

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

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

PEDRO VARGAS PINILLA

Orientadora: Maria Cátira Bortolini

Porto Alegre, abril de 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Agradecimentos

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

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

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

Lista de siglas e abreviaturas

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

PVN – Núcleo paraventricular

RG: Raio de giro

RMSD: desvio da raiz quadrada média

RP: Receptores de Progesterona

SON - Núcleo supra - óptico

SP: Peptídeo sinal

Thr4Gly7OXT: Oxitocina Treonina4, Glicina 7

Thr4OXT: Oxitocina Treonina4

Thr8OXT – Oxitocina, treonina 8

TRH – Hormônio liberador de tireotrofina

Val3Pro8OXT – Oxitocina , Valina 3- Prolina 8

VT : Vasotocina

Lista de Tabelas

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

Lista de Figuras

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

SUMÁRIO

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

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

RESUMO

Um dos maiores desafios que as Ciências Biomédicas têm na atualidade é conseguir conectar variações em nível do genoma com aquelas observadas em nível de fenótipos. Utilizando a estratégia de genes candidatos e abordagens interdisciplinares, temos obtido sucesso nessa empreitada desafiadora, ajudando, inclusive, a quebrar paradigmas, pelo menos no que diz respeito a características táxon-específicas. Tivemos como foco os neuropeptídeos Oxitocina (OXT) e Vasopressina (AVP), dois neuro-hormônios parálogos que, ao interagirem com seus receptores (OXTR, AVPR1a, AVPR1b e AVPR2), promovem funções fisiológicas e comportamentais. Demonstramos que a postulada conservação da sequência de aminoácidos de OXT em todos os mamíferos placentários não se confirma, visto serem encontradas pelo menos 7 formas (Leu⁸OXT, Pro⁸OXT, Val³Pro⁸OXT, Ala⁸OXT, Thr⁸OXT, Phe²OXT e Val³OXT) em espécies de primatas do Novo Mundo (pNM). Conectamos, ainda, pelo menos algumas dessas variantes com traços complexos em clados de macacos do Novo Mundo, tal como parto gemelar, monogamia social e cuidado paterno, o que indica sua possível relevância evolutiva, detectada também por testes específicos para seleção positiva e coevolução entre ligante e receptor. Para avançar no conhecimento funcional das potencialmente adaptativas variantes, conduzimos testes e experimentos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, comparando-as com a forma mais comum de OXT (Leu⁸OXT) e AVP. Demonstramos a capacidade reduzida das variantes *Cebidae* Pro⁸OXT e *Saguinus* Val³Pro⁸OXT no recrutamento das β -arrestinas, com consequente impacto na internalização de receptores e na dessensibilização de todo o sistema *OXT-AVP*. Ainda, conseguimos avaliar a capacidade de ambas as variantes estimularem o cuidado paterno em ratos, mostrando, pela primeira vez, um modelo natural para o conceito de agonismo com seletividade funcional, com prováveis implicações evolutivas. Além disso, investigamos a região regulatória do gene *OXTR* e identificamos que o número de elementos de resposta de progesterona (PREs) no promotor do referido gene é significativamente correlacionado com a presença de cuidado paterno no clado dos pNM. Com isso, buscamos delinear um cenário completo sobre a emergência de fenótipos adaptativos em macacos do Novo Mundo.

ABSTRACT

One of the greatest challenges that the Biomedical Sciences has at present is to be able to connect variations at genome level with those observed at phenotype level. Using the strategy of candidate genes and interdisciplinary approaches we have succeeded in this challenging endeavor and even helped to break paradigms, at least considering taxon-specific characteristics. We focused on the oxytocin (OXT) and Vasopressin (AVP) nonapeptides, two paralog neurohormones that interact with their receptors (OXTR, AVPR1a, AVPR1b and AVPR2) promoting physiological and behavioral functions. We demonstrated that the postulated conservation of the amino acid sequence of OXT in all placental mammals is not true since at least 7 forms (Leu⁸OXT, Pro⁸OXT, Val³Pro⁸OXT, Ala⁸OXT, Thr⁸OXT, Phe²OXT and Val³OXT) were found in New World primate species (NWm). We also connected at least some of these variants with complex features in clades of NWm, such as twin birth, social monogamy and paternal care, indicating their possible evolutionary relevance, also detected by specific tests for positive selection and co-evolution between ligand and receptor. To understand the functional knowledge of the potentially adaptive variants we conducted *in silico*, *in vitro* and *in vivo* tests and experiments comparing them with the most common form of OXT (Leu⁸OXT) and AVP. We demonstrated the reduced capacity of the Cebidae Pro⁸OXT and Saguinus Val³Pro⁸OXT variants in the recruitment of β -arrestins, with a consequent impact on receptor internalization and desensitisation of the entire OXT-AVP system. Furthermore, we were able to evaluate the ability of both variants to stimulate paternal care in rats, showing, for the first time, a natural model for the concept of agonism with functional selectivity, with probable evolutionary implications. In addition, we investigated the regulatory region of the *OXTR* gene and identified that the number of progesterone response elements (PREs) in the promoter of the above mentioned gene is significantly correlated with the presence of parental care in the NWm clade. With this, we aimed to delineate a complete scenario on the emergence of adaptive phenotypes in the New World monkeys.

CAPÍTULO I

1.1 Introdução

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

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

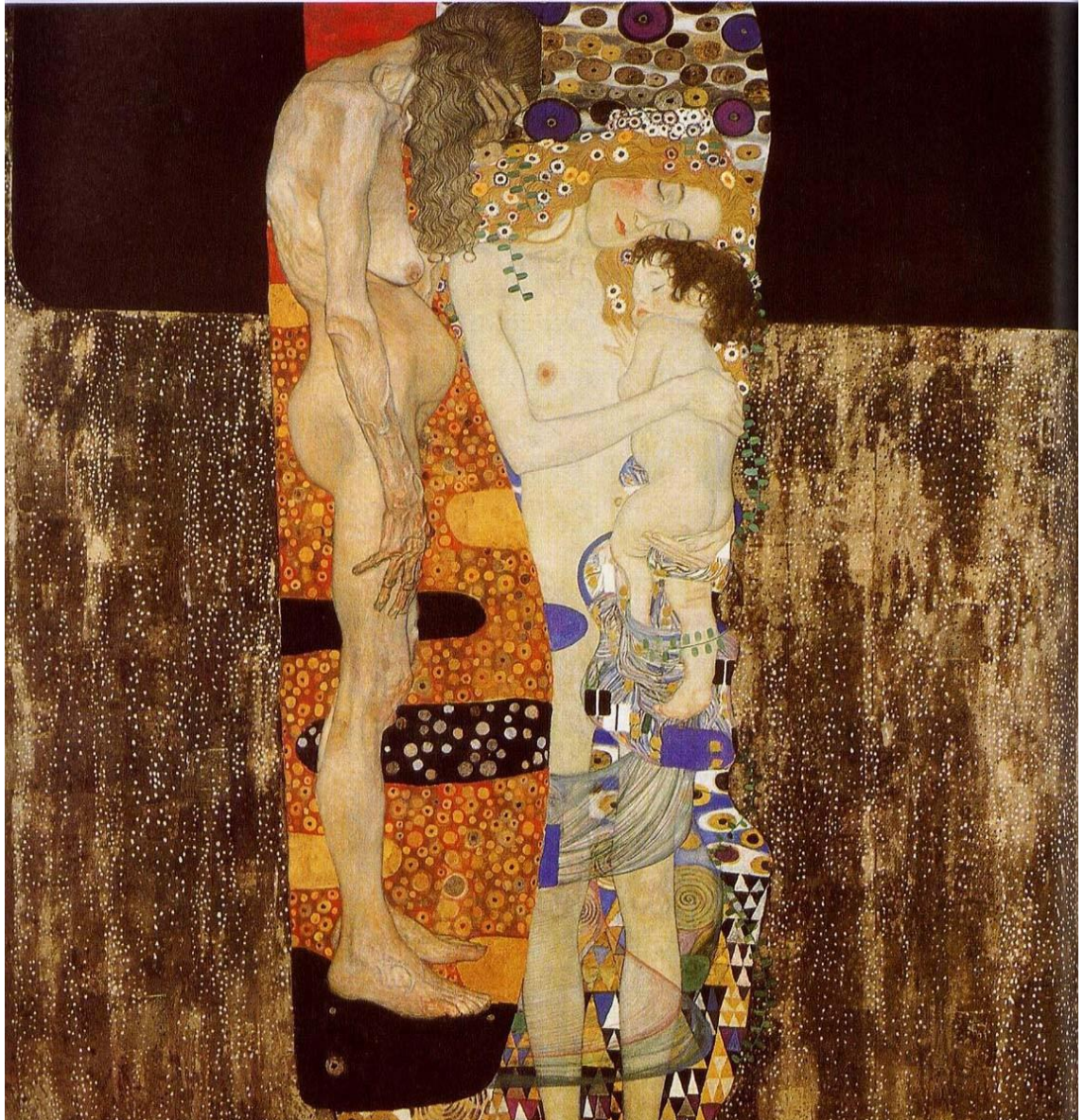


Figura 1. *As Três Idades da Mulher*, obra de 1905 do pintor austríaco Gustav Klimt.

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

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

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

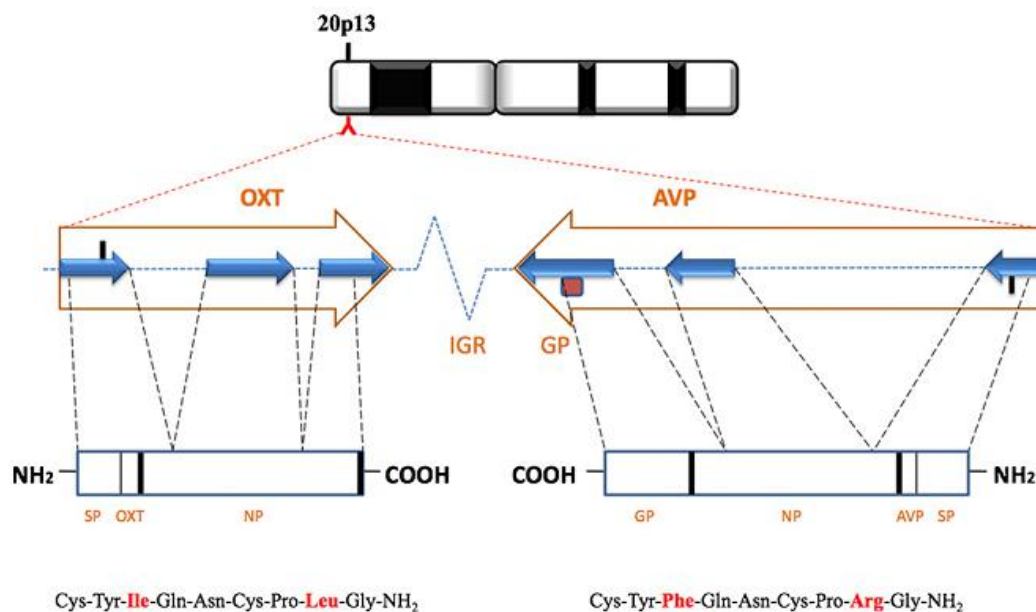


Figura 2. Diagrama dos genes de oxitocina e vasopressina (respectivamente, *OXT* e *AVP*, representados pelas setas grandes); pré-pró-hormônios ilustrados pelas caixas. A sequência de aminoácidos de cada um dos nonapeptídeos aparece abaixo, e a localização destes no cromossomo 20 humano é ilustrada acima.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

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

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

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

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

1.2 Evolução do sistema OXT/OXTR e proteínas relacionadas

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

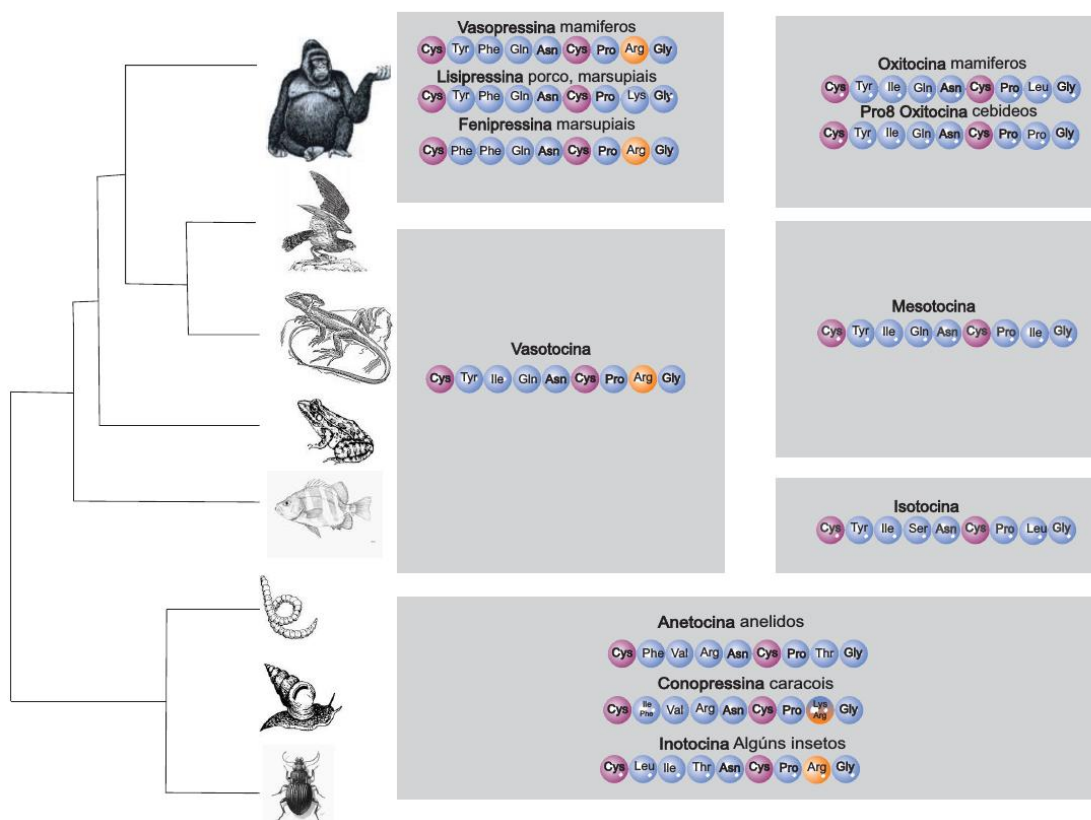


Figura 3. Homólogos de oxitocina e vasopressina. Donaldson & Young (2008), com modificações.

Tabela 1. Oxitocina e peptídeos relacionados.

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

^a Os aminoácidos 1Cys, 5Asn, 6Cys, 7Pro e 9Gly (NH₂) são conservados.

^b Inclui peixes pulmonados.

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

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

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

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

1.3 Receptores

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

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

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

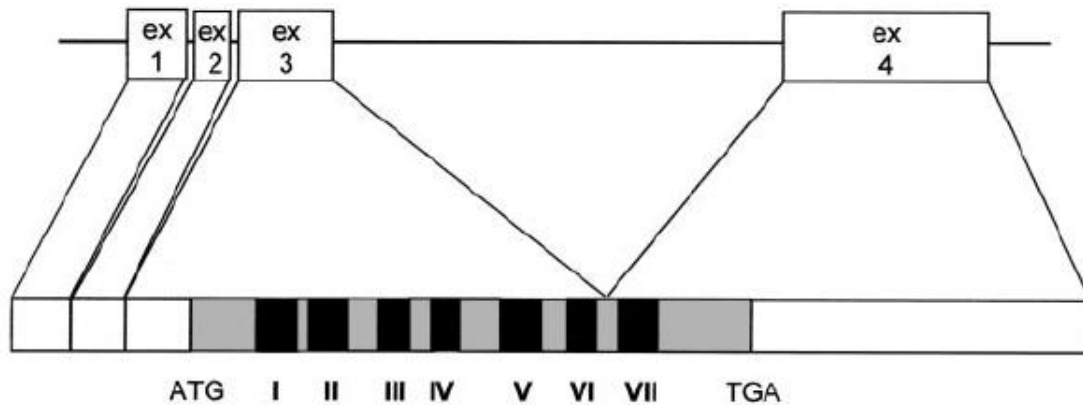


Figura 4. Esquema gráfico do gene *OXTR*. As áreas escuras, numeradas por algarismos romanos, correspondem aos domínios transmembrana de *OXTR*. Gimpl & Fahrenholz 2001.

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

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

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

1.4 Algumas características da interação ligante-receptor

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

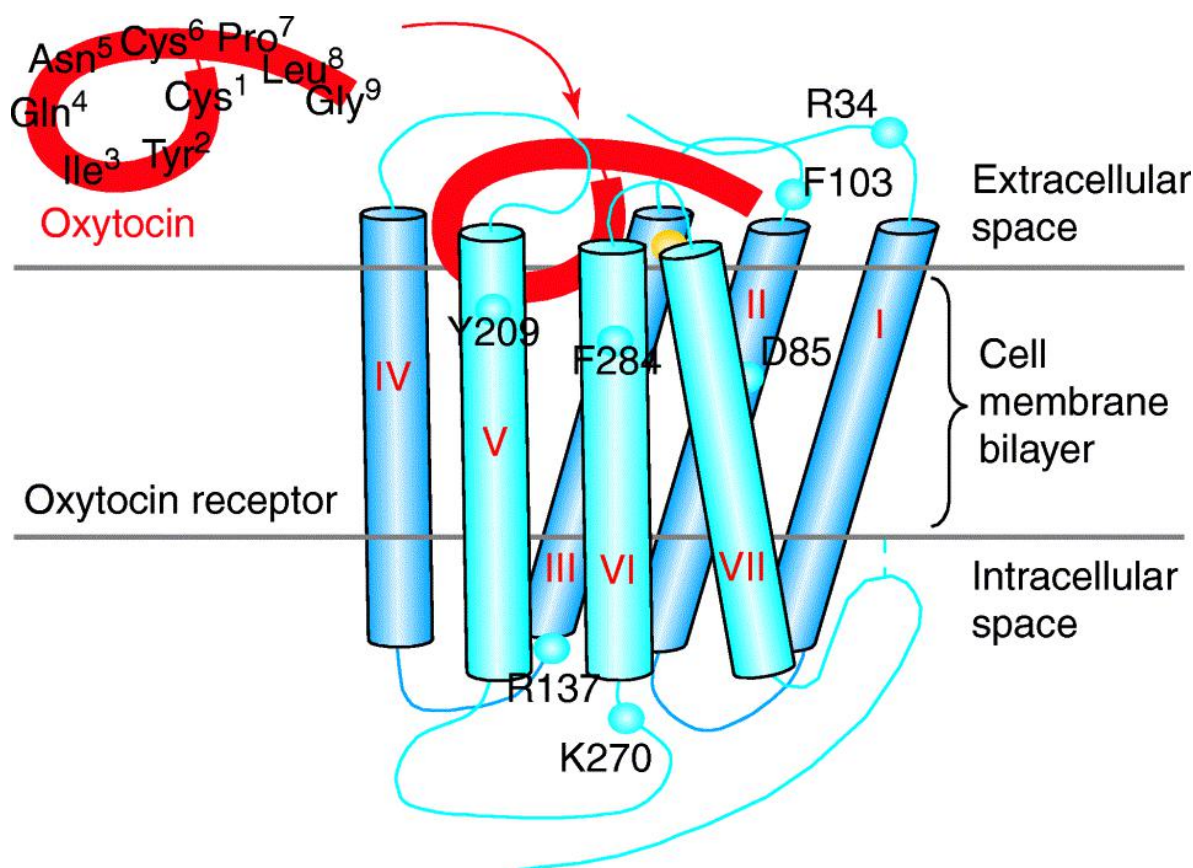


Figura 5. Modelo esquemático da estrutura da OXT e de OXTR. A oxitocina encontra-se representada no canto superior esquerdo, em vermelho, com seus resíduos de aminoácidos numerados de 1 a 9. O receptor, em azul, mostra a interação do hormônio quando o complexo está ativado. Os sete domínios intermembrana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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5 Expressão

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

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

1.6 Ordem Primates

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

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

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

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

1.6.1 Parvordem Catarrhini

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

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

1.6.2 Parvordem Platyrrhini

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

Pitecídeos

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

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

Atelídeos

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

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

Cebídeos

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabela 4. Características ecológicas de primatas analisados neste trabalho.

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

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

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

1.6.3 Organização social

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

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

1.6.4 Cuidado parental

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

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

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

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

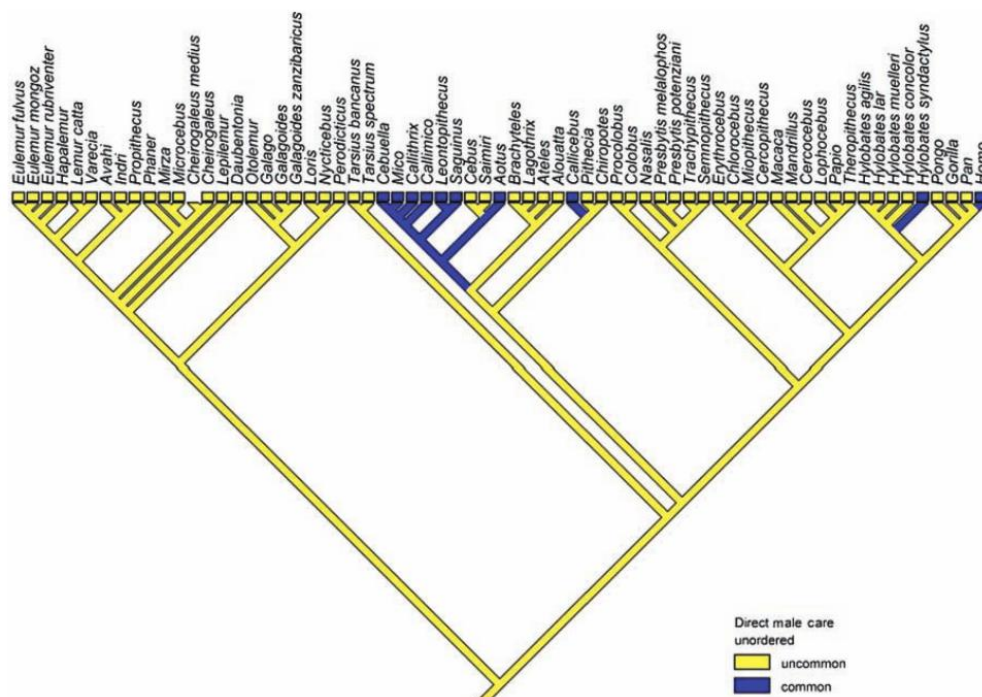


Figura 6. Primatas que apresentam cuidado paterno direto (em azul). Fonte: Fernandez-Duque et al. 2009.

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

1.7 Conservação da OXT em mamíferos placentários

Revisões publicadas na última década sobre evolução e estrutura de nonapeptídeos indicavam que a estrutura da OXT estava conservada em todas as espécies de mamíferos placentários investigadas até então (Donaldson & Young 2008; Lee et al. 2009; Insel 2010). Porém, no ano de 2011, Lee e colaboradores sequenciaram as regiões codificantes do gene *OXT* em cinco espécies de pNM: *Cebus apella*, *Saimiri sciureus*, *Aotus nancymae*, *Callithrix jacchus* e *Callicebus cupreus*. Encontraram uma substituição nucleotídica não sinônima no códon que codifica o oitavo aminoácido do nonapeptídeo (CTG→CCG; Leu8→Pro8) em todas as espécies de pNM analisadas, exceto no *Callicebus cupreus*, descrevendo, assim, pela primeira vez, a forma Pro⁸OXT nos mamíferos eutérios.

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

CAPÍTULO II

2.1 Objetivos

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

2.2 Objetivos Específicos

Constituem objetivos específicos deste estudo:

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

CAPÍTULO III

3.1 Evolução do Sistema OXT-AVP

Conforme comentado anteriormente, até o início da década atual, acreditava-se que OXT não variava em mamíferos placentários. Buscando ampliar os conhecimentos sobre a variante Pro⁸OXT descrita por Lee et al. (2011), sequenciamos e analisamos a região codificadora do gene *OXT* de 29 espécies de pNM. Deste conjunto de espécies, 21 foram também investigadas com relação à porção codificadora do gene *OXTR*.

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

O material suplementar encontra-se no seguinte link:

www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1419399112/-/DCSupplemental.



Evolutionary pattern in the OXT-OXTR system in primates: Coevolution and positive selection footprints

Pedro Vargas-Pinilla^{a,1}, Vanessa Rodrigues Paixão-Côrtes^{a,1}, Pamela Paré^a, Luciana Tovo-Rodrigues^a, Carlos Meton de Alencar Gadelha Vieira^a, Agatha Xavier^a, David Comas^b, Alcides Pissinatti^c, Marialva Sinigaglia^a, Maurício Menegatti Rigo^a, Gustavo Fioravanti Vieira^a, Aldo B. Lucion^d, Francisco Mauro Salzano^{a,2}, and Maria Cátira Bortolini^{a,2}

^aDepartamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil; ^bInstitut de Biologia Evolutiva, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain; ^cCentro de Primatologia do Rio de Janeiro, 20940-200 Rio de Janeiro, RJ, Brazil; and ^dDepartamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

Contributed by Francisco Mauro Salzano, November 26, 2014 (sent for review July 11, 2014; reviewed by Guido Barbujani and Rafal Slusarz)

Oxytocin is a nonapeptide involved in a wide range of physiologic and behavioral functions. Until recently, it was believed that an unmodified oxytocin sequence was present in all placental mammals. This study analyzed oxytocin (OXT) in 29 primate species and the oxytocin receptor (OXTR) in 21 of these species. We report here three novel OXT forms in the New World monkeys, as well as a more extensive distribution of a previously described variant (Leu8Pro). In structural terms, these OXTs share the same three low-energy conformations in solution during molecular dynamic simulations, with subtle differences in their side chains. A consistent signal of positive selection was detected in the Cebidae family, and OXT position 8 showed a statistically significant ($P = 0.013$) correlation with litter size. Several OXTR changes were identified, some of them promoting gain or loss of putative phosphorylation sites, with possible consequences for receptor internalization and desensitization. OXTR amino acid sites are under positive selection, and intramolecular and intermolecular coevolutionary processes with OXT were also detected. We suggest that some New World monkey OXT-OXTR forms can be correlated to male parental care through the increase of cross-reactivity with its correlated vasopressin system.

OXT | OXTR | primates | coevolution | behavior

Oxytocin has crucial functions related to physiological processes and social behaviors in primates and other placental mammals. A nonapeptide (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly) (1), oxytocin (OXT-8Leu) is both a neurotransmitter released by neuronal cells in synapses and a hormone, activating receptors distant from the site of its synthesis through the circulatory system (2). In mammals, OXT acts as a hormone in uterine contraction during parturition and in milk ejection while lactating. It is also a key central nervous system neurotransmitter, regulating/modulating complex social and reproductive behaviors (i.e., pair bonding and parental care) (3–7).

Until recently, it was believed that the OXT amino acid chain was the same in all placental mammals. However, Lee and colleagues (8) reported a T > C change in four New World monkeys (NWms), *Saimiri sciureus*, *Cebus apella*, *Callithrix jacchus*, and *Aotus nancimae*, substituting leucine to proline at position 8 (OXT-8Pro). This form was also found in *Tupaia belangeri*, a tree shrew species of Southeast Asia (8). OXT differs from its paralog vasopressin (AVP; Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly) at positions 3 and 8. Variation at position 8 also identifies nonplacental OXT/AVP-like nonapeptides, such as mesotocin, present in some marsupials (7, 9). These findings dispel the notion of a universal OXT amino acid sequence for placental mammals. They also suggest that residue variability at position 8, in some cases associated with variations at positions 2–5, may be connected with the recognition, binding, and activation of receptors, potentially leading to species-specific functional changes (7, 10).

OXT activity depends on adequate interaction with its unique receptor, OXTR, although it can also bind to the vasopressin receptors (AVPR1a, AVPR1b, and AVPR2) with lower affinity (11–13). Similar to other receptors that use G proteins as transducer signals across the cell membranes, OXTR is composed of seven transmembrane (TM1–TM7), four extracellular (N-terminal tail-ECL3), and four intracellular (ICL1–C-terminal tail) domains. ECL and ICL are important for the interaction with OXT and G proteins, respectively, whereas TMs are connected with both functions (7, 11).

In contrast to what is observed for placental mammal OXT, OXTR presents hundreds of variants in regulatory and coding regions, including at the intraspecific level. In humans, OXTR single-nucleotide polymorphisms have been associated with several social behavioral phenotypes (14).

The presence of OXT-OXTR-related systems throughout the animal kingdom indicates that their typical roles in placental mammals are likely exaptations of ancient functions, such as regulation of fluid balance and egg-laying (15, 16). Studies have attempted to investigate both the interaction of OXT-OXTR-like systems and their coevolution (11, 17). However, our knowledge about this nonapeptide-receptor system, including the extent of its variability in the primate order, remains limited.

Significance

It was previously believed that placental mammals present no variability in oxytocin (OXT). The present study reports novel data on the diversity of OXT and its receptor (OXTR) in primate species, including New World monkeys. Contrary to prior expectations, we found three novel OXT forms and several OXTR nonsynonymous changes not previously described. In the Cebidae family, signals of positive selection were found for an OXT variant at position 8, which is associated with larger litter sizes. We detected positive selection for OXTR forms and report a coevolutionary process between changes in OXT and OXTR.

Author contributions: P.V.-P., V.R.P.-C., C.M.d.A.G.V., F.M.S., and M.C.B. designed research; P.V.-P., V.R.P.-C., C.M.d.A.G.V., and A.X. performed research; A.P. contributed new reagents/analytic tools; P.V.-P., V.R.P.-C., P.P., L.T.-R., M.S., M.M.R., G.F.V., and M.C.B. analyzed data; A.P. provided information about the animals investigated; and P.V.-P., V.R.P.-C., P.P., D.C., A.B.L., F.M.S., and M.C.B. wrote the paper.

Reviewers included: G.B., Università di Ferrara; and R.S., University of Gdansk.

The authors declare no conflict of interest.

Data deposition: The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank database (accession nos. [KM186262](#) to [KM186289](#)).

¹P.V.-P. and V.R.P.-C. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. Email: francisco.salzano@ufrgs.br or maria.bortolini@ufrgs.br.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1419399112/-DCSupplemental.

NWm emerged ~30 million years ago. They are classified into 16 genera and ~75 species and present a wide range of reproductive and social behaviors (18, 19), but little is known about their genetic variability and concurrent phenotypic variation (20).

The present study reports results about *OXT* and *OXTR* diversity in 29 primate species, including 20 NWm species. These analyses include original *OXT* and *OXTR* sequences for 16 and 12 NWm species, respectively. We discuss details about the co-evolution of these systems, as well as possible connections among reported genetic variability, positive selection, and some key species-specific biologic traits.

Results

OXT Variants in Primates. Fig. 1 shows that OXT-8Pro is present in all species from the Cebidae family; furthermore, A > G (isoleucine > valine) at position 3 (OXT-3Val-8Pro) in *Saguinus*. The Pitheciidae family presented two novel OXT forms, both with changes at codon 8: C > G (leucine > alanine) in *Cacajao melanocephalus* and *Chiropotes utahickae* (OXT-8Ala), and C > A

(leucine > threonine) in one specimen of *Chiropotes albinus* (OXT-8Thr).

All amino acid changes were found to be homozygous. In species tested with multiple individuals, no intraspecific variation was found, suggesting these OXT forms are probably species- or group-specific.

Grantham scores (GSs) were calculated to investigate the putative functional effects of detected changes in OXT. Cebidae OXT8-Pro and Pitheciidae OXT8-Ala, as well as *C. albinus* OXT-8Thr, are moderately conserved (GS = 98, 96, and 92, respectively), whereas a Val at position 3 in *Saguinus* is a conservative change (GS = 29). No statistically significant differences in relation to biochemical properties were found using PRIME and SIFT tools.

The available 3D structure for OXT (PDB ID code 1NPO) (21) was used to perform a structural evaluation of the implications of these changes. OXT-8Leu was in silico with water and ions at specific physiologic concentrations in a virtual cube. On the basis of this molecular dynamics simulation, a free-energy

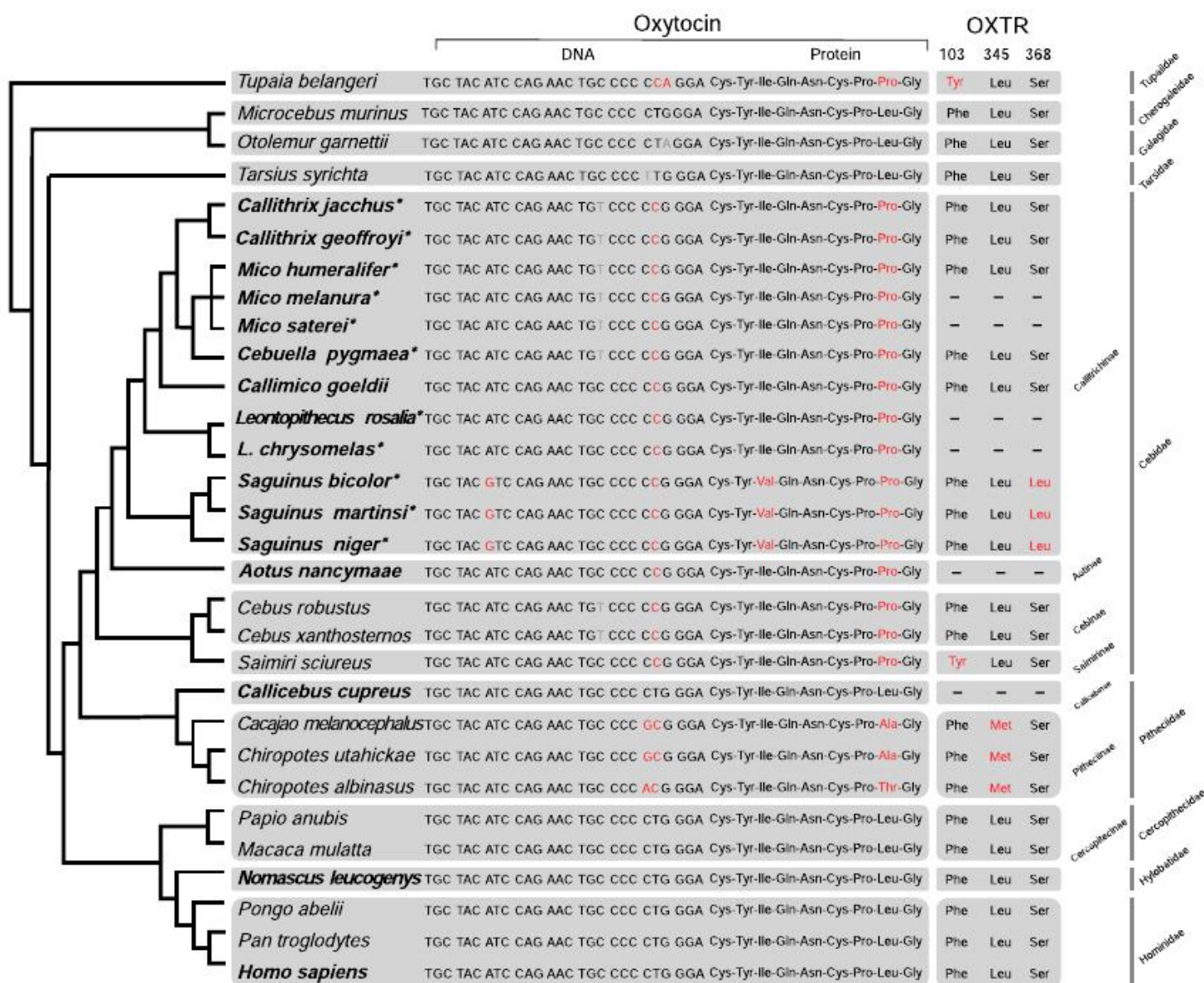


Fig. 1. Oxytocin nucleotide and amino acid sequences observed in primates, with the OXTR positions coevolving with OXT. The maximum likelihood phylogenetic tree was based on an ~8-Mb genomic sequence reported by Perelman and colleagues (19). Nonsynonymous nucleotide and amino acid changes are shown in red. Taxonomic families and subfamilies are indicated, as well as species with common male care (in bold) and those with twin pregnancies (asterisks). The trace (-) indicates that no information is available.

surface analysis revealed three main low-energy conformations: type 1, type 2, and type 3 (*SI Appendix, Figs. S1 A and B and S2 and Table S1*). Type 1 has a more open conformation than the others, whereas type 2 and type 3 are more compact. Type 2 also shows hydrogen bonds between the Tyr2/Cys6 and Tyr2/Asn5 residues, which lead to the typical ring structure that resembles oxytocin complexed with neurophysin, its molecular carrier (21, 22). All OXT forms showed the presence of the same three conformational types, with some small differences in the side chains (*SI Appendix, Fig. S1A*).

The same experiment was conducted with AVP. *SI Appendix, Fig. S1B* shows that these three conformational types are also observed there, with small changes in the side chains. This suggests preservation of the 3D conformations that allow nonapeptide transport (through connection with neurophysin) and adequate coupling with receptors.

It is difficult to imagine these OXT changes have no evolutionary implications. Thus, we tested whether they might have been under selection through two different approaches. The NsSites model failed to detect codons under positive selection. However, when considered site by site, a nonsynonymous/synonymous ratio (ω) of ~ 1 was found for OXT at position 8. This site was also recovered by the Branch-site model, indicating relaxation (*SI Appendix, Fig. S3*). This last model detected evidence for positive selection in the Cebidae family. Clade Model D had a better performance compared with the neutral model, using a likelihood ratio test ($P = 0.0368$, $\omega = 125.99$; *SI Appendix, Table S2*). This result indicates that the primate ω values can vary between branches, suggesting a distinctive evolutionary pattern for the Cebidae family.

In addition, when the species phylogenetic tree (Fig. 1) is visually compared with the OXT maximum likelihood tree, different topologies can be clearly observed (*SI Appendix, Fig. S7*). When an incongruence of this nature is detected, a simple neutral model of mutation and drift is insufficient to explain the pattern found.

We assessed significance associations between molecular OXT forms and specific NwM social behavior and ecological traits, using Mann-Whitney or Fisher exact tests (23). Proline at position 8 was significantly associated with larger litters ($P = .013$), but not with other ecological/social primate traits (*SI Appendix, Tables S3 and S4*).

OXT. Our analyses reveal 73 nonsynonymous OXTR changes, 17 of which have not been previously described, to our knowledge (*SI Appendix, Table S5*), whereas others are located in known human polymorphic sites. Of the 73 sites, 18 (five novel) are located in the N-terminal tail, one of the most relevant domains for the interaction with OXT. Thirty-eight changes (six novel) are present in the intracellular domain 3 and C-terminal tail, and 10 (six novel) are found along TM1 and TM3–TM5 (*SI Appendix, Fig. S4*). The highest number of nonsynonymous changes was found in *Cebus xanthosternos*, *Saguinus niger*, and *C. utahickae* (27 each), and *S. sciureus* and *C. utahickae* have the higher number of singletons (four each).

According to the GS, 4% of the OXTR changes are considered radical changes: Gly22Trp (located at the N-terminal tail; GS = 184), Trp161Gly (TM4; GS = 184), and Cys383Gly (C-terminal tail; GS = 159). Twenty percent of the changes lead to moderately radical changes and are present in the N-terminal tail, TM1, ICL2, and C-terminal domains. The amino acid change at position Trp161Gly (*C. xanthosternos*) was also predicted as damaging, using SIFT (*SI Appendix, Table S5*).

Although homology modeling and docking experiments are important for understanding the OXTR-OXT system interaction, the G protein coupled receptor (GPCR) signaling regarding intracellular domains is also fundamental to elucidating receptor response. On this basis, we analyzed the level of OXTR protein

disorder, secondary structure, and solvent accessibility, as well as the putative phosphorylation sites in the intracellular domains. Our analyses indicated that OXTR has long disordered regions on N, C-terminal tails and a portion of ICL3. The analyses showed that the changes do not introduce any important difference in flexibility or accessibility. Taking into account the available information for two GPCRs (protein kinase C and the G protein coupled receptor kinase), 13 putative phosphorylation sites were identified (*SI Appendix, Table S6*). Arg149Ser is sufficient to create a new phosphorylation site in *C. jacchus* and *C. geoffroyi*, *Cebuella pygmaea*, *C. xanthosternos*, and *C. albinus*, probably compensating for the loss of the phosphorylation site at position 152. *Papio anubis* and *Macaca mulatta* also gained a phosphorylation site (Phe362Thr). In contrast, the Ser368Leu form present in three *Saguinus* species disrupts an important phosphorylation site from one of the two known OXTR serine clusters (Ser368–Ser370 and Ser377–Ser379; *SI Appendix, Fig. S4*). These clusters are relevant for β arrestin binding, a protein involved in the desensitization of GPCRs (11, 24). These findings suggest that some of the OXTR changes may be functional.

The NsSites maximum likelihood model (*SI Appendix, Table S7*) indicated that the best-fit model (M2a) allows for sites under positive selection. In OXTR, 91% (P0) of the sites are under selective constraint ($\omega_0 = 0.036$), 8% (P1) with indication of selective relaxation ($\omega_1 = 1$), and 1% (P2) with positive selection ($\omega_2 = 5.157$). Results in the same direction were obtained with another model (M8) that admits positive selection (*SI Appendix, Table S7*). The Bayes Empirical Bayes test indicated that two sites, 6Ala (N-terminal) and 255Val (ICL3), present signals of positive selection, with a probability of 98% (*SI Appendix, Fig. S5*).

In addition, the Selecton software detected three positively selected OXTR sites, 6Ala, 255Val, and 251Gly (ICL3), two of which NsSites also detected. All are located in important regions that interact with the nonapeptides or G proteins (*SI Appendix, Fig. S4*).

These results reveal that the degree of conservation and evolutionary rates were unequally distributed across the OXTR domains. The N-terminal and ICL3 regions were most variable, whereas TMs were most conserved. This may be because TMs have the double function of interaction with nonapeptides and G proteins (7, 11).

OXT-OXTR Coevolution. Intramolecular coevolution analyses (*SI Appendix, Table S8*) showed that *C. geoffroyi*, *C. jacchus*, *Cebuella pygmaea*, *C. xanthosternos*, and *C. albinus* are coevolving at OXTR positions 23 (N-terminal) and 149 (ICL2). When a serine is found at position 23, a serine is also found at position 149 (posterior probability, 81%), creating a new putative phosphorylation site recognized by protein kinase C (*SI Appendix, Table S6*).

Other important results emerged regarding OXTR binding sites (Arg-34, Phe-103, Tyr-209, and Phe-284) (25–28). These sites are conserved in the species sampled, with the exception of *S. sciureus*, which showed the Phe103Tyr change (7). OXTR-103 is a binding site for OXT at position 8 (*SI Appendix, Fig. S4*) and a homolog of the binding site for AVPR1a at position 115. Remarkably, when the AVPR1a-115 site is artificially mutated in rat cells (Tyr115Phe), the affinity of AVPR1a for OXT increases (29). Keeping in mind that Tyr is the most common amino acid present in AVPR1a, the presence of a Tyr at OXTR position 103 could increase its affinity for AVP at least in *S. sciureus*. These findings suggest that coevolutionary processes might involve not simply OXT and OXTR, or AVP and its three receptors, but rather, a cross-reaction between these systems.

The Spidermonkey software showed two coevolutionary processes in intermolecular analyses: OXT at position 3 coevolves with OXTR (position 368, C-terminal, posterior probability of 56%), whereas OXT at position 8 coevolves with OXTR at position 345 (C-terminal, posterior probability of 80%; *SI Appendix, Fig. S6 and Table S8*). More specifically, the three species of

Saguinus have a Val at position 3 concomitantly with a Leu at OXTR 368. As mentioned, the latter change removes an important phosphorylation site from one known OXTR serine cluster, which could modify the desensitization of G protein-coupled receptors (11, 24).

In addition, a correlation analysis revealed that species that have the highest OXT genetic distances tend to show a similar pattern with OXTR ($\rho = 0.52$; $P < 0.001$; *SI Appendix, Table S9*), independent of their position on the phylogenetic tree. This result suggests similar evolutionary tendencies, which can be a result of natural selection.

Discussion

The nonapeptide oxytocin and its paralog vasopressin perform crucial functions in physiologic processes and social and reproductive behaviors in placental mammals. During the roughly ~70 million years of evolution that separate the human and mouse lineages, no amino acid replacement occurred in OXT. In contrast, NWms present five forms of OXT, with changes found exclusively at positions 3 and 8. These positions are the most important for highly selective binding to different receptor subtypes (29). Interestingly, AVP is conserved in the NWm branch (*SI Appendix, Fig. S6*), at least according to 15 species studied recently (30).

Prominent examples of positive selection in the NWm lineage are rare (20). Here we obtained consistent evidence for positive selection in OXT for the Cebidae branch (OXT-8Pro and OXT-3Val-8Pro). For OXTR, we identified sites that seem to be relevant for the function of the OXT-OXTR system beyond those previously identified (25–28). For three of them (sites 6, 251, and 255), signals of positive selection were detected. Intermolecular coevolutionary analysis also revealed that *Saguinus* presents a Val at position 3 of OXT that seems to have coevolved with a Leu at 368 of OXTR. It is noteworthy that Smith and Ginsburg (31) demonstrated through in vivo and in vitro experiments that a Val at position 3 of OXT increases uterus contraction, indicating its functionality at least for this trait.

Because natural selection acts on phenotypes, we verified whether the amino acid changes described here would have phenotypic implications. Although the GS predictions for the new NWms-OXTs showed moderate/conservative values and no significant alteration in some physicochemical properties, all changes deserve to be investigated. For instance, comparing isotocin (present in fishes) (2) with mesotocin (found in birds, lungfish, reptiles, amphibians, and some marsupials; 2) identified two amino acid changes, Ser > Gln (GS = 68) and Leu > Ile (GS = 5), at positions 4 and 8, respectively. In addition, the difference between mesotocin and OXT consists of only one alteration at position 8: Ile > Leu (GS = 5). These changes have lower GS values than those we report here in the NWm group.

Furthermore, our analysis reveals that the five OXT forms present three preferential conformations in solution, suggesting the preservation of basal characteristics of these molecules and, consequently, of their primordial functions in placental mammals.

As for OXT-OXTR affinity, an instigating example of coevolutionary analysis can be cited: *S. sciureus* presents both OXT-8Pro and OXTR-103Tyr forms. The presence of the Tyr residue at position 103 could increase affinity with AVP at position 8, similar to what occurs with OXT and AVPR1a when changes are introduced in homolog sites (29). Considering receptor activation and signaling, a leucine at OXTR-368 in *Saguinus* (coevolving with a Val at OXT position 3) destroys an important phosphorylation site. This could lead to instability of the OXTR- β -arrestin interaction and consequent changes in OXTR internalization and desensitization. Also, a serine at OXTR position 149 (coevolving with a Ser at position 23 in several species) creates a new putative phosphorylation site recognized by protein kinase C.

The processes described here can be connected to ecological and social behavior traits, particularly in the Callitrichinae subfamily, where we found an association between larger litter size and a proline at position 8.

Both OXT and AVP are related to pair bonding and parental care, but apparently the OXT system plays a more important role in females and the AVP system primarily influences males. This suggests an interesting sexually dimorphic pattern (32), which has been described in *C. jacchus* (33). Another study showed that AVPR1a increases in dendritic spines of the prefrontal cortex during *C. jacchus* fatherhood (34). Furthermore, experimentation with prairie voles showed the importance of AVP and AVPR1a in complex male behaviors, including monogamy and paternal care (2, 35). Thus, our finding of the OXT-8Pro and OXT-3Val-8Pro in the Cebidae could increase OXT affinities to AVP receptors (especially AVPR1a). Meanwhile, changes in OXTR (i.e., OXTR-103Tyr) could increase its affinity to AVP.

In Callitrichinae, the subfamily of the Cebidae to which *Saguinus* and *Callithrix* belong, it is well documented that males (fathers, siblings, and unrelated) provide important support for infant survival (36). Studies also demonstrate that male exposure to newborns increases responsiveness for care in inexperienced alloparental Callitrichinae (37). There are well-known reasons that could justify this pattern of multiple helpers: first, the high energetic costs of reproduction (birth weight of twin infants is ~30% of Callitrichinae females' body weight), and second, females have a postpartum estrus and may become pregnant while still nursing. The result is that infant survival rates of experienced mothers with inexperienced fathers and no siblings are lower than those observed when both parents are experienced and siblings are present (36). In addition, even in some Cebidae species in which twin births are rare, paternal care is present, which could be connected to a strategy that promotes the evolution of genetic monogamy, such as observed in *Aotus azarae* (38) and *Callimico goeldii* (20).

Paternal care seems to have evolved independently at least four times in the radiation of the primate order, one of which is in the Cebidae branch (39). Thus, OXT-8Pro and OXT-3Val-8Pro forms could influence behaviors through increase of affinity, at least with AVPR1a. These behaviors include parental male care in Cebidae species with twin pregnancies or in other reproductive and social circumstances in which male care (both parental and alloparental) is fundamental for adaptive success.

Several studies reveal intense male and female parental, as well as alloparental, care in the Callitrichinae subfamily (20). Thus, Cebidae OXT-8Pro and OXT-3Val-8Pro forms can be also connected with female behaviors. Recently, Cavanaugh and colleagues (40) showed that treatment with OXT-8Pro in *C. jacchus* facilitated fidelity in females, but not in males, but they unfortunately did not test other behaviors, including parental care.

Curiously, the shrew *T. belangeri* presents both OXT-8Pro and OXTR-103Tyr, as observed in *S. sciureus*. The simultaneous presence of these two forms in different taxa suggests parallel evolution, providing a potential example of positive selection and adaptive evolution (41). *T. belangeri* males do not take care of their offspring. A similar behavior is observed in *Saimiri*, one of only two genera of the Cebidae family without paternal care (39), indicating a possible reversion from the ancestral state (Fig. 1). Another parallelism involves the OXTR Ala218Thr (652C > T) change found in *S. sciureus*. It is also reported as a human polymorphism (rs4686302), with implications in ligand-receptor affinity and preterm births (42). The implication of this change to *S. sciureus* is unknown.

Finally, although some species studied here share similar reproductive and parental care behaviors, they have also intra- and interspecies differences (43, 44). Thus, the general genotype-phenotype connections suggested in the present study should be considered with caution and can only be confirmed with

additional population and functional studies, as well as investigations with related genes.

Conclusion

We reported novel OXT forms in NWMs and a previously unrecognized lack of sequence conservation in placental mammals. Signals of positive selection and of coevolution at inter- and intramolecular levels were detected. Some changes in the OXT-OXTR system seem to be connected to specific ecological/social behavior traits, such as intense parental care.

Materials and Methods

DNA Samples, Sequencing, and Sequence Alignment. Blood samples from 41 individuals belonging to 16 NWM species (*SI Appendix, Table S10*) were provided by Rio de Janeiro's Primatology Center (mapadecultura.rj.gov.br/guapimirim/centro-de-primatologia-do-rio-de-janeiro/).

Genomic DNA was extracted and PCR products were purified and sequenced (27 and 1,167 nucleotides coding for the OXT nonapeptide and OXTR systems, respectively), using Applied Biosystem Genetic Analyzer sequencers (GenBank accession nos. KM186262 to KM186289).

DNA sequences from genomic databases were also included in the analyses (*SI Appendix, Table S10*), for a total of 29 primate species for OXT and 21 for OXTR.

Multiple alignments were performed in the Mega software (5.1 version), using amino acid sequences with the MUSCLE algorithm (45). The alignments were also visually checked.

Evolutionary Analyses. We used the phylogeny-based maximum likelihood analysis, as implemented in the CODEML program of the PAML 4.7 package, to test for positive selection and/or relaxation of functional constraints (46). Two approaches using the nonsynonymous/synonymous ratio ($dN/dS = \omega$), where $\omega < 1$ indicates negative or constraint selection, $\omega \cong 1$ indicates neutral or relaxing selection, and $\omega > 1$ indicates positive selection) were applied: the NsSites codon substitution model, which allows ω values to vary among sites, and the Branch-site Models, which enable ω variation in different branches of the phylogeny. Unrooted trees, necessary for the construction of the input files, were created on the basis of the primate phylogenetic tree provided by Perelman and colleagues (19). Coevolution was tested at the intramolecular (within single molecules or genes) or intermolecular (between different molecules or genes) levels (47). First we considered recognized specific binding sites, OXT amino acid chain positions 3 and 8, and OXTR amino acid chain positions 34, 103, 209, and 284 (25–28). Second, we examined coevolutionary processes through the Bayesian Spidermonkey tool (48), available at the Datamonkey server (www.datamonkey.org/). This test furnishes the posterior probability of a change in a site as dependent on a change or changes in another site or sites. Intramolecular (inside the same gene) and intermolecular (between different genes) analyses were performed. Third, we calculated pairwise Nei-Gojobori (49) OXT/OXTR distances for the 21 primate species with MEGA 5.2. Correlation between genetic distance matrices was calculated using the Mantel test (GenAlEx 6.5) (50).

Molecular Characteristics and Predicted Functionality. Changes found in NWM species were compared with the amino acid residue present in *Otolemur*

garnettii and classified according to Grantham scores (51) as conservative (0–50), moderately conservative (51–100), moderately radical (101–150), or radical (>151) (52). Changes in physicochemical properties were also evaluated using PRIME (53) and SIFT (54).

The structures of OXT and AVP variants were modeled starting from the OXT-8Leu crystal 3D structure (PDB ID code 1NPO). A molecular dynamics simulation was applied to the six structures (five OXT and one AVP) along 400 ns to evaluate the effect of amino acid changes in solution (two independent simulations for each system, using the GROMACS package v. 4.5.1) (55). To retrieve low-energy conformers, which can reflect stable conformations in solution, a Free Energy Surface was calculated for the OXT and AVP molecules. In addition, a clustering approach was applied to determine the most frequent conformational states over the simulation of each peptide hormone.

Although 3D crystal structures of GPCRs are known, they present less than 29% similarity with OXTR. This level of similarity can be used to model G protein-coupled A class receptors (13, 27). However, we opted for a more conservative approach to evaluate the OXTR changes. We took into account functional information for OXTR intracellular domains (loops and C-terminal portion) to search for phosphorylation posttranslational modifications, as they are very important for GPCR regulation, as well as dimerization (24, 56, 57). Three available software packages were used to obtain a consensus result: PPSP 1.06 Prediction of PK-specific Phosphorylation site (58), Net-PhosK 1.0 (59), and GPS 2.1 Group-based Prediction System (58). For predictions, only consensus sites for kinases experimentally known to interact with OXTR, namely, Protein Kinase C (60) and G protein-coupled receptor kinase (61), were considered. In addition, we analyzed the pattern of protein disorder, secondary structure, and solvent accessibility in the OXTR intracellular domains to assess the effect of changes on loop flexibility and to offer further support for phosphorylation analysis, using PONDR-FIT (intrinsic protein disorder) (62), PSIPRED and NetSurfP v.1.1 (secondary structure) (63,64), and NetSurfP v.1.1 (solvent accessibility) (64).

OXT/OXTR Forms and Ecological/Social Behavioral Traits Analysis. We assessed significance associations between molecular OXT and OXTR changes and seven NWM social behavior and ecological traits (*SI Appendix, Table S3*), using Mann-Whitney or Fisher exact tests (23). Differences were considered significant with a *P* value < 0.05 after Bonferroni correction.

A complete description of all procedures listed here is found in the *SI Appendix*.

Ethical Approval. This project was registered in the official Brazilian system, which permits the collection of biological material for research in conservation units [Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) number 27951–2].

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Sidia M. Callegari-Jacques and Fabricio Rodrigues dos Santos for help with different aspects of this work. Special thanks are due to the Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, Estação Ecológica Estadual Paraíso, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, Fundação Carlos Chagas Filho, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (process no. 26/171.271/2006), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul for support and funding.

- Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S (1953) The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem* 205(2):949–957.
- Donaldson ZR, Young LJ (2008) Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* 322(5903):900–904.
- Gimpl G, Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: Structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81(2):629–683.
- Neumann ID (2008) Brain oxytocin: A key regulator of emotional and social behaviors in both females and males. *J Neuroendocrinol* 20(6):858–865.
- Takayanagi Y, et al. (2005) Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(44):16096–16101.
- Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH, Young WS, 3rd (2009) Oxytocin: The great facilitator of life. *Prog Neurobiol* 88(2):127–151.
- Koebach J, Stockner T, Bergmayr C, Muttenthaler M, Gruber CW (2013) Insights into the molecular evolution of oxytocin receptor ligand binding. *Biochem Soc Trans* 41(1):197–204.
- Lee AG, et al. (2011) A novel form of oxytocin in New World monkeys. *Biol Lett* 7(4):584–587.
- Wallis M (2012) Molecular evolution of the neurohypophysial hormone precursors in mammals: Comparative genomics reveals novel mammalian oxytocin and vasopressin analogues. *Gen Comp Endocrinol* 179(2):313–318.
- Stoop R (2012) Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron* 76(1):142–159.
- Zingg HH, Laporte SA (2003) The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab* 14(5):222–227.
- Koshimizu TA, et al. (2012) Vasopressin V1a and V1b receptors: From molecules to physiological systems. *Physiol Rev* 92(4):1813–1864.
- Slusarz MJ, Sikorska E, Slusarz R (2013) Interactions of vasopressin and oxytocin receptors with vasopressin analogues substituted in position 2 with 3,3'-diphenylalanine—a molecular docking study. *J Pept Sci* 19(2):118–126.
- Kumsta R, Heinrichs M (2013) Oxytocin, stress and social behavior: Neurogenetics of the human oxytocin system. *Curr Opin Neurobiol* 23(1):11–16.
- Oumi T, et al. (1996) Annetocin, an annelid oxytocin-related peptide, induces egg-laying behavior in the earthworm, *Eisenia foetida*. *J Exp Zool* 276(2):151–156.
- Fujino Y, et al. (1999) Possible functions of oxytocin/vasopressin-superfamily peptides in annelids with special reference to reproduction and osmoregulation. *J Exp Zool* 284(4):401–406.
- Barberis C, Mouillac B, Durroux T (1998) Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol* 156(2):223–229.
- Rosenberger AL, Hartwig WC (2001) New World monkeys. *Encyclopedia of Life Sciences* (John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ), pp 1–4.
- Perelman P, et al. (2011) A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 7(3):e1001342.

20. Marmoset Genome Sequencing and Analysis Consortium (2014) The common marmoset genome provides insight into primate biology and evolution. *Nat Genet* 46(8): 850–857.
21. Rose JP, Wu CK, Hsiao CD, Breslow E, Wang BC (1996) Crystal structure of the neurophysin-oxytocin complex. *Nat Struct Biol* 3(2):163–169.
22. de Araujo AD, et al. (2014) Selenoether oxytocin analogues have analgesic properties in a mouse model of chronic abdominal pain. *Nat Commun* 5:3165.
23. IBM (2011) SPSS Statistics for Windows (Armonk, NY:Released), Version 20.0.
24. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem* 276(22):19452–19460.
25. Chini B, et al. (1996) Two aromatic residues regulate the response of the human oxytocin receptor to the partial agonist arginine vasopressin. *FEBS Lett* 397(2-3): 201–206.
26. Fanelli F, Barbier P, Zanchetta D, de Benedetti PG, Chini B (1999) Activation mechanism of human oxytocin receptor: A combined study of experimental and computer-simulated mutagenesis. *Mol Pharmacol* 56(1):214–225.
27. Slusarz R, Kaźmierkiewicz R, Gieldoń A, Lammek B, Ciarkowski J (2001) Molecular docking-based test for affinities of two ligands toward vasopressin and oxytocin receptors. *Acta Biochim Pol* 48(1):131–135.
28. Wesley VJ, Hawtin SR, Howard HC, Wheatley M (2002) Agonist-specific, high-affinity binding epitopes are contributed by an arginine in the N-terminus of the human oxytocin receptor. *Biochemistry* 41(16):5086–5092.
29. Chini B, et al. (1995) Tyr115 is the key residue for determining agonist selectivity in the V1a vasopressin receptor. *EMBO J* 14(10):2176–2182.
30. Ren D, Chin KR, French JA (2014) Molecular variation in AVP and AVPR1a in New World Monkeys (Primates, Platyrrhini): Evolution and implications for social monogamy. *PLoS ONE* 9(10):e111638.
31. Smith MW, Ginsburg M (1961) Fate of synthetic oxytocin analogues in the rat. *Br Pharmacol Chemother* 16(3):244–252.
32. Young LJ (2007) Regulating the social brain: A new role for CD38. *Neuron* 54(3): 353–356.
33. Wang Z, Moody K, Newman JD, Insel TR (1997) Vasopressin and oxytocin immunoreactive neurons and fibers in the forebrain of male and female common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Synapse* 27(1):14–25.
34. Kozorovitskiy Y, Hughes M, Lee K, Gould E (2006) Fatherhood affects dendritic spines and vasopressin V1a receptors in the primate prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 9(9): 1094–1095.
35. Barrett CE, et al. (2013) Variation in vasopressin receptor (Avpr1a) expression creates diversity in behaviors related to monogamy in prairie voles. *Horm Behav* 63(3): 518–526.
36. Cleveland J, Snowdon CT (1984) Social development during the first twenty weeks in the cotton-top tamarin (*Saguinus o. oedipus*). *Anim Behav* 32(2):432–444.
37. Barbosa MN, da Silva Mota MT (2013) Alloparental responsiveness to newborns by nonreproductive, adult male, common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Am J Primatol* 75(2):145–152.
38. Huck M, Fernandez-Duque E, Babb P, Schurr T (2014) Correlates of genetic monogamy in socially monogamous mammals: Insights from Azara's owl monkeys. *Proc Biol Sci* 281(1782):20140195.
39. Fernandez-Duque E, Vallengia CR, Mendoza SP (2009) The biology of paternal care in human and nonhuman primates. *Annu Rev Anthropol* 38:115–130.
40. Cavanaugh J, Mustoe AC, Taylor JH, French JA (2014) Oxytocin facilitates fidelity in well-established marmoset pairs by reducing sociosexual behavior toward opposite-sex strangers. *Psychoneuroendocrinology* 49:1–10.
41. Zhang J, Kumar S (1997) Detection of convergent and parallel evolution at the amino acid sequence level. *Mol Biol Evol* 14(5):527–536.
42. Kim J, et al. (2013) Sequence variants in oxytocin pathway genes and preterm birth: A candidate gene association study. *BMC Med Genet* 14:77.
43. Fuchs E, Corbarch-Sohle S (2009) Tree shrews. *UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, eds Hubrecht R, Kirkwood J (Wiley-Blackwell, Oxford, UK), 8th Ed, pp 262–275.
44. Martin R (1990) *Primate Origins and Evolution: A Phylogenetic Reconstruction* (Chapman & Hall, London).
45. Tamura K, et al. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10):2731–2739.
46. Yang Z (2007) PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol* 24(8):1586–1591.
47. Lovell SC, Robertson DL (2010) An integrated view of molecular coevolution in protein-protein interactions. *Mol Biol Evol* 27(11):2567–2575.
48. Poon AF, Lewis FI, Frost SD, Kosakovsky Pond SL (2008) Spidermonkey: Rapid detection of co-evolving sites using Bayesian graphical models. *Bioinformatics* 24(17): 1949–1950.
49. Nei M, Gojobori T (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3(5):418–426.
50. Peakall R, Smouse PE (2012) GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28(19):2537–2539.
51. Grantham R (1974) Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185(4154):862–864.
52. Li WH, Wu CI, Luo CC (1985) A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol Biol Evol* 2(2):150–174.
53. Atchley WR, Zhao J, Fernandes AD, Drüke T (2005) Solving the metric sequence problem. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(18):6395–6400.
54. Ng PC, Henikoff S (2001) Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11(5):863–874.
55. Pronk S, et al. (2013) GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* 29(7):845–854.
56. Tobin AB (2008) G-protein-coupled receptor phosphorylation: Where, when and by whom. *Br J Pharmacol* 153(Suppl 1):S167–S176.
57. Woods AS, Jackson SN (2013) How adenylate cyclase choreographs the pas de deux of the receptors heteromerization dance. *Neuroscience* 238:335–344.
58. Xue Y, et al. (2008) GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 7(9):1598–1608.
59. Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4(6):1633–1649.
60. Berrada K, Plesnicher CL, Luo X, Thibonnier M (2000) Dynamic interaction of human vasopressin/oxytocin receptor subtypes with G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C after agonist stimulation. *J Biol Chem* 275(35):27229–27237.
61. Hasbi A, Devost D, Laporte SA, Zingg HH (2004) Real-time detection of interactions between the human oxytocin receptor and G protein-coupled receptor kinase-2. *Mol Endocrinol* 18(5):1277–1286.
62. Xue B, Dunbrack RL, Williams RW, Dunker AK, Uversky VN (2010) PONDR-FIT: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim Biophys Acta* 1804(4): 996–1010.
63. Jones DT (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292(2):195–202.
64. Petersen B, Petersen TN, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C (2009) A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct Biol* 9:51.

CAPÍTULO IV

4.1 Novas formas de OXT, novas funções

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

O material suplementar encontra-se no seguinte link:

www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1711687114/-/DCSupplemental.



Functional New World monkey oxytocin forms elicit an altered signaling profile and promotes parental care in rats

Lucas T. Parreiras-e-Silva^{a,1}, Pedro Vargas-Pinilla^{b,1}, Diego A. Duarte^{a,1}, Dânae Longo^{b,c}, Grace Violeta Espinoza Pardo^d, Andrea Dulor Finkler^d, Vanessa Rodrigues Paixão-Côrtes^e, Pâmela Paré^b, Diego L. Rovaris^b, Eduardo B. Oliveira^a, Rafael Andrade Caceres^f, Gislene L. Gonçalves^b, Michel Bouvier^{g,h}, Francisco M. Salzano^{b,2}, Aldo B. Lucion^{d,2}, Claudio M. Costa-Neto^{a,2}, and Maria Cátira Bortolini^{b,2}

^aDepartamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; ^bDepartamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; ^cInstituto Federal Farroupilha, 97555-000 Alegrete, Rio Grande do Sul, Brazil; ^dDepartamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; ^eDepartamento de Biologia Geral, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, 40170-290 Salvador, Bahia, Brazil; ^fUniversidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; ^gDepartment of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada; and ^hInstitute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada

Contributed by Francisco M. Salzano, July 12, 2017 (sent for review December 1, 2016; reviewed by Ali Salahpour and Froylán Vargas-Martínez)

The neurohormone oxytocin is a key player in the modulation of reproductive and social behavioral traits, such as parental care. Recently, a correlation between different forms of oxytocin and behavioral phenotypes has been described in the New World Monkeys (NWMs). Here, we demonstrate that, compared with the Leu⁸OXT found in most placental mammals, the Cebidae Pro⁸OXT and *Saguinus* Val³Pro⁸OXT taxon-specific variants act as equally efficacious agonists for the G_q-dependent pathway but are weaker agonists for the β-arrestin engagement and subsequent endocytosis toward the oxytocin receptor (OXTR). Upon interaction with the AVPR1a, Pro⁸OXT and the common Leu⁸OXT yielded similar signaling profiles, being equally efficacious on G_q and β-arrestin, while Val³Pro⁸OXT showed reduced relative efficacy toward β-arrestin. Intranasal treatment with either of the variants increased maternal behavior and also promoted unusual paternal care in rats, as measured by pup-retrieval tests. We therefore suggest that Val³Pro⁸OXT and Pro⁸OXT are functional variants, which might have been evolutionarily co-opted as an essential part of the adaptive genetic repertoire that allowed the emergence of taxon-specific complex social behaviors, such as intense parental care in the Cebidae and the genus *Saguinus*.

paternal care | biased agonism | primates | oxytocin variants | social behaviors

In placental mammals, the nonapeptides oxytocin (Leu⁸OXT) and arginine vasopressin (AVP) differ by two amino acid residues at positions 3 and 8 (OXT: Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly; AVP: Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly). Both act as hormones and neurotransmitters and play a key role in the modulation of reproductive and social behavioral traits, such as parental care and bonding between sexual partners. It is thought that the oxytocin system plays a greater role in females, while the AVP system primarily influences bonding and parental care in males (1–4).

Until a few years ago, it was thought that the nine amino acid sequence of oxytocin, known since the 1950s (5), was strictly conserved across all placental mammals. Recently, this paradigm was challenged when several taxon-specific forms of oxytocin were identified in New World monkeys (NWMs). In a first instance, Lee et al. (6) reported a Leu-to-Pro substitution at position 8 (Pro⁸OXT) in four species. Later, four more NWM forms of oxytocin, Ala⁸OXT, Thr⁸OXT, Phe²OXT, and Val³Pro⁸OXT were identified by our group (7) and by Ren et al. (8). On the other hand, the AVP amino acid sequence was shown to be conserved in species expressing the novel oxytocin forms (9, 10).

The Pro⁸OXT variant emerged at least ~20 Mya (10) and is expressed by all genera of the Cebidae family. In the genus *Saguinus* (family Cebidae, subfamily Callitrichinae) (11), an additional mutation led to the substitution of Ile to Val at position 3 (Val³Pro⁸OXT). These two variants might form an essential part of the genetic repertoire which allowed certain NWM to evolve behavioral traits that are otherwise rare among mammals, such as social monogamy (8) and intense caregiving behavior by males (7). These behaviors are typical of the Cebidae family, which is also characterized by small body size and, in some subfamilies such as Callitrichinae, twin births. Furthermore, a clear positive selection signal was detected for the Pro⁸OXT variant in the Cebidae (7). Based on these findings, it seems plausible that these recently described taxon-specific oxytocin variants might have relevant functional and evolutionary implications. In this context, it is noteworthy that an independent

Significance

Several forms of the oxytocin neurohormone have been found in New World monkeys (NWMs). Previous research has suggested an association between these forms and behaviors typical of this primate branch, including paternal care and monogamy. Our study provides genetic, pharmacological, behavioral, and *in silico* evidence supporting this connection. Rats treated intranasally with two NWM oxytocin variants showed an increase in some parental care behaviors. The same two variants were found to elicit different cell-signaling profiles in cell-based assays compared with ancestral oxytocin. Our findings highlight how mutations in the OXT DNA sequence coding for a nonapeptide result in distinct signaling profiles that may be linked to the emergence of novel adaptive traits, in this case, paternal care and monogamy.

Author contributions: L.T.P.-e.-S., P.V.-P., D.A.D., D.L., A.B.L., C.M.C.-N., and M.C.B. designed research; L.T.P.-e.-S., P.V.-P., D.A.D., D.L., G.V.E.P., A.D.F., P.P., and G.L.G. performed research; E.B.O., R.A.C., M.B., A.B.L., C.M.C.-N., and M.C.B. contributed new reagents/analytic tools; L.T.P.-e.-S., P.V.-P., D.A.D., D.L., V.R.P.-C., D.L.R., M.B., A.B.L., C.M.C.-N., and M.C.B. analyzed data; and L.T.P.-e.-S., P.V.-P., D.A.D., D.L., R.A.C., M.B., F.M.S., A.B.L., C.M.C.-N., and M.C.B. wrote the paper.

Reviewers: A.S., University of Toronto; and F.V.-M., Cinvestav I.P.N.

The authors declare no conflict of interest.

¹L.T.P.-e.-S., P.V.-P., and D.A.D. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. Email: francisco.salzano@ufrgs.br, alucion@ufrgs.br, claudio@fmrp.usp.br, or maria.bortolini@ufrgs.br.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1711687114/-DCSupplemental.

Leu-to-Pro substitution at position 8 occurred ~11 Mya in the family Atelidae, leading to the convergent occurrence of the Pro⁸OXT variant in the genus *Ateles* (10).

The activity of the oxytocin and vasopressin systems depends on the interaction of these neuropeptides with their respective G protein-coupled receptors (GPCRs), namely, OXTR, AVPR1a, AVPR1b, and AVPR2, although it is known that some level of cross-interaction can occur among them (12, 13). The GPCRs are the largest family of signal transducers. The classical GPCR activation model posits that, after agonist binding, a signaling cascade is started by the interaction with, and thereby activation of, heterotrimeric G proteins. Under this classical model, GPCRs are phosphorylated by GPCR kinases after activation, promoting the recruitment of β -arrestin proteins to the receptor, which in turn evokes receptor internalization and termination of G-protein signaling (14, 15). More recently, β -arrestins were also shown to serve as scaffolds for other effectors, such as kinases (16, 17), and several groups have reported that some compounds can trigger β -arrestin-mediated cellular responses even in the absence of G-protein activation (18–21). The finding that different molecules can selectively or preferentially trigger different pathways after interacting with the same receptor led to the concept of biased agonism or functional selectivity (22). As a result, ligands are now often referred to as “ β -arrestin-biased” or “G protein-biased” agonists to indicate their preferential triggering of β -arrestin-dependent or G protein-dependent signaling pathways, respectively.

The correlation between taxon-specific oxytocin variants and behavioral phenotypes suggested by us and others (7, 8), paired with the current knowledge of GPCR signaling diversity (22), prompted us to hypothesize that the Val³Pro⁸OXT and Pro⁸OXT variants might display distinct signaling profiles, which could be correlated to the complex social behaviors observed in some NWM clades, such as paternal care, which are unusual among primates and mammals in general.

In the present study, we explored the functional selectivity of the Cebidae Pro⁸OXT and *Saguinus* Val³Pro⁸OXT variants by performing cell-based pharmacological characterization and in silico analyses. Additionally, we evaluated the role of Val³Pro⁸OXT and Pro⁸OXT in parental behavior in male and female rats using intranasal spray treatment. The distinct in vivo behaviors observed are well correlated with the signaling profiles and the in silico analyses, reinforcing the evidence that Val³Pro⁸OXT and Pro⁸OXT are functionally distinct variants that may underlie the unusual caregiving behaviors observed in some NWM clades.

Results

Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT Are Full Agonists of the G-Protein Pathway but Are Less Efficacious Toward β -Arrestin at the OXTR. To functionally characterize the NWM oxytocin forms, we investigated the abilities of the *Saguinus* Val³Pro⁸OXT and Cebidae Pro⁸OXT variants to trigger distinct signaling cascades when binding to the OXTR and to AVPR1a. In an initial approach, we used HEK293T cells expressing the human OXTR to evaluate G_q coupling, the classical pathway triggered by OXTR, through the intracellular mobilization of calcium. Fig. 1A shows that both variants behave as full agonists, yielding the same maximal response as the ancestral Leu⁸OXT, with potencies similar to that of Leu⁸OXT (1.3 nM, 1.7 nM, and 5.6 nM, respectively, for Leu⁸OXT, Pro⁸OXT, and Val³Pro⁸OXT) (SI Appendix, Table S1). To evaluate if the variants could promote OXTR coupling to other G proteins, we also evaluated the activation profiles of G₁₁, G₁₂, G₁₃, and G_q using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based G-protein activation assays (23, 24). Fig. 1B shows that the variants behave similarly to Leu⁸OXT and are mainly coupled to G_q ($P < 0.001$).

We also addressed β -arrestin engagement by measuring the OXT variants-promoted recruitment of β -arrestin1 and 2 to the

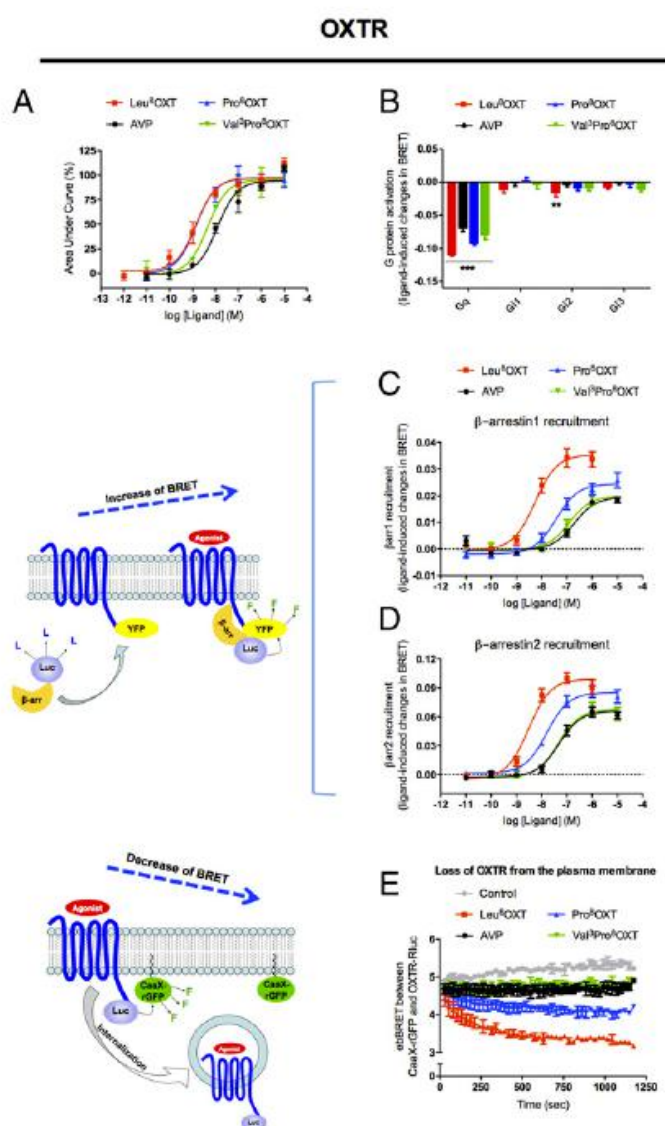


Fig. 1. Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT are better agonists toward the calcium signaling than the β -arrestin pathway at the OXTR. The different OXT forms and AVP were functionally analyzed for calcium mobilization (A); G_q, G₁₁, G₁₂, and G₁₃ coupling (B); β -arrestin1 (C) and β -arrestin2 (D) recruitment; and OXTR internalization kinetics (E) induced by 100 nM of ligands. β -Arrestin recruitment and receptor internalization were monitored by BRET as shown by the diagram on the left side of C and D, respectively.

OXTR by BRET (25). As shown in Fig. 1C and D, Leu⁸OXT induced robust β -arrestin1 and 2 recruitment to the OXTR, resulting in clear dose-response curves with potencies of 4.8 nM and 3 nM, respectively. Interestingly, the Pro⁸OXT variant yielded decreased potencies for recruitment of β -arrestin1 (33.9 nM, $P < 0.01$) and 2 (15.8 nM, $P < 0.05$) as well as reduced maximal response for β -arrestin1 (72% of the response induced by Leu⁸OXT, $P < 0.05$). The Val³Pro⁸OXT-induced β -arrestin1 recruitment was even more reduced, yielding lower potencies for β -arrestin1 (128.8 nM, $P < 0.001$) and β -arrestin2 (45.7 nM, $P < 0.001$) as well as smaller maximal responses (62%, $P < 0.01$ and 70%, $P < 0.05$, respectively) (Fig. 1C and D and SI Appendix, Table S1). To confirm this observation, we monitored the kinetics of β -arrestin recruitment to the plasma membrane using an enhanced bystander BRET-based assay (ebBRET) (26). In agreement with the results described in Fig. 1C and D, the NWM Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT variants are clearly less efficacious than Leu⁸OXT in promoting β -arrestin1 and 2 recruitment to the plasma membrane (SI Appendix, Fig. S1A and B).

One of the first consequences of arrestin engagement is the desensitization of G-protein signaling followed by receptor internalization. As illustrated in Fig. 1E, Leu⁸OXT induces a robust and time-dependent loss of plasma membrane receptor as assessed by ebBRET (26) that reflects agonist-promoted internalization. In contrast, Pro⁸OXT evokes only a moderate decrease of the plasma membrane receptor, and Val³Pro⁸OXT and AVP induce virtually no detectable internalization (Fig. 1E), consistent with their lower propensity to recruit β -arrestins.

In the calcium mobilization assay, the Val³Pro⁸OXT and Pro⁸OXT variants presented a maximal response similar to that of Leu⁸OXT, whereas for arrestin recruitment they showed significantly decreased maximal responses and potencies. Taken together, these data provide evidence that Val³Pro⁸OXT and Pro⁸OXT variants display a clear, distinct functional profile, acting as biased agonists toward the G_q and calcium signaling pathway at OXTR. Because the assays were performed using different biosensor cellular systems, a possible source of the differences observed in the efficacies and potencies could be different levels of receptor expression. To rule out this possibility, calcium responses and β -arrestin recruitment assays were carried out in the same cells, eliminating any possible contribution of different expression levels. As shown in *SI Appendix, Fig. S2*, both Pro⁸OXT, Val³Pro⁸OXT showed similar propensities to promote calcium mobilization but showed reduced β -arrestin recruitment compared with Leu⁸OXT.

Pro⁸OXT Signaling Through AVPR1a Is Similar to Leu⁸OXT, While Val³Pro⁸OXT Presents an Altered Activation Profile. AVPR1a is the main receptor through which AVP promotes pair bonding and paternal care (1, 2, 27). Based on the results described above, which show that Val³Pro⁸OXT and Pro⁸OXT variants display a more efficacious profile toward the calcium-signaling pathway at the OXTR receptor, and on studies that have reported that Leu⁸OXT can bind to AVPR1a (12, 13), we evaluated the signaling profiles of these NWM variants at the AVPR1a. As shown in Fig. 2A, native Leu⁸OXT and the Pro⁸OXT NWM variant yielded clear dose–response curves in intracellular calcium-mobilization assays, reaching maximal responses similar to that induced by AVP but with lower potency values (15.1 nM, $P < 0.001$ and 39.8 nM, $P < 0.001$ for Leu⁸OXT and Pro⁸OXT, respectively, compared with 0.2 nM obtained for AVP). Val³Pro⁸OXT also acted as a full agonist, inducing a maximal response similar to AVP, but displayed the lowest potency (151.3 nM, $P < 0.001$), showing that the presence of a valine at position 3 might have added novel functional characteristics to the nonapeptide.

To evaluate if the variants could induce coupling of AVPR1a to other G proteins, we evaluated the activation profiles of G₁₁, G₁₂, G₁₃, and G_q. Fig. 2B shows that the major signaling pathway triggered by AVP, as well as by Leu⁸OXT, Pro⁸OXT, and Val³Pro⁸OXT, is G_q ($P < 0.001$). AVP was also found to promote moderate activation of G₁₁ ($P < 0.05$) and G₁₂ ($P < 0.001$). Dose–response experiments for assessment of β -arrestin1 and 2 recruitment to AVPR1a (Fig. 2C and D) showed that only AVP was able to induce a maximal response, also with high potency values (both 1.4 nM). Native Leu⁸OXT and the NWM variants Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT presented smaller maximal responses (respectively 64%, $P < 0.05$; 59%, $P < 0.01$; and 46%, $P < 0.01$ of AVP-promoted responses for β -arrestin1 and 65%, $P < 0.05$; 56%, $P < 0.05$; and 65%, $P < 0.05$ for β -arrestin2), as well as lower potencies (respectively 63.1 nM, $P < 0.001$; 123 nM, $P < 0.001$; and 3,548 nM, $P < 0.001$ for β -arrestin1 and 50.1 nM, $P < 0.001$; 74.1 nM, $P < 0.001$; and 2,291 nM, $P < 0.001$ for β -arrestin2) (*SI Appendix, Table S1*). Kinetic analyses of β -arrestin1 and 2 translocation to the plasma membrane using ebBRET confirmed that all OXT variants had reduced ability to promote β -arrestin translocation compared with AVP, with Val³Pro⁸OXT having the lowest ability (*SI Appendix, Fig. S1 C and D*). Agonist-promoted internalization as assessed by the loss of plasma membrane receptor using ebBRET was

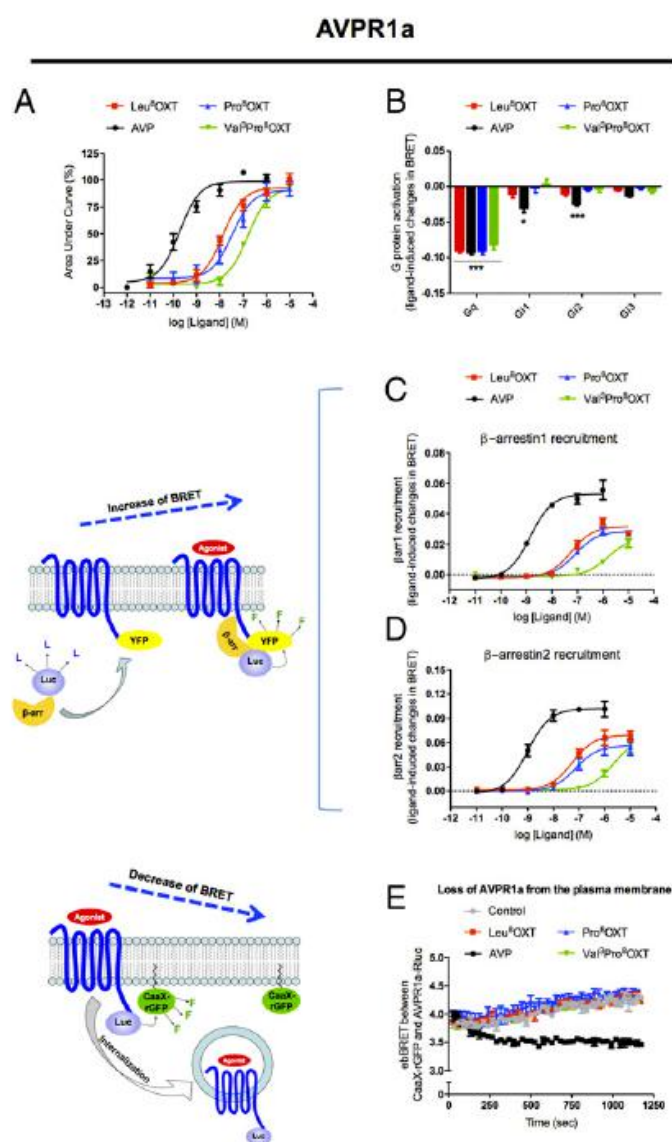


Fig. 2. The Pro⁸OXT signaling profile when activating the AVPR1a is similar to Leu⁸OXT, while Val³Pro⁸OXT presents decreased potencies of activation. The different OXT forms and AVP were functionally analyzed for calcium mobilization (A); G_q, G₁₁, G₁₂, and G₁₃ coupling (B); β -arrestin1 (C) and β -arrestin2 (D) recruitment; and AVPR1a internalization kinetics (E) induced by 100 nM of ligands. β -Arrestin recruitment and receptor internalization were monitored by BRET as shown by the diagram on the left side of C and D, respectively.

detected only for AVP stimulation (Fig. 2E), consistent with AVP having lowest propensity of the OXT variants to promote β -arrestin recruitment.

Intranasal Treatment with Val³Pro⁸OXT and Pro⁸OXT Induced Changes in Rat Parental Behaviors. The distinct pharmacological profiles of Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT compared with Leu⁸OXT, as described above, prompted us to explore the possible functional role of the NWM variants in vivo through behavioral assays (*SI Appendix, Fig. S3*). To this end, we conducted tests using rats (*Rattus norvegicus*; Wistar strain) subjected to intranasal treatment with either one of the two NWM variants or the ancestral Leu⁸OXT.

We tested whether the NWM oxytocin forms could trigger changes in paternal and maternal behaviors (*SI Appendix, Tables S2 and S3*). Fourteen behaviors related to female–pup, male–pup, and male–female interactions were evaluated and scored. We used generalized linear models to compare group means,

selecting the appropriate distribution for each outcome evaluated (*SI Appendix, Tables S4 and S5*). Statistical significances of the differences were then assessed by a Dunn's test for multiple comparisons (*SI Appendix, Tables S6 and S7*). To perform statistical analyses, the scores obtained for individual variables were clustered into three major sets of variables: parental care, couple bonding, and aggression/dominance (*SI Appendix, Table S3*). We found no significant differences between treatment groups in maternal care, couple bonding, or aggressive behavior toward male partners (*SI Appendix, Table S4*).

Caregiving behavior was additionally evaluated in males and females by measuring their motivation to recover their own pups using a known pup-retrieval test (28). Females treated with Val³Pro⁸OXT and Pro⁸OXT showed faster pup retrieval (total time to grouping) than females treated with Leu⁸OXT (Fig. 3A and *SI Appendix, Tables S6 and S7*). Although paternal care has been observed in mice under certain circumstances (29, 30), it has never been described in rats. In our study, males contacted their pups significantly faster when treated with Leu⁸OXT or with Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT, compared with those treated with saline, indicating increased motivation to contact pups (contact latency, Fig. 3B and *SI Appendix, Tables S6 and S8*). Females showed a shorter time to group the litter (total time to grouping, Fig. 3A and *SI Appendix, Tables S6 and S7*).

Physicochemical Analysis and Molecular Dynamics Simulation of OXT Forms. To investigate possible physicochemical or conformational properties of OXT variants that could correlate to the observed different functional profiles, we analyzed their sequences and molecular dynamics compared with those of other nonapeptides. Our molecular dynamics analysis revealed only subtle conformational changes, indicating that the NWM OXT forms preserve conformational features similar to those of the ancestral Leu⁸OXT. On the other hand, physicochemical analysis of peptide sequences showed that the introduction of a proline residue in position 8 and valine in position 3 of Leu⁸OXT clearly altered their hydrophilicity indexes (*SI Appendix, Fig. S4*). Therefore, it seems plausible to infer that the adaptive taxon-specific traits discussed in this study might be at least partially related to the altered hydrophobic properties of the OXT forms.

Discussion

One of the greatest challenges of biological systems is unveiling the complex connection between molecular findings and phenotypic traits. Recently, our group and others have reported the discovery of the oxytocin variants Pro⁸OXT in the Cebidae and Val³Pro⁸OXT in the *Saguinus* genus (Cebidae, subfamily Callitrichinae) (11), which are characterized by complex social behaviors such as intense maternal care, male parental care, and social monogamy (7, 8). At least two of these behaviors (male

parental care and social monogamy) are rare in mammals but are evolutionarily relevant in contexts where reproduction bears a high energetic cost. For example, in the Callitrichinae, the birth weight of twin infants is ~30% of the female's body weight (31, 32). As a result, the investment in caregiving behaviors by both parents, as well as sibs, increases the infant survival rate in the Callitrichinae (31).

Leu⁸OXT is a known agonist of the GPCR OXTR. Based on the current knowledge of the intricate and diversified signaling profiles triggered through GPCRs (22), we decided to explore if the taxon-specific oxytocin variants Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT could lead to different signaling profiles, which might play a role in the complex behavioral traits described above. To that end, we synthesized both oxytocin variants and investigated their signaling profiles upon the activation of OXTR or AVPR1a with a particular focus on G_q and β -arrestin pathways.

The cell-based characterization showed that both Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT are equi-efficacious to Leu⁸OXT for the G_q-dependent pathway (Fig. 1A and B) while being significantly less efficacious than Leu⁸OXT in inducing β -arrestin recruitment to the OXTR (Fig. 1C and D). As would be expected from the role of β -arrestins in agonist-promoted endocytosis, both Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT showed significantly reduced ability to promote time-dependent loss of cell-surface OXTR (Fig. 1E), therefore possibly maintaining high receptor levels at the plasma membrane and allowing extended signaling of G_q-dependent pathways. Upon interaction with the AVPR1a, Pro⁸OXT yielded a signaling profile similar to that obtained for Leu⁸OXT, but the *Saguinus* Val³Pro⁸OXT showed changes in its activation profile (Fig. 2C and D and *SI Appendix, Fig. S1C and D*). These data suggest that the adaptive behavioral phenotypes observed in monkeys that present a proline at position 8 of their OXT amino acid sequences could be related to taxon-specific altered signaling pathways mainly triggered downstream of OXTR, while an additional change at position 3 (Val) also modified signaling pathways triggered downstream of AVPR1a.

The relative hydrophilicity of the oxytocin residues in positions 3 and 8 could determine the type of ligand-receptor interaction (7, 10, 33), thereby affecting their downstream activation pathways. In this context, it is of interest that Busnelli et al. (34) have described two synthetic oxytocin analogs that share the same critical change at position 8 that increases hydrophilicity. Like the NWM variants discussed here, these variants have low performance for β -arrestin recruitment and OXTR internalization, supporting the importance of the position 8 (Leu in the ancestral OXT) in selectively triggering β -arrestin recruitment. We also detected that valine at position 3 in *Saguinus* has a possible implication for β -arrestin recruitment at AVPR1a (Fig. 2C and D). Thus, two successive mutations in the OXT gene over the past ~20 My led to amino acid changes with key functional alterations concerning β -arrestin recruitment. From an

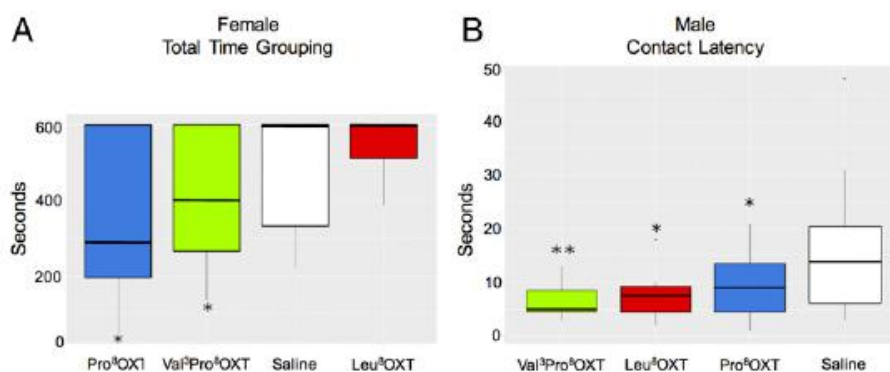


Fig. 3. (A) Female total time to group all pups at nest; * $P < 0.05$ for Dunn comparisons with Leu⁸OXT. (B) Time latency of male contact with first pup; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ for Dunn comparisons with saline treatment.

evolutionary perspective, they were likely selected to allow the emergence of successive behavioral adaptive novelties in Cebid monkeys without influencing this neurohormone's basic functions in placental mammals, such as lactation and uterine contractions.

Adding to these findings, there is evidence for a coevolutionary process between oxytocin variants and their receptors in NWMs (7). In *Saguinus*, for instance, the OXTR Leu³⁶⁸ residue and the oxytocin Val³ residue seem to be the result of coevolution (7). From a functional perspective, the replacement of Ser³⁶⁸ by Leu in a Ser cluster in the OXTR C terminus disrupts an important phosphorylation site that has been reported to contribute to β -arrestin recruitment in many GPCRs (13). Our current results and the above-described data reveal an important evolutionary tendency in the NWM OXT–OXTR system, moving toward reduced β -arrestin recruitment and a possible loss of G-protein desensitization by altering key residues in the ligand peptides (e.g., Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT), in the receptor (e.g., OXTR–Leu³⁶⁸ in *Saguinus*), or in both. Of note, the experiments reported here were performed with human OXTR, in which the C-terminal Ser cluster is preserved. Our work therefore highlights that alterations in ligand peptide structure seem to be sufficient to significantly decrease β -arrestin engagement and diminish OXTR internalization. Taken together, our results suggest that molecular changes in the OXT–OXTR system in Cebidae and *Saguinus* could produce a sustained G-protein-activated system due to their lower capacity to promote OXTR internalization. This hypothesis is further supported by earlier experiments in rats, in which synthetic oxytocin analogs characterized by Val³ (35) or Pro⁸ (36) substitutions were found to lead to a significant increase in the peptide's half-life in *in vivo* assays compared with ancestral oxytocin. In the context of our work, such observations suggest that Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT might also have an increased half-life, representing a complementary way to lead to sustained activation of G_q-protein-dependent signaling pathways.

Kosfeld et al. (37) suggested that synthetic Leu⁸OXT administered by intranasal delivery increased interpersonal confidence in humans. Although these and other results regarding this kind of treatment have been controversial (10), several studies have since reported an effect of intranasal oxytocin administration on a range of complex social behaviors in humans and other mammalian species (38–40). Black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) subjected to intranasal treatment with Pro⁸OXT showed reduced altruistic food sharing with opposite-sex strangers, while altruistic food sharing with their long-term pair-mates was unaffected (10). A recent study by Calcagnoli et al. (41) in male rats demonstrated that intranasal administration of Leu⁸OXT was effective in stimulating prosocial behavior, while parental care was not addressed.

Interestingly, we were able to show that rats treated intranasally with Pro⁸OXT or Val³Pro⁸OXT changed their behavior in a pup-retrieval test. Mothers treated with these variants showed faster pup retrieval (total time to grouping) than mothers treated with Leu⁸OXT (Fig. 3A). It is important to note that after delivery and during lactation females already bear high endogenous levels of Leu⁸OXT. As shown in Fig. 1C and D, Leu⁸OXT is able to efficiently induce β -arrestin1 and 2 recruitment and internalization of OXTR (Fig. 1E). We therefore believe that intranasal treatment with additional Leu⁸OXT might result in a desensitization effect, decreasing pup retrieval. In contrast, treatment with the NWM variants, which induce less efficacious β -arrestin recruitment (Fig. 1C and D) and decreased (Pro⁸OXT) or no (Val³Pro⁸OXT) OXTR internalization (Fig. 1E), did not have the same effect. This suggests that this difference in the signaling profile could be related to the observed maternal care behavior. In this context, it is important to note that rats treated with the NWM variants produce endogenous Leu⁸OXT, which can attenuate the variants' effects. We can therefore speculate that in Cebidae and *Saguinus*, which express only Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT, respectively, the behavioral effects could be even more pronounced.

When investigating the effect of the NWM oxytocin variants on rat male parental care behavior, we found that fathers contacted their pups significantly faster after treatment with Leu⁸OXT, Pro⁸OXT, or Val³Pro⁸OXT than after treatment with saline (Fig. 3B). Unlike lactating females, the OXT–OXTR system in males is not over-activated, meaning that it is not desensitized by treatment with exogenous Leu⁸OXT. Additionally, when rat males were treated with Val³Pro⁸OXT, the variant with the most altered pharmacological profile, they contacted their pups faster than those with any other intranasal treatment ($P < 0.01$).

Importantly, as discussed before, the effect of oxytocin on this particular kind of behavior seems to be related to G_q activation followed by calcium mobilization, a pathway efficaciously triggered by all ligands studied here. Recent research on genetically modified animals has shown a clear link between calcium-dependent signaling pathways and behavioral modulation. For instance, mice lacking the *Itpka* gene involved in inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) regulation show sustained high calcium levels in central amygdala and display alterations in control of fear and anxiety (42). Calcium signaling has also been reported to be involved in presynaptic degranulation and neurotransmitter release, including oxytocin, thereby contributing to prolonged OXTR stimulation in postsynaptic neurons (43). Although the effectors, pathways, and the behaviors described above are different from the ones investigated here, we believe that they highlight the importance of calcium signaling in behavior modulation, in agreement our hypothesis that the reduced ability to desensitize OXTR may be a key mechanism by which the NWM oxytocin variants are involved in the origin of specific adaptive behaviors. It is noteworthy that although Val³Pro⁸OXT promotes a weaker recruitment of β -arrestins to AVPR1a (Fig. 2C and D), it is unable to promote receptor internalization as assessed by the loss of plasma membrane receptor using eBRET (Fig. 2E). One of the possible explanations for this result is that, although arrestins can reach the AVPR1a, they could be stabilized in distinct conformations (44, 45) that might not be suitable for allowing receptor internalization. Taking these findings together, we can hypothesize that AVPR1a, when activated by Val³Pro⁸OXT, might also play a role in the parental behaviors considered in this study.

Nevertheless, it is clear that a range of other molecular and biological processes is involved in the modulation of social complex behaviors. For example, OXT and OXTR present distinct brain distribution patterns in different mammal species (2, 10, 27, 46). By extension, genetic and molecular changes involving biological systems and signaling pathways beyond those discussed here may play an important role in these complex behavioral traits. Interestingly, the NWM *Callicebus* (family Pitheciidae), which is characterized by social monogamy and paternal care and which expresses the native (ancestral) Leu⁸OXT, has a large number of progesterone-response elements in the OXTR promoter region. This is similar to what is found in Cebidae (47) and might be another way to contribute to increased caregiving behaviors. On the other hand, Pro⁸OXT is present in the large-bodied spider monkey (genus *Ateles*; family Atelidae). Although the males of this species are not involved in raising the offspring, it is interesting that females present the longest breastfeeding time among all NWMs.

Finally, despite of the contribution of other elements and processes such as gene regulation and epigenetic mechanisms, it is likely that the Cebidae Pro⁸OXT and *Saguinus* Val³Pro⁸OXT variants represent key components of a genetic repertoire that allowed the emergence of taxon-specific complex behavioral phenotypes.

Materials and Methods

Peptide Synthesis and Cell-Based Pharmacological Characterization. The Pro⁸OXT and Val³Pro⁸OXT variants were synthesized by solid-phase peptide synthesis and purified by HPLC. The efficiency of synthesis was assessed by amino acid composition analysis. HEK293T cells were cultured in supplemented

DMEM and transfected with OXTR- or AVPR1a-encoding plasmids using polyethylenimine. After transfection, cells were transferred to specific plates for development of different cell-based functional assays.

In Vivo Tests. Forty-two pairs of *Rattus norvegicus* were mated randomly, and pregnancy was confirmed on the day after mating by the presence of sperm in vaginal smears. Pairs were assigned to four experimental groups and received intranasal treatment with saline or the Leu⁸OXT, Pro⁸OXT, or Val³Pro⁸OXT variants. A total of 14 behaviors related to female–pup, male–pup, or male–female interactions were scored. Maternal and paternal motivations were evaluated in the pup-retrieval test. Results were analyzed by a pairwise comparison (Dunn's test).

In Silico Analyses. The starting structure of oxytocin was obtained from the Protein Data Bank (48). Molecular Dynamics simulations were performed for Leu⁸OXT, Pro⁸OXT, Val³Pro⁸OXT, Ala⁸OXT, Thr⁸OXT, Phe²OXT, and AVP, and their structural and physicochemical parameters were compared using

Shapiro–Wilk, Kruskal–Wallis, and Dunn's tests, as well as Principal Component Analysis.

Ethics. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Approval no. 28542) and are in accordance with Brazilian Law 11.794/2008, which regulates these procedures in Brazil. A complete description of the methods can be found in *SI Appendix, Materials and Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported by Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant 2012/20148-0; by Canadian Institute for Health Research Grant FDN-148431; and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul. M.B. holds a Canada Research Chair in in Signal Transduction and Molecular Pharmacology and is a Fellow of the Canadian Institute for Advanced Research. C.M.C.-N. and M.B. are recipients of Joint International Cooperation Grant SPRINT 2015/50086-4 funded by the FAPESP.

- Wang Z, Ferris CF, De Vries GJ (1994) Role of septal vasopressin innervation in paternal behavior in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 400–404.
- Donaldson ZR, Young LJ (2008) Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* 322:900–904.
- Goodson JL (2008) Nonapeptides and the evolutionary patterning of sociality. *Prog Brain Res* 170:3–15.
- Lee H-J, Macbeth AH, Pagani JH, Young WS, 3rd (2009) Oxytocin: The great facilitator of life. *Prog Neurobiol* 88:127–151.
- Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S (1953) The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem* 205:949–957.
- Lee AG, et al. (2011) A novel form of oxytocin in New World monkeys. *Biol Lett* 7: 584–587.
- Vargas-Pinilla P, et al. (2015) Evolutionary pattern in the OXT-OXTR system in primates: Coevolution and positive selection footprints. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 88–93.
- Ren D, et al. (2015) Genetic diversity in oxytocin ligands and receptors in New World monkeys. *PLoS One* 10:e0125775.
- Ren D, Chin KR, French JA (2014) Molecular variation in AVP and AVPR1a in New World monkeys (Primates, Platyrrhini): Evolution and implications for social monogamy. *PLoS One* 9:e111638.
- French JA, Taylor JH, Mustoe AC, Cavanaugh J (2016) Neuropeptide diversity and the regulation of social behavior in New World primates. *Front Neuroendocrinol* 42: 18–39.
- Perelman P, et al. (2011) A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 7: e1001342.
- Slusarz MJ, Sikorska E, Slusarz R (2013) Interactions of vasopressin and oxytocin receptors with vasopressin analogues substituted in position 2 with 3,3'-diphenylalanine—a molecular docking study. *J Pept Sci* 19:118–126.
- Zingg HH, Laporte SA (2003) The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab* 14: 222–227.
- Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 273: 18677–18680.
- Zhang J, Barak LS, Winkler KE, Caron MG, Ferguson SS (1997) A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J Biol Chem* 272:27005–27014.
- Luttrell LM, et al. (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283:655–661.
- Luttrell LM, et al. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2449–2454.
- Azzi M, et al. (2003) Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11406–11411.
- Baker JG, Hall IP, Hill SJ (2003) Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol Pharmacol* 64:1357–1369.
- Wei H, et al. (2003) Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10782–10787.
- Gbahou F, et al. (2003) Protean agonism at histamine H3 receptors in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11086–11091.
- Costa-Neto CM, Parreiras-e-Silva LT, Bouvier M (2016) A pluridimensional view of biased agonism. *Mol Pharmacol* 90:587–595.
- Galés C, et al. (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13:778–786.
- Quoyer J, et al. (2013) Pepducin targeting the C-X-C chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory G protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E5088–E5097.
- Angers S, et al. (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3684–3689.
- Namkung Y, et al. (2016) Monitoring G protein-coupled receptor and β -arrestin trafficking in live cells using enhanced bystander BRET. *Nat Commun* 7:12178.
- Koshimizu TA, et al. (2012) Vasopressin V1a and V1b receptors: From molecules to physiological systems. *Physiol Rev* 92:1813–1864.
- Bosch OJ, Neumann ID (2008) Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 17139–17144.
- Liang M, et al. (2014) Pairmate-dependent pup retrieval as parental behavior in male mice. *Front Neurosci* 8:186.
- Liu H-X, et al. (2013) Displays of paternal mouse pup retrieval following communicative interaction with maternal mates. *Nat Commun* 4:1346.
- Cleveland J, Snowdon CT (1984) Social development during the first twenty weeks in the cotton-top tamarin (*Saguinus O. Oedipus*). *Anim Behav* 32:432–444.
- Cavanaugh J, French JA (2013) Post-partum variation in the expression of paternal care is unrelated to urinary steroid metabolites in marmoset fathers. *Horm Behav* 63: 551–558.
- Koehbach J, Stockner T, Bergmayr C, Muttenthaler M, Gruber CW (2013) Insights into the molecular evolution of oxytocin receptor ligand binding. *Biochem Soc Trans* 41: 197–204.
- Busnelli M, Bulgheroni E, Manning M, Kleinau G, Chini B (2013) Selective and potent agonists and antagonists for investigating the role of mouse oxytocin receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 346:318–327.
- Smith MW, Ginsburg M (1961) Fate of synthetic oxytocin analogues in the rat. *Br Pharmacol Chemother* 16:244–252.
- Gaziz D (1978) Plasma half-lives of vasopressin and oxytocin analogs after iv injection in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 158:663–665.
- Kosfeld M, Heinrichs M, Zak PJ, Fischbacher U, Fehr E (2005) Oxytocin increases trust in humans. *Nature* 435:673–676.
- Carter GG, Wilkinson GS (2015) Intranasal oxytocin increases social grooming and food sharing in the common vampire bat *Desmodus rotundus*. *Horm Behav* 75: 150–153.
- Lieberwirth C, Wang Z (2014) Social bonding: Regulation by neuropeptides. *Front Neurosci* 8:171.
- Veening JG, Olivier B (2013) Intranasal administration of oxytocin: Behavioral and clinical effects, a review. *Neurosci Biobehav Rev* 37:1445–1465.
- Calcagnoli F, Kreutzmann JC, de Boer SF, Althaus M, Koolhaas JM (2015) Acute and repeated intranasal oxytocin administration exerts anti-aggressive and pro-affiliative effects in male rats. *Psychoneuroendocrinology* 51:112–121.
- Chung S, et al. (2016) The role of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A in regulating emotional behavior and amygdala function. *Sci Rep* 6:23757.
- Stoop R (2012) Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron* 76:142–159.
- Zimmerman B, et al. (2012) Differential β -arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Sci Signal* 5:ra33.
- Santos GA, et al. (2015) Comparative analyses of downstream signal transduction targets modulated after activation of the AT1 receptor by two β -arrestin-biased agonists. *Front Pharmacol* 6:131.
- Freeman SM, Young LJ (2016) Comparative perspectives on oxytocin and vasopressin receptor research in rodents and primates: Translational implications. *J Neuroendocrinol* 28:1–22.
- Vargas-Pinilla P, et al. (2017) Progesterone response element variation in the OXTR promoter region and paternal care in New World monkeys. *Behav Genet* 47:77–87.
- Rose JP, Wu CK, Hsiao CD, Breslow E, Wang BC (1996) Crystal structure of the neurophysin-oxytocin complex. *Nat Struct Biol* 3:163–169.

CAPÍTULO V

5.1 Evolução da região regulatória

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

Progesterone Response Element Variation in the *OXTR* Promoter Region and Paternal Care in New World Monkeys

Pedro Vargas-Pinilla¹ · Paul Babb² · Leandro Nunes¹ · Pâmela Paré¹ ·
Gabrielle Rosa¹ · Aline Felkl¹ · Dânae Longo¹ · Francisco M. Salzano¹ ·
Vanessa R. Paixão-Côrtes³ · Gislene Lopes Gonçalves¹ · Maria Cátira Bortolini¹

Received: 30 December 2015 / Accepted: 10 August 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Paternal care is a complex social behavior common in primate species with socially monogamous mating systems and twin births. Evolutionary causes and consequences of such behavior are not well understood, nor are their neuroendocrine and genetic bases. However, the neuropeptide oxytocin (OXT) and its receptor (OXTR) are associated with parental care in mammalian lineages. Here we investigated the interspecific variation in the number of progesterone response elements (PREs) in the *OXTR* promoter region of 32 primate species, correlating genetic data with behavior, social systems, and ecological/life-history parameters, while controlling for phylogeny. We verified that PREs are only present in New World monkeys and that PRE number is significantly correlated with the presence of paternal care in this branch. We suggest that PRE number could be an essential part of the genetic repertoire that allowed the emergence of taxon-specific complex social behaviors, such as paternal care in marmosets and tamarins.

Keywords Behavioral genetics · Callitrichinae · Molecular evolution · Oxytocin system

Introduction

Parental care is a complex social behavior associated with animal breeding systems, life history, and ecology (Houston et al. 2005; Kokko and Jennions 2008; Alonzo 2010). Parental care is fundamental for offspring fitness in many animal taxa, and thus can also be characterized as an effective evolutionary strategy.

In mammals, behavioral differences among *taxa* rely not only on the type of care associated with different stages of offspring development and survival but also on the relative contribution of males and females to paternal and maternal care, respectively. Lactation, for instance, is an exclusive maternal attribute linked to the first infancy, but other activities such as carrying, grooming, sharing food, feeding, defending, and teaching can be provided by the father and/or other group members.

Fathers that regularly contribute to offspring care occur in only ~5 % of mammals but evolved independently at least sixty times within these lineages, including four times within the primate order (Lukas and Clutton-Brock 2013). This kind of male behavior is thus equally interesting from an evolutionary perspective when compared with the much more usual maternal care observed in mammals.

Environmental, physiological, epigenetic, and genetic factors promote the neuroendocrine changes associated with parental care in different taxa (Adkins-Regan 2005; Székely et al. 2010; Lucion and Bortolini 2014; French et al. 2016). For this reason, it is not a trivial task to identify the genetic factors involved in both maternal and paternal care, their specific (e.g., breast-feeding) and

Edited by Stephen Maxson.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10519-016-9806-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Maria Cátira Bortolini
maria.bortolini@ufrgs.br

¹ Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

² Department of Systems Pharmacology and Translational Therapeutics, Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, SCTR Room 10-130 Bldg. 421, 3400 Civic Center Blvd., Philadelphia, PA 19104, USA

³ Departamento de Biologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, Salvador, BA 40170-290, Brazil

shared (e.g., infant protection) characteristics, the connections with the other above-mentioned factors, and elements linked to ecological and evolutionary contexts (e.g., specific selective pressures) of the investigated taxa.

New World monkeys (NWM, or platyrrhines) are a group of particular interest for addressing the genetic basis of these complex traits because they present a well-known cooperative breeding system, including paternal and alloparental care, essential behaviors in a context where twin birth is common, especially in the small marmosets and tamarins (*Callitrichinae* subfamily) (Goldizen 1990; French et al. 2016). Male caregiver behavior has been associated with a high energetic cost of female reproduction in *Callitrichinae*. For instance, the birth weight of marmoset and tamarin twin infants is ~30 % of the female's body weight (Cleveland and Snowdon 1984; Cavanaugh and French 2013). Therefore, mothers have large twin neonates relative to their body weight. In this context, infant survival rates are higher when both parents are present (Cleveland and Snowdon 1984).

Recent studies, based on promising candidate genes (and pathways), have revealed insights into paternal care and correlated behaviors (e.g., monogamy). For example, Lee et al. (2011), Vargas-Pinilla et al. (2015) and Ren et al. (2015) investigated the nonapeptide oxytocin (OXT) and its receptor (OXTR), a system long known to induce labor and breastfeeding and that is also associated with the regulation and/or modulation of complex social behaviors. These authors described five new OXT forms in NWMs, suggesting that at least some of these variants could promote male (i.e., father, sibling, and unrelated; Vargas-Pinilla et al. 2015) care, as well as social monogamy (Ren et al. 2015). Furthermore, Vargas-Pinilla et al. (2015) verified that amino acid changes in NWM OXTRs are under positive selection and are coevolving with some of these taxon-specific OXT forms. For instance, in the three species of tamarins, a valine at OXT position 3 coevolves with a leucine at OXTR position 368 (posterior probability of 80 %). On the other hand, Babb et al. (2015) showed that genetic variation in this system is not limited to the *OXT* and *OXTR* coding regions because they found substantial variation in the putative *OXTR* 5' regulatory region, with marked structural differences across primate taxa, particularly humans and chimpanzees.

There is also evidence that a paralogous system, vasopressin and its three receptors (AVP-AVPR1a/AVPR1b/AVPR2), is also involved with monogamy and paternal care (Fernández-Duque et al. 2009). Hammock and Young (2005) suggested that variation in the *AVPR1a* regulatory region could be involved in social bonding among primates, including humans. Similarly, repetitive variation in this gene was linked to monogamous mating in voles (Lim et al. 2004). OXT can also bind to AVP receptors and AVP to OXTR, but with less affinity (Zingg and Laporte 2003; Koshimizu et al.

2012; Slusarz et al. 2013). Based on this information, Vargas-Pinilla et al. (2015) suggested that some NWM OXT forms could promote paternal/male alloparental care through increased affinities with AVPR1a.

The endogenous steroid hormone progesterone (PG), which plays a role in regulating expression of genes in female reproductive traits as well as in organs and tissues present in both males and females, including the brain (Kyurkchiev et al. 2010; Wolfson et al. 2015), also interacts with the OXT-OXTR system. For instance, in placental mammals, PG can block OXTR and/or OXT signaling, preventing their binding capacities with G proteins through complex mechanisms that are not completely known (Bishop 2013).

The broad spectrum of functions promoted by PG, including regulation of target genes, is primarily mediated by interaction with its receptor PR, a member of the nuclear/intracellular superfamily of ligand-dependent transcription factors (Leonhardt et al. 2003). The regulatory action of the PG-PR complex is relatively well known, at least compared with the independent action of PG. The PG-PR complex binds to specific palindromic DNA sites (5'-RGNA-CANRNTGTNCY-3') called progesterone response elements (PREs), which are located at the promoter region of target genes (Lieberman et al. 1993; Leonhardt et al. 2003; Jacobsen and Horwitz 2012). After binding, transcription of the target gene is initiated through recruitment of RNA polymerase II and several other transcription elements (Jacobsen and Horwitz 2012). Functional studies have demonstrated the importance of both the PG-PR complex and PREs in the transcriptional activity of many target genes (Cho et al. 2011).

Although studies with myometrium of rats have demonstrated that OXTR levels are regulated by PG (Soloff et al. 2011), no direct connection with the presence of PREs at the *OXTR* promoter region has been suggested to date. Therefore, to determine the potential interaction between PREs and OXTR, we investigated variation at the *OXTR* 5' regulatory region in 32 primate species, predicted the occurrence of PREs, and compared their presence and number with behavioral social traits and ecological/life-history parameters, while controlling for a phylogenetic effect. We hypothesized that the variable number of PREs at the *OXTR* promoter region among primate taxa is non-neutral and could be an essential part of the basic genetic repertoire that was coopted during evolution allowing the emergence of taxon-specific complex social behaviors.

Materials and methods

Molecular analyses

We analyzed 2095 base pairs (bp) of the *OXTR* 5' regulatory region in 32 species of primates, including 1 galago,

22 NWM, and 9 catarrhines, including *Homo sapiens*. We performed an analysis focused on the NWM, specifically the Callitrichinae (i.e., marmosets and tamarins; here we adopted the classification proposed by Schneider 2000 and Perelman et al. 2011). This subfamily consists of approximately 15 species belonging to two genera of marmosets (*Cebuella* and *Callithrix*) and two genera of tamarins (*Saguinus* and *Leontopithecus*) (Hershkovitz 1977). The Callitrichinae subfamily is also characterized by the frequent occurrence of twin births (Gengozian et al. 1978).

The data were retrieved from GenBank (NCBI), the University of California-Santa Cruz Genome Browser (UCSC GB), and the European Bioinformatics Institute's ENSEMBL browser (Table S1). The sequences were aligned using ClustalW under strict (>90 %) agreement thresholds with the Geneious R8 software package (Kearse et al. 2012), and alignment gaps were manually checked.

Different binding site matrices from the TRANSFACT: EMBOSS (Rice et al. 2000), and PROMO databases (Messeguer et al. 2002) were used to search for transcription factors across all sequences. Summary statistics were generated through programs written in R (R Development Core Team 2008). An intraspecific characterization of the *OXTR* regulatory region was performed in 25 individuals of Azara's night monkey (*Aotus azarae*), using similar methods to evaluate whether the variations found could be assumed to be taxon-specific.

The joint correlation and ancestral state trait reconstruction were implemented using BEAST v1.8 software (Drummond et al. 2012). Complete mitochondrial genome (mtDNA) sequences were used to recover the phylogenetic relationships among species. Data were compiled from GenBank (Table S1) for each surveyed species. For those few taxa for which complete mtDNA genomes were not available, we used the cytochrome b mitochondrial gene sequence. The nucleotide substitution model (general time reversible with gamma-distributed rate variation across sites) was obtained in Modeltest 2 (Darriba et al. 2012), using the Akaike information criterion (Akaike 1974). BEAST was run for 60,000,000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) cycles and parameters were sampled every 6000 cycles. The analysis was repeated four times to test for MCMC convergence, and priors exceeded 200 to ensure effective sample sizes (ESS). Burn-in was determined in Tracer 1.5 (Drummond and Rambaut 2007) based on ESS and parameter trajectories, and 10 % of the first trees were then removed with TreeAnnotator. The consensus tree was visualized and edited in FigTree 1.4.2 software (Rambaut 2014) to illustrate the changes in PRE numbers along branches.

To detect signals of positive selection in noncoding sequences, we measured their rate of nucleotide substitutions relative to the rate of synonymous substitutions in

coding sequences were measured by the parameter ζ using EvoNC (Wong and Nielsen 2004). The *OXTR* exon 3 (first coding exon) was selected for this analysis because it is adjacent to the promoter region being investigated. The coding sequence was concatenated to the 2095 bp of the *OXTR* 5' regulatory region. Additional analyses were performed with different sequence segments containing the PREs. According EvoNC, sequences evolve neutrally when $\zeta_2 = 1$, whereas $\zeta_2 < 1$ and $\zeta_2 > 1$ suggest negative and positive selection, respectively (Wong and Nielsen 2004).

Genotype–phenotype correlations

Two behavioral social systems were investigated in this study. These included the mating system (monogamy as a single couple formed for more than one mating season, inhabiting the same home range, with or without non-breeding offspring; or non-monogamy) and paternal care (fathers regularly contributing to activities such as carrying, grooming, sharing food, feeding, defending, and teaching, with a clear purpose of benefitting the offspring; or its absence). Additionally, five selected ecological and life-history parameters were assigned to each primate species: population density, body mass, gestation duration, weaning duration, and number of offspring per birth (1 or 2). These two sets of potentially correlated characteristics were compiled from Fernández-Duque et al. (2009), Lukas and Clutton-Brock (2013), Vargas-Pinilla et al. (2015), the Animal Diversity (Myers et al. 2015) and Primate Info Net (Gron 2008) websites.

It is not a trivial task to define species-specific characteristics such as those listed above, since observations should be made in nature, and there is always some level of intraspecific variation. Thus, some a priori criteria were formulated. For instance, Lukas and Clutton-Brock (2013) classified a species as socially monogamous if the majority of breeding females (>50 %) shared a home range with only one male and with no other breeders for more than 1 year. The same authors classified behavior as paternal care if males regularly contributed to feeding or carrying their offspring, considering only behaviors that were clearly adapted to the offspring's benefit. We employed these definitions in this study.

It should be mentioned that Lukas and Clutton-Brock (2013) classified the Goeldi's marmoset (*Callimico goeldii*) as non-monogamous, while we classified it as a monogamous species in our earlier study (Vargas-Pinilla et al. 2015). Here we continue to treat social monogamy as the modal grouping pattern for this species because it is estimated that roughly two in three Goeldi's marmoset groups are formed by monogamous pairs (Gron 2008). Anzenberger and Falk (2012) also consider Goeldi's marmoset to be monogamous in nature.

Comparative analysis across species requires explicit consideration of evolutionary history. Phenotypic similarity in different *taxa* might reflect either convergent evolutionary responses to a similar underlying cause, or limited divergence from a shared common ancestor (Felsenstein 1985; Harvey and Pagel 1991; Hadfield and Nakagawa 2010). The correlation between PREs and the above-mentioned traits were assessed through a recently developed Bayesian integrative method: the multivariate phylogenetic latent liability model (MPLLM), which simultaneously controls for shared evolutionary history through putatively neutral DNA sequences (Cybis et al. 2015). This approach is similar to the phylogenetic threshold model developed by Felsenstein (2012), but MPLLM allows joint reconstruction using data types that are not just binary or continuous, including evolutionary rates and discrete data with multiple (un)ordered states. Thus, parameters were modeled as a multivariate Brownian diffusion process along the phylogenetic tree, taking into account their covariance and the presence of possible phylogenetic uncertainty. In other words, MPLLM estimates the correlation between characteristics while simultaneously controlling for the correlation of characteristics shared by descent. Failing to control for descent can confound results, as false inferences weaken association analyses when population substructure or relatedness among individuals are not considered (Cybis et al. 2015). We used the “gplots” package v.2.11.0 (Warnes et al. 2012) in R to plot the significant posterior mean correlation matrices from the BEAST analysis in a heatmap.

Results

The data concerning the number of predicted PREs, OXT forms, as well as the log-transformed reproductive and ecological-life history parameters used for the statistical calculations are presented in Table 1.

We found 24 classes of transcription factor binding sites within the 2095 bp of the *OXTR* 5' promoter region. The most abundant were CP2 (85), PRE (70), Pit1a (61), MEP1 (60), and myogenin (45) (Table S2). The highest numbers of binding sites were observed in the northern white-cheeked gibbon (*Nomascus leucogenys*, 24) and the white-bellied spider monkey (*Ateles belzebuth*, 20). PRE copy numbers varied in the *OXTR* 5' promoter regions of all NWM species surveyed except the bald uakari (*Cacajao calvus*), which had no predicted PREs. We observed a range from one in spider monkeys (*Ateles*) to the highest number of predicted PREs, five, in marmosets (*Callithrix* and *Callimico*) and woolly spider monkeys (*Brachyteles*) (Fig. 1). The marmosets belong to the Callitrichinae subfamily, together with the tamarins (*Saguinus* and *Leontopithecus*, both having four predicted PREs).

A Bayesian posterior probability test compared the number of PREs to two ecological (body mass, population density), three reproductive (number of offspring, gestation and weaning), and two behavioral (paternal care, mating system) characteristics; the results are presented in Table 2 and Fig. 2. The correlations were generally non significant, and only the relationship between paternal care and PRE number was statistically significant (posterior probability 0.98). The relationship between PRE number and number of offspring approached the 0.95 significance level, with a value of 0.91.

Since Lukas and Clutton-Brock (2013) classified Goeldi's marmoset (*Callimico goeldii*) as non-monogamous, we tested whether our decision to consider them monogamous could have influenced the general results by rerunning the analysis with this species coded as non-monogamous. The results did not differ. We also tested the number of other predicted transcription binding sites (Table S2) against these same variables using association tests (Mann and Whitney 1947; Kruskal and Wallis 1952) and observed no significant results.

Additional analyses were performed to reconstruct the PRE state of the primate lineages (Fig. 1). PRE numbers at the nodes and branches suggest that the first PREs probably originated before the three NWM families split from each other (Cebidae, Pitheciidae, and Atelidae) about 25 million years ago (Schneider and Sampaio 2015). More recently, the number of PREs has progressively increased (Table 1; Fig. 1), except in the bald uakari (*Cacajao calvus*), which presents a probable reversion to the ancestral state (PRE absence in the *OXTR* promoter region).

All Cebidae species had at least three predicted PREs, suggesting a connection with paternal care, a common social behavior found in lineages within this clade (Fig. 1). However, although the tufted capuchin (*Sapajus apella*) and the common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) had three and four PREs, respectively, paternal care is not present in these species.

Our intraspecific analysis revealed no variation in the number of predicted PREs in the *OXTR* promoter region in the Azara's night monkey (*Aotus azarae*), indicating that four PREs characterize this species. In addition, no variation was detected in the other predicted binding sites, confirming reports of low nucleotide diversity in these regions (Babb et al. 2015), and suggesting that intraspecific variation in the *OXTR* promoter is rare or absent. The lack of intraspecific variation could signal an evolutionary constraint that might be connected to specific key functional properties.

Comparative analysis of the molecular evolution of PREs within the *OXTR* promoter region demonstrated a pattern of purifying selection (Fig. 1). The likelihood ratio test (Table S3) indicates this pattern, as $\zeta_2 < 1$ values were

Table 1 Ecological and genetic traits of the primates analyzed

Family ^a	Subfamily ^a	Species	Number of PRE	Monogamous ^b	Paternal care ^b	Number of offspring	Log body mass ^b	Log population density ^b	Log gestation duration ^b	Log weaning duration ^b	OXT ^c
Galaguidae		<i>Otolemur garnettii</i>	0	0	0	1	3.007	1.580	2.120	2.150	Leu8
Cebidae	Callithrichinae	<i>Callithrix pygmaea</i>	5	1	1	2	2.081	1.201	2.140	1.950	Pro8
		<i>Callithrix geoffroyi</i>	5	1	1	2	2.534	NA	NA	NA	Pro8
		<i>Callithrix jacchus</i>	5	1	1	2	2.450	2.706	2.170	1.780	Pro8
		<i>Callithrix kuhlii</i>	5	1	1	2	2.534	1.771	NA	NA	Pro8
		<i>Callithrix penicillata</i>	5	1	1	2	2.487	NA	NA	NA	Pro8
		<i>Callithrix aurita</i>	5	1	1	2	NA	NA	NA	NA	Pro8
		<i>Callimico goeldii</i>	5	1	1	1	2.746	0.318	2.180	1.810	Pro8
		<i>Leontopithecus rosalia</i>	4	1	1	2	2.783	0.610	2.110	1.950	Pro8
		<i>Saguinus midas</i>	4	1	1	2	2.708	1.041	2.100	1.850	Pro8
		<i>Aotus azarai</i>	4	1	1	1	3.090	NA	NA	NA	Pro8
Atelidae	Atelinae	<i>Sapajus apella</i>	3	0	0	1	3.413	1.376	2.190	2.420	Pro8
		<i>Saimiri sciureus</i>	4	0	0	1	2.884	1.557	2.230	2.230	Pro8
		<i>Callicebus cupreus</i>	4	1	1	1	3.049	0.689	NA	NA	Leu8
		<i>Cacajao calvus</i>	0	0	0	1	3.560	1.179	NA	NA	Ala8
Pitheciidae	Pitheciinae	<i>Chiropotes chiropotes</i>	4	0	0	1	NA	NA	NA	NA	Ala8
		<i>Pithecia pithecia</i>	4	1	0	1	3.155	0.622	NA	NA	Thr8
		<i>Ateles geoffroyi</i>	1	0	0	1	3.830	1.280	2.350	2.880	Pro8
		<i>Ateles belzebuth</i>	1	0	0	1	3.811	1.130	NA	NA	Pro8
		<i>Brachyteles hypoxanthus</i>	5	0	0	1	NA	NA	NA	NA	Leu8
		<i>Lagothrix lagotricha</i>	2	0	0	1	3.837	1.030	2.350	2.500	Leu8
		<i>Lagothrix poeppigii</i>	2	0	0	1	NA	NA	NA	NA	Leu8
		<i>Alouatta caraya</i>	2	0	0	1	3.733	1.903	2.270	2.510	Phe2
		<i>Chlorocebus sabaeus</i>	0	0	0	1	NA	NA	NA	NA	Leu8
		<i>Macaca mulatta</i>	0	0	0	1	3.834	1.045	2.220	2.280	Leu8
<i>Papio anubis</i>	0	0	0	1	NA	1.033	2.260	2.770	Leu8		

Table 1 continued

Family ^a	Subfamily ^a	Species	Number of PRE	Monoamous ^b	Paternal care ^b	Number of offspring	Log body mass ^b	Log population density ^b	Log gestation duration ^b	Log weaning duration ^b	OXT ^c
Hylobatidae		<i>Nomascus leucogenys</i>	0	1	0	1	3.773	0.820	2.310	2.740	Leu8
Hominiidae	Hominiinae	<i>Pan troglodytes</i>	0	0	0	1	4.616	0.212	NA	NA	Leu8
		<i>Pan paniscus</i>	0	0	0	1	4.560	0.301	2.380	3.030	Leu8
		<i>Homo sapiens</i>	0	1	1	1	NA	NA	NA	NA	Leu8
		<i>Gorilla gorilla</i>	0	0	0	1	5.081	-0.229	2.410	3.110	Leu8
	Ponginae	<i>Pongo abelii</i>	0	0	0	1	NA	NA	2.400	2.860	Leu8

0 absence, 1 presence

The human sequence is 1Cys-2Thr-3Ile-4Gln-5Asp-6Cys-7Pro-8Leu-9Gly represented by Leu8. Only the amino acid at the 8th position is indicated for the other taxa, with the exception of *A. caraya* (Phe2)

^a Classification according to Perelman et al. (2011)

^b Ecological traits according to Lukas and Clutton-Brock (2013)

^c Oxytocin forms according to Vargas-Pinilla et al. (2015) and Ren et al. (2015)

detected for all *OXTR* promoter (2095 bp) region and those segments containing the PREs ($p < 0.001$ and $p = 0.002$, respectively).

Discussion

Few species of mammals (~5 %) present paternal/allopaternal care even though it is relevant for offspring survival (Lukas and Clutton-Brock 2013). Because this complex and uncommon social behavior has emerged independently multiple times in mammals, and particularly in primates, it is reasonable to speculate that specific evolutionary trajectories may underlie it. In this study, we suggest a new genetic element, connected with the neuroendocrine pathway, that might have facilitated the emergence of paternal care in the small marmosets and tamarins, where twin births are common (Callitrichinae subfamily: *Callithrix*, *Callimico*, *Saguinus*, and *Leontopithecus*).

A connection may exist between the number of predicted PREs located in the *OXTR* promoter region and paternal care, given that the highest numbers of PREs are present in species within the Callitrichinae clade, which is mostly characterized by monogamous pairs, marked paternal care, and twin births. The *OXTR* promoter region among primates is conserved through purifying selection, reinforcing the possibility that these relatively few changes (i.e., PRE origin and duplication) have adaptive value, although no signal of positive selection was detected. It should be noted, however, that under low levels of sequence variation, the prediction of positive selection is difficult to achieve with the current methods of analysis (Anisimova and Anisimov 2001; Wong and Nielsen 2004).

Differences in hormone levels have been demonstrated in NWM and other female placental mammals during reproductive and pregnancy periods. For example, in marmosets the PG levels increase 400-fold during pregnancy and reach a maximal level around birth (Pryce et al. 1993). Chambers and Hearn (1979) observed ~228 ng/ml in female marmoset plasma, which is higher than in human women (180 ng/ml), female chimpanzees (49–120 ng/ml), and rhesus monkeys (4–12 ng/ml). Additionally, PG administration increased the maternal motivation of primate marmosets (Pryce et al. 1993). Similarly, functional studies with sheep showed that progesterone treatment in females enhanced ovarian *OXTR* mRNA production (Al-Matubsi et al. 1999). More recently, Fleming et al. (2006) predicted PREs in the ovine *OXTR* promoter region, which supports the suggestion that the presence of PREs may be related to the *OXTR* regulation, mediated by the PG-PR complex.

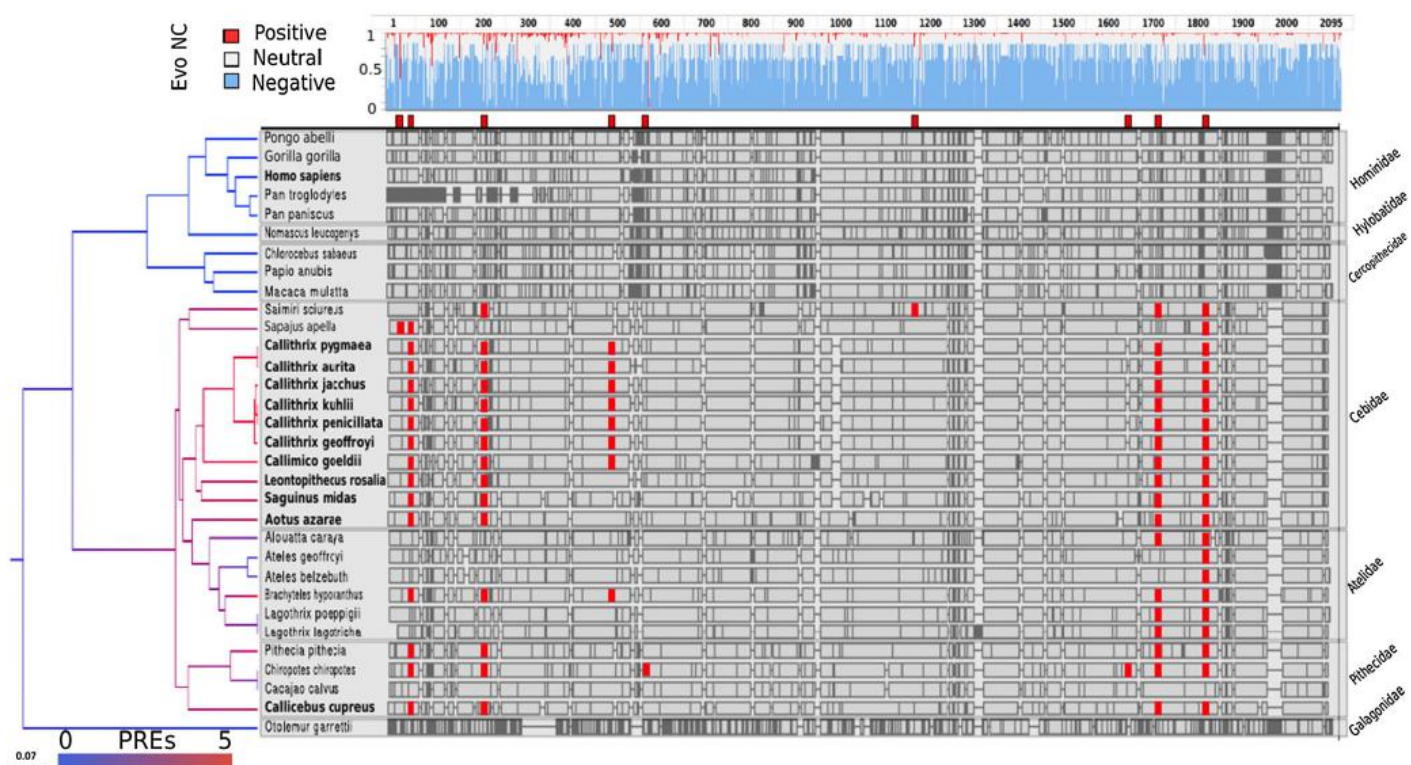


Fig. 1 Alignment of the OXTR regulatory region from the 32 studied species. The predicted PREs are indicated by *red bands*, and mismatch regions are in *black*. The values were calculated using EvoNC and are indicated in the *upper part* of the figure, reflecting the type of selection inferred by this method. The phylogenetic tree at the *left* was reconstructed based on mitochondrial sequences, and it allows to see the changes in PRE numbers along branches (shown by

a *color gradient*). The topology obtained matches the phylogeny proposed by Perelman et al. (2011). Species listed in *bold* show paternal care according to Gron (2008), Fernández-Duque et al. (2009), Lukas and Clutton-Brock (2013), Vargas-Pinilla et al. (2015), and Myers et al. (2015). The *length bar* below the tree indicates the rate of substitution by site (0.07) (Color figure online)

Although it has been demonstrated that reproductive experiences in female Callitrichinae promote neuroendocrine changes, including fluctuations in PG levels that promote maternal behavior, the mechanisms that lead to paternal care are not clear (Saito 2015). However, it is likely that paternal care would be influenced by the same neuroendocrine pathway that conditions maternal behavior (Wynne-Edwards and Reburn 2000).

Our results associating the number of PREs in the OXTR promoter region with paternal care suggest a possible role for PR, inducible by PG, in the OXTR expression in Callitrichinae, and perhaps in other NWM lineages. Under this scenario, the number of PREs could be related to OXTR expression. For instance, Cho et al. (2011) performed functional studies and demonstrated that the progressive deletion of portions of the promoter region containing predicted PREs dramatically decreased transcription of the *PLDI* gene. This indicates that PREs probably have some important gene regulatory functions. Additionally, other studies have shown differentiation in the OXTR expression pattern in brain regions of monogamous NWM when they are compared with those of other primates (Loup et al. 1991; Schorscher-Petcu et al. 2009; Freeman et al. 2014a, b).

Our study also revealed that certain species that do not exhibit paternal care, such as the tufted capuchin (*Sapajus apella*), the common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*), and the northern muriqui (*Brachyteles hypoxanthus*), have high numbers of predicted PREs (three, four, and five, respectively; Table 1). According to Fernández-Duque et al. (2009), two independent events promoted the emergence of paternal care in NWM, one in the ancestor of all Cebidae, and another in the ancestor of the titi monkeys (*Callicebus*). The tufted capuchin and the common squirrel monkey thus either subsequently lost their paternal care behavior, possibly through other genetic compensatory pathways owing to specific ecological conditions and evolutionary demands, or never developed it despite their PREs. On the other hand, all nonhuman primates with paternal care, including the coppery titi (*Callicebus cupreus*), have at least four predicted PREs. It should be noted that predicted PREs are found in the three NWM families (Cebidae, Pitheciidae, and Atelidae), but only Cebidae present paternal care in some lineages. These results suggest that changes in the 5' regulatory OXTR region, which led to transcription based on the PG-PR system, preceded the emergence of paternal care in NWM (Fig. 1). Additionally, a general functional constraint is

Table 2 Bayesian posterior probability (BIC) for seven ecological, reproductive or behavior correlations with PREs, as well as among themselves, using the MPLLM model

	Number of offspring	Body mass	Pop density	Gestation	Weaning	PREs	Paternal care
Body mass	0.30 [−0.62, 0.45]						
Pop density	0.90 [−0.18, 0.81]	0.99 [0.13, 0.62]					
Gestation	0.81 [−0.28, 0.70]	0.99 [0.33, 0.75]	1 [0.49, 0.81]				
Weaning	0.71 [−0.37, 0.63]	0.99 [0.33, 0.75]	0.99 [0.41, 0.77]	1 [0.90, 0.97]	0.06 [−0.68, 0.04]		
PREs	0.91 [0.20, 0.95]	0.00 [−0.81, −0.33]	0.48 [−0.59, 0.47]	0.15 [−0.64, 0.17]	0.39 [−0.58, 0.43]	0.98 [−0.10, 0.83]	
Paternal care	0.90 [−0.13, 0.85]	0.64 [−0.39, 0.68]	0.39 [−0.66, 0.53]	0.59 [−0.44, 0.58]	0.62 [−0.39, 0.51]	0.38 [−0.56, 0.36]	0.01 [−0.94, −0.24]
Mating system	0.40 [−0.66, 0.43]	0.12 [−0.76, 0.13]	0.81 [−0.32, 0.75]	0.49 [−0.50, 0.44]			

Bold value indicates BIC > 95 % for the PRE correlations

The confidence interval is presented in brackets [inferior, superior]

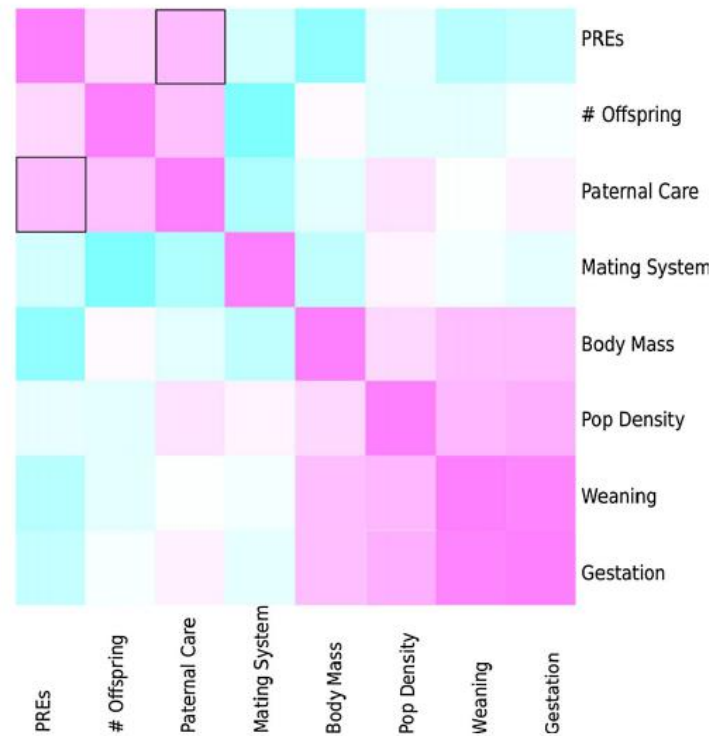


Fig. 2 Heat map of the posterior means for the genotypic-phenotypic correlations between PRE and ecological/life-history parameters in the latent liability model. *Intense colors* indicate stronger correlations, while *light colors* indicate weaker correlations; *pink* indicates positive correlations and *blue* indicates negative correlations. Significant correlations are enclosed with a *black square*; posterior probabilities are presented in Table 2 (Color figure online)

expected considering a promoter region of a gene with a large range of functions (e.g., basal placental mammal physiological traits, as well as general and specific behavioral phenotypes). In this context, few changes can lead to larger effects in some *taxon*-specific phenotypes, according to their evolutionary demands, maintaining at the same time primordial functions. Pereira et al. (2006) discussed this situation and named it as an “evolutionary window” in an extremely conserved gene or genomic region. In the same direction, other authors have shown that mutations at a promoter region allow rapid adaptations required by selective pressures (Gokcumen et al. 2011).

A general evolutionary scenario can thus be suggested. At the beginning of the NWM evolutionary history (~25million years ago), mutations generated the PREs in the *OXTR* promoter sequence of the common ancestor of this group. Presumably, PREs and changes in the coding region of both *OXT* and *OXTR*, as well as in other genes in the same or correlated neuroendocrine pathways (Ren et al. 2015; Vargas-Pinilla et al. 2015; French et al. 2016) allowed the emergence of advantageous behaviors such as paternal care in socially monogamous NWM species that are also characterized by a small body size and twin births (Callitrichinae). These same changes could have favored the emergence of other male caregivers (siblings, other

relatives, and even unrelated individuals) in some NWM clades because their help would have been important for infant survival (Barbosa and Da Silva Mota 2013).

It is important to point out that paternal care is a complex trait that evolved under different evolutionary contexts, and that intraspecific variation in the trait also exists (Fernández-Duque et al. 2009; French et al. 2016). Thus, it is expected that changes in different genomic regions, genes, and pathways could influence the emergence (or reversion) of this characteristic.

Finally, based on our results it is unlikely that a variable number of PREs would be neutral from an evolutionary point of view. Specific changes in the promoter region possibly generated functional adaptations in the primate behavior, maintaining at the same time the primordial functions of placental mammals. Additional studies will be needed to confirm the relationships between OXT-OXTR, PG-PR, and taxon-specific complex social behavior, particularly paternal care, in the Callitrichinae clade.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest Pedro Vargas-Pinilla, Paul Babb, Leandro Nunes, Pâmela Paré, Gabrielle Rosa, Aline Felkl, Dânae Longo, Francisco M. Salzano, Vanessa R. Paixão-Côrtes, Gislene Lopes Gonçalves & Maria Cátira Bortolini declare that they have no conflict of interest.

Human and Animal Rights and Informed Consent This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Adkins-Regan E (2005) Hormones and animal social behavior. Princeton University Press, Princeton
- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control* 19:716–723
- Al-Matubsi HY, Frazer S, Fairclough RJ, Jenkin G (1999) Effects of progesterone on expression of messenger RNA encoding oxytocin-neurophysin, oxytocin receptor and prostaglandin G/H synthase-1 and -2 during the early oestrous cycle in the ovine corpus luteum. *Reprod Fertil Dev* 11:435–442
- Alonzo SH (2010) Social and coevolutionary feedbacks between mating and parental investment. *Trends Ecol Evol* 25:99–108. doi:10.1016/j.tree.2009.07.012
- Anisimova AA, Anisimov AP (2001) Morphofunctional parameters of the nucleoli during development of polyploid nutrient cells of gonads from the snail *Succinea lauta*. *Tsitologiya* 43:544–552
- Anzenberger G, Falk B (2012) Monogamy and family life in callitrichid monkeys: deviations, social dynamics and captive management. *Int Zoo Yearb* 46:109–122. doi:10.1111/j.1748-1090.2012.00176.x
- Babb PL, Fernández-Duque E, Schurr TG (2015) Oxytocin receptor gene sequences in owl monkeys and other primates show remarkable interspecific regulatory and protein coding variation. *Mol Phylogenet Evol* 91:160–177. doi:10.1016/j.ympev.2015.05.006
- Barbosa MN, Da Silva Mota MT (2013) Alloparental responsiveness to newborns by nonreproductive, adult male, common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Am J Primatol* 75:145–152. doi:10.1002/ajp.22092
- Bishop CV (2013) Progesterone inhibition of oxytocin signaling in endometrium. *Front Neurosci* 7:138. doi:10.3389/fnins.2013.00138
- Cavanaugh J, French JA (2013) Post-partum variation in the expression of paternal care is unrelated to urinary steroid metabolites in marmoset fathers. *Horm Behav* 63:551–558. doi:10.1016/j.yhbeh.2013.02.006
- Chambers PL, Hearn JP (1979) Peripheral plasma levels of progesterone, oestradiol-17 beta, oestrone, testosterone, androstenedione and chorionic gonadotrophin during pregnancy in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *J Reprod Fertil* 56:23–32
- Cho JH, Yoon MS, Koo JB, Kim YS, Lee JH, Han JS (2011) The progesterone receptor as a transcription factor regulates phospholipase D1 expression through independent activation of protein kinase A and Ras during 8-Br-cAMP-induced decidualization in human endometrial stromal cells. *Biochem J* 436:181–191. doi:10.1042/BJ20101614
- Cleveland BYJ, Snowdon CT (1984) Social development during the first twenty weeks in the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). *Anim Behav* 32:432–444. doi:10.1016/S0003-3472(84)80279-1
- Cybis G, Sinsheimer S, Bedford T, Mather AE, Lemey P, Suchard MA (2015) Assessing phenotypic correlation through the multivariate phylogenetic latent liability model. *Ann Appl Stat* 9:22
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772. doi:10.1038/nmeth.2109
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214. doi:10.1186/1471-2148-7-214
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29:1969–1973. doi:10.1093/molbev/mss075
- Felsenstein J (1985) Phylogenies and the comparative method. *Am Nat* 125:1–15
- Felsenstein J (2012) A comparative method for both discrete and continuous characters using the threshold model. *Am Nat* 179:145–156. doi:10.1086/663681
- Fernández-Duque E, Vallengia CR, Mendoza SP (2009) The biology of paternal care in human and nonhuman Primates. *Annu Rev Anthropol* 38:115–130. doi:10.1146/annurev-anthro-091908-164334
- Fleming JG, Spencer TE, Safe SH, Bazer FW (2006) Estrogen regulates transcription of the ovine oxytocin receptor gene through GC-rich SP1 promoter elements. *Endocrinology* 147:899–911. doi:10.1210/en.2005-1120
- Freeman SM, Inoue K, Smith AL, Goodman MM, Young LJ (2014a) The neuroanatomical distribution of oxytocin receptor binding and mRNA in the male rhesus macaque (*Macaca mulatta*). *Psychoneuroendocrinology* 45:128–141. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.03.023
- Freeman SM, Walum H, Inoue K, Goodman MM, Bales KL, Young LJ (2014b) Neuroanatomical distribution of oxytocin and vasopressin 1a receptors in the socially monogamous coppery titi monkey (*Callicebus cupreus*). *Neuroscience* 273:12–23. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.04.055
- French JA, Taylor JH, Mustoe AC, Cavanaugh J (2016) Neuropeptide diversity and the regulation of social behavior in New World primates. *Front Neuroendocrinol*. doi:10.1016/j.yfrne.2016.03.004
- Gengozian N, Batson JS, Smith TA (1978) Breeding of marmosets in a colony environment. *Primates Med* 10:71–78
- Gokcumen O, Babb PL, Iskow RC, Zhu Q, Shi X, Mills RE, Ionita-Laza I, Vallender EJ, Clark AG, Johnson WE, Lee C (2011)

- Refinement of primate copy number variation hotspots identifies candidate genomic regions evolving under positive selection. *Genome Biol* 12:R52. doi:10.1186/gb-2011-12-5-r52
- Goldizen AW (1990) A comparative perspective on the evolution of tamarin and marmoset social systems. *Int J Primatol* 11:63–83. doi:10.1007/bf02193696
- Gron KJ (2008) Primate factsheets: Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*) taxonomy, morphology & ecology. http://pin.primat.wisc.edu/factsheets/entry/goeldi's_monkey. Accessed 25 Sep 2015
- Hadfield JD, Nakagawa S (2010) General quantitative genetic methods for comparative biology: phylogenies, taxonomies and multi-trait models for continuous and categorical characters. *J Evol Biol* 23:494–508
- Hammock EAD, Young LJ (2005) Microsatellite instability generates diversity in brain and sociobehavioral traits. *Science* 308:1630–1634. doi:10.1126/science.1111427
- Harvey PH, Pagel MD (1991) The comparative method in evolutionary biology. Oxford University Press, Oxford
- Hershkovitz P (1977) Living new world monkeys (Platyrrhini) with an introduction to primates. University of Chicago Press, Chicago
- Houston AI, Székely T, McNamara JM (2005) Conflict between parents over care. *Trends Ecol Evol* 20:33–38. doi:10.1016/j.tree.2004.10.008
- Jacobsen BM, Horwitz KB (2012) Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* 357:18–29. doi:10.1016/j.mce.2011.09.016
- 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, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199
- Kokko H, Jennions MD (2008) Parental investment, sexual selection and sex ratios. *J Evol Biol* 21:919–948. doi:10.1111/j.1420-9101.2008.01540.x
- Koshimizu TA, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, Tanoue A (2012) Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev* 92:1813–1864. doi:10.1152/physrev.00035.2011
- Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc* 47:583–621
- Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev SD (2010) New target cells of the immunomodulatory effects of progesterone. *Reprod Biomed Online* 21:304–311. doi:10.1016/j.rbmo.2010.04.014
- Lee AG, Cool DR, Grunwald WC et al (2011) A novel form of oxytocin in New World monkeys. *Biol Lett* 7:584–587. doi:10.1098/rsbl.2011.0107
- Leonhardt SA, Boonyaratanakornkit V, Edwards DP (2003) Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* 68:761–770
- Lieberman BA, Bona BJ, Edwards DP, Nordeen SK (1993) The constitution of a progesterone response element. *Mol Endocrinol* 7:515–527. doi:10.1210/mend.7.4.8388996
- Lim MM, Wang Z, Olazábal DE, Ren X, Terwilliger EF, Young LJ (2004) Enhanced partner preference in a promiscuous species by manipulating the expression of a single gene. *Nature* 429:754–757. doi:10.1038/nature02539
- Loup F, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ (1991) Localization of high-affinity binding sites for oxytocin and vasopressin in the human brain. An autoradiographic study. *Brain Res* 555:220–232
- Lucion AB, Bortolini MC (2014) Mother-pup interactions: rodents and humans. *Front Endocrinol* 5:17. doi:10.3389/fendo.2014.00017
- Lukas D, Clutton-Brock TH (2013) The evolution of social monogamy in mammals. *Science* 341(6145):526–530. doi:10.1126/science.1238677
- Mann HB, Whitney DR (1947) On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Stat* 18(1):50–60
- Messeguer X, Escudero R, Farré D, Núñez O, Martínez J, Albà MM (2002) PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18:333–334
- Myers P, Espinosa R, Parr CS, Jones T, Hammond GS, Dewey TA (2015) The animal diversity web. <http://animaldiversity.org>. Accessed 20 May 2015
- Pereira TV, Salzano FM, Mostowska A, Trzeciak WH, Ruiz-Linares A, Chies JA, Saavedra C, Nagamachi C, Hurtado AM, Hill K, Castro-de-Guerra D, Silva-Júnior WA, Bortolini MC (2006) Natural selection and molecular evolution in primate PAX9 gene, a major determinant of tooth development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(15):5676–5681. doi:10.1073/pnas.0509562103
- Perelman P, Johnson WE, Roos C, Seuánez HN, Horvath JE, Moreira MAM, Kessing B, Pontius J, Roelke M, Rumler Y, Schneider MPC, Silva A, O'Brien SJ, Pecon-Slattery J (2011) A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 7:e1001342
- Pryce CR, Döbeli M, Martin RD (1993) Effects of sex steroids on maternal motivation in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): development and application of an operant system with maternal reinforcement. *J Comp Psychol* 107:99–115
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>
- Rambaut A (2014) Figtree. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Ren D, Lu G, Moriyama H, Mustoe AC, Harrison EB, French JA (2015) Genetic diversity in oxytocin ligands and receptors in New World monkeys. *PLoS One* 10:e0125775. doi:10.1371/journal.pone.0125775
- Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOSS: the european molecular biology open software suite. *Trends Genet* 16:276–277
- Saito A (2015) The marmoset as a model for the study of primate parental behavior. *Neurosci Res* 93:99–109. doi:10.1016/j.neures.2014.12.011
- Schneider H (2000) The current status of the New World monkey phylogeny. *An Acad Bras Cienc* 72:165–172
- Schneider H, Sampaio I (2015) The systematics and evolution of New World primates—a review. *Mol Phylogenet Evol* 82 Pt B:348–357. doi:10.1016/j.ympev.2013.10.017
- Schorscher-Petcu A, Dupré A, Tribollet E (2009) Distribution of vasopressin and oxytocin binding sites in the brain and upper spinal cord of the common marmoset. *Neurosci Lett* 461:217–222. doi:10.1016/j.neulet.2009.06.016
- Slusarz MJ, Sikorska E, Slusarz R (2013) Interactions of vasopressin and oxytocin receptors with vasopressin analogues substituted in position 2 with 3,3'-diphenylalanine—a molecular docking study. *J Pept Sci* 19:118–126. doi:10.1002/psc.2485
- Soloff MS, Jeng Y-J, Izbán MG, Sinha M, Luxon BA, Stamnes SJ, England SK (2011) Effects of progesterone treatment on expression of genes involved in uterine quiescence. *Reprod Sci* 18:781–797. doi:10.1177/1933719111398150
- Székely T, Moore AJ, Komdeur J (2010) Social behaviour: genes, ecology and evolution. Cambridge University Press, Cambridge
- Vargas-Pinilla P, Paixão-Côrtes VR, Paré P, Tovo-Rodrigues L, Vieira CM, Xavier A, Comas D, Pissinatti A, Sinigaglia M, Rigo MM, Vieira GF, Lucion AB, Salzano FM, Bortolini MC (2015) Evolutionary pattern in the OXT-OXTR system in primates: coevolution and positive selection footprints. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:88–93. doi:10.1073/pnas.1419399112

- Warnes G, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Huber W, Liaw A, Lumley T, Maechler M, Magnusson A, Moeller S, Schwartz M, Venables B (2012) Package “gplots.” Various R programming tools for plotting data. <http://cran.rproject.org/package=gplots>
- Wolfson ML, Schander JA, Bariani MV, Correa F, Franchi AM (2015) Progesterone modulates the LPS-induced nitric oxide production by a progesterone-receptor independent mechanism. *Eur J Pharmacol* 769:110–116. doi:10.1016/j.ejphar.2015.11.005
- Wong WS, Nielsen R (2004) Detecting selection in noncoding regions of nucleotide sequences. *Genetics* 167:949–958. doi:10.1534/genetics.102.010959
- Wynne-Edwards KE, Reburn CJ (2000) Behavioral endocrinology of mammalian fatherhood. *Trends Ecol Evol* 15:464–468
- Zingg HH, Laporte SA (2003) The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab* 14:222–227

CAPÍTULO VI

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

6.1 Bioinformática

Em nossas análises exploratórias, através de simulações de dinâmica molecular, além das formas de oxitocina encontradas nos pNM (Leu⁸OXT, Pro⁸OXT, Val³Pro⁸OXT, Ala⁸OXT, Thr⁸OXT, Phe²OXT; Figura 7), aqui chamadas de formas naturais, foram incluídas também variantes sintéticas nunca encontradas na natureza (Thr⁴OXT e Thr⁴Gly⁷OXT).

Alguns estudos mostram que Thr⁴OXT é duas vezes mais eficiente na ativação de OXTR, mas perde cerca de 10% a 25% da sua habilidade para ativar os receptores de AVP quando se compara com Leu⁸OXT. Somada a Thr⁴, Gly⁷ resulta em uma atividade reduzida a menos de um terço da atividade de OXTR, enquanto sua atividade com receptores de AVP é nula (Lowbridge et al. 1977; Yedvabny et al. 2015).

A análise de componente principal para cada forma de OXT mostra três conformações de baixa energia em todas as formas naturais (Leu⁸OXT, Pro⁸OXT, Val³Pro⁸OXT, Ala⁸OXT, Thr⁸OXT, Phe²OXT; Figura 7). É interessante observar que esse padrão não se confirma nas formas sintéticas, que apresentam as estruturas Thr⁴OXT e Thr⁴Gly⁷OXT. Essas conformações diferentes presentes nas formas sintéticas poderiam influenciar sua funcionalidade e a sua capacidade de ativar receptores (Lowbridge et al. 1977), como é observado em trabalhos já publicados (Glembo et al. 2012).

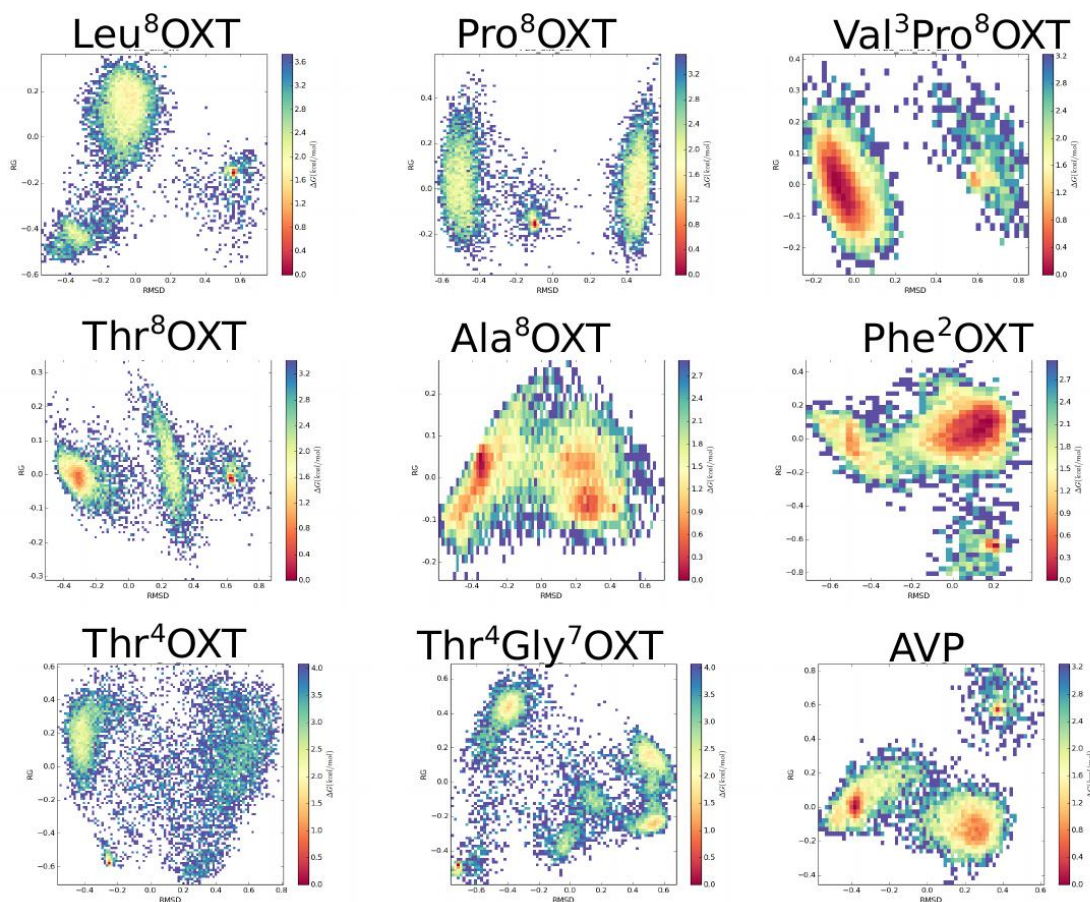


Figura 7. Gráfico de energia de superfície livre (FES; *Free Energy Surface*) para as formas de OXT e AVP, considerando-se os valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*), no eixo X, e Raio de Giro (RG), no eixo Y. A energia livre é representada no gradiente que vai de cores quentes, para valores elevados,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

6.2 Comparação das dinâmicas

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

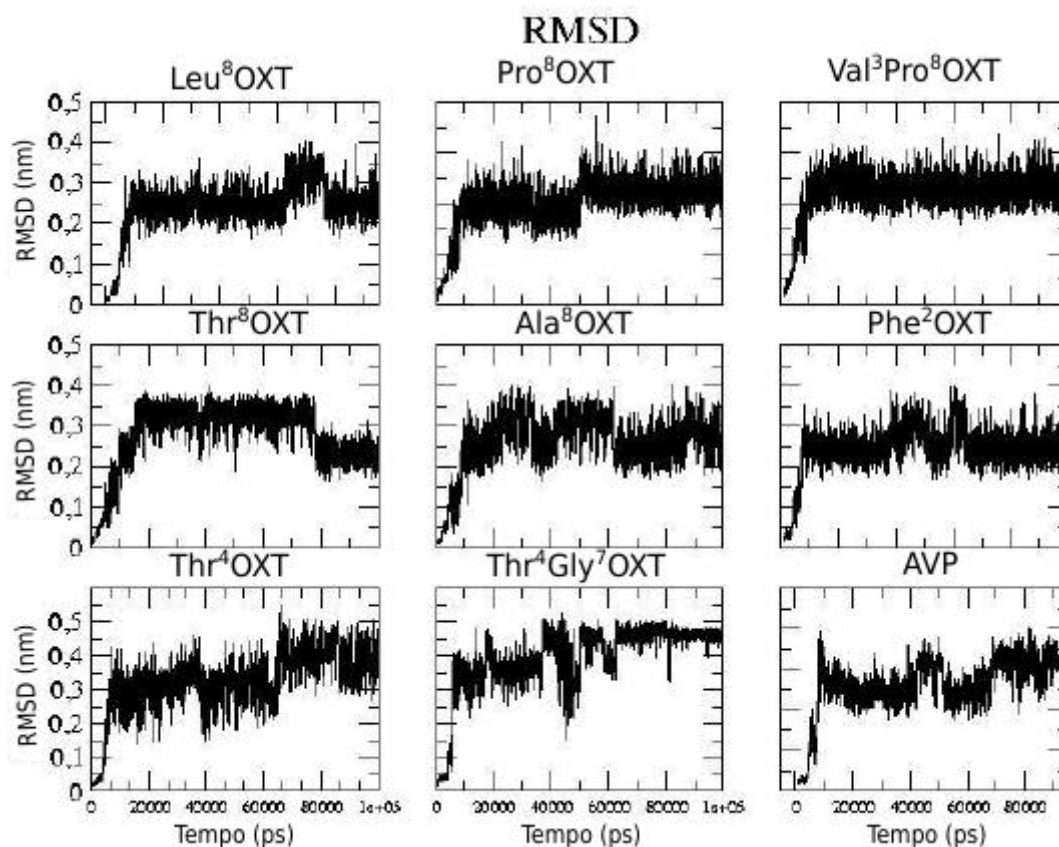


Figura 8. Valores de RMSD para as formas de OXT e AVP ao longo dos 100 ns da simulação.

Na Figura 9, na representação de RMSD (*Root Mean-Square Deviation*), os valores mais baixos pertencem a Pro⁸OXT e Val³Pro⁸OXT, diferenciando-se significativamente ($p < 0,001$; azul escuro) das outras formas naturais (azul claro). Essas últimas, por sua vez, diferenciam-se das formas sintéticas Thr⁴OXT (laranja) e Thr⁴Gly⁷OXT (vermelho), confirmando valores descritos em outros trabalhos (Yedvabny et al, 2015).

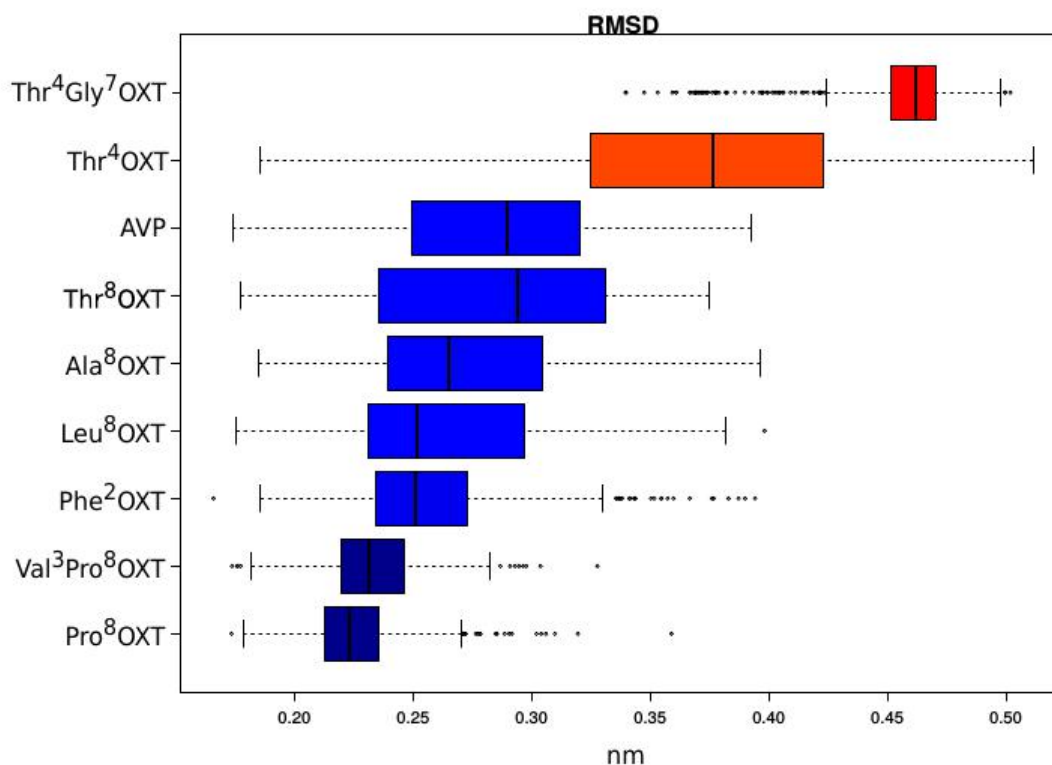


Figura 9. Boxplot dos valores de RMSD dos últimos 50 ns da simulação da dinâmica molecular para cada forma de oxitocina e vasopressina. O teste de Dunn identificou 4 grupos significativamente diferentes: 1: Thr⁴Gly⁷OXT; 2: Thr⁴OXT; 3: AVP, Thr⁸OXT, Ala⁸OXT, Leu⁸OXT e Phe²OXT; e 4: Val³Pro⁸OXT e Pro⁸OXT ($p < 0,001$).

Outro parâmetro considerado é o Raio de Giro (RG). A forma sintética Thr⁴OXT apresenta os maiores valores (Figura 10), diferenciando-se significativamente das formas naturais e de Thr⁴Gly⁷OXT. Justamente essa última forma permite inferir o impacto da mudança na sétima posição; Pro>Gly parece ser determinante para a diminuição dos valores do RG, dado que Thr⁴Gly⁷OXT parece ser uma estrutura mais compacta. Essa mudança influenciando o RG poderia ser determinante na ativação do receptor, considerando que, como se mencionou anteriormente, Thr⁴Gly⁷OXT apresenta valores reduzidos na ativação de OXTR e AVPRs.

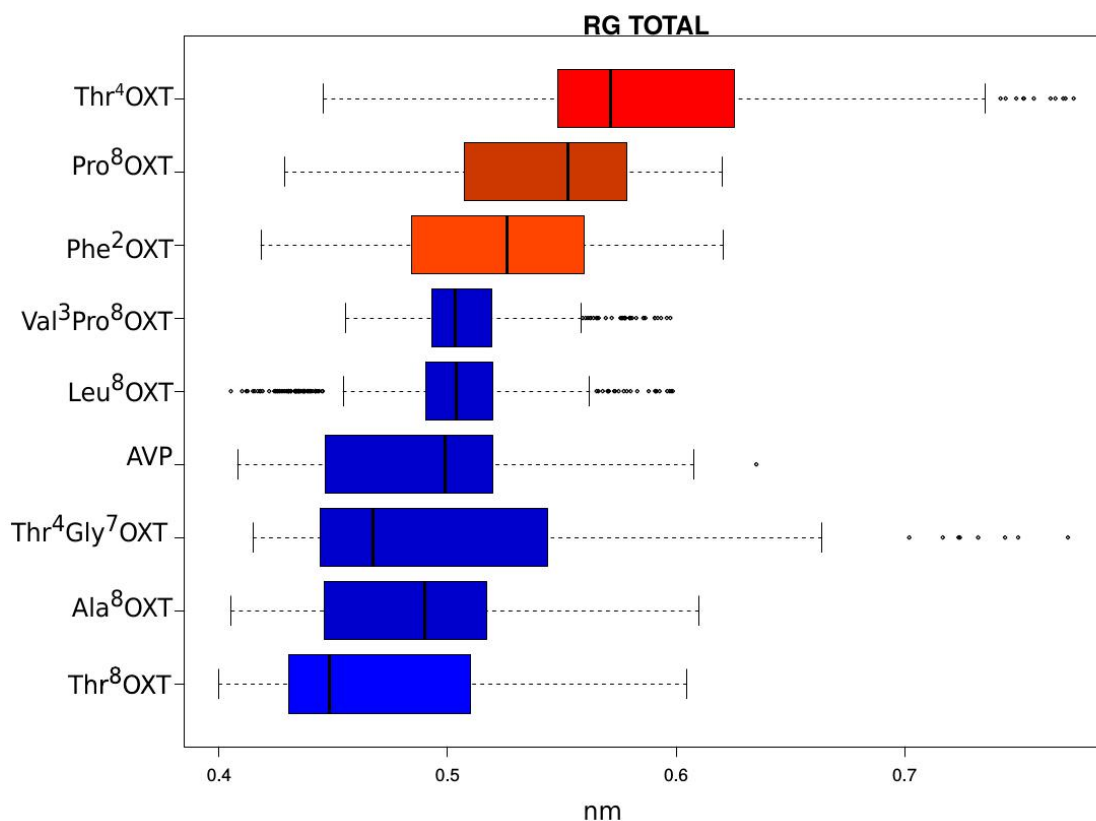


Figura 10. Boxplot dos valores de Raio de Giro dos últimos 50 ns da simulação da dinâmica molecular para cada forma de OXT e AVP. O teste de Dunn identificou 4 grupos significativamente diferentes: 1: Thr⁴OXT; 2: Pro⁸OXT; 3: Phe²OXT; e 4: Val³Pro⁸OXT, Leu⁸OXT, AVP, Thr⁴Gly⁷OXT, Ala⁸OXT e Thr⁸OXT ($p < 0,001$).

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

A análise da cauda carboxiterminal de 3 aminoácidos (7-9) evidencia que Val³Pro⁸OXT apresenta valores superiores de RG ($p < 0,001$; Figura 11) aos das demais formas comparadas; a mesma análise, considerando a estrutura cíclica (aminoácidos 1-6), evidencia que a forma sintética Thr⁴OXT apresenta os maiores valores (Figura 12).

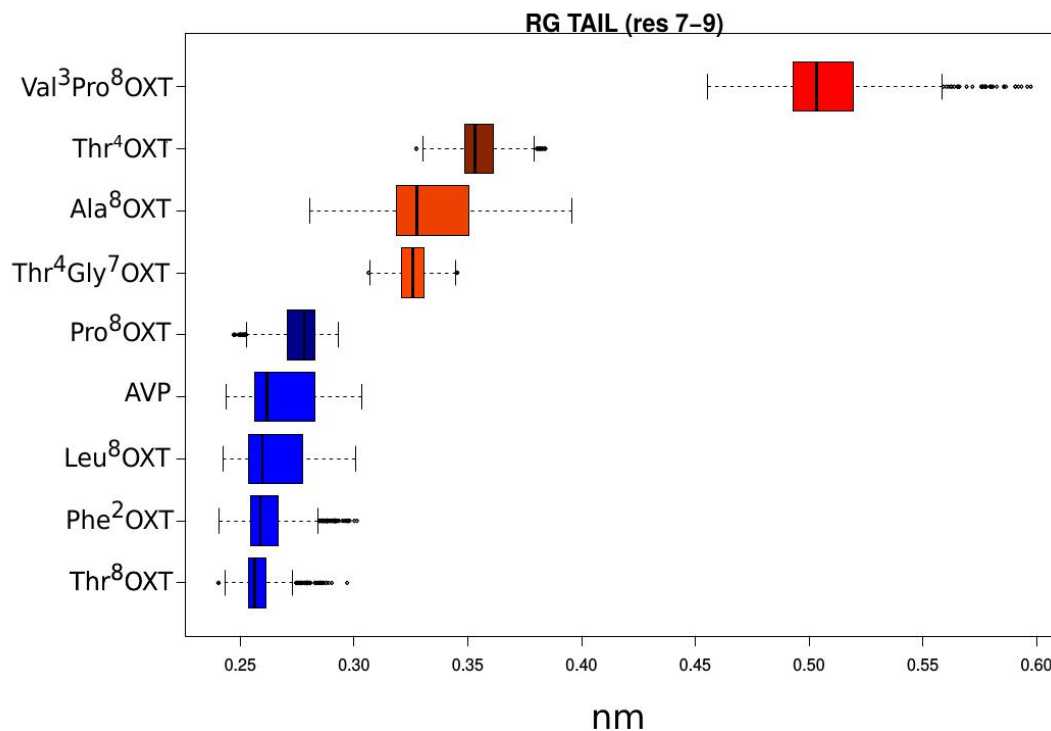


Figura 11. Boxplot dos valores de Raio de Giro da cauda carboxiterminal (aminoácidos 7-9) dos últimos 50 ns da simulação da dinâmica molecular para cada forma de oxitocina e vasopressina. O teste de Dunn identificou 6 grupos significativamente diferentes: 1: Val³Pro⁸OXT; 2: Thr⁴OXT; 3: Ala⁸OXT e Thr⁴Gly⁷OXT; 4: Pro⁸OXT; 5: Leu⁸OXT, AVP e Phe²OXT; e 6: Thr⁸OXT ($p < 0,001$).

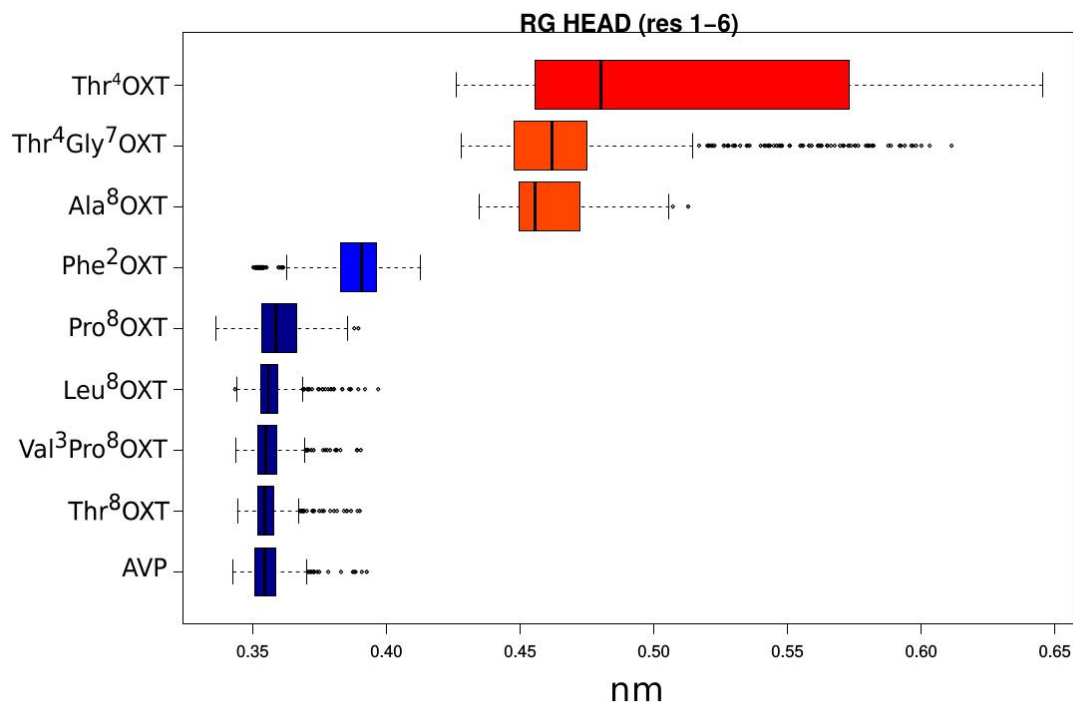


Figura 12. Boxplot dos valores de Raio de Giro da parte cíclica (aminoácidos 1-6) dos últimos 50 ns da simulação da dinâmica molecular para cada forma de oxitocina e vasopressina. O teste de Dunn identificou 4 grupos significativamente diferentes: 1: Thr⁴OXT; 2: Ala⁸OXT e Thr⁴Gly⁷OXT; 3: Phe²OXT; e 4: Leu⁸OXT, AVP, Pro⁸OXT, Val³Pro⁸OXT e Thr⁸OXT ($p < 0,001$).

Análises similares evidenciam que a cauda tripeptídica é mais flexível do que a parte cíclica (Bhaskaran et al. 1992). Isso é evidente para todas as estruturas analisadas, mas especificamente Val³Pro⁸OXT apresenta valores de RG mais elevados, ultrapassando as formas sintéticas. Vale a pena salientar que, a partir do fato, observado em nossa análise, de que a forma Pro⁸OXT apresenta valores similares aos das outras formas analisadas, é possível inferir que a mudança na terceira posição (Ile>Val na parte cíclica) é determinante nos valores elevados da cauda carboxiterminal. Esse resultado é coerente com os resultados que se apresentaram na análise seguinte, na qual foram avaliadas as ligações de hidrogênio dentro das estruturas ao longo da dinâmica.

As ligações de hidrogênio (LH) foram calculadas através do pacote HB em Gromacs. Aqui, pôde-se observar que Val³Pro⁸OXT apresenta o menor número de ligações de hidrogênio (23); Thr⁴OXT, por sua vez, apresenta o maior número (64; Tabela 5). Todos os neuropeptídeos apresentam três LH; o primeiro, entre o carboxilo (CO) da Tirosina (Tyr) 2 e o grupo amino (NH) da Asparagina (Asn) 5; o segundo, entre o grupo NH da Tirosina 2 e o grupo CO da Asn5; o terceiro, entre o grupo NH da Cisteína (Cys)

6 e o CO de Tyr2. Uma ligação também frequente ocorre em todas as formas menos em Val³Pro⁸OXT e Pro⁸OXT: é a que se dá entre o grupo NH da Glicina (Gly) 9 e o grupo CO da (Cys) 6. Curiosamente, como se comentou anteriormente, Val³Pro⁸OXT apresenta os mais valores de RG na parte carboxiterminal, o que poderia corresponder a um menor número de ligações de hidrogênio intermolecular, permitindo uma maior flexibilidade dentro da molécula.

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

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

Esses movimentos diferentes relativos a Val³Pro⁸OXT poderiam representar mudanças na sua afinidade com o ligante e/ou efeitos na cascata de sinalização, incluindo a capacidade de recrutamento de β -arrestinas, como já demonstrado experimentalmente no Capítulo IV.

É conhecido que a isoleucina (Ile) na terceira posição da OXT e a arginina (Arg) na oitava da AVP são determinantes para a ativação do OXTR e dos AVPRs, respectivamente. Sabe-se que as interações dos neuropeptídeos com seus respectivos receptores são determinadas pela polaridade dessas posições (Slusarz et al. 2006a), de modo que é importante estudar as mudanças na polaridade nas OXTs presentes nos pNM. Duas mudanças na polaridade são registradas nas formas naturais; por um lado, nos pitecídios, a treonina (Thr; aminoácido polar) na oitava posição substitui uma leucina (Leu; aminoácido não polar) originando a forma Thr⁸OXT. Por outro lado, a forma presente no gênero *Alouatta*, Phe²OXT, descrita por Ren et al. 2015 (ver mais detalhes no Capítulo VII), apresenta uma fenilalanina (Phe) na segunda posição (não polar), substituindo uma tirosina (aminoácido polar; Figura 3).

A hidrofobicidade ao longo da dinâmica foi também estudada nas diferentes formas de oxitocina. O achado mais interessante é o fato de que Pro⁸OXT e Val³Pro⁸OXT apresentam valores intermediários entre AVP e Leu⁸OXT; as outras formas apresentam valores menores de hidrofobicidade que Leu⁸OXT (Figura 13).

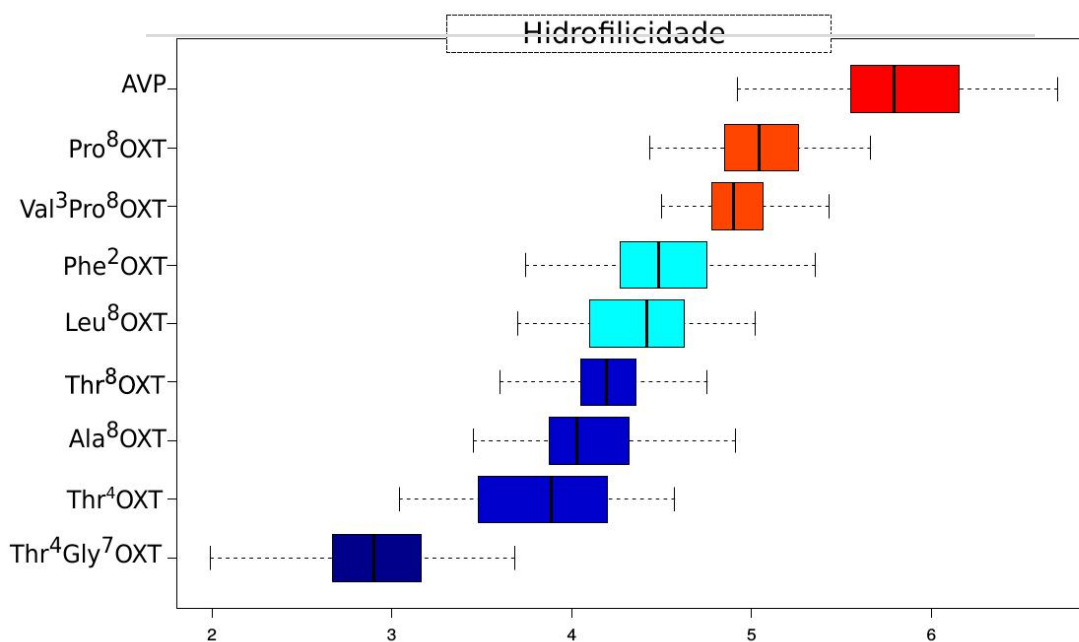


Figura 13. Boxplot dos valores de hidrofilicidade dos últimos 50 ns da simulação da dinâmica molecular para cada forma de oxitocina e vasopressina. O teste de Dunn identificou 5 grupos significativamente diferentes: 1: AVP; 2: Pro⁸OXT e Val³Pro⁸OXT; 3: Phe²OXT; Leu⁸OXT; 4: Thr⁸OXT, Ala⁸OXT e Thr⁴OXT; e 5: Thr⁴Gly⁷OXT ($p < 0,001$).

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

Outro fato que chama a atenção é o de que a maioria de formas descritas apresenta modificações na terceira e oitava posições, o que permitiria pensar, portanto, que tais modificações impactam não só as interações com o receptor nativo, como também as interações com o receptor de vasopressina. Conforme estudo referido no Capítulo IV, pelo menos as variantes Pro⁸OXT e Val³Pro⁸OXT impactam a internalização de AVPR1a.

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

já na forma Val³Pro⁸OXT (na primeira linha, terceira coluna da Figura 14), justamente a posição que apresenta a mudança, Ile³Val, descreve um movimento pronunciado direcionado ao exterior da estrutura.

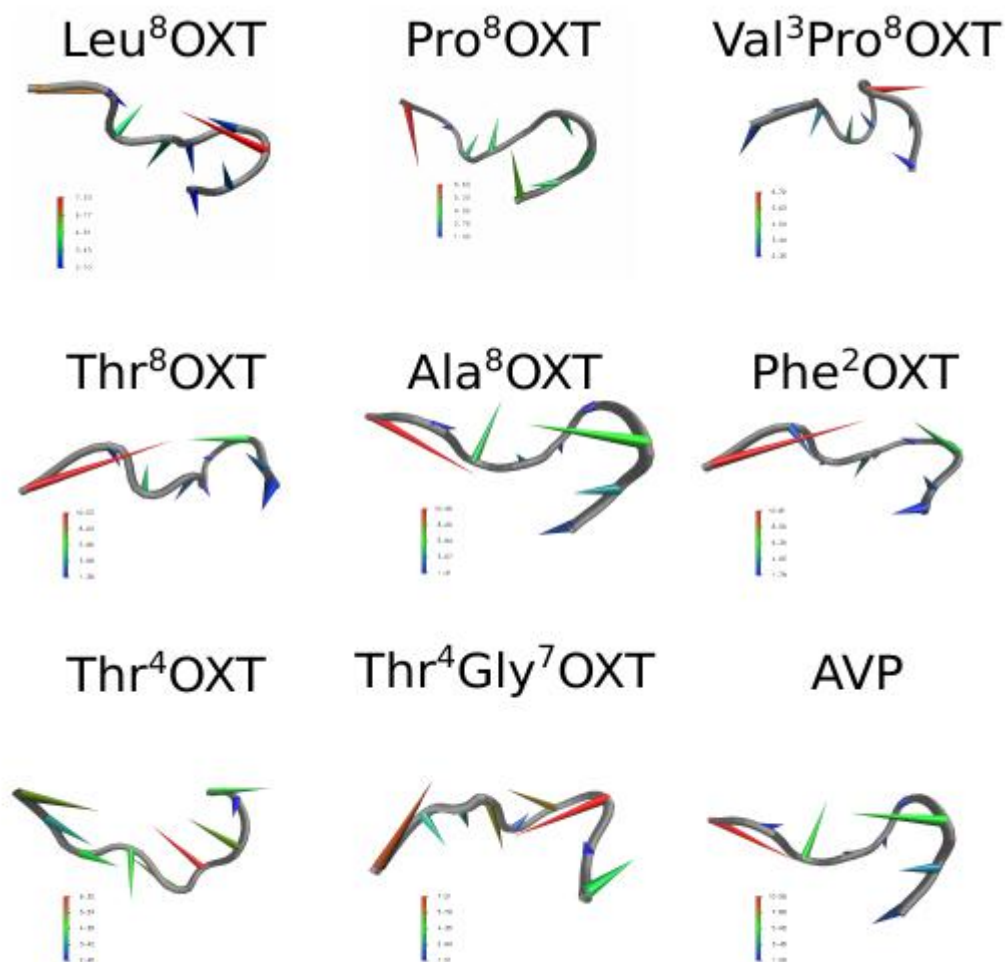


Figura 14. Gráfico de espinhos de formas naturais e sintéticas de OXT e AVP. Cada espinho representa a intensidade e o sentido do movimento do carbono alfa de cada aminoácido: a Cys1, à direita e a Gly9, à esquerda.

Finalmente, dentro das análises realizadas incluiu-se um PCA (Análise de Componentes Principais, na sigla em inglês para *Principal Component Analysis*), que considerou os diferentes parâmetros analisados na dinâmica de todas as formas naturais e sintéticas (Figura 15). No PCA, o que primeiro se evidencia é uma separação entre as formas sintéticas e as naturais; um primeiro *cluster*, formado por Thr⁴OXT e Thr⁴Gly⁷OXT (formas sintéticas) está separado pelo primeiro componente principal (66%) das formas naturais; já o segundo componente principal (18%) separa as formas de oxitocina presentes nos cebídeos, Pro⁸OXT, Val³Pro⁸OXT, das restantes (Leu⁸OXT, Ala⁸OXT, Thr⁸OXT, Phe²OXT e AVP).

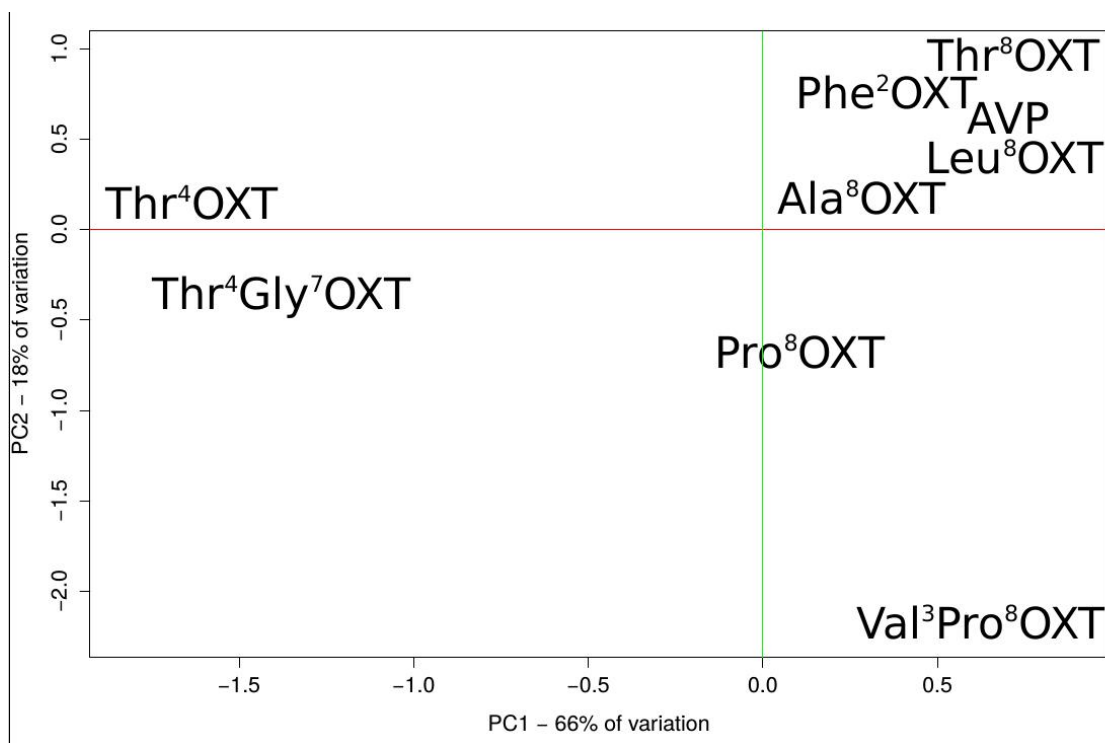


Figura 15. PCA que considera os parâmetros apresentados na Tabela 5 para cada uma das formas naturais e sintéticas de OXT e AVP estudadas.

Vale a pena salientar que as formas que apresentam a prolina na oitava posição (Pro⁸OXT e Val³Pro⁸OXT) possuem uma modificação significativa na estrutura do ligante, pois, devido à limitada flexibilidade da sua cadeia lateral, a prolina impõe limitações na estrutura rotacional do peptídeo. A sequência em tandem de duas prolinas na sétima e oitava posições produz uma hélice de poliprolinas, característica que, por restringir ainda mais a flexibilidade das proteínas, altera significativamente os perfis de interação ligante-membrana celular (Geisler & Chmielewski 2009).

Como um todo, a simulação da dinâmica molecular possibilitou identificar padrões estruturais e de comportamento molecular nas formas naturais de oxitocina; dentro destas, possibilitou, ainda, determinar os elementos que diferenciam a Pro⁸OXT e a Val³Pro⁸OXT. Propriedades como hidrofobicidade ou movimentos do terceiro aminoácido permitem sugerir a hipótese de interações diferenciadas desses hormônios com seus receptores cognatos. Essa informação estrutural, somada aos resultados dos estudos apresentados nos Capítulos anteriores, define de maneira bastante robusta o potencial funcional e evolutivo das variantes presentes nos clados de pNM.

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

CAPÍTULO VII

7.1 Discussão

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

7.1.1 Variantes de OXT-OXTR

Concomitantemente ao desenvolvimento de nossa pesquisa, Ren e colaboradores (2015) publicaram um trabalho que confirmou os achados descritos em nosso estudo (Vargas-Pinilla et al. 2015). Os referidos pesquisadores analisaram um conjunto similar de espécies através de diferentes métodos, e descreveram também mais uma variante de oxitocina, Phe²OXT, em *Alouatta caraya* (família Atelidae). Outro dado interessante foi a descrição dentro dessa família do que parece ser uma convergência com a forma Cebidae Pro⁸OXT, especificamente em *Ateles geoffroyi* e *Ateles belzebuth*. Além disso, na família Pitheciidae, eles também descrevem a forma Thr⁸OXT em *Pithecia pithecia*, que já havia sido descrita para e *Chiropotes albinasus* (Capítulo III; Vargas-Pinilla et al. 2015). Já em *Chiropotes chiropotes*, observaram a forma Ala⁸OXT, forma por nós descrita em *Chiropotes utahickae* e *Cacajao melanocephalus* (Capítulo III; Vargas-Pinilla et al. 2015). Mais recentemente, Campbell e Cortés-Ortiz descrevem uma sétima forma, Val³OXT, presente em *Alouatta seniculus* (Mustoe et al. 2018).

Conclusões similares foram obtidas nos dois trabalhos. A Figura 16 apresenta o resumo gráfico dos achados de ambos os estudos, que quebram de maneira marcante o paradigma de que Leu⁸OXT estaria presente em todos os mamíferos placentários.

Traçando-se um panorama amplo, pode-se dizer que Pitheciidae emergiu há cerca de 23,5 mya (Perelman et al. 2011) e apresenta três formas de oxitocina (Leu⁸OXT, Thr⁸OXT e Ala⁸OXT), sendo que as últimas duas variantes apareceram há pelo menos 14 mya (French et al. 2016).

No ramo dos cebídeos, a mutação que gerou a forma Pro⁸OXT provavelmente aconteceu há ~23 mya, e uma mutação mais recente dos últimos ~11 mya originou a substituição por uma valina na terceira posição no gênero *Saguinus*, criando a forma Val³Pro⁸OXT.

Dentro dos Atelídeos, ao menos três mutações independentes aconteceram: duas no gênero *Alouatta*, há pelo menos 16 mya, produzindo as formas Phe²OXT e Val³OXT; a terceira, há pelo menos 11 mya, gerando, por convergência, a forma Pro⁸OXT no gênero *Ateles* (French et al. 2016).

É provável que o ancestral do pNM expressasse Leu⁸OXT, visto que essa forma é expressa em dois dos três clados do ramo e em todos os catarrinos com sequências disponíveis (French et al. 2016).

Um ponto de divergência nos trabalhos comentados deve-se à forma apresentada no gênero *Saguinus*. Ren et al. (2015) descrevem em *Saguinus midas* a forma Pro⁸OXT; porém, em nosso trabalho (Vargas-Pinilla et al. 2015), como se mencionou anteriormente, é descrita em *S. bicolor*, *S. Martinsi* e *S. niger* a forma Val³Pro⁸OXT. Análises transcriptômicas, por sua vez, realizadas em *S. midas* já indicavam a presença da Val³Pro⁸OXT nessa espécie (George et al. 2011), porém sem qualquer destaque. Desse modo, mais estudos são necessários para confirmar se houve mutação reversa em *S. midas*, o que teria pelo menos parte dos indivíduos dessa espécie perderem a valina na posição 3, tornando esse sítio, pelo menos nessa espécie, variável.

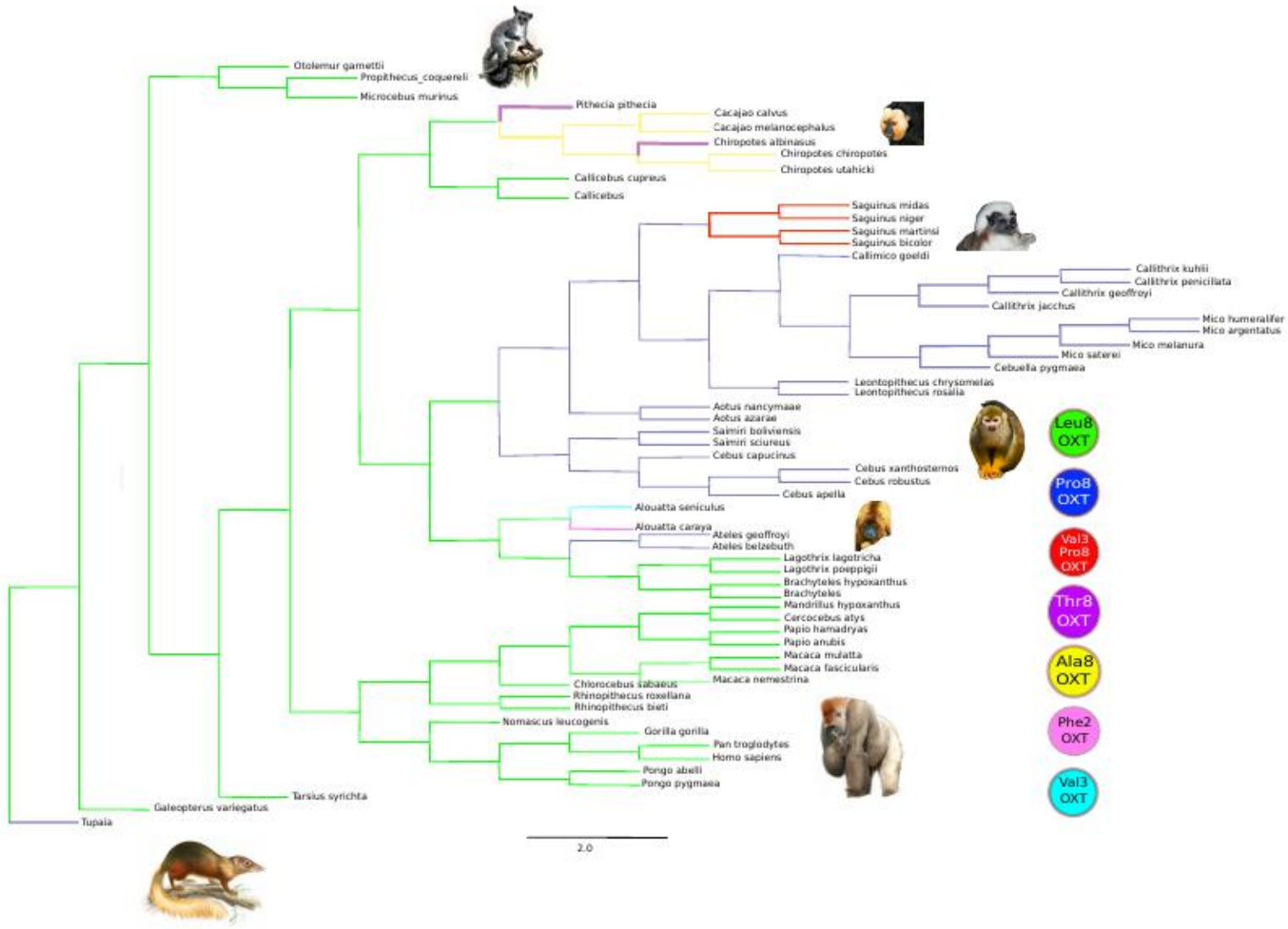


Figura 16. Reconstrução filogenética baseada nos dados de OXT nos primatas, considerando uma árvore consenso de acordo com Perelman et al. (2011).

Ferramentas similares foram utilizadas nos dois artigos para analisar os processos coevolutivos entre o ligante e o receptor. A filogenia de OXTR corresponde em geral à filogenia molecular convencional dos primatas, com uma clara separação dos primatas do Velho Mundo, Novo Mundo e prossímios. Ren et al.(2015) descrevem um processo coevolutivo interessante, no qual a única exceção à filogenia convencional, considerando os dados de *OXTR*, foi o gênero *Ateles*; seu *OXTR* é agrupado junto com os cebídeos, e não com seus congêneres dentro da família Atelidae. Vale a pena salientar que *Ateles* apresenta a mesma forma de OXT que os cebídeos, isto é, Pro⁸OXT.

Ren e colaboradores encontraram ainda clara associação de Pro⁸OXT com monogamia social, um traço reprodutivo comum em espécies de pNM com pequeno tamanho corporal, partos gemelares comuns e que também apresentam cuidado paterno (Vagas-Pinilla et al. 2015). De modo geral, os trabalhos de nosso grupo e de outros autores reforçam a funcionalidade e o valor adaptativo de pelo menos algumas das variantes de OXT em pNM.

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

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

7.1.2 Nível regulatório

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

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

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

Os estudos de expressão realizados em primatas se concentram basicamente em 4 espécies: *Callithrix jacchus*, *Callicebus cupreus*, *Macaca mulatta* e *Homo sapiens*. Na Tabela 6, são apresentadas, de forma resumida, algumas investigação realizadas sobre a distribuição dos receptores no cérebro dessas espécies. A partir dessa informação, pode-se dizer que *Callithrix* e *Callicebus*, embora apresentem estruturas sociais similares, sendo monogâmicos e apresentando cuidado biparental, mostram diferenças marcantes nos padrões de expressão de OXTR e AVPR1a. Isso evidencia que diferentes repertórios genéticos foram cooptados evolutivamente, resultando em fenótipos comportamentais adaptativos similares, o que é demonstrado também pelo fato de *Callithrix* possuir a forma Pro⁸OXT e *Callicebus* a forma Leu⁸OXT, sendo que ambos os gêneros apresentam um número alto de PREs (em *Callithrix*: 5, e em *Callicebus*: 4).

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

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

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

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

7.1.3 Comportamento

Alguns dos principais trabalhos relacionando os neuropeptídeos com comportamentos sociais em primatas, tal como comportamento sócio-sexual, proximidade, limpeza da pele (*grooming*), partilha dos alimentos, entre outros, encontram-se resumidos na Tabela 7. Note-se que na compilação aí apresentada, *Saguinus* foi considerado um gênero que expressa Pro⁸OXT, o que não foi corroborado por nosso estudo (ver discussão no item “7.1.1 Variantes de OXT-OXTR” da presente sessão), de modo que os achados presentes na Tabela 7, no que diz respeito a este gênero, devem ser considerados com cautela.

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

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

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

OXTant: antagonista de OXT. OXT-peri: Concentrações periféricas de OXT. AVPR1aAnt: Antagonista de AVPR1a. a: Smith (Smith et al. 2010) et al (2010); b: Cavanaugh (Cavanaugh et al. 2014) et al (2014). c: Cavanaugh et al (Mustoe et al. 2015) (2015). d: Finkenwirth (Finkenwirth et al. 2015) et al (2015). e: Snowdon (Snowdon et al. 2010) et al (2010). f: Brosnan (Leverett et al. 2015) et al (2015). g: Jarcho et al (Jarcho et al. 2011) (2011). h: Cavanaugh et al (Cavanaugh et al. 2016) (2016) i: Taylor & French (Taylor & French 2015) (2015). j: Saito & Nakamura (Saito & Nakamura 2011) (2011). k: Mustoe et al (Mustoe et al. 2015) (2015). l: Mustoe et al (Mustoe et al. 2016) (2016). m: Taylor, et al (Taylor et al. 2017) (2017). Tomado e modificado de French et al. (2016). Seta para cima (↑) indica aumento do comportamento social; seta para baixo (↓), diminuição do comportamento social; o número 0 (zero) indica nenhuma alteração significativa no comportamento social. Por exemplo, na primeira linha, em *Callithrix*, a administração de Leu⁸OXT aumentou o comportamento de agregação, enquanto que tal comportamento é reduzido na presença de um antagonista de OXT.

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

Embora tenha sido descrita a associação entre as formas de OXT e a presença de monogamia social, cuidado paterno e tamanho de ninhada (Vargas-Pinilla et al. 2015; Ren et al. 2015), deve-se considerar que esta não é uma associação completa. Por exemplo, *Callicebus* é um gênero com espécies consideradas socialmente monógamas, com cuidado paterno, que expressam Leu⁸OXT, enquanto *Saimiri* é um gênero com espécies polígamas e sem cuidado paterno, que expressam Pro⁸OXT. Mais uma vez, nota-se que diferentes repertórios genéticos foram cooptados evolutivamente para a emergência de fenótipos comportamentais adaptativos que variam de acordo com as pressões ecológicas e ambientais impostas.

Além disso, o comportamento cuidador nos machos também é afetado pela Leu⁸OXT, dado que aumenta o comportamento de provedor de alimentos nos machos do *Callithrix* (Saito & Nakamura 2011) e incrementa as respostas destes aos estímulos dos infantes (Taylor & French 2015). Em humanos, a Leu⁸OXT aumenta o contato paterno e o contato visual pai-filho (Weisman et al. 2012).

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

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

Conforme trabalho referido no Capítulo IV (Parreiras-e-Silva et al. 2017), as formas *Cebidae Pro⁸OXT* e *Saguinus Val³Pro⁸OXT* induzem comportamento afiliativo em rato machos, indicando a capacidade dessas variantes de alterar comportamentos em espécies diferentes daquelas em que são encontradas de maneira endógena.

Além disso, utilizamos nos experimentos farmacológicos (Parreiras-e-Silva et al. 2017) receptores OXT e AVPR1a humanos, o que levanta a pergunta: O efeito das variantes *Cebidae Pro⁸OXT* e *Saguinus Val³Pro⁸OXT* seria ainda mais diferenciado diante dos receptores táxon-específicos presentes nesses clados de primatas? A resposta a essa pergunta já está sendo por nós investigada (dados não publicados), bem como por outros autores. Por exemplo, Mustoe e colaboradores (2018) reportam que estão trabalhando na definição do perfil farmacológico, considerando a variante *Pro⁸OXT* e o receptor OXTR de *Callithrix jacchus*.

Cabe ainda salientar o destaque dado por Mustoe e colaboradores (2018) aos nossos estudos (Capítulo IV; Parreiras-e-Silva et al. 2017), que mostraram, pela primeira vez, como as variantes *Cebidae Pro⁸OXT* e *Saguinus Val³Pro⁸OXT* produzem efeitos diferenciais na dessensibilização e internalização do OXTR e AVPR1a.

7.2.1 Sistema AVP e algumas particularidades em pNM

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

7.2.2 AVPR1a e alguns achados em pNM

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

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

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

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

7.2.3 AVPR1b e alguns achados em pNM

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

Na posição 98 do AVPR1b, todos os Cebidae e Atelidae portam uma fenilalanina, enquanto uma tirosina é encontrada na família Pitheciidae (Tabela 8), assim como no resto dos mamíferos. Na posição homóloga no OXTR (posição 103), assim como a maioria dos mamíferos, os Cebidae também carregam uma fenilalanina, com exceção de *Saimiri* e *Aotus*, ambos portadores de tirosina (Babb et al. 2015; Vargas-Pinilla et al. 2015). Na posição homóloga no AVPR1a (posição 115), uma tirosina é encontrada na maioria dos mamíferos (Vargas-Pinilla et al. 2015; French et al. 2016). Esta região nos três receptores é conhecida por interagir com a posição 8 do nonapeptídeo, que apresenta uma prolina (Pro⁸OXT) na família Cebidae (Tabela 8).

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

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

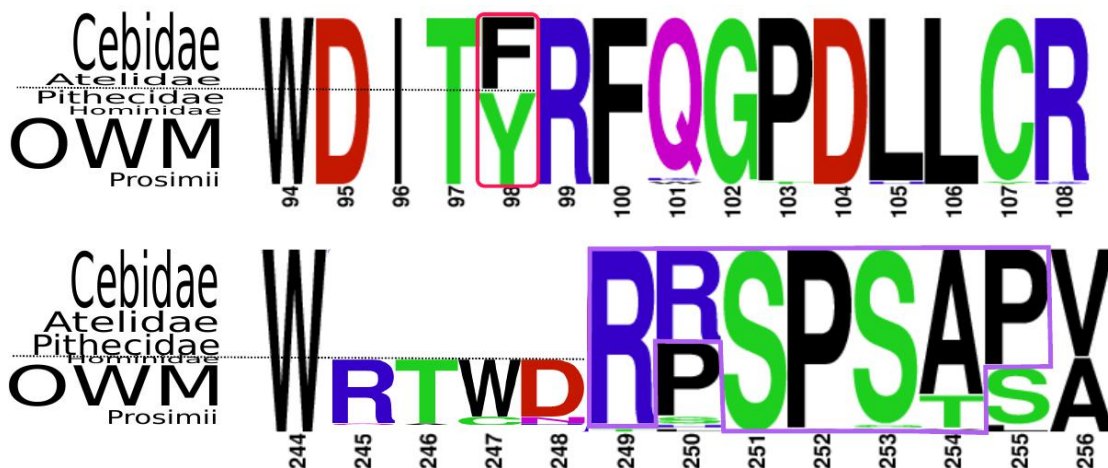


Figura 17. Weblogo ilustrando o múltiplo alinhamento da região extracelular (EC1; 94-108) e da região intracelular 3 (IC3; 244-256) de AVPR1b. Em EC1, a caixa vermelha salienta mutação Tyr98Phe presente nas famílias Cebidae e Atelidae. Em IC3, o espaço em branco representa a deleção presente nos pNM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

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

7.3 Questionamentos adicionais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

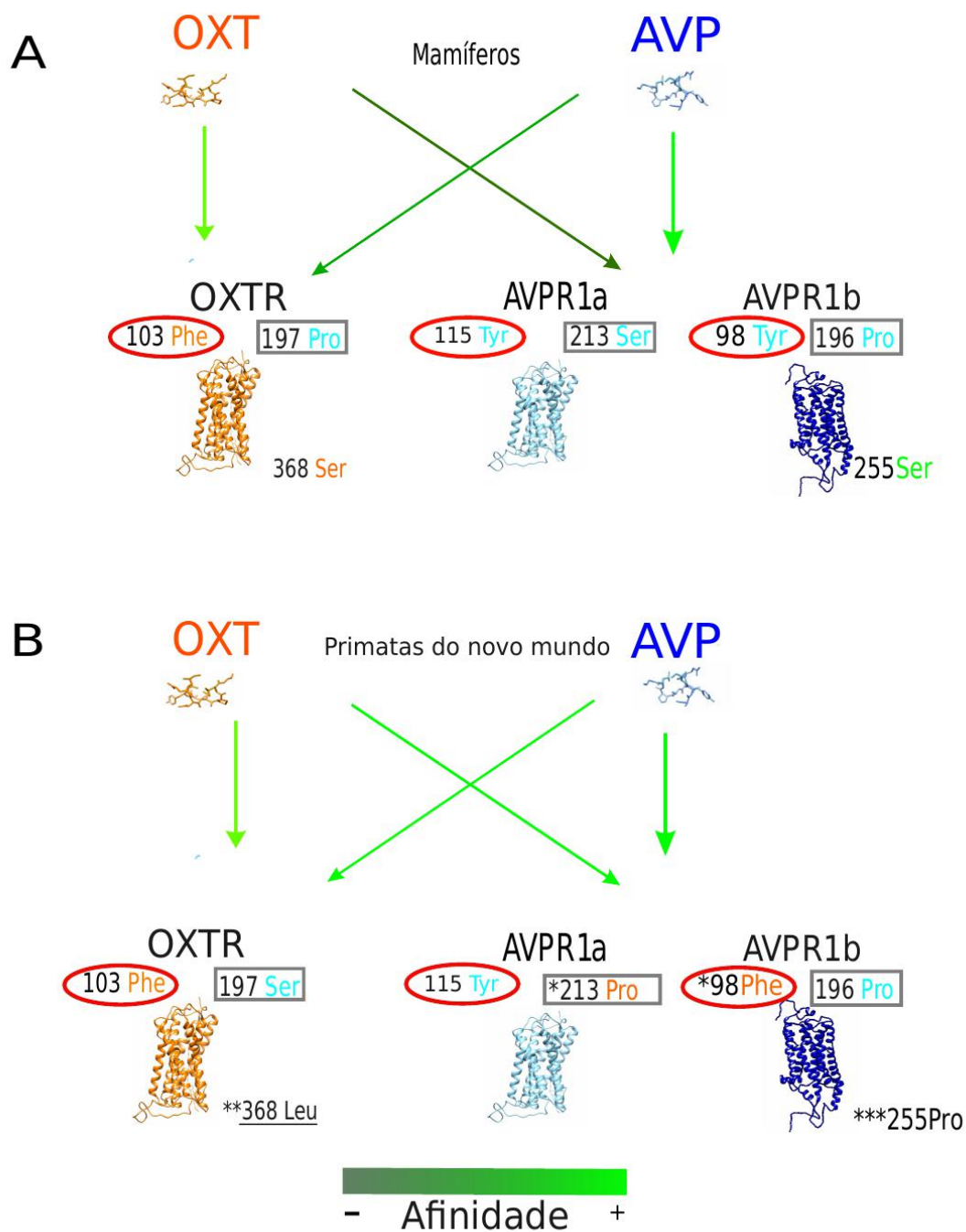


Figura 18. Representação esquemática das principais mudanças que se apresentam no sistema OXT-AVP. A. Aminoácidos que estão conservados na maioria dos mamíferos estudados até hoje. B. Mudanças nos primatas do Novo Mundo ou ramos específicos dentro desse grupo. * Mudança que pode afetar a afinidade com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

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

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

CAPÍTULO VIII

8.1 Considerações Finais

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

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

REFERÊNCIAS

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

- fascicularis*. J Comp Neurol 287:302–325. doi: 10.1002/cne.902870304
- Caldwell HK, Wersinger SR and Young WS (2008) The role of the vasopressin 1b receptor in aggression and other social behaviours. Prog Brain Res 170:65–72. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00406-8
- Cao W, Luttrell LM, Medvedev A V., Pierce KL, Daniel KW, Dixon TM, Lefkowitz RJ and Collins S (2000) Direct Binding of Activated c-Src to the β_3 -Adrenergic Receptor Is Required for MAP Kinase Activation. J Biol Chem 275:38131–38134. doi: 10.1074/jbc.C000592200
- Cavanaugh J, Carp SB, Rock CM and French JA (2016) Oxytocin modulates behavioral and physiological responses to a stressor in marmoset monkeys. Psychoneuroendocrinology 66:22–30. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.12.027
- Cavanaugh J, Mustoe AC, Taylor JH and French JA (2014) Oxytocin facilitates fidelity in well-established marmoset pairs by reducing sociosexual behavior toward opposite-sex strangers. Psychoneuroendocrinology 49C:1–10. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.06.020
- Chini B, Mouillac B, Ala Y, Balestre MN, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Elands J, Hibert M, Manning M and Jard S (1995) Tyr115 is the key residue for determining agonist selectivity in the V1a vasopressin receptor. EMBO J 14:2176–2182.
- Chini B, Mouillac B, Balestre M-NN, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Hibert M, Andriolo M, Pupier S, Jard S and Barberis C (1996) Two aromatic residues regulate the response of the human oxytocin receptor to the partial agonist arginine vasopressin. FEBS Lett 397:201–206. doi: S0014-5793(96)01135-0 [pii]
- Corrêa HKM, Coutinho PEG and Ferrari SF (2000) Between - year differences in the feeding ecology of highland marmosets (*Callithrix aurita* and *Callithrix flaviceps*) in south - eastern Brazil. J Zool 252:421–427. doi: 10.1111/J.1469-7998.2000.TB01224.X
- Defler TR, Nash SD, Landazábal Mendoza C, Nieto Díaz M, Rodríguez-Mahecha JV and Conservation International. (2003) Primates de Colombia. Conservación Internacional Colombia
- Digby L, F Ferrari S and Saltzman W (2010) Callitrichines: The Role of Competition in Cooperatively Breeding Species.
- Donaldson ZR and Young LJ (2008) Oxytocin, vasopressin, and the

neurogenetics of sociality. *Science* (80-) 322:900–904. doi: 322/5903/900 [pii] 10.1126/science.1158668

Ebstein RP, Knafo A, Mankuta D, Chew SH and Lai PS (2012) The contributions of oxytocin and vasopressin pathway genes to human behavior. *Horm Behav* 61:359–379. doi: 10.1016/j.yhbeh.2011.12.014

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

Submitted:

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

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

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

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

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

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

Fleagle JG (2013) *Primate Adaptation and Evolution: 3rd Edn.* Academic Press
 Fliers E, Guldenaar SE, van de Wal N and Swaab DF (1986) Extrahypothalamic vasopressin and oxytocin in the human brain; presence of vasopressin cells in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 375:363–7.

Fliers E, Swaab DF, Pool CW and Verwer RW (1985) The vasopressin and oxytocin neurons in the human supraoptic and paraventricular nucleus; changes

with aging and in senile dementia. *Brain Res* 342:45–53.

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

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

Gainer H, Fields RL and House SB (2001) Vasopressin gene expression: experimental models and strategies. *Exp Neurol* 171:190–199. doi: S0014-4886(01)97769-6 [pii] 10.1006/exnr.2001.7769

Geisler I and Chmielewski J (2009) Cationic Amphiphilic Polyproline Helices: Side-Chain Variations and Cell-Specific Internalization. *Chem Biol Drug Des* 73:39–45. doi: 10.1111/j.1747-0285.2008.00759.x

George RD, McVicker G, Diederich R, Ng SB, MacKenzie AP, Swanson WJ, Shendure J and Thomas JH (2011) Trans genomic capture and sequencing of primate exomes reveals new targets of positive selection. *Genome Res* 21:1686–1694. doi: 10.1101/gr.121327.111

Gimpl G and Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81:629–683.

Gimpl G, Fahrenholz F and Gene C (2001) The Oxytocin Receptor System : Structure , Function , and Regulation. *Physiol Rev* 81:629–683.

Glebo TJ, Farrell DW, Gerek ZN, Thorpe MF and Ozkan SB (2012) Collective dynamics differentiates functional divergence in protein evolution. *PLoS Comput Biol* 8:e1002428. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002428

Goodman M, Porter C a, Czelusniak J, Page SL, Schneider H, Shoshani J, Gunnell G and Groves CP (1998) Toward a phylogenetic classification of Primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. *Mol Phylogenet Evol* 9:585–598. doi: 10.1006/mpev.1998.0495

Gruber CW and Muttenthaler M (2012) Discovery of defense- and neuropeptides in social ants by genome-mining. *PLoS One* 7:1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0032559

Grueter CC, Chapais B and Zinner D (2012) Evolution of Multilevel Social Systems in Nonhuman Primates and Humans. *Int J Primatol* 33:1002–1037. doi: 10.1007/s10764-012-9618-z

- Hoyle CH (1998) Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Regul Pept* 73:1–33. doi: S0167011597010732 [pii]
- Hrdy SB (2010) Mothers and others : the evolutionary origins of mutual understanding.
- Insel TR (2010) The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. *Neuron* 65:768–779. doi: 10.1016/j.neuron.2010.03.005
- Ishunina TA and Swaab DF (1999) Vasopressin and Oxytocin Neurons of the Human Supraoptic and Paraventricular Nucleus; Size Changes in Relation to Age and Sex. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4637–4644. doi: 10.1210/jcem.84.12.6187
- Jarcho MR, Mendoza SP, Mason WA, Yang X and Bales KL (2011) Intranasal vasopressin affects pair bonding and peripheral gene expression in male *Callicebus cupreus*. *Genes, Brain Behav* 10:375–383. doi: 10.1111/j.1601-183X.2010.00677.x
- Kappeler PM and Van Schaik CP (2002) Evolution of primate social systems. *Int J Primatol* 23:707–740. doi: 10.1023/A:1015520830318
- Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ and Okayama H (1992) Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356:526–529. doi: 10.1038/356526a0
- Kleiman DG and Malcolm JR (1981) The Evolution of Male Parental Investment in Mammals. *Parental Care in Mammals*. Springer US, Boston, MA, pp 347–387
- Koshimizu TA, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H and Tanoue A (2012) Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev* 92:1813–1864. doi: 10.1152/physrev.00035.2011
- Kowalewski M, Urbani B, Tejedor M and Oklander L (2016) Explorando al orden primates: La primatología como disciplina Bioantropológica.
- Kozorovitskiy Y, Hughes M, Lee K and Gould E (2006) Fatherhood affects dendritic spines and vasopressin V1a receptors in the primate prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 9:1094–1095. doi: 10.1038/nn1753
- Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH and Young WS (2009) Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol* 88:127–151. doi: S0301-0082(09)00046-X [pii] 10.1016/j.pneurobio.2009.04.001

Leverett K, Heyler C, Flemming T, Talbot CF, Zak PJ, Essler JL, Dougall P and Brosnan SF (2015) Oxytocin reduces food sharing in capuchin monkeys by modulating social distance. *Behaviour* 152:941–961. doi: 10.1163/1568539X-00003268

Lima MGM, Silva-Júnior J de S e, Černý D, Buckner JC, Aleixo A, Chang J, Zheng J, Alfaro ME, Martins A, Di Fiore A et al. (2018) A phylogenomic perspective on the robust capuchin monkey (*Sapajus*) radiation: First evidence for extensive population admixture across South America. *Mol Phylogenet Evol* 124:137–150. doi: 10.1016/j.ympev.2018.02.023

Loup F, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Pizzolato G and Dreifuss JJ (1989) Localization of oxytocin binding sites in the human brainstem and upper spinal cord: an autoradiographic study. *Brain Res* 500:223–30.

Lowbridge J, Manning M, Haldar J and Sawyer WH (1977) Synthesis and some pharmacological properties of [4-threonine, 7-glycine]oxytocin, [1-(L-2-hydroxy-3-mercaptopropanoic acid), 4-threonine, 7-glycine]oxytocin (hydroxy[Thr4, Gly7]oxytocin), and [7-Glycine]oxytocin, peptides with high oxytocic-antidiuretic . *J Med Chem* 20:120–123.

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

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

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

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

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

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

10.1111/1749-4877.12318

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

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

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

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

Norconk MA and Kinzey WG (1994) Challenge of neotropical frugivory: Travel patterns of spider monkeys and bearded sakis. *Am J Primatol* 34:171–183. doi: 10.1002/ajp.1350340208

Norconk MA and Veres M (2011) Physical Properties of Fruit and Seeds Ingested by Primate Seed Predators with Emphasis on Sakis and Bearded Sakis. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol* 294:2092–2111. doi: 10.1002/ar.21506

Oldenhof J, Vickery R, Anafi M, Oak J, Ray A, Schoots O, Pawson T, von Zastrow M and Van Tol HH (1998) SH3 binding domains in the dopamine D4 receptor. *Biochemistry* 37:15726–36. doi: 10.1021/bi981634+

Parreiras-e-Silva LT, Vargas-Pinilla P, Duarte DA, Longo D, Espinoza Pardo GV, Dulor Finkler A, Paixão-Côrtés VR, Paré P, Rovaris DL, Oliveira EB et al. (2017) Functional New World monkey oxytocin forms elicit an altered signaling profile and promotes parental care in rats. *Proc Natl Acad Sci* 114:9044–9049. doi: 10.1073/pnas.1711687114

Perelman P, Johnson WE, Roos C, Seuánez HN, Horvath JE, Moreira MA, Kessing B, Pontius J, Roelke M, Rumpler Y et al. (2011) A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 7:e1001342. doi: 10.1371/journal.pgen.1001342

Ren D, Chin KR and French JA (2014) Molecular Variation in AVP and AVPR1a in New World Monkeys (Primates, Platyrrhini): Evolution and Implications for

- Social Monogamy. PLoS One 9:e111638. doi: 10.1371/journal.pone.0111638
- Ren D, Lu G, Moriyama H, Mustoe AC, Harrison EB and French JA (2015) Genetic diversity in oxytocin ligands and receptors in New World monkeys. PLoS One 10:e0125775. doi: 10.1371/journal.pone.0125775
- Rodrigo J, Pena A, Murat B, Trueba M, Durroux T, Guillon G and Rognan D (2007) Mapping the Binding Site of Arginine Vasopressin to V_{1a} and V_{1b} Vasopressin Receptors. Mol Endocrinol 21:512–523. doi: 10.1210/me.2006-0202
- Royle NJ, Smiseth PT and Kölliker M (2012) The evolution of parental care. Oxford University Press
- Rylands AB (1993) Marmosets and tamarins : systematics, behaviour, and ecology. Oxford University Press
- Rylands AB and Anzenberger G (2012) Introduction: New World Primates. Int Zoo Yearb 46:4–10. doi: 10.1111/j.1748-1090.2012.00182.x
- Saito A and Nakamura K (2011) Oxytocin changes primate paternal tolerance to offspring in food transfer. J Comp Physiol A 197:329–337. doi: 10.1007/s00359-010-0617-2
- Saltzman W and Maestriperi D (2011) The neuroendocrinology of primate maternal behavior. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 35:1192–1204. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.09.017
- Schneider H (2000) The current status of the New World monkey phylogeny. An Acad Bras Cienc 72:165–172.
- Siehl S and Milligan G (2011) G protein-coupled receptors : structure, signaling, and physiology. Cambridge University Press
- Slusarz MJ, Giełdoń A, Slusarz R and Ciarkowski J (2006a) Analysis of interactions responsible for vasopressin binding to human neurohypophyseal hormone receptors-molecular dynamics study of the activated receptor-vasopressin-G(alpha) systems. J Pept Sci 12:180–189. doi: 10.1002/psc.714
- Slusarz MJ, Slusarz R and Ciarkowski J (2006b) Molecular dynamics simulation of human neurohypophyseal hormone receptors complexed with oxytocin-modeling of an activated state. J Pept Sci 12:171–179. doi: 10.1002/psc.713
- Smith AS, Ågmo A, Birnie AK and French JA (2010) Manipulation of the oxytocin system alters social behavior and attraction in pair-bonding primates,

- Callithrix penicillata. *Horm Behav* 57:255–262. doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.12.004
- Snowdon CT, Pieper BA, Boe CY, Cronin KA, Kurian A V and Ziegler TE (2010) Variation in oxytocin is related to variation in affiliative behavior in monogamous, pairbonded tamarins. *Horm Behav* 58:614–618. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.06.014
- Storey AE and Ziegler TE (2016) Primate paternal care: Interactions between biology and social experience. *Horm Behav* 77:260–271. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.07.024
- Sussman RW, Garber PA and Cheverud JM (2005) Importance of cooperation and affiliation in the evolution of primate sociality. *Am J Phys Anthropol* 128:84–97. doi: 10.1002/ajpa.20196
- Symington MM (1990) Fission-fusion social organization in *Ateles* and *Pan*. *Int J Primatol* 11:47–61. doi: 10.1007/BF02193695
- Tavaré S, Marshall CR, Will O, Soligo C and Martin RD (2002) Using the fossil record to estimate the age of the last common ancestor of extant primates. *Nature* 416:726–729. doi: 10.1038/416726a
- Taylor JH and French JA (2015) Oxytocin and vasopressin enhance responsiveness to infant stimuli in adult marmosets. *Horm Behav* 75:154–159. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.10.002
- Taylor JH, Intorre AA and French JA (2017) Vasopressin and Oxytocin Reduce Food Sharing Behavior in Male, but Not Female Marmosets in Family Groups. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:181. doi: 10.3389/fendo.2017.00181
- Tessmar-Raible K, Raible F, Christodoulou F, Guy K, Rembold M, Hausen H and Arendt D (2007) Conserved sensory-neurosecretory cell types in annelid and fish forebrain: insights into hypothalamus evolution. *Cell* 129:1389–1400. doi: S0092-8674(07)00605-8 [pii] 10.1016/j.cell.2007.04.041
- Vargas-Pinilla P, Paixão-Côrtes VR, Paré P, Tovo-Rodrigues L, Vieira CM, Xavier A, Comas D, Pissinatti A, Sinigaglia M, Rigo MM et al. (2015) Evolutionary pattern in the OXT-OXTR system in primates: coevolution and positive selection footprints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:88–93. doi: 10.1073/pnas.1419399112
- Wang Z, Moody K, Newman JD and Insel TR (1997a) Vasopressin and oxytocin immunoreactive neurons and fibers in the forebrain of male and female

- common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Synapse* 27:14–25. doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(199709)27:1<14::AID-SYN2>3.0.CO;2-G
- Wang Z, Toloczko D, Young LJ, Moody K, Newman JD and Insel TR (1997b) Vasopressin in the forebrain of common marmosets (*Callithrix jacchus*): studies with in situ hybridization, immunocytochemistry and receptor autoradiography. *Brain Res* 768:147–56.
- Weisman O, Zagoory-Sharon O and Feldman R (2012) Oxytocin Administration to Parent Enhances Infant Physiological and Behavioral Readiness for Social Engagement. *Biol Psychiatry* 72:982–989. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.06.011
- Wesley VJ, Hawtin SR, Howard HC and Wheatley M (2002) Agonist-specific, high-affinity binding epitopes are contributed by an arginine in the N-terminus of the human oxytocin receptor. *Biochemistry* 41:5086–5092. doi: bi015990v [pii]
- Woller MJ, Sosa ME, Chiang Y, Prudom SL, Keelty P, Moore JE and Ziegler TE (2012) Differential hypothalamic secretion of neurocrines in male common marmosets: parental experience effects? *J Neuroendocrinol* 24:413–21. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02252.x
- Wright PC (1990) Patterns of paternal care in primates. *Int J Primatol* 11:89–102. doi: 10.1007/bf02192783
- Wynne-Edwards KE and Reburn CJ (2000) Behavioral endocrinology of mammalian fatherhood. *Trends Ecol Evol* 15:464–468.
- Yedvabny E, Nerenberg PS, So C and Head-Gordon T (2015) Disordered structural ensembles of vasopressin and oxytocin and their mutants. *J Phys Chem B* 119:896–905. doi: 10.1021/jp505902m
- Young LJ (1999) Frank A. Beach Award. Oxytocin and vasopressin receptors and species-typical social behaviors. *Horm Behav* 36:212–221. doi: S0018506X99915489 [pii] 10.1006/hbeh.1999.1548
- Zingg HH and Laporte SA (2003) The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab* 14:222–227. doi: S1043276003000808 [pii]