonista, a cascata de ativação promove a ativação da proteína G e pode ativar duas vias distintas nestes receptores. No OXTR, AVPR1a e AVPR1b aumentam a atividade hidrolítica da fosfolipase C no fosfatil- inositol-bifosfato, o que promove a reação do inositol-trifosfato e diacilglicerol, que promovem a liberação do  $Ca^{++}$  intracelular estimulando as proteínas quinases C. Enquanto no AVPR2 temos a ativação da adenil ciclase e liberação de cAMP, o que resulta em uma maior atividade das proteínas quinase A. Com o recrutamento de proteínas do tipo  $\beta$ -arrestina, que promovem a internalização do receptor na membrana, há término da cascata de sinalização e direcionamento para vias de degradação ou reciclagem (Tovo-Rodrigues et al., 2014; Parreiras e Silva et al., 2017). A importância funcional destes receptores na modulação não apenas de características fisiológicas mas comportamentais tem sido demonstrada *in vitro* e *in vivo* (Cavanaugh et al., 2016; Parreiras-e-Silva et al., 2017; Mustoe et al., 2019). Em outro de nosso grupo de pesquisa, Paré et al., (2016), demonstraram a variabilidade destes 4 receptores, considerando o surgimento ou perda de motivos curtos de interação linear (SLIMs) em mamíferos, incluindo primatas.

O gene *OXTR* está localizado no cromossomo 3p25 em humanos e tem 3 exons gerando uma proteína de 389 aminoácidos que é expresso no sistema nervoso central e em tecidos periféricos. Desempenha um papel importante não só na modulação de características fisiológicas essenciais para a reprodução de mamíferos placentários como a contração uterina e a ejeção do leite, mas também na modulação de uma série de comportamentos como a afetividade e formação de casais. Num estudo de nosso grupo de pesquisa, Vargas-Pinilla et al., (2015) demonstraram que as formas táxon-específicas deste receptor estão em coevolução com as formas variantes de OXT (por exemplo, Pro<sup>8</sup>OXT) apresentando um padrão de variação compatível com sinais de seleção positiva no ramo dos primatas do Novo Mundo. Além disso, nosso grupo de pesquisa também investigou a presença de a variação interespecífica no número de elementos de resposta à progesterona (PREs) na região promotora de *OXTR* em 32 espécies de primatas, correlacionando esses dados genéticos com comportamento, sistemas sociais e ecologia/história de vida. Foi verificado que os PREs estavam presentes apenas em espécies de Platyrrhini e que o

número PREs estava significativamente correlacionado com a presença de cuidados paternos. Foi então sugerido que o número de PREs poderia ser também uma parte essencial do repertório genético que permitiu o surgimento de comportamentos sociais complexos específicos deste clado (Vargas-Pinilla et al., 2016), já comentados acima.

Os três receptores de AVP, por sua vez, apresentam funções e expressão distintas. O gene *AVPR1a* localizado no 12q14-q15 em humanos e possui 2 éxons e um produto final de 418 aminoácidos que é expresso no sistema nervoso central e em uma série de tecidos periféricos, tais como fígado, coração, rins e músculo esquelético. Possui amplo espectro de atuação na memória e reconhecimento social através da interação com neurohormônios, em especial AVP (Ren et al., 2014). Em uma série de estudos clássicos, a administração de um antagonista de AVPR1a em uma espécie monogâmica de roedores do campo (*Microtus ochrogaster*) demonstrou a importância deste receptor na formação de pares, sugerindo que a sinalização celular via AVPR1a é necessária para a formação e escolha de parceiros na monogamia social (Donaldson e Young, 2008). Polimorfismos na região promotora de *AVPR1a* denominada RS03, por sua vez, foram associados a um maior ou menor grau de sociabilidade, sensibilidade e ansiedade em bonobos e chimpanzés (Staes et al., 2014; Staes et al., 2016). Já *AVPR1b* localizado no cromossomo 1q32 em humanos possui 3 exons, traduzindo uma proteína de 424 aminoácidos. É expresso principalmente no sistema nervoso central atuando como um importante modulador do eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal (HPA), através de sua interação com AVP. Sendo assim, AVPR1b modula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico, regulando os níveis de cortisol plasmáticos e, conseqüentemente, mediando o controle de estresse e agressividade (Caldwell et al., 2008; Roper et al., 2011).

O gene *AVPR2* está localizado no cromossomo X e possui 3 exons que resultam em uma proteína de 371 aminoácidos que é expressa nos dutos coletores dos rins. Diferentemente dos demais receptores do sistema, o AVPR2 é o único receptor que não é expresso no sistema nervoso central. A importância do AVPR2 na regulação hipotalâmica-renal da água e da homeostase eletrolítica tornou-se evidente quando mutações no gene *AVPR2* foram associadas com diabetes insípida nefrogênica (DIN) e com a Síndrome da diurese inapropriada (SDI). Mutações no *AVPR2* causam perda de função do receptor e incapacidade de concentração da urina, poliúria e polidipsia, sendo já descrita em humanos,

camundongos, cães e cavalos (Luzius et al., 1992, Bösel et al., 2009; Terrillon et al., 2004). Bösel et al., (2009) analisando um conjunto grande de mamíferos que ocupam nichos diversos com acesso restrito ou amplo à água doce, sugeriram que o receptor AVPR2 é altamente conservado em sua estrutura de aminoácidos e propriedades funcionais. Ainda, observaram que embora alguns mamíferos tenham acesso ilimitado à água doce, não havia evidências de perda completa da função AVPR2 nesses ou em quaisquer outros mamíferos investigados, indicando que alguma atividade desse receptor é essencialmente necessária para a sobrevivência. Por outro lado, mudanças nas sequências de AVPR2 em marsupiais especialmente de clima árido resultariam em um ganho de função, podendo fornecer uma vantagem para manter a homeostase da água e eletrólitos (Bösel et al., 2009). Interessantemente, este ganho de função em alguns ortólogos incluindo marsupiais que habitam regiões mais áridas, leva ao aumento da atividade basal independente de AVP (Bösel et al., 2009). A importância de modificações neste receptor para adaptações a diferentes ambientes foi também destacada no trabalho de nosso grupo de pesquisa (Paré et al., 2016). Os autores descrevem a importância da presença da mutação 345R em AVPR2, o qual criava um motivo linear curto (DOC\_MAPK\_1) que modula o encaixe com proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), presente em uma espécie de roedor de clima árido, *Dipodomys ordii* (rato canguru). Sabe-se que este tipo de motivo de ligação está diretamente envolvidos com respostas celulares a uma variedade diversificada de estímulos, incluindo o estresse osmótico. Interessantemente, os receptores do sistema também já foram citados como sendo parte do repertório genético da domesticação animal. Noutro trabalho de pesquisa de nosso grupo, no qual participo (Fam et al., 2018), também foi demonstrado que quando comparados as taxas evolutivas destes receptores em conjuntos de espécies domesticadas com seus respectivos ancestrais selvagens, ou com espécies selvagens filogenéticas próximas, havia diferenças que puderam ser associadas a presença da seleção artificial no primeiro grupo (espécies domesticadas). Foi encontrado, inclusive, no AVPR2 pontos de convergência adaptativa entre espécies domesticadas filogeneticamente distantes, demonstrando que pressões seletivas no ambiente domesticado, caracterizado por disponibilidade de água e outros recursos, deixaram marcas similares no genoma desses animais.

Atualmente apenas 5 sequências de AVPR2 de pNM (*Aotus nancymae*, *Callithrix jacchus*, *Saimiri boliviensis*, *Sapajus apella* e *Cebus capucinus*) estão disponíveis nos

bancos públicos todas pertencente à família Cebidae, o qual contrasta com o conhecimento relativamente amplo que temos sobre a variabilidade táxon-específica dos demais receptores. Além disso, a área de distribuição destas espécies de primatas Platyrrhini é ampla, um verdadeiro mosaico de paisagens e ecossistemas. Como visto em itens anteriores da presente Tese, apesar de sua origem monofilética, estas espécies passaram por uma radiação adaptativa que permitiu a colonização de diferentes biomas dentro de um mesmo continente, abrangendo desde os áridos Cerrado e Caatinga até a úmida Floresta Amazônica. Conhecendo o papel de AVPR2 na homeostase da água e fenótipos relacionados, bem como trabalhos como o de Boselt et al., (2009) e de Fam et al., (2018), é possível especular que este receptor tenha tido algum papel na adaptação desses animais nesses biomas, onde a disponibilidade de água no ambiente é bastante diferente.



**Figura 1.** Esquema modificado a partir de Theofanopoulou et al. (2021) representando a variabilidade dos peptídeos homólogos no sistema oxitocinérgico ao longo da filogenia de Metazoa. Note que nova nomenclatura é proposta.

#### 1.4 A emergência de fenótipos comportamentais adaptativos em Platyrrhini

Diferentes estratégias reprodutivas emergiram em macacos do Novo Mundo, incluindo comportamentos sociais que são considerados raros não só entre primatas, mas entre mamíferos placentários em geral (Lukas e Clutton-Brock, 2013), tais como a presença de monogamia social (que ocorre somente em somente em ~6% das espécies de mamíferos) e a presença do cuidado paterno direto da prole, sendo também um comportamento muito

raro e ocorre somente entre 3 a 9% das espécies de mamíferos. Interessantemente, neste grupo restrito de primatas Platyrrhini a prevalência destes comportamentos reprodutivos raros é mais frequente. Por exemplo, a monogamia social chega a uma prevalência de 62% nas espécies Platyrrhini (Lukas e Clutton-Brock, 2013; French et al., 2016). Esse fato torna este grupo de organismos um interessante alvo de estudos que buscam revelar o repertório genético por trás da emergência destes traços comportamentais, reprodutivos e sociais com claro componente adaptativo.

A monogamia social é o termo utilizado para descrever a relação entre machos e fêmeas que ocupam um mesmo espaço e tempo de vida durante um ou mais períodos reprodutivos. Esta característica comportamental está presente em diferentes gêneros da família Cebidae, incluído os gêneros *Aotus*, *Callimico*, *Saguinus*, *Mico*, *Callithrix*, *Leontopithecus* e *Cebuella*. Espécies as quais são também caracterizadas pela presença do cuidado biparental da prole. Características as quais são de fundamental importância para o valor adaptativo da espécie, uma vez que estas apresentam também a presença de parto gemelar. Além disso, os indivíduos dessas espécies apresentam um tamanho corporal pequeno, onde a prole pode representar até 20% do tamanho da mãe. Ainda, os ciclos reprodutivos podem ser relativamente rápidos quando comparados com espécies de primatas de maior porte (Kamilar e Cooper, 2013). Desse modo, é possível sugerir que a presença da monogamia social e de um cuidado biparental (mãe e pai cuidando diretamente da prole) representam um ganho fundamental para a sobrevivência dos filhotes, em especial quando há nascimento de gêmeos (Kamillar e Cooper., 2013; Vargas-Pinilla et al., 2015; Ren et al., 2015).

Vale destacar que as espécies pertencentes à família Atelidae, assim como os gêneros *Cacajao* e *Chiropotes* da família Pitheciidae vivem em grandes grupos e são poligâmicos, com exceção dos gêneros *Plecturocebus* e *Callicebus* (também Pitheciidae) que apresentam monogamia social e cuidado paterno, mas sem a presença de parto gemelar (Izar et al., 2009; Vargas-Pinilla et al., 2015).

A importância das formas recentemente descritas de OXT, bem como das variações táxon-específicas observadas na região codificadora e/ou promotora de OXTR, AVPR1a e AVPR1b, na emergência destes fenótipos adaptativos vem sendo recentemente elucidado por nosso grupo de pesquisa (Vargas-Pinilla et al., 2015; 2017; Parreiras-e-Silva, et al.,

2017; Fam et al., 2017) e outros autores (Ren et al, 2014; 2015). Por exemplo, as formas Pro<sup>8</sup>OXT, presente em todos Cebidae já estudados, e Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT, característica dos *Saguinus*, foram recentemente testadas quanto a sua capacidade funcional pelo nosso grupo de investigação (Parreiras-e-Silva et al., 2017). Foi demonstrado através de ensaios *in vitro* que Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT e Pro<sup>8</sup>OXT, em comparação com Leu<sup>8</sup>OXT, são agonistas igualmente eficientes, quando comparadas com Leu<sup>8</sup>OXT, na mediação de rotas dependentes da proteína G, mas que apresentam uma capacidade reduzida para o recrutamento das  $\beta$ -arrestinas 1 e 2, diminuindo assim ou mesmo impedindo a internalização de OXTR, tendo assim um possível relevante impacto na dessensibilização de todo o sistema (Parreiras-e-Silva et al., 2017). *Saguinus* Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT também mostrou recrutamento reduzido de  $\beta$ -arrestinas após a interação com o receptor AVPR1a. A capacidade de ambas variantes estimular o cuidado paterno em ratos também foi mostrada no nosso estudo (Parreiras-e-Silva et al., 2017). Esses resultados apresentaram, pela primeira vez, um modelo natural para o conceito de agonismo com seletividade funcional (Costa-Neto et al., 2016), com prováveis implicações evolutivas (Parreiras-e-Silva et al., 2017). Os testes *in vivo*, por sua vez, foram realizados com as variantes OXT<sup>8</sup>Pro e Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT sintéticas administradas via spray intranasal em casais de ratos WTG (*Rattus norvegicus*). De acordo com parâmetros e protocolos para estudos de comportamento já bem definidos na literatura especializada, foi possível também observar um aumento do comportamento materno, bem como cuidados paternos incomuns em ratos, conforme medido por alguns dos testes aplicados (Parreiras-e-Silva et al., 2017). Futuros estudos ainda precisam elucidar o papel da funcionalidade das variantes OXT<sup>8</sup>Pro e Val<sup>3</sup>Pro<sup>8</sup>OXT considerando os receptores AVPR1b ou AVPR2.

### **1.5 Enzima Leucil-cistinil aminopeptidase (LNPEP) e seu papel no sistema oxitocinérgico**

A fim de ampliar o conhecimento sobre a rede do sistema oxitocinérgico, foi investigado na presente Tese o gene *LNPEP*, codificador da enzima Leucil-cistinil aminopeptidase (LNPEP). A enzima é também conhecida como IRAP (aminopeptidase regulada por insulina), CAP (cistinil aminopeptidase) ou P-LAP (leucina aminopeptidase

placentária) pois é expressa em diversos tecidos e foi identificada independentemente por diferentes grupos de pesquisa. LNPEP pertence à família M1 de aminopeptidases, um conjunto de enzimas funcionais que atuam nas porções N-terminais dos polipeptídeos. Tsujimoto e Hattori (2005) propuseram que as aminopeptidases derivadas de adipócitos (ERAP1 ou A-LAP) e aminopeptidases derivadas de leucócitos (ERAP2 ou L-RAP) deveriam ser agrupadas com a enzima LNPEP em um clado separado da família M1, denominado subfamília Oxitocinase, por causa da capacidade de clivar a ligação peptídica entre a cisteína N-terminal e os resíduos de tirosina adjacentes, que caracterizam OXT. Assim, a enzima LNPEP tem a capacidade de degradar não só OXT, mas outros outros pequenos peptídeos, como o AVP (Elkins et al., 2017).

Os neuro-hormônios OXT e AVP têm uma meia-vida de ~20 minutos e ~3 minutos no líquido cefalorraquidiano e no plasma respectivamente (Ludwig & Leng, 2006; Gazis, 1978; Elkins et al., 2017), de modo que o ritmo de sua degradação interfere na cascata de sinalização desencadeadas por eles. O LNPEP está presente na membrana na placenta, sendo sua atividade acentuada no período gestacional, embora permaneça baixa no primeiro trimestre sua atividade sérica aumenta progressivamente durante o segundo e terceiro trimestres, com atividade máxima próxima a data do parto, quando então declina rapidamente (Mizutani e Tomoda, 1996; Matsumoto et al., 2000), assim, a presença de LNPEP na placenta e no soro materno auxilia na manutenção de níveis adequados de OXT e AVP nos tecidos fetais, placentários e maternos.

Como visto em itens anteriores da presente Tese, os nonapeptídeos OXT e AVP são agentes uterotônico e vasoativo, de modo que os níveis crescentes de oxitocinases, tal como LNPEP, na circulação materna previnem contrações uterinas prematuras e controlam a pressão sanguínea materno-fetal (Tian et al., 2016). Os últimos autores chegaram a essa conclusão depois que observaram que os níveis séricos de LNPEP eram mais baixos entre mulheres com complicações hipertensivas na gravidez ou diabetes gestacional do que entre mulheres grávidas saudáveis, sendo que tais níveis eram extremamente baixos entre aqueles com morte fetal (Tian et al., 2016). Sendo assim, LNPEP seria um elemento fundamental na manutenção da homeostase da gravidez (Nomura et al., 2005; Tian et al., 2016).

No estudo de Elkins et al. (2017) onde o polipeptídeo homólogo com 53%-70% (dependendo do domínio) de identidade com a LNPEP humana foi isolado e sequenciado a

partir do tecido ovariano do peixe *Cyprinodon nevadensis*. Além disso, foi possível identificar transcritos em maior abundância em outros tecidos como gônadas, hipotálamo, prosencéfalo, tectum óptico, guelras e músculo esquelético de peixes adultos. Interessantemente, foi possível identificar uma maior quantidade de mRNA no hipotálamo de fêmeas e machos socialmente subordinados, e em menor abundância no telencéfalo de machos socialmente dominantes em comparação com as fêmeas dominantes, indicando uma associação entre o comportamento social e a abundância de transcritos de LNPEP hipotalâmicos. Esses achados ilustram a importância de LNPEP para a modulação de IST/VT dos ortólogos presentes em *Cyprinodon nevadensis*, por LNPEP contribuir no mecanismo pelo qual tais nonapeptídeos regulam o comportamento social nesta espécie (Elkins et al., 2017).

A estrutura do LNPEP contém, dentre outros, um motivo catalítico chamado GAMEN. Seu nome vem das letras iniciais (em inglês) dos aminoácidos que o compõe: Glicina - Alanina - Metionina - Ácido glutâmico – Asparagina; Ye et al, 2007). A fim de compreender o papel de GAMEN na ligação aos substratos peptídicos, Ye et al. (2007) realizaram um estudo funcional com mutações dirigida e demonstraram que os resíduos de glicina e alanina do motivo GAMEN são importantes para a ligação ao substratos enquanto os resíduos de metionina, ácido glutâmico e asparagina são essenciais para a atividade enzimática.

Embora a maioria dos mamíferos placentários tenha Leu<sup>8</sup>OXT, existem outras formas táxon-específicas de OXT em primatas Platyrrhini, como visto nos itens anteriores da presente Tese. Considerando que OXT e AVP são degradados por LNPEP, pode-se presumir que a enzima tenha um papel regulador influenciando nos níveis de OXT e/ou AVP disponíveis. Portanto, pode ser considerada como um elemento essencial na modulação da cascata de sinalização desses neuropeptídeos, seja em nível fisiológico, seja em nível comportamental, como de fato tem sido demonstrado (Nomura et al., 2005; Tian et al., 2016; Elkins et al., 2017). Embora o domínio catalítico GAMEN seja extremamente conservado em mamíferos, dados preliminares baseados em dados genômicos disponíveis) de nosso grupo de pesquisa indicaram que há variação em espécies de Platyrrhini (<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/202474/001101566.pdf?sequence=1&isAllowed=y>). Interessantemente, foi constatado que as mutações no motivo de ligação ao substrato são exclusivas de LNPEP, não sendo observadas nas duas outras enzimas da

subfamília Oxitocinase, ERAP1 e ERAP2. Não era sabido, no entanto, a extensão dessa variação, e se as variantes são táxon-específicas, e nem tampouco se há correspondência entre os domínios variantes de LNPE e as variantes de OXT em Platyrrhini. Por conta dessa falta de informação, dados originais foram gerados para a presente Tese, buscando identificar a extensão da variação deste domínio em Platyrrhini.

## CAPÍTULO II

### **2. Justificativa**

Moorjani et al. (2016) constataram que os genomas nucleares de Platyrrhini tinham, em média, uma taxa mutacional 1,64 vezes mais rápida que os demais primatas. Como descrito na Introdução da presente Tese, as variantes táxon-específicas encontradas em alguns dos genes do sistema oxitocinérgico ilustram bem tais fenômenos. Na presente Tese buscou-se expandir o conhecimento sobre o sistema e o complexo repertório genético por trás de fenótipos adaptativos como o comportamento social de primatas, a fim de fornecer um panorama mais completo sobre o sistema. Além disso buscamos compreender ainda a importância do sistema na modulação fisiológica da homeostasia das espécies analisadas. Para tal, os objetivos abaixo foram elencados:

## 2.1 Objetivo geral

Ampliar o conhecimento sobre a variabilidade de genes do sistema oxitocinérgico e seus produtos em espécies de Platyrrhini buscando compreender seu papel na emergência de fenótipos adaptativos.

## 2.2 Objetivos específicos

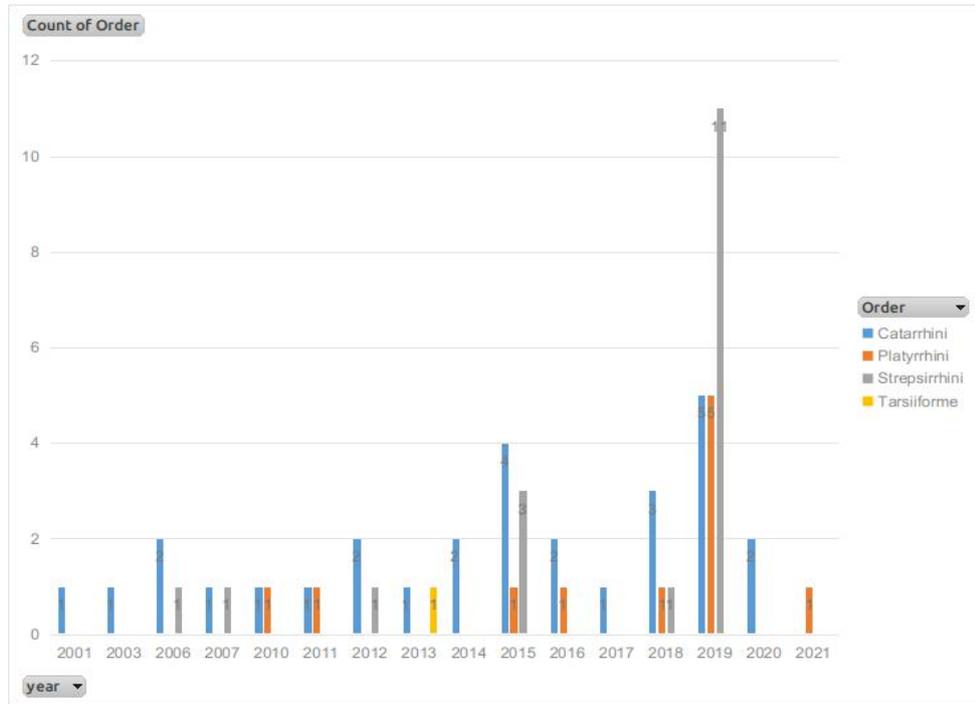
- 2.2.1. Caracterizar em nível molecular o gene *AVPR1b*, bem como seu produto, para identificar variabilidade em Platyrrhini. Avaliar se as variações encontradas estão conectadas à emergência de fenótipos comportamentais adaptativos nas espécies investigadas;
- 2.2.2. Caracterizar em nível molecular o gene *AVPR2*, bem como seu produto, para identificar variabilidade em Platyrrhini. Avaliar se as variações encontradas estão conectadas à emergência de fenótipos fisiológicos adaptativos que emergiram durante a colonização de diferentes nichos por estes primatas.
- 2.2.3. Fazer a caracterização molecular do motivo catalítico GAMEN de LNPEP em espécies Platyrrhini buscando identificar variações que possam estar correlacionadas com processos de degradação das formas táxon-específicas de OXT encontradas nesses primatas.

## CAPÍTULO III

### **3. Resultados. Considerações gerais**

O papel da OXT como o “o grande facilitador da vida” ou “o hormônio do amor” é amplamente conhecido desde o início do século. Devido a grande importância do sistema oxitocinérgico para a manutenção da vida, pelas suas funções fisiológicas ligadas à reprodução e à homeostasia e também à modulação de uma gama de comportamentos sociais complexos este sistema neurohormonal tem sido amplamente estudado. Com o aumento de informações sobre o repertório genético de diferentes espécies animais ao longo das últimas décadas foi possível traçar um panorama sobre a história evolutiva deste sistema e compreender melhor a sua diversidade e a sua importância nestes grupos. Foi a partir dos anos 2000 com o aumento do número de genomas disponíveis em bancos de dados públicos que os pesquisadores começaram a ter acesso real aos enigmas da biodiversidade. A Figura 2 exemplifica uma pequena parcela deste aumento exponencial de informação biológica disponível, representando o aumento do número de genomas de primatas depositados no banco de dados público Genbank nos últimos vinte anos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Além disso, a presente Tese traz dados originais dos genes de interesse em espécies de Platyrrhini cujos genomas não são conhecidos.

Os resultados que serão apresentados estão em formato de artigos científicos (Capítulos IV, V e VI). Ali poderão ser conferidos as metodologias usadas para que os 3 principais objetivos apresentados no Capítulo II pudessem ser atingidos. Outros resultados, obtidos durante o período de desenvolvimento da presente Tese, também serão apresentados nos Capítulos posteriores.



**Figura 2.** Gráfico representando o número de genomas de primatas publicados no Genbank por clado ao longo dos últimos vinte anos.

## CAPÍTULO IV

### **4. Resultados. Variabilidade do receptor AVPR1b e a emergência de fenótipos adaptativos em primatas Platyrrhini**

A fim de ampliar o conhecimento sobre a variabilidade do receptor AVPR1b em Platyrrhini o presente estudo promoveu o sequenciamento da região codificante de vinte espécies de primatas das famílias Cebidae, Atelidae e Pitheciidae. Com isso, aumentamos a representatividade do conhecimento deste clado. O estudo promoveu análises evolutivas, predições de motivos de ligação e análises estatísticas de associação com fenótipos relacionados ao sistema OXT-AVP como a emergência do cuidado paterno, monogamia social e presença de parto gemelar.

O artigo completo está disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajp.23028>

Fam BSO, Reales G, Vargas-Pinilla P, Paré P, Viscardi LH, Sortica VA, Felkl AB, O. Franco Á, Lucion AB, Costa-Neto CM, Pissinatti A, Salzano FM, Paixão-Côrtes VR, Bortolini MC (2019) **AVPR1b variation and the emergence of adaptive phenotypes in Platyrrhini primates**. Am J Primatol. doi: 10.1002/ajp.23028.

Páginas 32 a 42 não disponíveis nesta versão

## CAPÍTULO V

### **5. Resultados. O papel do receptor AVPR2 na osmorregulação e sua variabilidade em primatas Platyrrhini (primeira versão do manuscrito)**

Neste capítulo da Tese apresentamos o estudo em que sequenciamos a região codificadora do receptor de vasopressina AVPR2 de trinta e oito espécies de primatas Platyrrhini e analisamos sua variabilidade de acordo com a distribuição espacial das espécies e as particularidades climáticas, considerando temperatura e precipitação. Buscamos assim identificar se variantes táxon-específica teriam algum papel na ocupação de diferentes nichos e ao longo da radiação adaptativa destes primatas.

Páginas 44 a 94 não disponíveis nesta versão

## CAPÍTULO VI

### **6. Resultados. Processos coevolutivos no sistema oxitocinérgico**

A fim de contribuir com novas informações sobre o sistema oxitocinérgico e continuar elucidando os processos evolutivos que levaram às inovações adaptativas em primatas Platyrrhini, neste estudo dados orginais foram gerados sobre a região codificante do genes *OXT*, *OXTR* e *LNPEP*

Páginas 96 a 146 não disponíveis nesta versão

## CAPÍTULO VII

### 7. Considerações finais e perspectivas

O papel da OXT é amplamente conhecido, e tem sido referido como “o grande facilitador da vida” pela sua atuação em diferentes aspectos que permeiam a reprodução em espécies animais. Tanto OXT quanto, a molécula paráloga AVP, modulam fenótipos básicos da fisiologia reprodutiva e também traços comportamentais complexos. Além disso, pelo menos um dos receptores do sistema (AVPR2) modula a ação do ligante AVP agindo em uma das funções biológicas básicas modulando a osmorregulação animal. Por conta dessa importância, o sistema oxitocinérgico é amplamente estudado pela comunidade científica. Por exemplo, numa rápida busca no PubMed com a palavra chave “oxytocin” 14.359 artigos científicos foram publicados desde o ano 2000, uma média de 650 artigos científicos por ano. O aumento de informações sobre o repertório genético de diferentes espécies animais conforme discutido no Capítulo I da presente Tese ao longo das últimas duas décadas foi em parte devido ao aumento do número de genomas disponíveis em bancos de dados públicos, cujos dados os pesquisadores começaram a ter acesso. Nosso grupo de pesquisa ao longo dos últimos 7 anos tem contribuído com esse conhecimento, gerando dados originais especificamente sobre a região codificadora de genes do sistema oxitocinérgico, considerando um grande número de espécies de primatas da parvorder Platyrrhini, cujos genomas completos ainda não estão disponíveis. Porém desvendar e compreender o papel de cada molécula do sistema oxitocinérgico, suas interações, bem como as diferentes nuances relativo as suas conexões com fenótipos adaptativos complexos em clados específicos não é uma tarefa trivial, sendo um grande desafio que se impõe. Assim, a presente tese busca seguir cobrindo as lacunas do conhecimento sobre o sistema oxitocinérgico em primatas Platyrrhini, fornecendo informações sobre a variabilidade de genes codificantes do sistema em espécies de animais não modelo e com baixa representatividade em bancos de dados. Fomentando assim a ciência de base e o conhecimento sobre a diversidade da fauna neotropical.

No Capítulo IV da presente Tese apresentamos os resultados da investigação sobre a variabilidade do receptor de vasopressina denominado AVPR1b. Este receptor que é expresso principalmente no SNC e modula o eixo HPA, está relacionado principalmente à modulação do estresse e da agressividade. Até nosso referido estudo (Fam et al., 2019), dados de apenas 5 espécies de primatas Platyrrhini, todos de uma mesma família (Cebidae), estavam disponíveis em bancos públicos e/ou na literatura. Conseguimos ampliar a representatividade, gerando dados originais para espécies das famílias Atelidae e Pitheciidae. Conforme discutido no Capítulo IV a variabilidade do receptor AVPR1b foi associado a emergência de comportamentos sociais raros em primatas neotropicais. O estudo da variabilidade de comportamento sociais é extremamente interessante em um contexto em que sabemos da relevância da rede de genes na modulação destes comportamentos e também na modulação do eixo HPA pelo receptor AVPR1b. Assim, ao reconhecer a diversidade deste receptor em outras espécies de primatas não humanos e organismos não modelos expande a possibilidade de novos estudos *in silico* e *in vitro* para compreendermos o perfil dos diferentes ligantes do sistema.

De maneira semelhante no Capítulo V ampliamos o conhecimento sobre o receptor AVPR2 para mais espécies de primatas Platyrrhini fornecendo um panorama das variantes táxon-específica de todas as três famílias, Atelidae, Cebidae e Pitheciidae. Buscou-se identificar se a variabilidade deste receptor teve papel na radiação adaptativa desses primatas, bem como a consequente ocupação de diferentes nichos ou foi acompanhada de “sinais” genéticos e evolutivos em AVPR2 que poderiam estar relacionados a modulação da osmorregulação. Conforme discutido no Capítulo V o receptor apresenta sítios específicos de extrema importância para modulação de afinidade como ligante ou de manutenção da estrutura do receptor do mesmo na membrana para manter uma adequada sinalização permitindo a homeostasia dos organismos. Variações tem sido reportadas em sítios específicos em humanos como sendo parte do repertório de síndromes como o Diabetes insípido congênito e a diurese inapropriada, porém em primatas os mesmos sítios tem apresentado sinais de variabilidade e sinais de coevolução. Esta variabilidade em sítios funcionais pode representar estratégia importante em espécies que ocupam diferentes nichos tanto em regiões de florestas tropicais quanto em ambientes mais secos como cerrado e até

regiões áridas como a Caatinga. Contribuímos assim com dados que permitem novos estudos *in silico* e *in vitro* expandido as perspectivas dos estudos com este receptor.

No Capítulo VI da presente Tese buscamos elucidar o papel das variantes de oxitocina e da aminopeptidase LNPEP, que atua degradando principalmente OXT, sendo assim, um importante elemento regulador da atividade do sistema oxitocinérgico. Dados originais foram gerados para o exon 6 do motivo catalítico de LNPEP, assim como dados novos para OXT. Uma extraordinária variabilidade foi detectada, estando ela em co-evolução com variantes de OXT e OXTR. Este novo estudo gera novas possibilidades para compreender a modulação do sistema através da degradação do peptídeo circulante, a medida que reconhecemos a diversidade molecular do peptídeo seu receptor e a respectiva peptidase, analisando o processo coevolutivo entre estas moléculas.

Considerando ainda a história evolutiva de primatas o Anexo I da presente Tese apresenta um manuscrito que traz a história demográfica e evolutiva de uma população extremamente interessante de macacos prego da espécie *Sapajus libidinosus* que habitam o Parque da Serra da Capivara (Piauí), localizado no bioma semi-árido da Caatinga. Esta população extremamente adaptada ao clima seco desenvolveu habilidades únicas de utilizar ferramentas líticas. O estudo referido apresenta o primeiro conjunto de dados genéticos (mtDNA, *CYTB*) desta população. Com esses dados foi possível identificar a história demográfica, mediada pelas fêmeas, dessa população, que foi discutida em contexto de modelos de distribuição de nicho, considerando espécies de plantas, cujos frutos, sementes e raízes são processadas com o uso de ferramentas pelos macacos prego *Sapajus libidinosus*. No momento, mais dados genéticos dessa população estão sendo obtidos, incluindo de 10 loci de microsatélites, um sistema biparental, que serão utilizados para comparar com os resultados obtidos com o *CYTB*. Dessa forma, será possível identificar parâmetros demográficos diferenciados, caso eles existam, considerando machos e fêmeas. Além disso, será possível estimar relações precisas de parentesco e definir o sucesso reprodutivo dos adultos mais hábeis no uso de ferramentas, que são aqueles mais observados pelos jovens aprendizes.

Em sistemas complexos como o sistema oxitocinérgico outros genes podem interagir na cascata de sinalização, conforme discutido no Anexo II da presente Tese.

Um dos trabalhos anexos, em colaboração com demais colegas de grupo do LEHM (Paré et al., 2021), a pesquisa buscou investigar o papel do receptor da Prolactina em mamíferos placentários e marsupiais na modulação de comportamentos reprodutivos. Dados originais foram gerados e as diferenças entre marsupiais e mamíferos placentários foram discutidos.

De maneira geral os capítulos acima citados contribuem de maneira significativa para o conhecimento genético do patrimônio natural da fauna brasileira, particularmente de primatas, contribuído com o conhecimento sobre a história evolutiva de espécies nativas, muitas delas raras e ameaçadas as quais ocupam os mais diversos Biomas Brasileiros, Floresta Amazônica, Floresta Atlântica, Cerrado e Caatinga. Buscamos assim ampliar o conhecimento a respeito da diversidade genética desses animais, enriquecendo o conhecimento científico sobre temas desafiadores tais como relação entre repertório genético e fenótipos adaptativos, bem como o papel da cultura como agente catalizador da evolução de uma espécie de primata não humano (*Sapajus libidinosus*). Ressaltamos ainda que tal tipo de conhecimento também pode ser útil para dar visibilidade a estes animais no contexto de sua preservação e dos biomas a estes relacionados.

Considerando que a presente Tese foi escrita em momento histórico (e dramático) para o Brasil e para a humanidade como um todo, nosso grupo de pesquisa também contribuiu respondendo a questionamentos pertinentes frente a desafios impostos, utilizando abordagens evolutivas. Neste sentido o Anexo III surge em resposta à epidemia de Zika vírus no Brasil e contribui com dados inéditos ainda da região do exon 6 do gene *STAT2*, proteína de resposta viral. Buscamos identificar padrões genéticos por trás das diferentes respostas à infecção por flavivírus em clado de mamíferos suscetíveis (primatas) e não suscetíveis (roedores) (Landau et al., 2021).

De maneira semelhante os estudos apresentados nos Anexo IV e Anexo V da presente Tese surgem em resposta aos desafios da pandemia de SARS-CoV-2 (Fam et al., 2020). Buscamos comparar a molécula receptora do vírus no hospedeiro, ACE2, em diferentes espécies de mamíferos placentários, considerando ainda populações humanas. Os dados ali publicados, corroborados por estudos posteriores e a própria dinâmica da pandemia da Covid-19, indicavam que as populações humanas seriam suscetíveis, pelo

menos considerando a molécula ACE2, já que não havia importante diversidade em sítios de ligação com a proteína Spike viral. Desse modo, se diferenças populacionais quanto a desfechos clínicos e de infecção eram observadas, seriam devido a outros fatores, tais como resposta imunológica inata, bem como métodos de controle e prevenção da disseminação do patógeno.

Mais recentemente em Yépez et al. (2022), também contribuimos com uma visão abrangente sobre a trajetória evolutiva da variante P.1 (Gamma) do SARS-CoV-2 e como fenômenos tais como epistasia e pleiotropia antagônica poderia limitar o surgimento de novos alelos (e combinações deles) em linhagens SARS-COV-2, mantendo a infectividade em humanos, enquanto fornece capacidades de resposta rápida para enfrentar a corrida armamentista desencadeada pelas respostas imunes do hospedeiro.

## 8. Referência Bibliográfica

- Archer, R., Chauvet, J., Chauvet, M. T. (1995). Man and the chimaera. Selective versus neutral oxytocin evolution. *Adv Exp Med Bio*, 395, 615-27.
- Bond M, Tejedor MF, Campbell KE, Chornogubsky L, Novo N and Goin F (2015) Eocene primates of South America and the African origins of New World monkeys. *Nature* 520:538–541. doi: 10.1038/nature14120
- Böselt I, Römpler H, Hermsdorf T, Thor D, Busch W, Schulz A and Schöneberg T (2009) Involvement of the V2 vasopressin receptor in adaptation to limited water supply. *PLoS One* 4:e5573
- Caldwell, H. K., Wersinger, S. R., Young, W. S. (2008). The role of the vasopressin 1b receptor in aggression and other social behaviours. *Prog Brain Res*. 170, 65–72.
- Campbell SK and Cortés-Ortiz L (2021) Oxytocin amino acid variation within Neotropical primates: new genetic variants in hormone and receptor sequences and evidence for evolutionary forces driving this unexpected diversity. *Biological Journal of the Linnean Society* 132:211–220. doi: 10.1093/biolinnean/blaa173
- 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
- Costa-Neto, C. M., Parreiras-Silva, L. T. Bouvier, M. (2016). A Pluridimensional View of Biased Agonism. *Mol Pharmacol*.90, 587-595.
- Di Giglio, M. J., Muttenthaler, M., Harpsoe, K., Liutkeviciute, Z., et al. (2017). Development of a human vasopressin V1a-receptor antagonist from an evolutionary-related insect neuropeptide. *Sci Rep*. 7:41002, 1-15.
- Donaldson Z. R., Young L. J. (2008). Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science*.322 (5903):900-904.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797.
- Fernández-Duque, E.; Valeggia, C. R.; Mendoza, S. P. (2009). The biology of paternal care in human and nonhuman primates. *Annual Review of Anthropology*.38, 115–130.
- French, J. A., Taylor, J. H., Mustoe, A. C., Cavanaugh, J. (2016). Neuropeptide diversity and the regulation of social behavior in New World primates. *Frontiers in Neuroendocrinology*.42, 18-39.
- Galhardo RS, Hastings PJ and Rosenberg SM (2007) Mutation as a Stress Response and the Regulation of Evolvability. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42:399–435. doi: 10.1080/10409230701648502
- Gimpl, G., Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*.8, 2,629-83.
- Grimmelikhujzn, C. j. P., Hauser, F. (2012). Mini-review: The evolution of neuropeptide signaling. *Reg Pept*.177, 56-59.
- Herlyn H (2016) The phylogenetic system of primates - character evolution in the light of a consolidated tree. *Organisms Diversity & Evolution*. doi: 10.1007/s13127-016-0279-1
- Hodgson JA, Sterner KN, Matthews LJ, Burrell AS, Jani RA, Raaum RL, Stewart C-B and Disotell TR (2009) Successive radiations, not stasis, in the South American primate fauna. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5534–5539. doi: 10.1073/pnas.0810346106

- Izar, P., Stone, A., Carnegi, S., Nakai, E. S. (2009) Sexual Selection, Femal Choice and Mating Systems. In P. A.Garber, A.Estrada, J. C. Bicca-Marques, E. W. Heymann & K. B. Strier (Eds.) *South American Primates* (pp. 157-189). New York, NY: Springer New York.
- Kamilar J. M., Cooper N.(2013). Phylogenetic signal in primate behavior, ecology and life history.*Phil Trans R Soc B*. 386, 1-10.
- Koehbach, J., Stockner, T., Bergmayr, C., Muttenthaler, M., & Gruber, C. W. (2013). Insights into the molecular evolution of oxytocin receptor ligand binding. *Biochemical Society Transactions*.41, 197–204.
- Koshimizu, T., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., & Tanoue, A. (2012). Vasopressin V1a and V1b receptors: From molecules to physiological systems. *Physiological Reviews*.92, 1813–1864.
- Lee, A. G., Cool, D. R., Grunwald, W. C., Neal, D. E., Buckmaster, C. L., Cheng, M. Y., et al. (2011). A novel form of oxytocin in New World monkeys. *Biology Letters*.7, 584–587.
- Lukas, D., Clutton-Brock, T. H. (2013). The Evolution of Social Monogamy. *Science*. 341, 526-530.
- Lynch Alfaro JW, Cortés-Ortiz L, Di Fiore A and Boubli JP (2015) Special issue: Comparative biogeography of Neotropical primates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 82:518–529. doi: 10.1016/j.ympev.2014.09.027
- Martincorena I, Seshasayee ASN and Luscombe NM (2012) Evidence of non-random mutation rates suggests an evolutionary risk management strategy. *Nature* 485:95–98. doi: 10.1038/nature10995
- Mustoe A, Schulte NA, Taylor JH, French JA and Toews ML (2019) Leu8 and Pro8 oxytocin agonism differs across human, macaque, and marmoset vasopressin 1a receptors. *Sci Rep* 9:15480. doi: 10.1038/s41598-019-52024-9
- Montgomery SH and Mundy NI (2013) Parallel episodes of phyletic dwarfism in callitrichid and cheirogaleid primates. *J Evol Biol* 26:810–819. doi: 10.1111/jeb.12097
- Paul S, Million-Weaver S, Chattopadhyay S, Sokurenko E and Merrikh H (2013) Accelerated gene evolution through replication-transcription conflicts. *Nature* 495:512–515. doi: 10.1038/nature11989
- Paré, P., Paixão-Côrtes, V. R., Tovo-Rodrigues, L., et al. (2016). Oxytocin and arginine vasopressin receptor evolution: implications for adaptive novelties in placental mammals. *Genet Mol Biol*.
- Parreiras-e-Silva, L. T., Vargas-Pinilla, P., Duarte, D. A., Longo, D., Espinoza Pardo, G. V., Dolor Finkler, A., Bortolini, M. C. et al. (2017). Functional New World monkey oxytocin forms elicit an altered signaling profile and promotes parental care in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*.114, 9044-9049.
- Perelman, P., Johnson, W. E., Roos, C., Seuánez, H. N., Horvath, J. E., Moreira, M. A. M., Pecon-Slattery, J. et al.(2011). A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genetics*.7, 1–17.
- Perez SI, Tejedor MF, Novo NM and Aristide L (2013) Divergence Times and the Evolutionary Radiation of New World Monkeys (Platyrrhini, Primates): An Analysis of Fossil and Molecular Data. *PLOS ONE* 8:e68029. doi: 10.1371/journal.pone.0068029
- R Development Core Team. (2010). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. Retrieved from <http://www.r-project.org>.

- Ren, D., Chin, K., French, J. A. (2014). Molecular Variation in AVP and AVPR1a in New World Monkeys (Primates, Platyrrhini): Evolution and Implications for Social Monogamy. *PLOS one*. 9(10) e111638.
- Ren, D., Lu, G., Moriyama, H., Mustoe, A. C. (2015). Genetic diversity in oxytocin ligands and receptors in New World Monkeys. *PLoS One*. 10, e0125775.
- Roper, J., O'Carroll, A.-M., Young, W., & Lolait, S. (2011). The vasopressin Avpr1b receptor: molecular and pharmacological studies. *Stress*. 14, 98–115.
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 459, 356–363.
- Rosenberger, A. L., Tejedor, M. F., Cooke, S. B. (2009) Platyrrhine Ecophylogenetics in Space and Time. In P. A. Garber, A. Estrada, J. C. Bicca-Marques, E. W. Heymann & K. B. Strier (Eds.) *South American Primates* (pp. 69-113). New York, NY: Springer New York.
- Rosenberg SM (2001) Evolving responsively: adaptive mutation. *Nat Rev Genet* 2:504–515. doi: 10.1038/35080556
- Seiffert ER, Tejedor MF, Fleagle JG, Novo NM, Cornejo FM, Bond M, Vries D de and Campbell Jr KE (2020) A parapatric stem anthropoid of African origin in the Paleogene of South America. *Science*. doi: 10.1126/science.aba1135
- Staes, N., Stevens, J. M. G., Helsen, P., Hillyer, M., Korody, M., & Eens, M. (2014). Oxytocin and Vasopressin Receptor Gene Variation as a Proximate Base for Inter- and Intraspecific Behavioral Differences in Bonobos and Chimpanzees. *PLOS one*, 9(11).
- Staes, N., Weiss, A., Helsen, P., Korody, M., Eens, M., & Stevens, J. M. G. (2016). Bonobo personality traits are heritable and associated with vasopressin receptor gene 1a variation. *Scientific Reports*. 6, 38193.
- Schneider, H., Sampaio, I. (2015). The systematics and evolution of New World primates - A review. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 348–357.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30, 2725–2729.
- Taylor, J. H.; Intorre, A. A.; French, J. (2017). Vasopressin and Oxytocin Reduce Food Sharing Behavior in Male, but not Female in Family Groups. *Front End*. 8, 181, 1-9.
- Theofanopoulou C, Gedman G, Cahill JA, Boeckx C and Jarvis ED (2021) Universal nomenclature for oxytocin–vasotocin ligand and receptor families. *Nature* 592:747–755. doi: 10.1038/s41586-020-03040-7
- Terrillon, S., Barberis, C., & Bouvier, M. (2004). Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with  $\beta$ -arrestin and their trafficking patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 101, 1548–1553.
- Tovo-Rodrigues, L., Roux, A., Hutz, M. H., Rohd, L. A., Woods, A. S. (2014). Functional characterization of G-protein-coupled receptors: A bioinformatics approach. *Neuroscience*. 1-16.
- Vargas-Pinilla, P., Paixão-Côrtes, V. R., Paré, P., Tovo-Rodrigues, L., Vieira, C. M. de A. G., Xavier, A., Bortolini, M. C., et al. (2015). Evolutionary pattern in the OXT-OXTR system in primates: Coevolution and positive selection footprints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA*. 112, 88–93.

- Vargas-Pinilla, P., Babb, P., Nunes, L., Paré, P., Rosa, G., Felkl, A., Bortolini, M. C., et al. (2017). Progesterone response element variation in the OXTR promoter region and paternal care in New World monkeys. *Behavior Genetics*, 47, 77-87
- Yamashita, K., Kitano, T. (2013). Molecular evolution of the oxytocin-oxytocin receptor system in eutherians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.67, 520–528.
- Yang, Z. (1998). Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. *Molecular Biology and Evolution*.15, 568–573.
- Yang, Z. (2007). PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput. Appl. Biosci.* 24, 1586-1591.
- Yang, Z. (2009). User Guide PAML : Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. *Molecular Biology and Evolution*.
- Young, L.J. Flanagan-Cato, L.M. (2012). Oxytocin, vasopressin and social behavior. *Hormones and Behavior*.61,3, 227-229,
- Wacker, D., Stevens, R. C., Roth, B. (2017). How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell*. 170, 414-427

## CAPÍTULO IX

### **9. Anexo I: Evolutionary and demographic history of the most skilled tool-handling Platyrrhini monkey: *Sapajus libidinosus* from Serra da Capivara National Park, Brazil**

Bibiana Fam<sup>a,1</sup>, Camile Cantele<sup>a,1</sup>, Tiago Falótico<sup>b</sup>, Lucca Fanti<sup>a</sup>, Luane Landau<sup>a</sup>, Lucas Henriques Viscardi<sup>a,c</sup>, Pedro Vargas-Pinilla<sup>a,d</sup>, Ossman Barrientos-Díaz<sup>a</sup>, Pedro Dornelles de Castro<sup>a</sup>, Alcides Pissinatti<sup>e</sup>, Vinicius A. Sortica<sup>a,f</sup>, Eduardo B. Ottoni<sup>g</sup>, Ana Lúcia A. Segatto<sup>h</sup>, Andreia Carina Turchetto-Zollet<sup>a</sup>, and Maria Cátira Bortolini<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>b</sup>Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, 03828-000 São Paulo, SP, Brazil;

<sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Escola de Medicina, Universidade Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>d</sup>Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil;

<sup>e</sup>Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, 20940-200 Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

<sup>f</sup>Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 01246-903 São Paulo, SP, Brazil;

<sup>g</sup>Departamento de Psicologia Experimental, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 05508-030 São Paulo, SP, Brazil;

<sup>h</sup>Departamento de Ensino, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, 95043-700 Caxias do Sul, RS, Brazil;

<sup>1</sup>B.F. and C.C. contributed equally to this work.

Páginas 157 a 195 não disponíveis nesta versão

## CAPÍTULO X

### **10. Anexo II: Molecular evolutionary insights from PRLR in mammals**

disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648021000848?via%3Dihub>

## CAPÍTULO XI

### **11. Anexo III: Evolutionary analysis of the antiviral *STAT2* gene os primates and rodents signature of different stages of an arm race**

disponível em :

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134821003282?via%3Dihub>

## CAPÍTULO XII

### **12. Anexo IV. ACE2 diversity in placental mammals reveals the evolutionary strategy of SARS-CoV2**

Neste estudo a análise da diversidade da proteína transmembranar ACE2 em 70 mamíferos placentários e em diferentes populações humanas revelou interessantes padrões nos domínios de ligação viral que permitem compreender os padrões de dispersão do vírus entre as diferentes populações humanas e o spillover entre as diferentes espécies de vertebrados.

Os dados analisados estão disponíveis em:

<https://www.scielo.br/j/gmb/a/RwFWyQFV8XnXyx4y8cCpdbk/?lang=en>

Páginas 201 a 211 não disponíveis nesta versão

## CAPÍTULO XIII

### **13. Anexo V: Evolutionary history of the SARS-Cov2 Gamma variant of concern (P.1: a perfect storm)**

disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648021000848?via%3Dihub>