

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO BACHARELADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Gabrielle Rosa Silva

Porto Alegre, 2016.

GABRIELLE ROSA SILVA

A variabilidade da região promotora do gene *OXTR* na evolução do comportamento social de primatas.

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aluna: Gabrielle Rosa Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cátira Bortolini

Coorientador: Me. Pedro Vargas-Pinilla

Porto Alegre, 2016.

A variabilidade da região promotora do gene *OXTR* na evolução do comportamento social de primatas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cátira Bortolini

Coorientador: Me. Pedro Vargas-Pinilla

Banca examinadora:

Dra. Gislene Lopes Gonçalves

Dra. Eliane Bandinelli

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado em 23 de junho de 2016.

Porto Alegre, julho de 2016.

Dedico este trabalho à minha sobrinha e
afilhada Ana Valentina, minha pequena e
adorável cientista, e ao meu novo
sobrinho, que nascerá em dezembro deste
ano.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Maria Cátira Bortolini, não apenas por ter me auxiliado da melhor maneira possível ao longo deste trabalho, mas também por ter permitido que eu fizesse parte desse grupo de pesquisa. Suas críticas foram sempre construtivas e me proporcionaram um enorme aprendizado.

Ao meu coorientador, Pedro Vargas-Pinilla, que me apresentou ao Laboratório de Evolução Humana e Molecular. Sou grata pela paciência inicial e também pela exigência contínua. E posso dizer agora que foram proveitosos os momentos em que ele apenas me deixava tentando responder sozinha a qualquer questão.

Ao Leandro Nunes, meu companheiro de laboratório. Ainda que ele seja, devo dizer, uma pessoa potencialmente irritante, nossas discussões sobre os mais diversos temas sempre me foram muito caras. Além disso, foi minha dupla nos trabalhos de bancada, atividade para a qual formamos a melhor equipe já vista neste mundo – mesmo quando errávamos o protocolo, o que acontecia com assombrosa frequência. Ele me acompanhou, também, nas intermináveis reconstruções *in silico* e ainda lia, pela madrugada, dúvidas remanescentes. Me encorajou diversas vezes, da sua maneira nada convencional de encorajar, e conseguiu me fazer rir e me manter calma em muitos momentos difíceis deste trabalho de conclusão.

A todos os outros integrantes do Laboratório de Evolução Humana e Molecular por proporcionarem um ótimo ambiente para quem quer debater Ciência, repleto de pesquisadores competentes, acessíveis e com um grande senso de humor. Agradeço a eles também por toda a ajuda e atenção que me foram concedidas.

Ao meu, digamos, time de sustentação psicológica: Ana Mastella, Antônia Pesenti, Carolina Ruggeri, Fany Nicilovitz, Marcos Schilling, Pietro Rebelo Casagrande, Renato Pincelli, Brenda e Boni. Nesse grupo estão alguns dos seres mais divertidos, brilhantemente criativos e amorosos que conheço. Coincidentemente, são também meus melhores amigos.

Por fim, mas acima de tudo, aos meus amados pais, Odila e Celso, irmãos, Daniele e Eduardo, e sobrinha, Ana Valentina: muito obrigada pelo apoio constante e muito obrigada pelo carinho, inclusive aqueles demonstrados em pequenos (grandes) gestos. Mãe e pai: não tenho como agradecer suficientemente a vocês dentro os limites desta página por todo o genuíno amor que recebi a vida inteira, mas saibam que vocês são os responsáveis diretos por eu ter chegado até aqui. Eu verdadeiramente amo vocês dois.

RESUMO

A monogamia social e o cuidado paternal são fenótipos considerados raros na ordem Primata, embora a presença desses comportamentos seja generalizada na subfamília Callitrichinae (Família Cebidae, Parvordem Platyrrhini). Nosso grupo de pesquisa já havia identificado substituições em relação à sequência de consenso de OXT na parvordem Platyrrhini (Primatas do Novo Mundo) e possível coevolução com seu receptor, OXTR. Outros estudos confirmaram nossos resultados e verificaram também variações interespecíficas na região promotora regulatória do gene *OXTR*. No presente trabalho, a variabilidade da região promotora de *OXTR* em sete famílias de primatas foi relacionada à monogamia social e ao cuidado paternal para verificar a existência de diferenças quanto à distribuição de motivos de ligação a fatores de regulação gênica entre os táxons, o que poderia favorecer a emergência desses padrões comportamentais em Callitrichinae ou a ausência desses fenótipos em outros grupos. Para isso, foram analisadas 32 espécies de primatas que possuem informações em bancos de dados. Consideramos 24 diferentes motivos de ligação a fatores de transcrição. Os elementos de resposta à progesterona (PREs) mostraram-se associados à presença de monogamia social e de cuidado paternal ($P < 0.01$) em Callitrichinae. Sequenciamos regiões correspondentes aos PREs de espécies de Platyrrhini ($n = 10$) com DNA armazenado em nosso laboratório (Laboratório de Evolução Humana e Molecular, UFRGS), mas para os quais a informação em bancos de dados do genoma é ainda inexistente. Esses segmentos mostraram-se conservados entre as espécies, e uma análise conjunta, por fim, indicou que a contribuição de cada PRE para os fenótipos parece ser diferenciada, o que sugere também que a localização desses elementos, e não apenas sua quantidade, exerce influência sobre os padrões de comportamento estudados.

Palavras-chave: Evolução molecular, Monogamia Social, Cuidado Paternal, Platyrrhini.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
2.1. PRIMATAS: CONTEXTO TAXONÔMICO.....	10
2.2. CUIDADO PATERNAL E MONOGAMIA SOCIAL	13
2.3. REGULAÇÃO E ANATOMIA FUNCIONAL DA REGIÃO PROMOTORA	15
2.4. OXITOCINA: HORMÔNIO, RECEPTOR E GENES	17
3. JUSTIFICATIVA	22
4. OBJETIVOS	22
4.1. OBJETIVO GERAL	22
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
5. METODOLOGIA	23
5.1. PESQUISAS <i>IN SILICO</i> E BUSCAS POR MOTIVOS DE LIGAÇÃO	23
5.2. INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS.....	23
5.3. ANÁLISES EVOLUTIVAS	24
5.3.1. Inferências filogenéticas	24
5.3.2. Sinais de seleção em sequências não-codificadoras	24
5.4. SEQUENCIAMENTO	24
5.4.1. Desenvolvimento de <i>primers</i>	24
5.4.2. Amplificação por PCR.....	25
5.5. ABORDAGEM ESTATÍSTICA.....	26
6. RESULTADOS	27
6.1. PESQUISAS NOS BANCOS DE DADOS E MOTIVOS DE LIGAÇÃO	27
6.2. ASPECTOS FÍSICOS E ECOLÓGICOS.....	31
6.3. REGIÕES CONSERVADAS E RECONSTRUÇÕES FILOGENÉTICAS.....	34
6.3.1. Análises Filogenéticas.....	34
6.3.2. Regiões conservadas: Elementos de Resposta à Progesterona	36

6.4. SEQUENCIAMENTO	38
6.5. RESULTADOS ESTATÍSTICOS.....	39
7. DISCUSSÃO.....	43
8. CONCLUSÃO.....	46
9. PARECER DE ÉTICA E AUTORIZAÇÕES.....	47
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Não esqueçamos que as causas das ações humanas costumam ser incomensuravelmente mais complexas e diversas do que nossas subseqüentes explicações sobre elas.

– Fiódor Dostoiévski, em O Idiota.

O cuidado paternal e o vínculo entre um par reprodutor são padrões comportamentais raros quando a ordem Primata é considerada em sua totalidade; contudo, são características frequentes na subfamília Callitrichinae (família Cebidae, parvordem Platyrrhini) [1]. Assim, a utilização de espécies desta subfamília é oportuna para investigar a relação entre perfis genéticos e fenótipos *taxa*-específicos. O neuro-hormônio oxitocina (OXT) e seu receptor (OXTR) estão envolvidos em comportamentos complexos e em processos fisiológicos essenciais à reprodução. Alterações no gene *OXTR*, que codifica o receptor de oxitocina, estão associadas a diferenças comportamentais, incluindo a presença de vínculo social e de cuidado paternal em linhagens da classe Mammalia [2][3][4].

O presente trabalho analisou a região promotora do gene *OXTR* tanto de espécies de Callitrichinae quanto de representantes de outros ramos da ordem Primata, construindo um panorama que possibilitasse a identificação de diferenças na distribuição de motivos de ligação a fatores de regulação gênica associados às diferenças comportamentais investigadas. A partir dos achados relacionados aos motivos de ligação, os dados genéticos foram correlacionados a algumas características fenotípicas de interesse, especificamente cuidado paternal e monogamia social. Análises adicionais foram realizadas com o intuito de avaliar o papel da seleção natural na manutenção dos padrões de variabilidade encontrados ao longo da região promotora do gene *OXTR* na ordem Primata.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. PRIMATAS: CONTEXTO TAXONÔMICO

A ordem Primata compreende duas subordens: Strepsirrhini e Haplorrhini. A divergência entre esses clados ocorreu há aproximadamente 75 milhões de anos [5]. A subordem Strepsirrhini é, por sua vez, subdividida nas infraordens Lemuriformes, Lorisiformes e Chiromyiformes. Também chamados prossímios, os integrantes desses grupos incluem, respectivamente às infraordens citadas, lêmures, galagos e aye-ayes [6]. Membros da linhagem Haplorrhini estão classificados nas infraordens Tarsiiformes e Simiiformes [Figura 1]; esta última, cujos integrantes são conhecidos como antropóides, é dividida em duas parvordens: Catarrhini e Platyrrhini. Dentre os Catarrhini estão todos os “Macacos do Velho Mundo” (superfamília Cercopithecoidea) e os homínídeos (superfamília Hominoidea): inclui, portanto, todos os símios dos continentes asiático, africano e europeu, além da própria espécie humana. Conforme a classificação filogenética de Perelman *et al.* (2011) [7], Schneider & Sampaio (2015) [8] e Pozzi *et al.* (2014) [5], adotada neste trabalho, os Platyrrhini, ou Primatas do Novo Mundo, são agrupados em três famílias – Cebidae, Atelidae e Pitheciidae [Figura 2], sendo Callitrichinae uma subfamília de Cebidae.

Figura 1: Primatas: Subordens e Infraordens

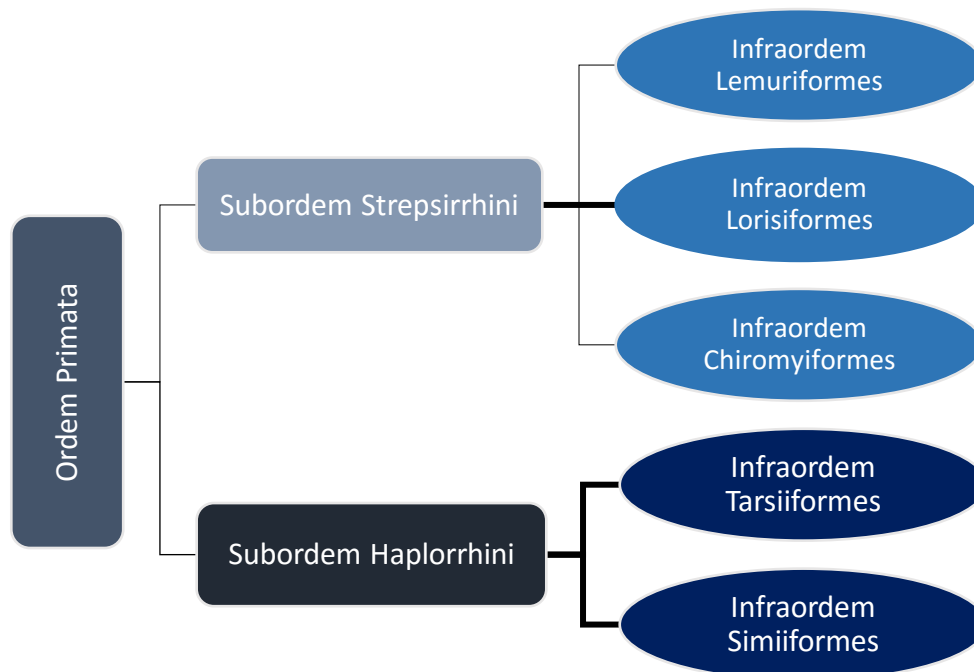


Fig.1. Classificação simplificada com base nas informações disponíveis em Animal Diversity Web (<http://animaldiversity.org/>). Os traços mais espessos destacam infraordens com representantes incluídos neste trabalho.

Figura 2: Parvordens Catarrhini e Platyrrhini e suas respectivas famílias.

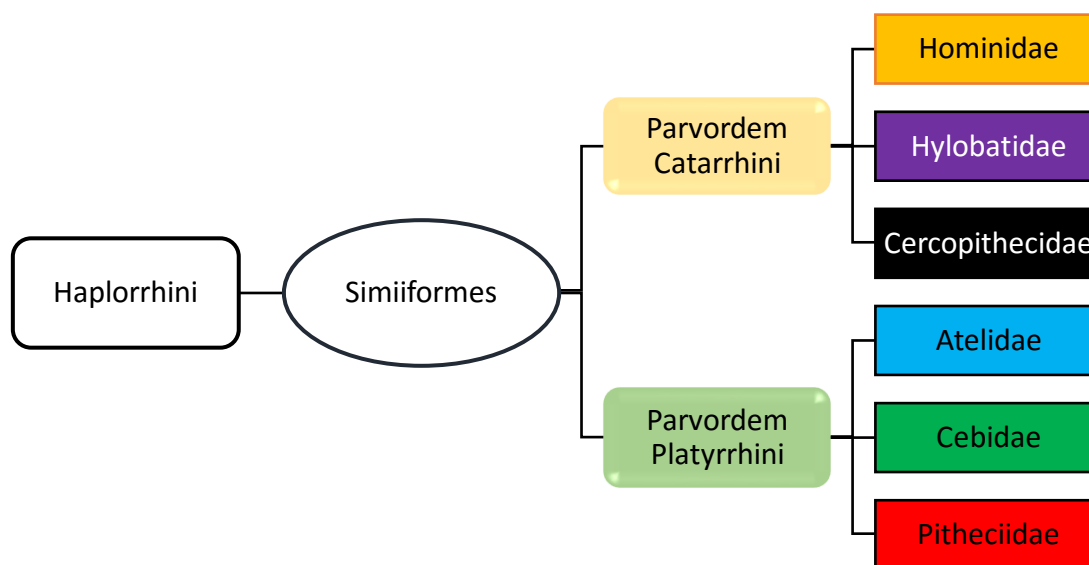


Fig. 2. Classificação adotada, com base em estudos filogenéticos de Perelman et al. (2011), Schneider & Sampaio (2015) e Pozzi et al. (2014).

Os prossímios conservam caracteres ancestrais dos mamíferos: hábito de vida solitário, comunicação especialmente dependente de sinais olfativos e vocais, presença de *tapetum lucidum* (membrana ocular que reflete a luz e melhora a visão em condições de baixa luminosidade) e baixa taxa metabólica [9]. Os antropoides apresentam as características mais derivadas, como a redução do olfato, aprimoramento da visão e desenvolvimento de músculos que permitem comunicação elaborada a partir de expressões faciais. É possível deduzir uma alteração no período de atividade entre essas linhagens: ao contrário dos prossímios – que, em sua maioria, são animais noturnos –, o hábito diurno é o padrão entre os antropoides. Com essas particularidades, houve também um aumento da complexidade comportamental. Entre os antropoides, há, ainda, infância prolongada, forte vínculo materno e neocórtex especialmente desenvolvido [10].

A **Tabela 1** apresenta as famílias e os gêneros de Platyrrhini, destacando o grupo monofilético Callitrichinae. Os integrantes desta subfamília apresentam características incomuns aos primatas antropoides. Além do pequeno tamanho e baixa massa corporal (que varia entre 115 e 600 gramas, com raras exceções), alguns exemplos incluem a presença de unhas em forma de garras e, com exceção do gênero *Callimico*, redução ou perda do terceiro molar, além de especializações da dentição e do intestino para o consumo de exsudatos de árvores, embora a dieta seja diversificada e inclua frutos e insetos em todos os gêneros. Calitriquíneos também se distinguem pela gemelaridade,

resultante da liberação de múltiplos óvulos por ciclo [10]-[11]. Gêmeos dizigóticos são predominantes, embora a ocorrência de trigêmeos já tenha sido observada; neste sentido, *Callimico* é também uma exceção, com a gestação de filhotes únicos. A alta fecundidade dos calitriquíneos também está relacionada a adaptações fisiológicas e comportamentais adequadas à necessidade de criação de múltiplos descendentes. A organização social inclui cooperação entre machos e fêmeas, onde, em geral, uma única fêmea é reprodutivamente ativa, enquanto a reprodução é suprimida nas fêmeas não-dominantes, seja essa uma inibição comportamental ou uma supressão fisiológica da ovulação [12]-[13]. As diferenças apresentadas em *Callimico* contribuíram para que este gênero fosse considerado inicialmente uma linhagem ancestral entre os calitriquíneos. Entretanto, classificações filogenéticas mais recentes desfizeram esse conceito ao colocá-lo próximo a *Callithrix* [8].

Tabela 1: Famílias e gêneros da Parvordem Platyrrhini

Famílias	Subfamília	Gêneros	Espécies
Cebidae	Callitrichinae	<i>Cebuella</i>	1
		<i>Mico</i>	15
		<i>Callithrix</i>	6
		<i>Callimico</i>	1
		<i>Saguinus</i>	15
		<i>Leontopithecus</i>	4
	Saimirinae	<i>Saimiri</i>	5
Pitheciidae	Callicebinae	<i>Callicebus</i>	28
		<i>Pithecia</i>	5
	Pitheciinae	<i>Chiropotes</i>	5
		<i>Cacajao</i>	3
		Atelidae	Alouattinae
<i>Ateles</i>	7		
Atelinae	<i>Brachyteles</i>		2
	<i>Lagothrix</i>		5

Tab. 1. O clado Callitrichinae, em destaque na tabela, inclui gêneros com características físicas e comportamentais que diferem, em geral, daquelas observadas nos demais antropóides. Tabela adaptada de Schneider & Sampaio (2015).

2.2. CUIDADO PATERNAL E MONOGAMIA SOCIAL

O comportamento materno observado nos mamíferos está relacionado, dentre outros fatores, a alterações hormonais que também estão envolvidas no parto e na lactação – ou seja, flutuações de estrógeno, progesterona e oxitocina [13]–[15]. Muito mais raro na classe é o cuidado paternal, que, segundo a definição de Fernandez-Duque (2009) [16], é um conjunto de comportamentos dirigidos à prole e desempenhados por um macho adulto (pai social ou putativo) que têm efeitos positivos sobre o desenvolvimento, sobrevivência ou bem estar dos infantes. Vários estudos que abordam as bases hormonais do cuidado paternal apontam, entre outros neuro-hormônios, os efeitos da vasopressina, oxitocina, prolactina e testosterona [17]–[20] como fundamentais para a emergência desse fenótipo. Os genes que codificam alguns receptores desses neuro-hormônios, tais como *AVPR1A*, *AVPR1B* e *OXTR*, estão sendo muito investigados, e há evidências de que seus produtos fazem parte da rede neuroendócrina envolvida em comportamentos sociais complexos, incluindo cuidado parental [21]–[23].

Monogamia social e cuidado paternal são fenótipos associados, mas o investimento do pai parece ser, em vez de causa, uma consequência da evolução da monogamia. Essas questões foram abordadas por Lukas & Brock (2013) [1], que analisaram os sistemas sociais de 2.545 espécies de mamíferos, classificando-as como (i) solitárias, quando as fêmeas reprodutoras forrageiam independentemente e em escalas territoriais individuais, encontrando machos apenas no período reprodutivo; (ii) monogâmicas sociais, marcadas pela presença de uma fêmea e de um macho reprodutores que compartilham um território e constituem um par em mais de um período de acasalamento, podendo ou não gerar e criar uma prole apenas entre os dois – em outras palavras, uma organização social que não faz qualquer suposição sobre exclusividade reprodutiva (o que seria o caso da monogamia genética) ou cuidado biparental; e, por fim, (iii) espécies que vivem em grupos sociais, nos quais várias fêmeas reprodutoras compartilham um espaço territorial, forrageiam e dormem juntas. No último caso, sistemas de acasalamento marcados por poliginia ou poligiandria são típicos. As espécies com cuidado paternal foram definidas como aquelas nas quais os machos contribuem para carregar e alimentar a prole.

Das espécies analisadas no trabalho de Lukas & Brock, 68% foram consideradas solitárias, 23% viviam em grupos sociais e 9% (229 espécies) eram monogâmicas sociais. Dentre aquelas espécies consideradas monogâmicas, 60% eram

caracterizadas também pela presença de um macho que fornecia alimentos à prole ou transportava os filhotes, enquanto o cuidado paternal foi observado em apenas três espécies não monogâmicas. Estavam incluídas 361 espécies de primatas neste estudo, e a monogamia social esteve presente em 29% delas. Embora a frequência desta característica em relação à classe Mammalia ou mesmo a outras ordens¹ seja notável, essa condição não é constante entre os táxons da ordem Primata. Em contraste à maioria de suas linhagens, a monogamia social e o cuidado paternal são frequentes na parvordem Platyrrhini. Curiosamente, esse fenótipo teria emergido de modo independente duas vezes nesse clado [16]: uma vez no ramo ancestral da família Cebidae, e outra vez naquele que deu origem ao gênero *Callicebus*, como mostra a **Figura 3**.

Figura 3: Filogenia do cuidado paternal entre os táxons da ordem Primata.

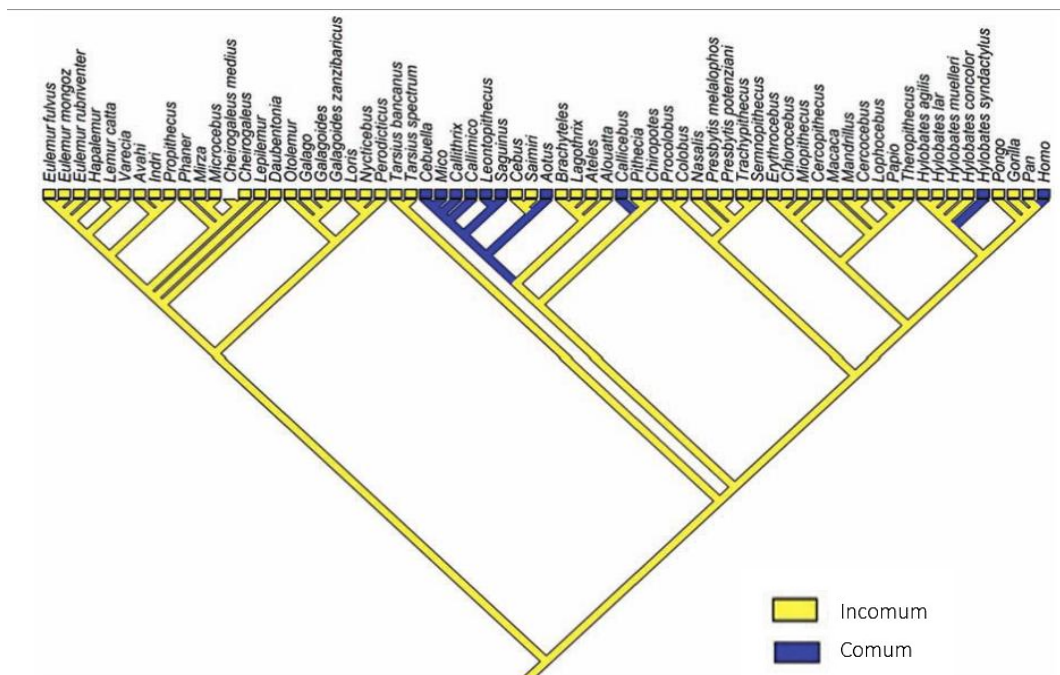


Fig. 3. A emergência do cuidado paternal nas linhagens dos primatas parece ter ocorrido duas vezes em Platyrrhini. Adaptação de Fernandez-Duque (2009).

¹ Foram incluídas 26 ordens no estudo em questão. Em 18 delas, a monogamia social estava ausente. A frequência foi estimada em 1% em Lagomorpha, 3% em Artiodactyla, 6% em Chiroptera e Rodentia, 13% em Diprodontia, 16% em Carnivora. Macroscelidea, com 93%, foi a única ordem com frequência maior de espécies monogâmicas sociais do que aquela observada em primatas.

2.3. REGULAÇÃO E ANATOMIA FUNCIONAL DA REGIÃO PROMOTORA

O sequenciamento e as análises comparativas do genoma mostram que o aumento da complexidade morfológica, fisiológica e comportamental de uma espécie não está correlacionado necessariamente à quantidade de genes que possui. O Projeto Genoma Humano é ilustrativo: inicialmente esperava-se encontrar cerca de 100 mil genes; entretanto, os resultados indicaram aproximadamente 30 mil [19]-[20]. Essa estimativa, que já estava entre 20 mil e 25 mil em 2004, passou, em 2014, para 19 mil genes [26]. As comparações do genoma revelam também que organismos diferentes compartilham basicamente os mesmos genes, e o alto grau de conservação das regiões codificadoras atribuiu maior importância ao papel das alterações na expressão gênica [27] – isto é, o modo como a sucessão de bases no DNA dirige a produção de RNA e de proteínas, sustentando o funcionamento de uma célula, além de conferir identidade a ela. A expressão de um gene depende de várias etapas, todas rigorosamente moduladas e, na maior parte das vezes, interdependentes. O início da transcrição é um dos pontos de controle mais importantes, no qual sequências específicas são reconhecidas pela maquinaria basal de transcrição no promotor e, como consequência, o gene e a síntese de RNA são ativados [28].

A região promotora de um gene é todo o trecho de DNA envolvido na transcrição. Em eucariotos, essa definição inclui duas classes funcionais: o promotor e as sequências regulatórias. O segmento que aponta o início da transcrição está no promotor, sendo o local onde o aparato de transcrição basal é acoplado. O promotor está situado imediatamente *upstream* ao gene e inclui sequências de consenso conservadas. Uma das mais comuns é o TATA box (sequência TATAAA), que antecede em cerca de 30 pares de bases o ponto de início da transcrição. Já as sequências regulatórias na região promotora, que neste trabalho serão chamadas conjuntamente de região regulatória, são locais onde as proteínas de regulação gênica ligam-se e controlam com que frequência, em qual local ou em qual momento o processo de transcrição de um determinado gene é iniciado [29]. A região regulatória pode ter diferentes configurações em cada gene, conferindo um espectro responsivo a, por exemplo, diferentes agentes hormonais e ambientais.

Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam a sequências específicas do DNA e promovem ou bloqueiam a ligação da RNA polimerase na região promotora do gene. Todas as sequências de nucleotídeos alvo de fatores de transcrição são chamadas

de elementos *cis*. Os limites dos elementos *cis* são definidos pelo domínio de ligação do fator de transcrição, possuindo, em geral, até 20 pares de bases (pb) de comprimento. A sequência de reconhecimento principal contém de 8 a 10 pb e é frequentemente palindrômica. Além do domínio associado de modo específico a um elemento *cis*, um fator de transcrição contém outro módulo que influencia direta ou indiretamente a síntese do RNA mensageiro [30]. Um a muitos elementos *cis* estão localizados nas imediações do TATA box. Os fatores de transcrição vinculados a esses elementos são geralmente ubíquos, e sua ligação ao DNA resulta em interações proteína-proteína com a maquinaria basal de transcrição. Essa configuração é exigida para que o processo transcricional inicie, e ocorre de modo não tecido-específico. Portanto, os correspondentes elementos *cis* estão localizados nos promotores de muitos genes, incluindo genes *housekeeping* [28].

A transcrição de determinados genes em células exclusivas ou em estágios de desenvolvimento particulares, entretanto, exige um mecanismo pormenorizado de regulação. Além dos fatores basais de transcrição, exigidos para a expressão de todos os genes transcritos pela RNA polimerase e, assim, presentes na maioria das células, existem fatores de transcrição regulatórios específicos, necessários para a expressão de genes que codificam proteínas restritas a um tipo celular ou a determinado período; nesta categoria estão incluídos ativadores, coativadores, repressores e correpressores da transcrição. Quando, por exemplo, um fator de transcrição ativador é associado a um elemento *cis* intensificador (*enhancer*), a taxa de transcrição do gene correspondente é elevada. Outros elementos de DNA, conhecidos como silenciadores, reprimem a expressão gênica por meio de uma sucessão similar de interações com fatores regulatórios repressores [31].

Em sequência à transcrição, o pré-mRNA dos eucariotos é processado e exportado do núcleo para o citoplasma. O RNA maduro estará apto, enfim, a ser traduzido, estocado ou degradado. Transcrição e tradução são etapas que interatuam, ou seja, a regulação da transcrição afeta a tradução. O potencial efeito pleiotrópico de mutações em regiões codificadoras é uma importante restrição à evolução gênica. Tais efeitos podem ser evitados por mutações nas sequências regulatórias [32].

2.4. OXITOCINA: HORMÔNIO, RECEPTOR E GENES

O gene *OXT* possui três éxons e codifica uma pré-proteína formada por 125 aminoácidos, a chamada pró-proteína oxitocina-neurofina I. Da clivagem desse produto, apenas nove resíduos de aminoácidos originam o peptídeo denominado oxitocina, enquanto todo o restante constitui a neurofina I, uma proteína carreadora. A oxitocina tem importância destacada em vários aspectos que particularizam a classe Mammalia; entre eles, a lactação e a viviparidade, estando também associada a comportamentos sociais complexos. A própria etimologia da palavra oxitocina é indicativa da atuação mais evidente (ou primeiramente descoberta) desta: derivada da língua grega, a palavra é uma união das partículas ὄξύς (*oxús*, “rápido”) e τόκος (*tókos*, “nascimento”), e faz referência à propriedade, descoberta em 1906 pelo farmacologista Henry Hallett Dale, de induzir à contração uterina [33]; já a função na ejeção do leite foi descrita nos cinco anos seguintes [20]-[21].

Em resposta a estímulos variados, OXT é liberado na circulação a partir da neurohipófise, onde é armazenado após ser produzido no hipotálamo. Portanto, é produzido no cérebro, mas sua atuação é sistêmica. Por conta disso, é reconhecido tanto como hormônio quanto por neurotransmissor. Possui um receptor próprio (OXTR), embora, com diferentes afinidades, possa também interagir com aqueles da vasopressina (AVPR1a, AVPR1b e AVPR2), um nonapeptídeo homólogo. O receptor OXTR é composto por sete domínios transmembranares (TM1-TM7) e quatro domínios extracelulares, sendo similar a outros receptores que utilizam proteínas G para a transdução de sinais pela membrana celular. OXT e OXTR estão intrinsecamente relacionados a processos fisiológicos envolvidos na reprodução, além de modularem comportamentos sociais também relacionados à reprodução, como a busca por parceiros e o cuidado parental [36].

A sequência consenso de nove aminoácidos da oxitocina (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly) era considerada idêntica entre os eutérios até 2011. Esta noção, entretanto, foi desfeita quando Lee *et al.* [37], naquele ano, descobriram uma substituição na posição 8 (OXT-8Pro) em quatro espécies de Primatas do Novo Mundo – *Saimiri sciureus*, *Cebus apella*, *Callithrix jacchus* e *Aotus nancimae*. Em 2015, novas formas foram descritas por nosso grupo de pesquisa [38], que também revelou presença generalizada de OXT-8Pro na família Cebidae, o que indica que a distribuição desta variante é mais abrangente do que aquela previamente observada por Lee *et al.* (2011).

No mesmo estudo de nosso grupo, uma segunda substituição em relação à sequência consenso foi registrada no gênero *Saguinus*: as três espécies avaliadas, *S. bicolor*, *S. martinsi* e *S. niger*, apresentavam uma valina, em vez de isoleucina, na posição 3 (OXT-3Val-8Pro). Ainda, duas novas substituições de aminoácidos foram reportadas na família Pitheciidae, ambas na posição 8 do peptídeo: em *Cacajao melanocephalus* e *Chiropotes utahickae* há uma alanina em vez de leucina (OXT-8Ala) e em um espécime de *Chiropotes albinasus* havia uma treonina nesta posição (OXT-8Thr). Essas alterações e a correspondência entre as variantes de OXT e OXTR são mostradas na **Figura 4**. É importante ressaltar que todas as variantes foram encontradas em homozigose e que em testes intraespecíficos não houve variação. Ou seja, são em princípio mutações *taxa*-específicas [38].

O sequenciamento da região codificadora de 22 espécies de primatas do Novo Mundo por outros autores corroborou nossos achados: Ren *et al.* (2015) [39] encontraram, além da sequência consenso OXT-8Leu e da variante OXT-8Pro, as duas variações que observamos em Pitheciidae: OXT-8Ala e OXT-8Thr. Além dessas, os autores descreveram a forma OXT-2Phe em *Alouatta caraya*, uma espécie da família Atelidae. Esses resultados estão esquematizados na **Figura 5** e estrutura molecular pode ser vista na **Figura 6**. Conjuntamente, estes estudos independentes mostram que estas variantes seriam funcionais e poderiam estar conectadas a traços que caracterizam esses clados, dentre os quais partos gemelares, monogamia social e cuidado paternal, comumente encontrados em espécies da subfamília Callitrichinae. Adicionalmente, foi demonstrado uma significativa coevolução entre as formas variantes de *OXT* e variações em *OXTR* [38].

Não apenas as regiões codificadoras de ambos os genes têm sido investigadas. Babb *et al.* (2015) [4] estudaram, além da porção codificadora de *OXTR*, a variação da região regulatória 5' deste gene em 25 espécimes de *Aotus azarae*. Também consideraram a variação interespecífica ao incluírem espécies de primatas e um grupo externo filogeneticamente, composto por roedores. As conclusões apontaram substancial variação na região regulatória 5' do gene entre os grupos, e a **Figura 7** é uma representação dessa variabilidade.

Figura 4: Coevolução entre OXT e OXTR

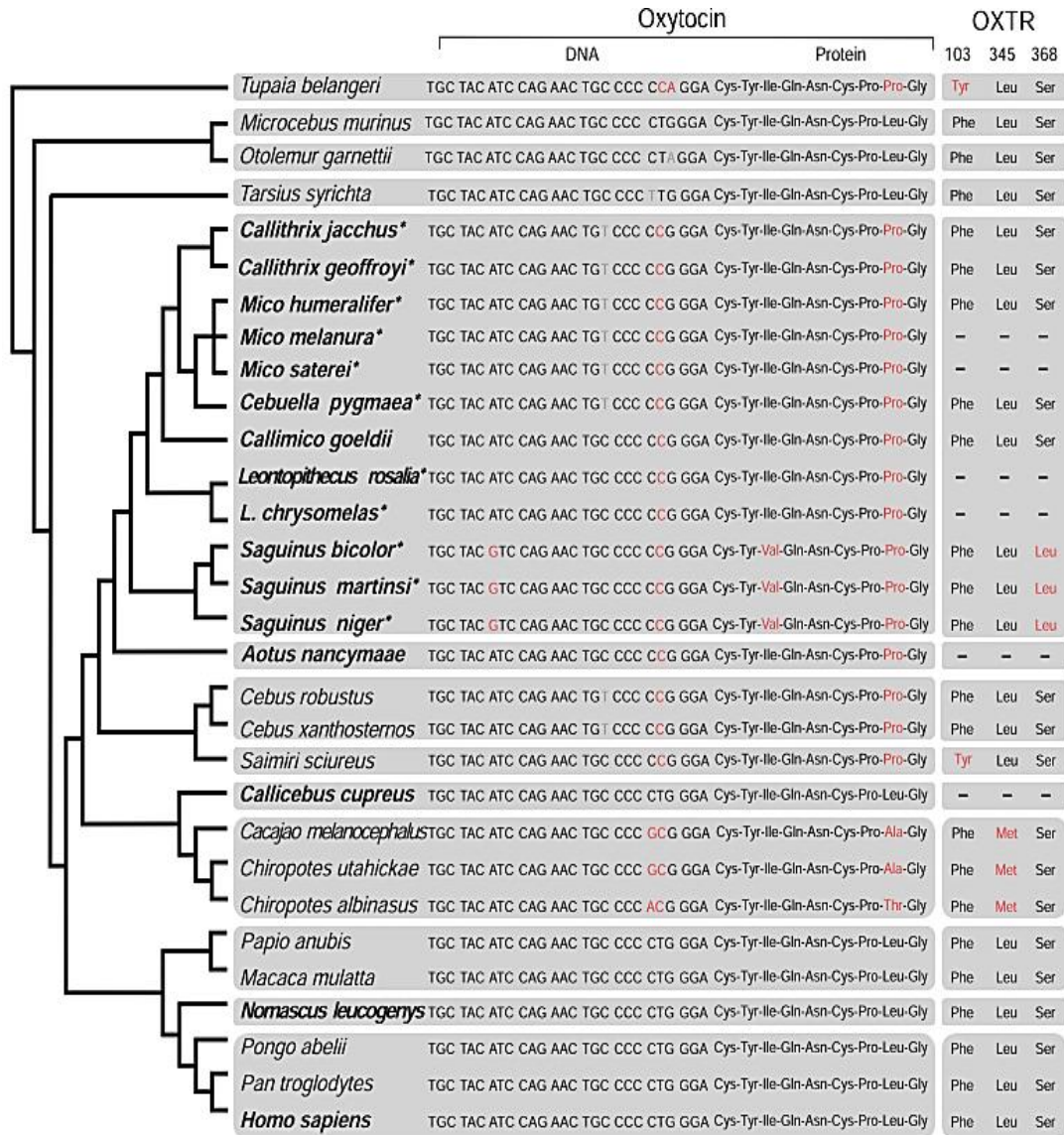


Fig. 4. As sequências dos nucleotídeos de *OXT* e dos aminoácidos observados em primatas e as posições em *OXTR* que estão coevoluindo. As alterações não sinônimas estão em vermelho. Fonte: Vargas-Pinilla *et al.* (2015).

Figura 5: Diversidade interespecífica de OXT

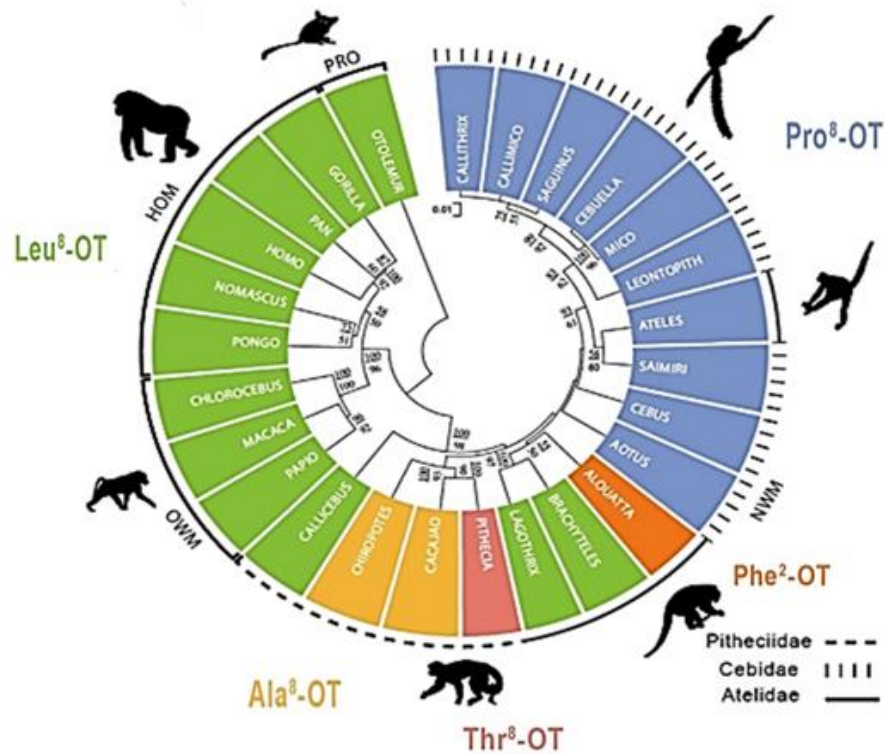


Fig. 5. Cinco ligantes OXT representados em uma distribuição gerada por uma árvore filogenética das sequências nucleotídicas de OXTR. Adaptado de Ren *et al.* (2015).

Figura 6: Estrutura molecular das variantes de OXT.

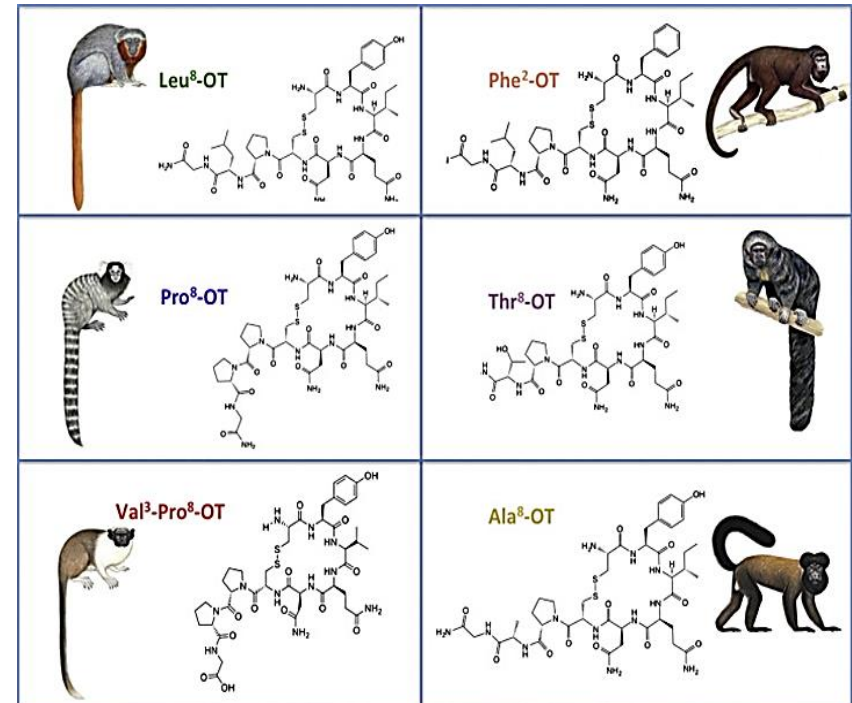


Fig. 6. Modelos das seis variantes identificadas em Primatas do Novo Mundo. As imagens representam os gêneros *Callicebus* (Leu⁸-OT), *Callithrix* (Pro⁸-OT), *Alouatta* (Phe²-OT), *Pithecia* (Thr⁸-OT) e *Chiropotes* (Ala⁸-OT). Além disso, há a espécie *Saguinus bicolor* (Val³-Pro⁸-OT). Fonte: French *et al.* (2016) [53].

Figura 7: Variação interespecífica na região promotora de *OXTR*.

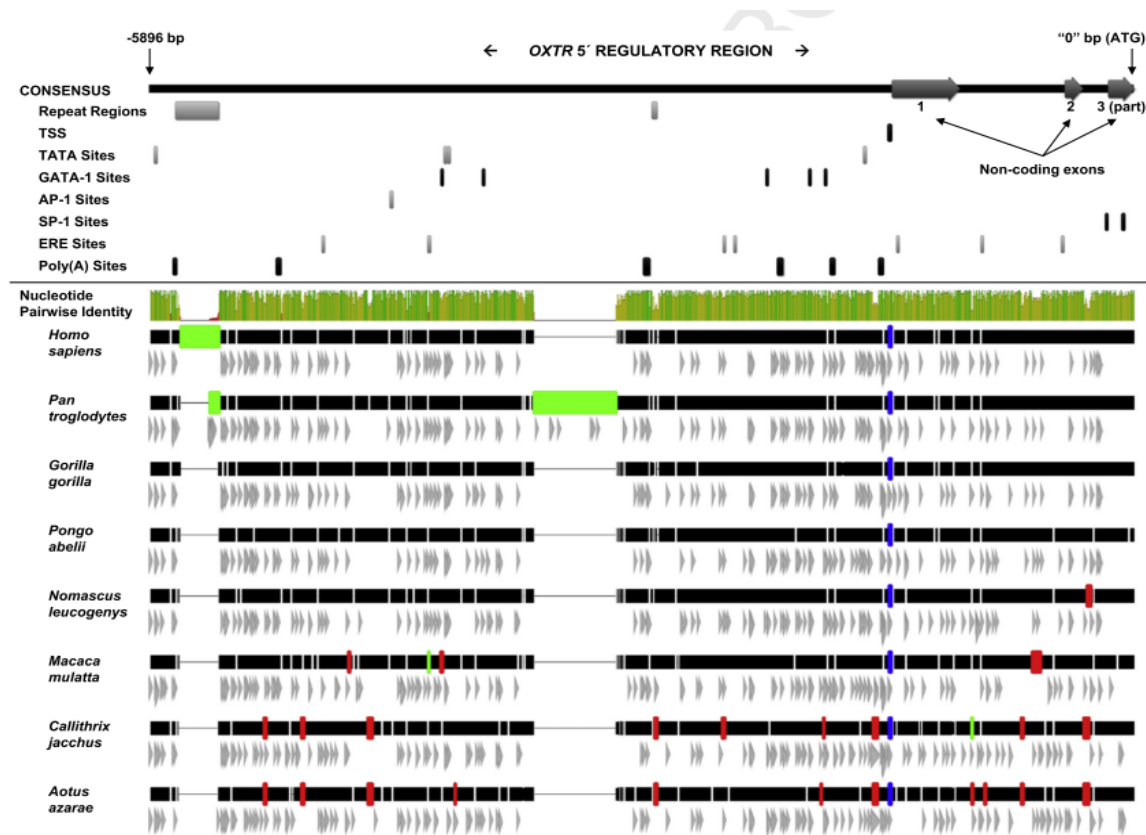


Fig. 7. Variação na região regulatória 5' do gene *OXTR* em oito espécies de Haplorrhini. Fonte: Babb *et al.* (2015).

3. JUSTIFICATIVA

As recentes descobertas dos trabalhos de Ren *et al.* (2015), Babb *et al.* (2015) e do nosso grupo de pesquisa (Vargas-Pinilla *et al.*, 2015) nos estimularam a ampliar a compreensão da influência genética sobre o comportamento. Considerando tais questões e justificando este trabalho, dois padrões comportamentais sociais com distribuições notadamente desiguais entre os táxons da ordem Primata são relacionados filogeneticamente à variabilidade da região promotora de *OXTR* entre as espécies.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Inferir relações entre a variabilidade da região promotora do gene *OXTR*, o cuidado paternal e a monogamia social em primatas, sobretudo em espécies da subfamília Callitrichinae.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Compilar dados da região de interesse na literatura com o propósito de se obter mais informações para as análises.
- Verificar se há correlação entre os motivos de ligação encontrados na região promotora de *OXTR* e a presença ou ausência de cuidado paternal e de monogamia social.
- Gerar dados originais por sequenciamento da região promotora de *OXTR* em espécies selecionadas.
- Investigar os processos evolutivos que poderiam estar conectados à variação na região promotora de *OXTR* nos primatas investigados.

5. METODOLOGIA

5.1. PESQUISAS *IN SILICO* E BUSCAS POR MOTIVOS DE LIGAÇÃO

A obtenção das sequências de DNA, para o subsequente alinhamento desses nucleotídeos, e a busca por motivos de ligação a fatores de transcrição caracterizaram esta etapa da pesquisa. Entre os dados do genoma de primatas já disponibilizados publicamente, foram pesquisadas aquelas espécies que possuíam informações da região promotora e codificadora de *OXTR*. Para esses mesmos táxons, obtivemos, também, sequências de DNA mitocondrial. Foram consultados os bancos de dados GenBank [40], por vezes com auxílio da ferramenta BLAST [41], e Ensembl [42]. Todas as sequências foram exportadas em formato FASTA, alinhadas no programa MAFFT versão 7 [43], visualizadas e editadas nos programas MEGA versão 6.0 [44] e Geneious R 8.1 [45]. As ferramentas de análise do pacote EMBOSS:*tfscan* [46], no ambiente do programa Geneious, sondaram os motivos de ligação a fatores de transcrição existentes na região promotora de *OXTR*.

5.2. INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

Para determinar presença ou ausência de cuidado paternal e de monogamia social em cada táxon, as informações do artigo de Lukas & Clutton-Brock [1] foram consideradas e eventualmente complementadas por outros trabalhos e bancos de dados especializados [3],[5],[41]. Além disso, outras características físicas e ecológicas foram pesquisadas para que pudessem ser utilizadas como comparação em situações específicas do estudo. É necessário salientar que classificações comportamentais são generalizações baseadas em parâmetros passíveis de divergências. Isto é, há sempre algum nível de variação intraespecífica nesses fenótipos. Lukas & Brock definiram uma espécie como monogâmica social quando a maioria (>50%) das fêmeas reprodutoras compartilham uma escala territorial com apenas um macho por mais de um ano; o cuidado paternal foi atribuído a uma espécie caso os machos contribuam regularmente para a alimentação ou o transporte da prole, considerando apenas comportamentos que são nitidamente benéficos para os filhotes.

5.3. ANÁLISES EVOLUTIVAS

5.3.1. Inferências filogenéticas

Reconstruções filogenéticas foram desenvolvidas no programa MEGA com as sequências da região promotora de *OXTR*. Adotaram-se os métodos de Máxima Verossimilhança e Máxima Parcimônia.

5.3.2. Sinais de seleção em sequências não-codificadoras

O programa EvoNC [49] testou sinais de seleção em sequências não-codificadoras utilizando como base três alinhamentos: além das sequências da região promotora de *OXTR*, foram incluídos, para as mesmas espécies, o alinhamento da região codificadora do mesmo gene e da árvore filogenética baseada nos dados do genoma mitocondrial. O EvoNC permite buscar indícios de seleção em qualquer ramo e utiliza algoritmos específicos para detectar quais sítios estão sob seleção negativa ou positiva, ou ainda quais poderiam ser considerados neutros evolutivamente. A taxa de substituição nessas regiões é modelada em relação às substituições presentes nas regiões codificadoras, indicada pelo parâmetro ζ . Uma condição de neutralidade terá $\zeta = 1$, seleção positiva será indicada por $\zeta > 1$, e $\zeta < 1$ representará seleção negativa.

5.4. SEQUENCIAMENTO

5.4.1. Desenvolvimento de *primers*

Amostras de DNA sanguíneo de 12 espécies de primatas da parvordem Platyrrhini (*Cacajao melanocephalus*, *Mico humilis*, *Callicebus coimbrai*, *Cebus robustus*, *Cebus xanthosternos*, *Chiropotes utahickae*, *Leontopithecus chrysomelas*, *Mico humeralifer*, *Mico melanura*, *Saguinus bicolor*, *Saguinus martinsi*, *Saguinus niger*), conservadas no Laboratório de Evolução Humana e Molecular foram utilizadas para amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR). A sequência da região promotora do gene *OXTR* de *Callithrix jacchus* (também conhecido como sagui-de-tufos-brancos ou *commom marmoset* – código KF701394.1 no NCBI) foi considerada um molde no Primer Blast [50]; estes resultados foram, a seguir, testados na ferramenta *PCR in silico* no UCSC Genome Browser tool suite (<https://genome.ucsc.edu/index.html>) chegando-se a cinco pares de *primers* satisfatórios (isto é, iniciadores com aproximadamente 20 pares de base de comprimento, ausência de *hairpins*, temperatura

de alinhamento em torno de 50°C, produtos com até 300 pares de base). Foram, então, incluídas bases degeneradas nos pares de *primers* 1, 2, 3 e 4 para que pudessem abranger o maior número de sequências [Tabela 2]. Os oligonucleotídeos liofilizados foram produzidos pela empresa Exxtend – Solução em Oligos, com uma concentração padrão de 50 pmol/μl, sendo ressuspensos em nosso laboratório e, por fim, diluídos para uma concentração de trabalho de 10 pmol/μl.

Tabela 2: Pares de *primers* selecionados após testes na ferramenta PCR *in silico* disponível no UCSC.

	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>	Produto (pb)	Região
Par 1	AAGTGYTGGCAATGTTCCA	AACGCTTGGGAGACAGTTTT	177	23 - 199
Par 2	GTTCTKCAACCTCCAGTAG	GCAGGAAATAGAGAGGTCCC	240	197 - 436
Par 3	GAGAGNTGGGGATCACACTA	GGACGGACTCTTCTACCCTT	182	476 - 657
Par 4	CTGGGATATCTTGGCAGGYG	CCTGCCCTTCCCTATTCTA	233	1144 - 1867
Par 5	TCCAAAGCAAGGATCTGCTC	TGGGTGTATTTTGCAGTGGT	248	1620 - 1867

Tab.2. Produto: tamanho do fragmento que se pretendeu amplificar (em pares de base). Região: sequência-alvo na região promotora do gene.

5.4.2. Amplificação por PCR

A PCR para cada amostra foi conduzida pelo seguinte protocolo: 5 μL de HotStarTaq® Mastermix Qiagen, 1 μl de *Primer Forward*, 1 μl de *Primer Reverse*, 20 μl de água RNase-Free Qiagen e 1 μl de DNA. Após um gradiente de concentração no termociclador TECHNE TC-512, onde foi verificado um intervalo de 52.5°C a 62.5°C para a temperatura de anelamento e com DNA de *Callithrix jacchus* como referência, observou-se que os melhores resultados ocorreram a 59°C. Assim, para as demais amostras, foi desenvolvido um programa com 02m00s de desnaturação inicial a 94.0°C seguida por 35 ciclos de 00m30s a 94.0°C, 00m30s a 59°C, 00m30s a 72°C, extensão final de 04m00s a 74.0°C e *final hold* a 10.0°C. Os produtos da PCR foram testados por eletroforese em gel de agarose 1% por aproximadamente 30 minutos. Apenas aqueles com resultados visíveis no transluminador foram encaminhados à MACROGEN para sequenciamento.

5.5.ABORDAGEM ESTATÍSTICA

O objetivo inicial foi realizar uma triagem para identificar quais motivos de ligação encontrados – considerados, neste caso, variáveis quantitativas –, poderiam estar associados, com significância estatística ($P < 0.05$), à monogamia social e ao cuidado paternal; estas duas variáveis comportamentais, neste contexto, foram interpretadas como qualitativas e subdivididas em duas categorias (presença ou ausência). Têm-se, portanto, dois conjuntos de indivíduos para cada característica, classificados pela presença ou ausência do fenótipo e, para cada indivíduo, a quantidade de cada motivo de ligação encontrado. Em cada caso, foi decidido se a hipótese nula – que considera ausência de associação entre a quantidade de cada motivo de ligação às variáveis qualitativas – deve ser preservada ou substituída pela hipótese alternativa, que deduz uma relação entre as variáveis. A distribuição dos dados foi verificada *a priori*, e optou-se pelo teste não paramétrico U de Wilcoxon Mann-Whitney. Uma segunda etapa, após resultados do sequenciamento, comparou categoricamente cada comportamento à presença ou ausência de um motivo de ligação específico. Neste caso, foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Tanto a estatística descritiva quanto os testes de hipóteses foram determinados pelos programas RStudio [48] e IBM SPSS, e pelo suplemento XLStat Premium 2016 para MS Excel®.

6. RESULTADOS

6.1. PESQUISAS NOS BANCOS DE DADOS E MOTIVOS DE LIGAÇÃO

A **Tabela 3** apresenta as informações resultantes das pesquisas nos bancos de dados. Foram selecionadas, nesta busca, 32 espécies. Da análise dessas sequências da região promotora de *OXTR*, com 2095 pares de bases, destacaram-se 24 motivos de ligação a fatores de transcrição. Os motivos de ligação estão relacionados na **Tabela 4** e a distribuição entre as 32 espécies pode ser vista na **Tabela 5**.

Tabela 3: Informação em bancos de dados: espécies e códigos de acesso às sequências utilizadas.

Espécies	5'UTR <i>OXTR</i>	<i>OXTR</i> (CDS)	Genoma Mitocondrial
<i>Aotus azarai</i>	KF701399.1	KT182982.1	NC_021939.1
<i>Callicebus cupreus</i>	KF701386.1	KT182969.1	NC_021965.1
<i>Callimico goeldii</i>	KF701396.1	KT182979.1	NC_024628.1
<i>Callithrix geoffroyi</i>	KF701392.1	KT182975.1	NC_021941.1
<i>Callithrix jacchus</i>	KF701394.1	KT182977.1	AB572419.1
<i>Callithrix kuhlii</i>	KF701393.1	KT182976.1	KR869628.1
<i>Callithrix penicillata</i>	KF701395.1	KT182978.1	AF245047.1+
<i>Callithrix pygmaea</i>	KF701390.1	KT182973.1	KC757389.1
<i>Callithrix aurita</i>	KF701391.1	KT182974.1	AF245049.1+
<i>Homo sapiens</i>	ENSG00000180914 *	AY389507.1	KT449867.1
<i>Leontopithecus rosalia</i>	KF701397.1	KT182980.1	NC_021952.1
<i>Saguinus midas</i>	KF701398.1	KT182981.1	AJ489760.1
<i>Alouatta caraya</i>	KF701383.1	KT182966.1	NC_021938.1
<i>Ateles belzebuth</i>	KF701385.1	KT182968.1	KC757386.1
<i>Ateles geoffroyi</i>	KF701384.1	KT182967.1	KR902382.1+
<i>Brachyteles hypoxanthus</i>	KF701380.1	KT182963.1	DQ118291.2+
<i>Cacajao calvus</i>	KF701389.1	KT182972.1	NC_021967.1
<i>Cebus apella</i>	KF701400.1	KT182983.1	NC_016666.1
<i>Chiropotes chiropotes</i>	KF701388.1	KT182971.1	FJ531667.1+
<i>Chlorocebus sabaeus</i>	ENSCSAG00000010788 *	XM_007985099.1	DQ069713.1
<i>Gorilla gorilla</i>	ENSGGOG00000011995 *	XM_004033536.1	D38114.1
<i>Lagothrix lagotricha</i>	KF701381.1	KT182964.1	KC757398.1
<i>Lagothrix poeppigii</i>	KF701382.1	KT182965.1	AY671799.1+
<i>Macaca mulatta</i>	ENSMMUG00000009703 *	NM_001044732.1	NC_005943.1
<i>Nomascus leucogenys</i>	ENSNLEG00000003784 *	XM_012502228.1	HQ622803.1
<i>Otolemur garnettii</i>	ENSOGAG00000001407 *	XM_003785470.1	AB371093.1~
<i>Pan paniscus</i>	NC_027871.1	XM_008966892.1	NC_001644.1
<i>Pan troglodytes</i>	ENSPTRG00000014582 *	XM_001144020.4	X93335.1
<i>Papioanubis</i>	ENSPANG00000005977 *	XM_003894143.2	NC_020006.2
<i>Pithecia pithecia</i>	KF701387.1	KT182970.1	KR902426.1+
<i>Pongo abelii</i>	ENSPPYG00000013689 *	XM_002813482.2	X97707.1
<i>Saimiri sciureus</i>	KF701401.1	JF330026.1	AB371091.1

Tab.3. 5'UTR (*untranslated region*): Região promotora. CDS (*coding DNA sequence*): Região codificadora. Genoma mitocondrial: quando não disponível, substituído pelo gene *Cytochrome B* (+) ou por sequência de um táxon irmão (~). Sequências de DNA obtidas no Ensembl Browser estão assinaladas por um asterisco; todas as demais estão disponíveis no NCBI GenBank.

Tabela 4: Motivos de ligação quantificados.

Código	Identificação
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
CAC-bp	<i>CAC-binding protein</i>
c-Jun	<i>Comprising Jun</i>
CP2	<i>Alpha-globin transcription factor CP2</i>
CREB	<i>Cyclic AMP-responsive element-binding protein</i>
CTF	<i>CCAAT-binding Transcription Factor</i>
FraI	<i>Fos-Related Antigen 1</i>
GATA-1	<i>5'-[AT]GATA[AG]-3'</i>
GR beta	<i>Glucocorticoid receptor</i>
HiNF-A	<i>Histone nuclear factor A</i>
HNF-3	<i>Hepatocyte nuclear factor</i>
IL-6 RE-BP	<i>Interleukin 6 response factor</i>
LyF-1	<i>Lymphoid transcription factor;</i>
MAZ	<i>MYC-Associated Zinc</i>
MEP-1	<i>Megakaryocytic/erythroid precursor</i>
myogenin	<i>Myogenin;</i>
NF-E2	<i>Nuclear factor erythroid-derived 2</i>
NF-k E2	<i>Nuclear factor kappaE2</i>
Pit-1a	<i>Pituitary-specific transcription fator 1a</i>
PRE	<i>Progesterone Response Element</i>
PTF	<i>Proximal sequence element (PSE)-binding transcription factor</i>
Sp1	<i>Specificity protein 1;</i>
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TFIID	<i>Transcription factor IID</i>

Tab. 4. Motivos de ligação a fatores de transcrição reportados na saída do programa Geneious.

Espécie	AP-1	CAC-BP	c-Jun	CP2	CREB	CTF	FraI	GATA-1	GR beta	HiNF-A	HNF-3	IL-6 RE-BP
<i>Cebusapela</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aotus azarai</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Saimirisciureus</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leontopithecus rosalia</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pithecia pithecia</i>	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Callithrix geoffroyi</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Callithrix jacchus</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Callithrix kuhlii</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Callithrix penicillata</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Callithrix aurita</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lagothrix lagotricha</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0
<i>Lagothrix poeppigii</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0
<i>Callimico goeldii</i>	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Callithrix pygmaea</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cacajao calvus</i>	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chiropotes chiropotes</i>	0	2	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Saguinus midas</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	2	3	0	0
<i>Callicebus cupreus</i>	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Brachyteles hypoxanthus</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4	0	0
<i>Chlorocebus sabaes</i>	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Macaca mulatta</i>	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Alouatta caraya</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4	2	0
<i>Papioa nubis</i>	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pan troglodytes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0
<i>Gorilla gorilla</i>	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0
<i>Homo sapiens</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pongo abelii</i>	0	0	0	1	0	6	0	0	0	0	0	0
<i>Ateles geoffroyi</i>	2	0	1	2	0	0	4	0	0	0	0	0
<i>Otolemur garnettii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Pan paniscus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0
<i>Ateles belzebuth</i>	2	0	0	2	0	0	4	0	0	2	0	0
<i>Nomascus leucogenys</i>	2	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	8	2	1	85	2	6	8	9	2	37	2	3

Tabela 5: Distribuição dos motivos de ligação a fatores de regulação gênica (Continua na próxima página).

Espécie	LyF-1	MAZ	MEP-1	MYOG	NF-E2	NF-k E2	Pit-1a	PR	PTF	Sp1	TBP	TFIID
<i>Cebus apela</i>	0	0	1	1	0	0	1	3	2	0	0	0
<i>Aotus azarai</i>	0	0	2	1	0	0	2	4	0	0	0	0
<i>Saimirisciureus</i>	0	0	0	1	0	0	1	4	2	0	0	0
<i>Leontopithecus rosalia</i>	0	0	2	1	0	0	2	4	0	0	0	0
<i>Pithecia pithecia</i>	0	0	2	1	0	0	1	4	0	0	0	0
<i>Callithrix geoffroyi</i>	0	0	2	2	0	0	0	5	0	0	0	0
<i>Callithrix jacchus</i>	0	0	2	2	0	0	0	5	0	0	0	0
<i>Callithrix kuhlii</i>	0	0	2	2	0	0	0	5	0	0	0	0
<i>Callithrix penicillata</i>	0	0	2	2	0	0	0	5	0	0	0	0
<i>Callithrix aurita</i>	0	0	2	2	0	0	0	5	0	0	0	0
<i>Lagothrix lagotricha</i>	0	0	1	1	0	0	2	2	2	0	0	0
<i>Lagothrix poeppigii</i>	0	0	1	1	0	0	2	2	2	0	0	0
<i>Callimico goeldii</i>	0	0	1	1	0	0	0	5	0	0	2	0
<i>Callithrix pygmaea</i>	2	0	1	2	0	0	0	5	0	0	0	0
<i>Cacajao calvus</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	2	2	0	0
<i>Chiropotes chiropotes</i>	0	0	1	1	0	0	1	4	1	0	0	0
<i>Saguinus midas</i>	0	0	1	1	0	0	2	4	0	0	0	0
<i>Callicebus cupreus</i>	0	0	1	1	0	0	2	4	2	1	0	0
<i>Brachyteles hypoxanthus</i>	0	0	1	1	0	0	0	5	2	0	0	0
<i>Chlorocebus sabaesus</i>	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0
<i>Macaca mulatta</i>	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0
<i>Alouatta caraya</i>	0	0	1	1	0	0	2	2	1	2	0	0
<i>Papioa nubis</i>	0	0	4	0	0	0	5	0	0	0	0	0
<i>Pan troglodytes</i>	0	0	4	2	0	0	3	0	0	1	0	0
<i>Gorilla gorilla</i>	0	0	4	2	0	0	3	0	0	0	0	0
<i>Homo sapiens</i>	0	0	4	2	0	0	3	0	0	7	0	0
<i>Pongo abelii</i>	0	3	0	2	0	0	6	0	0	0	0	0
<i>Ateles geoffroyi</i>	0	0	1	1	3	0	3	1	1	0	0	0
<i>Otolemur garnettii</i>	0	0	2	5	0	0	2	0	0	0	0	5
<i>Pan paniscus</i>	0	0	4	2	0	0	3	0	0	1	0	0
<i>Ateles belzebuth</i>	0	0	1	1	3	0	3	1	1	0	0	0
<i>Nomascus leucogenys</i>	0	0	1	2	7	2	3	0	3	0	0	0
TOTAL	2	3	60	45	13	2	61	79	21	14	2	5

Na página anterior: Continuação da **Tab. 5.**: As áreas sombreadas apontam os motivos de ligação encontrados em maior quantidade entre as 32 espécies.

6.2. ASPECTOS FÍSICOS E ECOLÓGICOS

A **Tabela 6** reúne qualitativamente as características comportamentais de 44 espécies (32 espécies incluídas após pesquisa nos bancos de dados e 12 espécies de nosso laboratório). Outras características que podem também influenciar as interpretações subsequentes estão dispostas na **Tabela 7**.

Tabela 6: Classificação das espécies e características comportamentais

Subordem	Familia	Especie	Monogamia	Cuidado Paternal		
Haplorrhini	Platyrrhini	Atelidae	<i>Ateles geoffroyi</i>	0	0	
			<i>Ateles belzebuth</i>	0	0	
			<i>Brachyteles hypoxanthus</i>	0	0	
			<i>Lagothrix lagotricha</i>	0	0	
			<i>Lagothrix poeppigii</i>	0	0	
		Alouattinae	<i>Alouatta caraya</i>	0	0	
		Cebidae	Callitrichinae	<i>Callithrix pygmaea</i>	1	1
				<i>Callithrix geoffroyi</i>	1	1
				<i>Callithrix jacchus</i>	1	1
				<i>Callithrix kuhlii</i>	1	1
				<i>Callithrix penicillata</i>	1	1
	<i>Callithrix aurita</i>			1	1	
	<i>Callimico goeldii</i>			1	1	
	<i>Leontopithecus rosalia</i>			1	1	
	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>			1	1	
	<i>Saguinus midas</i>			1	1	
	<i>Saguinus niger</i>			1	1	
	<i>Saguinus martinsi</i>			1	1	
	<i>Saguinus bicolor</i>			1	1	
	<i>Mico humeralifer</i>			1	1	
	<i>Mico melanura</i>			1	1	
	<i>Mico humilis</i>	1	1			
	Aotinae	<i>Aotus azarai</i>	1	1		
	Cebinae	<i>Cebus xanthosternos</i>	0	0		
		<i>Cebus robustus</i>	0	0		
		<i>Cebus apella</i>	0	0		
	Saimirinae	<i>Saimiri sciureus</i>	0	0		
	Pitheciidae	Callicebinae	<i>Callicebus cupreus</i>	1	1	
			<i>Callicebus coimbrai</i>	1	1	
		Pitheciinae	<i>Cacajao calvus</i>	0	0	
			<i>Cacajao melanocephalus</i>	0	0	
			<i>Chiropotes chiropotes</i>	0	0	
<i>Chiropotes utahickae</i>			0	0		
<i>Pithecia pithecia</i>	1	0				
Catarrhini	Cercopithecidae	Cercopithecinae	<i>Chlorocebus sabaues</i>	0	0	
		<i>Macaca mulatta</i>	0	0		
		<i>Papio anubis</i>	0	0		
	Hylobatidae	<i>Nomascus leucogenys</i>	1	0		
	Hominidae	Homininae	<i>Pan troglodytes</i>	0	0	
			<i>Pan paniscus</i>	0	0	
			<i>Homo sapiens</i>	1	1	
			<i>Gorilla gorilla</i>	0	0	
	Ponginae	<i>Pongo abelii</i>	0	0		
	Strepsirrhini	Galaguidae	<i>Otolemur garnetti</i>	0	0	

Tab.6. Classificação das 44 espécies quanto à monogamia social e ao cuidado paternal. 0: ausência, 1: presença.

Tabela 7: Características gerais das espécies

Espécie	Nome popular	Número de filhotes por gestação	Peso (kg)	Tempo gestacional (dias)	Tamanho do grupo (número médio de indivíduos)
<i>Otolemur garnettii</i>	Galago	1	0.751	130	4
<i>Cebuella pygmaea</i>	Sagui-leãozinho	2	0.13	140	5.5
<i>Callithrix geoffroyi</i>	Sagui-de-cara-branca	2	0.375	160	5
<i>Callithrix jacchus</i>	Sagui-de-tufos-brancos	2	0.848	148	10
<i>Callithrix kuhlii</i>	Sagui-de-wied	2	0.4	143	5
<i>Callithrix penicillata</i>	Sagui-de-tufos-pretos	2	0.2	150	8
<i>Callithrix aurita</i>	Sagui-da-serra-escuro	2	0.4	155	7.5
<i>Callimico goeldii</i>	Mico-de-goeldi	1	0.626	155	8
<i>Leontopithecus rosalia</i>	Mico-leão-dourado	2	0.654	133	6.5
<i>Saguinus midas</i>	Sagui-de-mãos-amarelas	2	0.5	140	6
<i>Aotus azarai</i>	Macaco da noite	1	0.8	130	5
<i>Cebus apella</i>	Macaco-prego	1	3	155	15
<i>Saimiri sciureus</i>	Macaco-de-cheiro	1	0.925	165	55
<i>Callicebus cupreus</i>	Zogue-zogue	1	1.12	150	5
<i>Cacajao calvus</i>	Uacari	1	3	190	30
<i>Chiropotes chiropotes</i>	Cuxiú	1	3	150	44
<i>Pithecia pithecia</i>	Parauaçu	1	1.5	146	4
<i>Ateles geoffroyi</i>	--	1	8	230	30
<i>Ateles belzebuth</i>	Macaco-aranha	1	8	220	30
<i>Brachyteles hypoxanthus</i>	Muriqui-do-norte	1	9	210	60
<i>Lagothrix lagotricha</i>	Macaco-barrigudo	1	7	224	40
<i>Lagothrix poeppigii</i>	Macaco-barrigudo-prateado	1	7	225	30

Tab.7. (Continuação). Características gerais das espécies.

Espécie	Nome popular	Número de filhotes por gestação	Peso (kg)	Tempo gestacional (dias)	Tamanho do grupo (número médio de indivíduos)
<i>Alouatta caraya</i>	Bugio preto	1	7	180	8
<i>Chlorocebus sabaesus</i>	--	1	5	180	40
<i>Macaca mulatta</i>	Macaco Rhesus	1	8	165	90
<i>Papio anubis</i>	Babuíno-anúbis	1	20	180	68
<i>Nomascus leucogenys</i>	Gibão-de-bochechas-brancas-do-norte	1	5.7	210	4
<i>Pan troglodytes</i>	Chimpanzé	1	50	230	35
<i>Pan paniscus</i>	Bonobo	1	40	230	15
<i>Homo sapiens</i>	espécie humana	1	65	280	5
<i>Gorilla gorilla</i>	Gorila-do-ocidente	1	100	257	10
<i>Pongo abelii</i>	Orangotango-de-sumatra	1	60	254	8
<i>Cacajao melanocephalus</i>	Uacari-Preto	1	3.2	190	25
<i>Saguinus martinsi</i>	Sauim	2	0.475	140	7
<i>Mico humeralifer</i>	Sagui-de-santarém	2	0.4	140	8
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Mico-leão-da-cara-dourada	2	0.535	128	7
<i>Cebus xanthosternos</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo	1	3	165	15
<i>Cebus robustus</i>	Macaco-prego-de-crista	1	3	165	9
<i>Callicebus coimbrai</i>	Guigó	1	1	150	6
<i>Mico humilis</i>	Sagui-anão	1	0.17	Não há dados	7
<i>Chiropotes utahickae</i>	--	1	3	165	25
<i>Mico melanura</i>	Sagui-do-Cerrado	2	0.33	145	7
<i>Saguinus bicolor</i>	Sauim-de-coleira	2	0.54	160	6
<i>Saguinus niger</i>	Sagui-uma	2	0.4	150	6

6.3. REGIÕES CONSERVADAS E RECONSTRUÇÕES FILOGENÉTICAS

6.3.1. Análises Filogenéticas

Figura 8: Análise por Máxima Verossimilhança para a região promotora de *OXTR*.

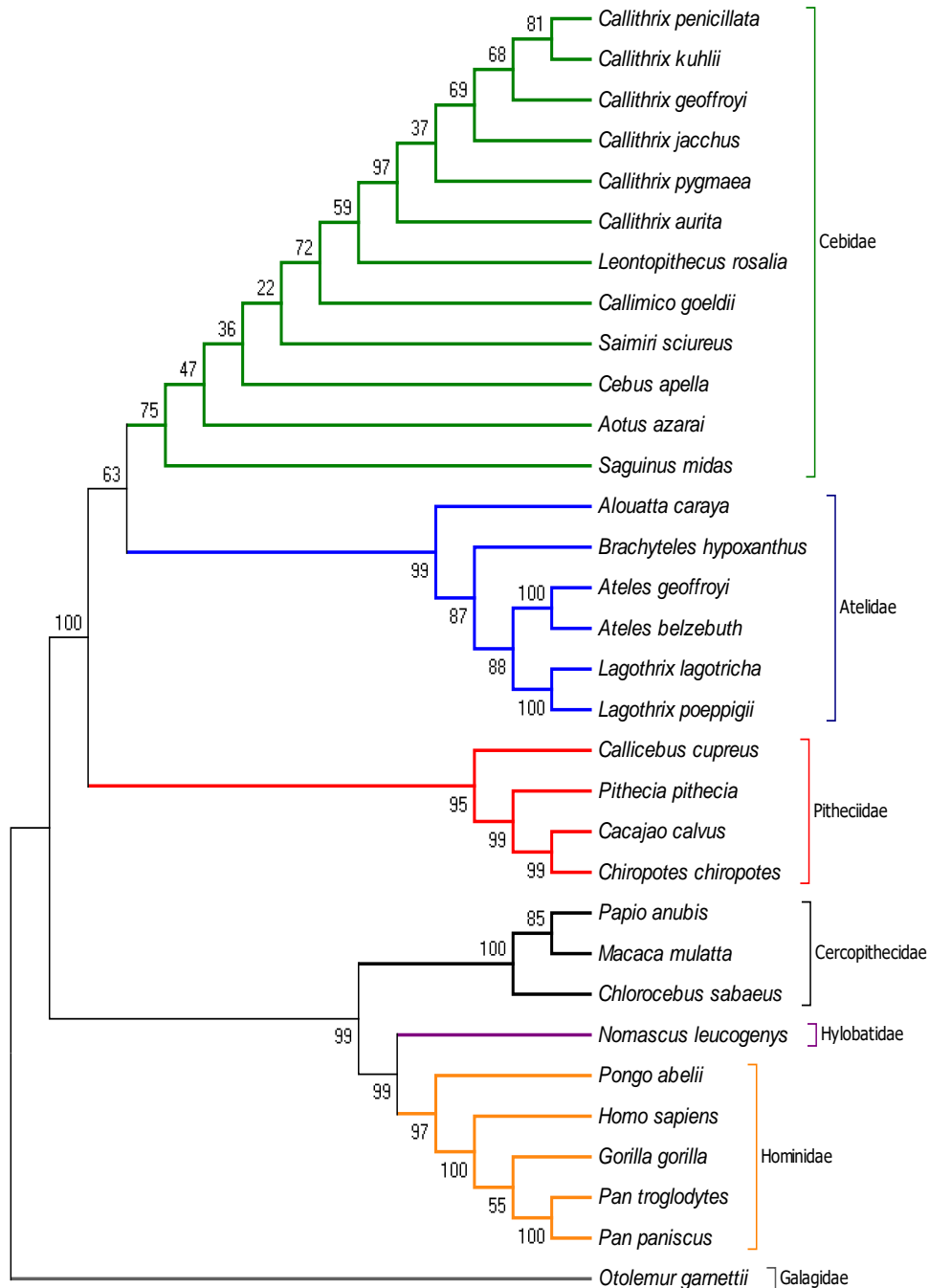


Fig. 8. Árvore de consenso após 1000 *bootstraps* baseada no modelo de Hasegawa-Kishino-Yano no programa MEGA.

Figura 9: Análise por Máxima Parcimônia da região promotora de *OXTR*.

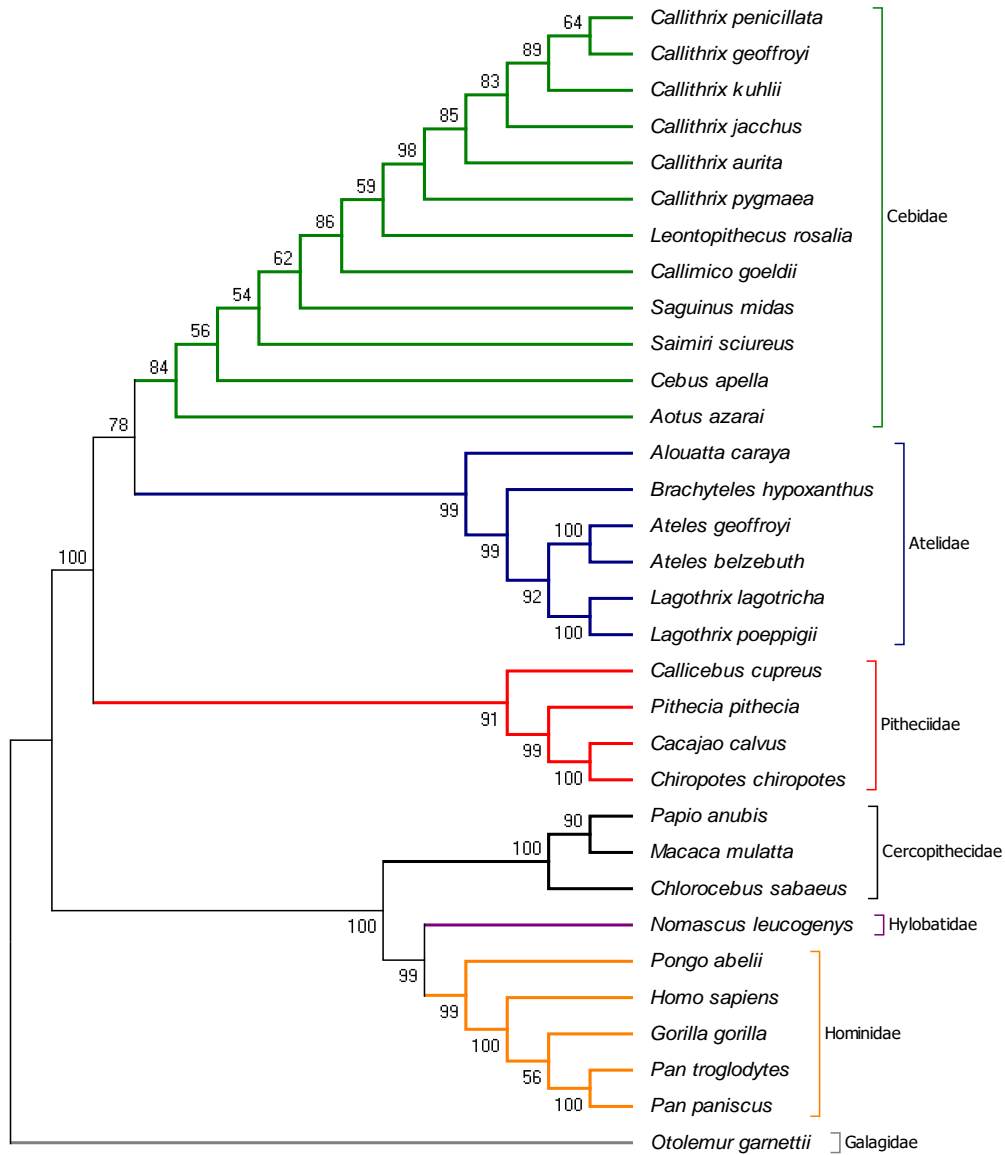


Fig.9. Árvore de consenso após 1000 *bootstraps*. Máxima Parcimônia com algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting (SPR)* no programa MEGA.

6.3.2. Regiões conservadas: Elementos de Resposta à Progesterona

Os elementos de resposta à progesterona, indicados em vermelho na figura abaixo, estavam mais frequentes em primatas com cuidado paternal e monogamia social. Estas regiões foram utilizadas posteriormente para o sequenciamento de espécies com DNA em nosso laboratório.

Figura 10: Alinhamento e regiões dos elementos de resposta à progesterona.

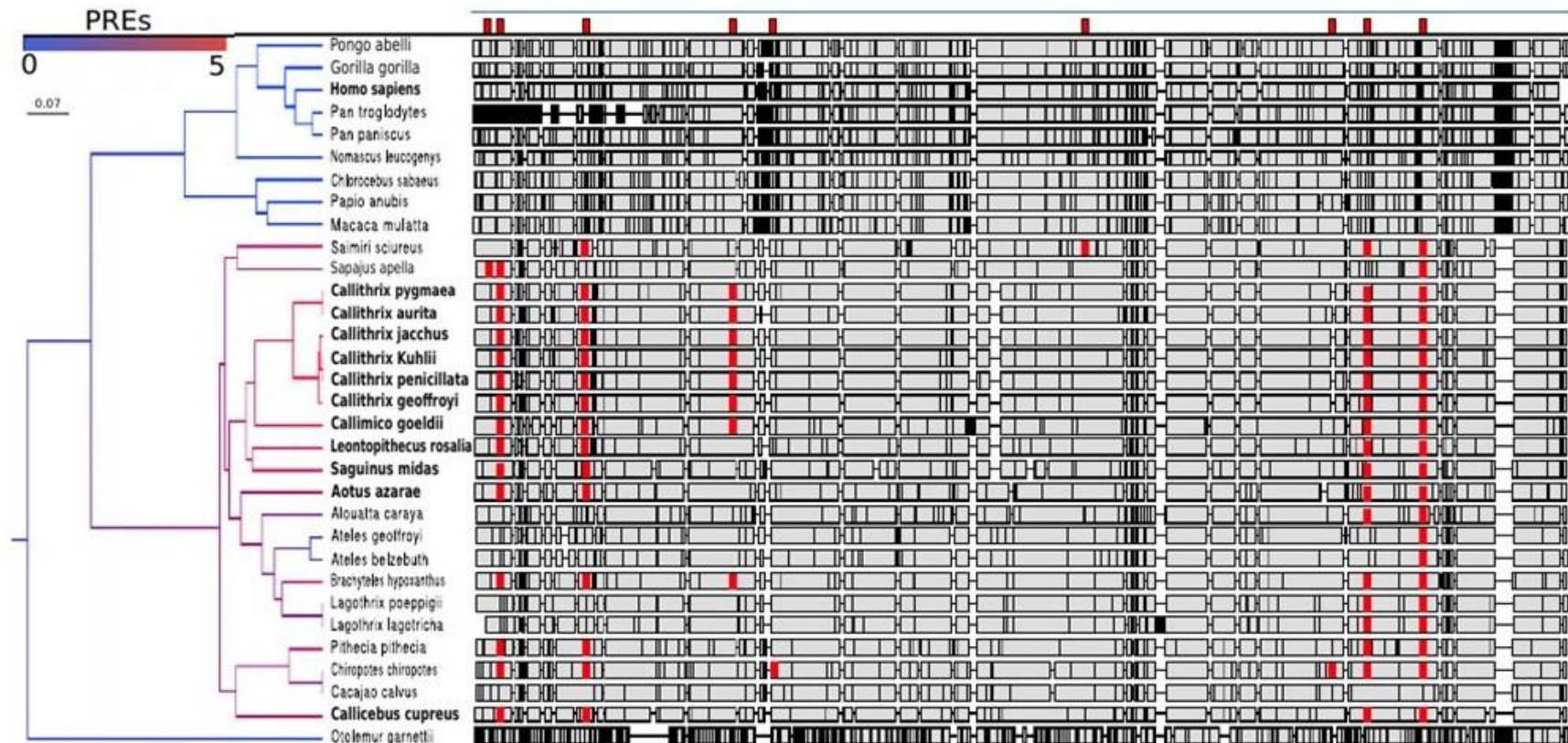


Fig. 10. Alinhamento das 32 espécies obtidas nos bancos de dados. Regiões em vermelho correspondem aos PREs (da esquerda para a direita, PREs 1 a 9).

6.3.3. Seleção em sequências não-codificadoras

Tanto no teste envolvendo toda a região promotora quanto em outro que incluiu apenas as regiões dos elementos de resposta à progesterona, foi apontada neutralidade.

Tabela 8: Teste de seleção na região regulatória de *OXTR*

Modelo		Parâmetros estimados				ℓ	p -value
Test1 All promoter region	M3: 3 Category	$\zeta_0=$	0.008	$p_0=$	0.240	-10965.581	<0.001
		$\zeta_1=$	1.000	$p_1=$	0.090	-10875.510	
		$\zeta_2=$	0.011	$p_2=$	0.669		
Test2 Only PRE region	M3: 3 Category	$\zeta_0=$	0.015	$p_0=$	0.276	-3750.704	0.002
		$\zeta_1=$	1.000	$p_1=$	0.089	-3742.396	
		$\zeta_2=$	0.000	$p_2=$	0.635		

Tab.8. Saída do programa EvoNC. Parâmetro ζ : taxa de substituição nas regiões regulatórias em relação às substituições presentes nas regiões codificadoras. $\zeta = 1$ significa neutralidade; $\zeta > 1$, seleção positiva; $\zeta < 1$, seleção negativa.

6.4. SEQUENCIAMENTO

Segmentos da região promotora correspondentes aos elementos de resposta à progesterona foram sequenciados [Tabela 9 e Tabela 10]. Estas regiões mostram-se conservadas em relação àquelas encontradas nos demais calitriquíneos.

Tabela 9: As regiões e os elementos incluídos correspondentes a cada par de *primers*.

Par de <i>primers</i>	Região	Elementos incluídos
Primer 1	> chr15:60690283-60690459	PREs 1 e 2
Primer 2	> chr15:60690046-60690285	PRE 3
Primer 3	> chr15:60689825-60690006	PREs 4 e 5
Primer 4	> chr15:60689106-60689338	PRE 6
Primer 5	> chr15:60688615-60688862	PRE 7, 8 e 9

Tab.9: Regiões disponíveis em *Genome UCSC – Genome Browser on Marmoset March 2009 (WUGSC 3.2/calJac3) Assembly*. PREs 1 – 9: Elementos de resposta à progesterona numerados conforme a localização exposta na Figura 10.

Tabela 10: Segmentos amplificados em cada espécie.

<i>Espécies testadas</i>	Regiões dos Elementos de Resposta à Progesterona								
	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
<i>Cacajao melanocephalus</i>	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
<i>Saguinus martinsi</i>	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
<i>Mico humeralifer</i>	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
<i>Cebus xanthosternos</i>	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
<i>Cebus robustus</i>	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
<i>Callicebus coimbrai</i>	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
<i>Mico humilis</i>	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
<i>Chiropotes utahickae</i>	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
<i>Mico melanura</i>	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
<i>Saguinus bicolor</i>	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
<i>Saguinus niger</i>	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9

Tab.10: Dados originais resultantes do sequenciamento a partir das espécies listadas estão em destaque. PREs 3 e 5 não foram amplificados. Também não foram obtidos dados para as espécies *Mico melanura* e *Saguinus bicolor*.

6.5. RESULTADOS ESTATÍSTICOS

Os motivos de ligação e as informações sobre monogamia social e cuidado paternal para as 32 espécies já sequenciadas foram compilados para análises estatísticas. O teste de Shapiro-Wilk ($P < 0.05$) mostrou disposição não gaussiana na maioria dos casos. Optou-se, então, pela aplicação do teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney para verificar se há diferença com significância na distribuição dos motivos de ligação em cada conjunto de fenótipos comportamentais. Considerando um grupo de 32 espécies, os elementos de resposta à progesterona e o fator de transcrição Pit-1a mostraram-se fortemente relacionados à condição de cada comportamento. Para cuidado paternal, o resultado do teste U teve valor $P = 0.001$ em relação aos elementos de resposta à progesterona e $P = 0.014$ para Pit1a [**Tabela 11**]; além do resultado ser também significativo para miogenina ($P = 0.049$). Quanto à monogamia social, os resultados novamente foram relevantes ao analisar os elementos de resposta à progesterona e o fator de transcrição Pit1a: $P = 0.001$ e $P = 0.008$, respectivamente; além disso, o resultado de HINF-A ($P = 0.049$) foi tecnicamente significativo para o valor P adotado. Contudo, após a correção de Bonferroni, apenas os elementos de resposta à progesterona mantiveram significância estatística.

O Teste Exato de Fisher analisou apenas os elementos de resposta à progesterona. As sequências dos bancos de dados e os resultados dos sequenciamentos foram examinados conjuntamente. Assim, em cada caso, o número de espécies consideradas variou, com um mínimo de 32 e um máximo de 37 espécies. O objetivo deste teste foi verificar individualmente a relação dos nove motivos de ligação correspondentes aos PREs, encontrados inicialmente, à monogamia social e ao cuidado paternal. Este teste, após a correção de Bonferroni, foi significativo ($P < 0.05$) para os PREs 2, 3 e 8 em relação à monogamia social [**Tabela 12** e **Tabela 13**]. E os PREs 3 e 4 foram estatisticamente significativos para a condição de cuidado paternal [**Tabela 14** e **Tabela 15**].

Tabela 11: Significância no teste U para cuidado Paternal e Monogamia Social para as espécies da Tabela 3.

Variáveis testadas	Cuidado Paternal	Bonferroni: Cuidado Paternal	Monogamia Social	Bonferroni: Monogamia
AP-1	0.713	17.105	0.817	19.600
CAC-bp	0.445	10.683	0.413	9.908
c-Jun	0.445	10.683	0.413	9.908
CP2	0.558	13.388	0.334	8.005
CREB	0.252	6.050	0.284	6.822
CTF	0.445	10.683	0.413	9.908
Fral	0.253	6.069	0.221	5.316
GATA-1	0.445	10.683	0.413	9.908
GR beta	0.252	6.050	0.284	6.823
HiNF-A	0.055	1.316	0.036	0.855
HNF-3	0.445	10.683	0.413	9.908
IL-6 RE-BP	0.445	10.683	0.413	9.908
LyF-1	0.252	6.050	0.284	6.822
MAZ	0.445	10.683	0.413	9.908
MEP-1	0.729	17.489	0.599	14.387
Miogenina	0.049	1.179	0.082	1.978
NF-E2	0.879	21.105	0.793	19.022
NF-kappaE2	0.252	6.050	0.284	6.822
Pit-1a	0.014	0.339	0.008	0.1972
PRE	0.001	0.033	0.001	0.019
PTF	0.087	2.083	0.050	1.201
Sp1	0.756	18.155	0.635	15.243
TBP	0.252	6.050	0.284	6.821
TFIID	0.445	10.683	0.413	9.908

Tab.11. Resultados estatísticos significativos ($P < 0.05$) em negrito. Total de espécies: 32.

Tabela 12: Total de PREs e de espécies com monogamia social.

	Monogamia								
	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
Espécies com monogamia social	15	15	14	17	14	15	15	18	18
Espécies sem monogamia social	19	19	18	20	18	18	18	19	19
Total de espécies	34	34	32	37	32	33	33	37	37
Espécies com ausência do elemento	2	4	1	3	1	1	1	9	10
Espécies com presença do elemento	1	13	10	10	0	1	1	17	16
Total de elementos	3	17	11	13	1	2	2	26	26

Tab.12. Total de PREs considerando todos os segmentos disponíveis para monogamia social. O número de espécies, portanto, varia em cada caso (mínimo de 32 e máximo de 37 espécies).

Tabela 13: Resultados do Teste exato de Fisher para Monogamia Social e quantidade de cada PRE.

Monogamia	PRE2	PRE3	PRE8
<i>Teste exato de Fisher</i>	0.0324	0.0001	0.00300
Correção de Bonferroni	0.0036	0.0009	0.027

Tab. 13. Resultados significativos para $P < 0.05$.

Tabela 14: Total de PREs e de espécies com cuidado paternal.

	Cuidado Paternal								
	PRE1	PRE2	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	PRE7	PRE8	PRE9
Espécies com cuidado paternal	13	13	12	15	12	13	13	16	16
Espécies sem cuidado paternal	21	21	20	22	20	20	20	21	21
Total de espécies	34	34	32	37	32	33	33	37	37
Espécies com ausência do elemento	2	5	1	3	1	1	1	11	11
Espécies com presença do elemento	1	12	10	10	0	1	1	15	15
Total de elementos	3	17	11	13	1	2	2	26	26

Tab. 14. Total de PREs considerando todos os segmentos disponíveis para cuidado paternal. O número de espécies varia dependendo do caso (mínimo de 32 e máximo de 37).

Tabela 15: Resultados do Teste exato de Fisher para Cuidado Paternal e quantidade de cada PRE.

Cuidado Paternal	PRE3	PRE4
<i>Teste exato de Fisher</i>	0.00001	0.0015
Correção de Bonferroni	0.00009	0.0135

Tab. 15. Resultados significativos para $P < 0.05$.

7. DISCUSSÃO

O sistema OXT-OXTR é objeto de pesquisas sobre a emergência de cuidado paternal e de monogamia social. Primatas do Novo Mundo são particularmente interessantes para o estudo evolutivo deste sistema pelo recorrente padrão de criação cooperativa da prole, incluindo cuidado aloparental e paternal, além de monogamia social. A abordagem filogenética da variabilidade da região promotora do gene *OXTR* é relevante neste contexto. No conjunto de 32 sequências obtidas nos bancos de dados, foram encontradas 24 classes de motivos de ligação a fatores de transcrição. Destes, os mais frequentes foram CP2 (85), PRE (79), Pit1a (61), MEP1 (60), miogenina (45) e Hinf-A (37). Quando cada fenótipo foi categorizado, PRE e Pit1a mostraram diferenças significativas ($P < 0.05$) na distribuição entre os grupos. Em geral, parece haver uma conexão entre a quantidade de elementos de resposta à progesterona e a presença dos comportamentos analisados. Por outro lado, Pit1a é mais abundante nos táxons que não apresentam esses fenótipos. Contudo, os resultados continuaram robustos, após correções estatísticas e ainda para os dois fenótipos, apenas para os PREs.

Os elementos de resposta à progesterona são sítios para a ligação do complexo entre esse hormônio e seu receptor (PG-PR) e estão localizados na região promotora de genes-alvo. Após a ligação, a transcrição dos genes é iniciada pelo recrutamento da RNA polimerase II e de outros elementos de transcrição [51]. O clado Callitrichinae, que possui a maior frequência de monogamia social e de cuidado paternal, é também o grupo com o maior número de elementos de resposta à progesterona. Os gêneros *Callithrix*, *Cebuella* e *Callimico* apresentam cinco PREs; *Leontopithecus* e *Saguinus* possuem quatro. Sendo o elemento mais abundante e mais significativamente associado aos comportamentos de interesse, os segmentos correspondentes aos PREs foram utilizados como referência para o sequenciamento de novas espécies de Platyrrhini.

A amplificação foi testada em 12 espécies diferentes, e em 10 delas ao menos um dos motivos foi sequenciado. Os elementos mostram-se conservados em relação às demais espécies, o que reforça a ideia de que sejam possivelmente funcionais. Testes posteriores indicaram que os PREs 2, 3 e 8 parecem ter maior contribuição para o fenótipo monogâmico social. Essa interessante diferença ocorre também nos PREs 3 e 4 em relação ao cuidado paternal. Isso sugere que a importância também recaia sobre a localização, possivelmente dependente do funcionamento modular com outros fatores de regulação gênica ou ao próprio sítio de início da transcrição.

Os fenótipos estudados aqui são características complexas; portanto, muitos fatores devem contribuir para as variações comportamentais interespecíficas (e provavelmente intraespecíficas). O que os resultados apontam é que a quantidade variável de determinados elementos, como os PREs, na região regulatória do gene *OXTR* pode ter implicações funcionais na emergência desses comportamentos. Algumas espécies possuem uma quantidade de elementos de resposta à progesterona similar àquela observada em *Callitrichinae*, mas não apresentam cuidado paternal ou monogamia social. *Cebus apella* e *Saimiri sciureus*, entre outras, exemplificam esse caso. Curiosamente, contudo, essas duas espécies não apresentam, segundo os testes realizados, os PREs 3 e 4, que parecem estar mais associados ao cuidado paternal.

Pit1a é um fator de transcrição pituitário-específico, responsável pelo desenvolvimento da pituitária e da expressão hormonal na classe Mammalia. Ainda que a estatística não seja tão sólida ao apontar sua relevância se comparado aos resultados dos PREs, esse fator transcricional é biologicamente interessante na conjuntura deste trabalho. Pit1a contém dois domínios, POU-específico a POU-homeo, responsáveis pela alta afinidade da ligação ao DNA nos genes codificadores do hormônio do crescimento e da prolactina. *Enhancers* nas regiões regulatórias 5' dos genes *GH* e *Prl* parecem controlar sua expressão pituitária-específica. *OXTR* na pituitária levaria a uma maior liberação de prolactina [52]. A ausência ou menor frequência de motivos de ligação a esse fator em Primatas do Novo Mundo talvez tenha relação com o tamanho corporal reduzido nesses táxons, além do desmame mais precoce, mas não há dados na literatura para fazer tal afirmação.

Algumas características tipicamente observadas em sistemas monogâmicos incluem adultos com pouco dimorfismo sexual, comportamental e físico, machos adultos (pais) que geralmente auxiliam a criação dos filhotes (transportando, alimentando ou defendendo a prole), e indivíduos jovens com uma maturação sexual atrasada, como observado por Pryce [13], que abordou a hipótese da proteção contra a defeminização, um processo de diferenciação sexual no qual uma estrutura potencialmente feminina tem seu desenvolvimento inibido por um processo de masculinização. Segundo Pryce, haveria proteção contra a defeminização na ontogenia de regiões cerebrais de machos de *Callithrix jacchus*. As questões físicas e ecológicas são importantes para estabelecer um tipo de comportamento social. Nesse sentido, o cuidado paternal e a monogamia social têm justificativas bastante plausíveis entre os calitriquíneos, um grupo no qual partos gemelares são comuns. Em primeiro lugar, pelo alto custo energético da reprodução, na

qual a massa corporal dos filhotes corresponde a cerca de 30% da massa corporal da fêmea. Em segundo lugar, há um estro pós-parto fértil concomitante à lactação. Essas condições demandam uma criação cooperativa da prole. A presença de outros cuidadores liberaria a fêmea para a geração de novos filhotes. Mecanismos como cuidado paternal, portanto, seriam adaptativos nesse caso.

A região promotora é conservada entre os primatas. A falta de sinais de seleção positiva, porém, também pode ser atribuída aos métodos atualmente disponíveis para esse fim em regiões não codificadoras. Elementos funcionais tendem a evoluir a uma taxa mais lenta, o que poderia explicar a conservação da região regulatória de *OXTR*. Sob níveis baixos de variação na sequência de nucleotídeos, a predição de seleção positiva é difícil de ser apurada. Entretanto, considerando as funções fisiológicas da progesterona e da oxitocina, e também de fatores de transcrição como Pit1-a, além da conservação interespecífica e constância *taxa*-específica desses motivos de ligação, é improvável que as mudanças nessas regiões sejam neutras. A presença desses elementos tem provavelmente implicações evolutivas.

8. CONCLUSÃO

A evolução da região promotora ou de regiões regulatórias é importante no contexto de fenótipos complexos pela capacidade de alterar a expressão gênica em resposta a sinais endócrinos e ambientais. Este trabalho explorou a variabilidade da região promotora do gene *OXTR* e encontrou diferenças significativas quanto aos elementos de resposta à progesterona entre as espécies com monogamia social e cuidado paternal. Em outras palavras pode-se inferir que a presença desses elementos genéticos foi cooptada ao longo da evolução dessas linhagens devido a pressões seletivas específicas, o que resultou em comportamentos sociais claramente adaptativos (monogamia e cuidado paternal) para a prole num contexto onde partos gemelares são comuns. Os resultados podem levar a investigações futuras que ajudariam a construir um quadro evolutivo mais completo do comportamento social de primatas, sobretudo ao investigar a interação entre progesterona, oxitocina e seus receptores na subfamília Callitrichinae.

9. PARECER DE ÉTICA E AUTORIZAÇÕES

O Laboratório de Evolução Humana e Molecular, sob a coordenação da profa. Maria Cátira Bortolini, tem autorização para armazenagem de material biológico e para a realização de pesquisa científica de amostras oriundas de cativeiro e/ou centros de manejo (SISBIO número 27951-2). A Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS, em comunicação datada de 25/11/2014, liberou a utilização das referidas amostras de DNA para investigações científicas, tendo em vista que o estudo não envolve procedimento experimental direto com animais e pelo fato da coleta do material (sangue para extração de DNA) ter sido realizada antes da promulgação da lei Nº 11.794 de outubro de 2008.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. Lukas and T. H. Clutton-Brock, “The Evolution of Social Monogamy in Mammals,” *Science* (80-.), vol. 341, no. 6145, pp. 526–530, 2013.
- [2] B. W. Haas, I. W. Anderson, and J. M. Smith, “Navigating the complex path between the oxytocin receptor gene (OXTR) and cooperation: an endophenotype approach,” *Front. Hum. Neurosci.*, vol. 7, no. November, p. 801, 2013.
- [3] H.-J. Lee, A. H. Macbeth, J. Pagani, and W. Scott Young 3rd, “Oxytocin : the Great Facilitator of Life,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 88, no. 2, pp. 127–151, 2010.
- [4] P. L. Babb, E. Fernandez-Duque, and T. G. Schurr, “Oxytocin receptor gene sequences in owl monkeys and other primates show remarkable interspecific regulatory and protein coding variation,” *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 91, no. May, pp. 160–177, 2015.
- [5] L. Pozzi, J. A. Hodgson, A. S. Burrell, K. N. Sterner, R. L. Raaum, and T. R. Disotell, “Primate phylogenetic relationships and divergence dates inferred from complete mitochondrial genomes,” *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 75, pp. 165–83, Jun. 2014.
- [6] T. A. D. Myers, P., R. Espinosa, C. S. Parr, T. Jones, G. S. Hammond, “Animal Diversity Web,” 2015. [Online]. Available: <http://animaldiversity.org>.
- [7] P. Perelman, W. E. Johnson, C. Roos, H. N. Seuánez, J. E. Horvath, M. A. M. Moreira, B. Kessing, J. Pontius, M. Roelke, Y. Rumpler, M. P. C. Schneider, A. Silva, S. J. O’Brien, and J. Pecon-Slattery, “A Molecular Phylogeny of Living Primates,” *PLoS Genet.*, vol. 7, no. 3, p. e1001342, 2011.
- [8] H. Schneider and I. Sampaio, “The systematics and evolution of New World primates – A review,” *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 82, pp. 348–357, 2015.
- [9] D. E. Mittermeier, R.A., Rylands, A.B. & Wilson, *Handbook of the Mammals of the World. Vol. 3. Primates*. Barcelona: Lynx Edicions, 2013.
- [10] J. G. Fleagle, *Primate adaptation and evolution*, 3th ed. Elsevier, 2013.
- [11] R. A. Harris, S. D. Tardif, T. Vinar, D. E. Wildman, J. N. Rutherford, J. Rogers, K. C. Worley, and K. M. Aagaard, “Evolutionary genetics and implications of small size and twinning in callitrichine primates,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 4, pp. 1467–72, 2014.
- [12] S. L. Díaz-Muñoz, “Complex cooperative breeders: Using infant care costs to explain variability in callitrichine social and reproductive behavior,” *Am. J. Primatol.*, no. April, 2015.
- [13] C. R. Pryce, “The regulation of maternal behaviour in marmosets and tamarins,” *Behav. Processes*, vol. 30, no. 3, pp. 201–24, 1993.
- [14] J. E. Fite and J. a French, “Pre- and postpartum sex steroids in female marmosets

- (*Callithrix kuhlii*): is there a link with infant survivorship and maternal behavior?," *Horm. Behav.*, vol. 38, pp. 1–12, 2000.
- [15] W. Saltzman and D. Maestriperi, "The neuroendocrinology of primate maternal behavior," *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 35, no. 5, pp. 1192–1204, 2011.
- [16] E. Fernandez-Duque, C. R. Valeggia, and S. P. Mendoza, "The Biology of Paternal Care in Human and Nonhuman Primates," *Annu. Rev. Anthropol.*, vol. 38, no. 1, pp. 115–130, 2009.
- [17] S. Nunes, J. E. Fite, K. J. Patera, and J. A. French, "Interactions among paternal behavior, steroid hormones, and parental experience in male marmosets (*Callithrix kuhlii*)," *Horm. Behav.*, vol. 39, no. 1, pp. 70–82, 2001.
- [18] H. E. Albers, "Species, sex and individual differences in the vasotocin/vasopressin system: Relationship to neurochemical signaling in the social behavior neural network," *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 36, pp. 49–71, 2015.
- [19] K. E. Wynne-Edwards, "Hormonal Changes in Mammalian Fathers," *Horm. Behav.*, vol. 40, no. 2, pp. 139–145, 2001.
- [20] M. T. D. S. Mota, C. R. Franci, and M. B. C. De Sousa, "Hormonal changes related to paternal and alloparental care in common marmosets (*Callithrix jacchus*)," *Horm. Behav.*, vol. 49, no. 3, pp. 293–302, 2006.
- [21] D. Ren, K. R. Chin, and J. A. French, "Molecular Variation in AVP and AVPR1a in New World Monkeys (Primates, Platyrrhini): Evolution and Implications for Social Monogamy," *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p. e111638, 2014.
- [22] K. Yamashita and T. Kitano, "Molecular evolution of the oxytocin-oxytocin receptor system in eutherians," *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 67, no. 2, pp. 520–528, 2013.
- [23] H. Schaschl, S. Huber, K. Schaefer, S. Windhager, B. Wallner, and M. Fieder, "Signatures of positive selection in the cis-regulatory sequences of the human oxytocin receptor (OXTR) and arginine vasopressin receptor 1a (AVPR1A) genes.," *BMC Evol. Biol.*, vol. 15, no. 1, p. 85, 2015.
- [24] E. S. et al. Lander, "Initial sequencing and analysis of the human genome.," *Nature*, vol. 409, no. 6822, pp. 860–921, 2001.
- [25] J. C. et al. Venter, "The sequence of the human genome.," *Science (80-.)*, vol. 291, no. 5507, pp. 1304–51, 2001.
- [26] I. Ezkurdia, D. Juan, J. M. Rodriguez, A. Frankish, M. Diekhans, J. Harrow, J. Vazquez, A. Valencia, and M. L. Tress, "Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 23, no. 22, pp. 5866–5878, 2014.
- [27] M. Levine and R. Tjian, "Transcription regulation and animal diversity.," *Nature*,

- vol. 424, no. 6945, pp. 147–151, 2003.
- [28] L. M. P. Zaha, Arnaldo; Henrique Bunselmeyer, Henrique F., Passaglia, *Biologia Molecular Básica*, 5^a ed. Porto Alegre: ARTMED, 2014.
- [29] P. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. New York: Garland Science, 2010.
- [30] J. D. Watson, *Molecular Biology of the Gene*, 7th ed. Benjamin-Cummings Publishing Company, 2014, 2014.
- [31] J. L. Jameson, L. J. De Groot, D. M. de Kretser, L. C. Giudice, A. B. Grossman, S. Melmed, J. T. Potts, and G. C. Weir, *Endocrinology: Adult and Pediatric*. Elsevier, 2016.
- [32] G. A. Wray, “The evolutionary significance of cis-regulatory mutations,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 8, no. 3, pp. 206–216, Mar. 2007.
- [33] H. H. Dale, “On some physiological actions of ergot,” *J. Physiol.*, vol. 34, no. 3, pp. 163–206, 1906.
- [34] S. J. Ott. I, “The Action of Infundibulum upon Mammary Secretion,” *Proc Soc Exp Biol.*, no. 8, pp. 48–49, 1910.
- [35] M. K. Schafer EA, “The Action of Animals Extracts on Milk Secretion,” *Proc. Roy Soc. London*, vol. 84, no. 568, pp. 16–22, 1911.
- [36] G. Gimpl and F. Fahrenholz, “The Oxytocin Receptor System: Structure , Function , and Regulation,” vol. 81, no. 2, pp. 629–683, 2010.
- [37] A. G. Lee, D. R. Cool, W. C. Grunwald, D. E. Neal, C. L. Buckmaster, M. Y. Cheng, S. a Hyde, D. M. Lyons, and K. J. Parker, “A novel form of oxytocin in New World monkeys.,” *Biol. Lett.*, vol. 7, no. 4, pp. 584–587, 2011.
- [38] P. Vargas-Pinilla, V. R. Paixão-Côrtes, P. Paré, L. Tovo-Rodrigues, C. M. de A. G. Vieira, A. Xavier, D. Comas, A. Pissinatti, M. Sinigaglia, M. M. Rigo, G. F. Vieira, A. B. Lucion, F. M. Salzano, and M. C. Bortolini, “Evolutionary pattern in the OXT-OXTR system in primates: Coevolution and positive selection footprints: Fig. 1.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 1, pp. 88–93, 2015.
- [39] D. Ren, G. Lu, H. Moriyama, A. C. Mustoe, E. B. Harrison, and J. A. French, “Genetic Diversity in Oxytocin Ligands and Receptors in New World Monkeys,” *PLoS One*, vol. 10, no. 5, p. e0125775, 2015.
- [40] E. W. Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, “GenBank,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. Database Issue, pp. D36–D42., 2013.
- [41] D. J. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, “Basic local alignment search tool,” *J. Mol. Biol.*, vol. 215, pp. 403–410, 1990.
- [42] F. Cunningham, M. R. Amode, D. Barrell, K. Beal, K. Billis, S. Brent, D.

- Carvalho-Silva, P. Clapham, G. Coates, S. Fitzgerald, L. Gil, C. G. Giron, L. Gordon, T. Hourlier, S. E. Hunt, S. H. Janacek, N. Johnson, T. Juettemann, A. K. Kahari, S. Keenan, F. J. Martin, T. Maurel, W. McLaren, D. N. Murphy, R. Nag, B. Overduin, A. Parker, M. Patricio, E. Perry, M. Pignatelli, H. S. Riat, D. Sheppard, K. Taylor, A. Thormann, A. Vullo, S. P. Wilder, A. Zadissa, B. L. Aken, E. Birney, J. Harrow, R. Kinsella, M. Muffato, M. Ruffier, S. M. J. Searle, G. Spudich, S. J. Trevanion, A. Yates, D. R. Zerbino, and P. Flicek, "Ensembl 2015," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. D1, pp. D662–D669, 2015.
- [43] K. Katoh and D. M. Standley, "MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 30, no. 4, pp. 772–780, 2013.
- [44] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, and K. S. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 30, no. 12, pp. 2725–2729., 2013.
- [45] A. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, "Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data," *Bioinformatics*, vol. 28(12), pp. 1647–1649, 2012.
- [46] A. Rice, P. Longden, I. and Bleasby, "EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite," *Trends Genet.*, vol. 16(6), pp. 276–277, 2000.
- [47] E. Fernandez-Duque, "Social monogamy in wild owl monkeys (*Aotus azarae*) of Argentina: the potential influences of resource distribution and ranging patterns," *Am. J. Primatol.*, 2015.
- [48] RStudio Team, "RStudio: Integrated Development for R. RStudio." Boston, MA, 2015.
- [49] W. S. W. Wong and R. Nielsen, "Detecting selection in noncoding regions of nucleotide sequences," *Genetics*, vol. 167, no. 2, pp. 949–958, 2004.
- [50] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, and T. L. Madden, "Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction," *BMC Bioinformatics*, vol. 13, no. 1, p. 134, 2012.
- [51] B. M. Jacobsen and K. B. Horwitz, "Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 357, no. 1–2, pp. 18–29, 2012.
- [52] L. E. Cohen, F. E. Wondisford, and S. Radovick, "Role of PIT-1 in the gene expression of Growth hormone, Prolactin and Thyrotropin," *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 25, no. 3, pp. 523–540, 1996.
- [53] J. A. French, J. H. Taylor, A. C. Mustoe, and J. Cavanaugh, "Neuropeptide diversity and the regulation of social behavior in New World primates," *Front. Neuroendocrinol.*, 2016.