

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Contribuição genética para o comportamento:
De eucariotos unicelulares aos humanos modernos**

LUCAS HENRIQUES VISCARDI

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

ORIENTADOR: PROFA.DRA. MARIA CÁTIRA BORTOLINI

PORTO ALEGRE, MAIO DE 2018

Instituições Financiadoras

A presente tese de Doutorado foi desenvolvida nos seguintes laboratórios:

- I. Laboratório de Genética Humana e Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- II. Instituto Metrópole Digital, Universidade Federal do Rio Grande do Norte
- III. *Department of System Biology, Columbia University*
- IV. *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät of the Eberhard Karls Universität Tübingen*
- V. O financiamento foi subsidiado por recursos do PPGBM e a bolsa de doutorado concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

Organização da Tese

A presente Tese de Doutorado está estruturada pelos seguintes itens:

- I. Na Seção I (Primeira Parte) há uma Introdução geral (Capítulo 1) em evolução humana, considerando a história natural da linhagem dos hominíneos. Além disso, a Seção I apresenta no Capítulo 2 a Justificativa e Objetivos da presente Tese de Doutorado.
- II. O núcleo da Tese, Seção II (Segunda Parte) é formado pelos Capítulos 3 a 6, que apresentam trabalhos já submetidos a publicação ou ainda em construção, obtidos ao longo dos três anos e dois meses de Doutorado.
- III. A Seção III (Terceira Parte) é então constituída por uma conclusão e perspectivas (Capítulo 7), seguidamente acompanhada de uma lista de outras produções científicas que ocorreram ao longo do Doutorado (capítulo *Anexos*).

*“A vida é uma peça de teatro que não
permite ensaios. Por isso, cante, chore,
dance, ria e viva intensamente, antes
que a cortina se feche e a peça termine
sem aplausos.”*

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço imensamente aos cidadãos brasileiros que contribuíram com seus impostos para que fosse possível a manutenção do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a UFRGS, que por fim financiou, assim como muitas outras, a elaboração da presente Tese de Doutorado. Sem o apoio de todos os contribuintes, é impossível construir/imaginar um cenário melhor para o futuro Brasileiro e seguir avançando, cada dia mais, rumo à uma nação mais justa e consciente.

Agradeço perante o sentimento mais puro à minha amada mãe, sem o qual nada disso seria possível. Desde o meu nascimento até os dias de hoje sou parte dela e a ela devo tudo. Espero algum dia retribuir todo carinho, conselho e investimento que me fora feito – se possível, com juros. Conjuntamente, agradeço ao meu padrasto por ter sido uma excelente companhia para com minha mãe, e uma influência no meu dia a dia e durante minha formação como pessoa. Com certeza, parte do que sou também muito devo a ele.

Ao meu querido sócio Édio Salton que me ensina cada dia mais os passos para uma gestão de sucesso e de grandes conquistas; sempre acompanhado de muito bom-humor!

Dentro do ambiente profissional acadêmico, agradeço, primeiramente, à minha orientadora, professora Maria Cátira Bortolini, por ter me acompanhado desde dezembro de 2010 até atualmente. Seu apoio e companhia sempre foram inestimáveis ao longo de todo esse caminho, acompanhado sempre de ótimas histórias e conselhos para compartilhar; mesmo nos momentos mais difíceis. Com certeza, um exemplo de amiga, profissional e que poderia ter sido uma excelente política!

Agradeço ao professor Salzano por ser um exemplo de disposição, sapiência e humildade, estando sempre disponível a tudo que lhe seja requerido; com um sorriso no rosto e sempre bem-humorado. A ciência, com certeza, precisa muito de profissionais como o senhor.

Agradeço duas grandes amigas, Vanessa Rodrigues Paixão-Côrtes e Luciana Tovo Rodrigues, que, apesar de distante há muito tempo, nunca vou esquecer por terem me direcionado por muitos anos na carreira de futuro pesquisador, bem como por todo carinho e apoio que me deram nessa trajetória.

Ao professor Thales Freitas por me abrir as portas para trabalhar com golfinhos e primatas, permitindo com que fosse criado um projeto que, com certeza, dará belos frutos. Ainda aos seus alunos Lilian Sanders, Leonardo Leinnitz, Rodrigo Fornel e William Peçanha que sempre foram grandes amigos e me ajudaram muito.

Um carinho especial aos três grandes profissionais e amigos, no qual foram essenciais na minha formação, especialmente durante o doutorado: André Strauss, Carlos Eduardo Guerra Amorim, e Rodrigo Juliani Siqueira Dalmolin. Em todos os sentidos eu lhes sou muito grato e não tenho palavras para retribuir pelas oportunidades que vocês me permitiram. Os artigos aqui escritos e os que estão por vir só foi possível pela paciência e conhecimento que vocês me passaram.

Ao professor Eduardo Ottoni e ao Tiago Falótico que permitiram iniciar uma colaboração que já trouxe resultados excelentes e muito animadores sobre evolução comportamental dos primatas. Espero poder contribuir ao máximo para que possamos dar continuidade a esse projeto sensacional.

Aos meus colegas de laboratório (LEHM), nos quais dividimos angústias e conquistas

ao longo de todos esses anos, talvez alguns mais recentemente: Aline, Álvaro, Bruna, Danae, Pamela, Pedro, Guillermo, Vinícius; e muito especialmente a tríade que me aguentou em momentos muito difíceis mesmo: Rafael, Bibiana e Vanessa (e Michita); o dia sempre foi mais suportável depois de uma conversa com vocês, muito obrigado por tudo!

Ao querido e amado por todos Elmo, sempre disposto a ajudar e tornar as tarefas do burocráticas mais simples.

Ao professor Claiton Henrique Dotto Bau, por me permitir andentrar no ramo da pesquisa da genética e psiquiatria e seu então aluno Diego Rovaris, por auxiliar durante esse momento de aprendizado.

À banca examinadora: Professores Eduardo Tarazona Santos, Eugênio Grevet e Nelson Fagundes por reservar seu precioso tempo e disposição para avaliar a presente Tese de Doutorado.

A minha querida professora Sídia! Muito obrigado pelas conversas, auxílio, carinho e apoio em absolutamente tudo. A senhora sempre vai ser lembrada com muito carinho, mesmo eu não estando no departamento.

Agradeço imensamente aos meus colegas arqueólogos que me permitiram ter inesquecíveis experiências arqueológicas e aprender tanto durante as escavações. Jonas Gregório, José Iriarte e Rafael Corteletti, apesar de há muito não poder participar das escavações, espero que o tempo não tarde de nos encontrarmos novamente!

Agradeço ainda a um outro grupo de arqueólogos, considerados por alguns como a “pior turma de arqueologia”, por dividir as dificuldades em ter um espírito de rebeldia, em busca de uma melhor formação, mais ampla e sem impor limites à pesquisa: Ananinhas (Fragoso e Paula), André, Caio, Eliane, Fátima, Freddy, Jonathan, Klismann, Luciana, Mariane, Mauro, Paulo, Thalís, Vinícius, Virgínia, e Zadir; e ainda pelas excelentíssimas professoras Maria Farias Gluchy, Marcia Naomi Kuniochi, Vanessa Quintana e Vanderlise Machado Barão, que permitiram a formação desse pelotão de “anarquistas arqueológicos”!

Ao time Guasca Rugby/Horda Bagual que me abriu as portas para voltar ao rugby depois de tantos anos; em especial aos meus amigos Black, Bruno, Cervejeiro, Carneiro, Cris, Israel, King, Paulista, Paulo e Tiagão.

Aos meus amigos de todas as horas Adriano, Ândrio, Flávio, Irving, Flávio, Jusoan, Naej, Renan e Thiago. Vocês fazem muita falta, pois o tempo de infância não volta, a a vida tem nos deixado cada vez mais distantes; mas com certeza isso em nada muda o que eu sinto por vocês.

À Gurizada: Fabrício, Giovanni, Gustavo, Felipe, Lauro, Lucas, Miguel, Thomás e Roberto; ainda somado ao André; que foram/são responsáveis por grandes momentos alcóolicos, muitas vezes imemoráveis, e me apoiaram muito durante momentos de grandes conquistas, perdas e mudanças.

Ao meu médico Nelson Asnis, por ser um grande amigo e ter me auxiliado durante todo esse percurso pedregoso, tendo sido um diferencial de grande importância na minha vida.

E por último, mas nunca menos importante, à minha amada companheira Fernanda Schäfer Hackenhaar, por todo seu carinho, amizade, companheirismo e cumplicidade. Os momentos finais de conclusão da presente Tese devem muito ao seu apoio e amor.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	vii
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL.....	5
Considerações Gerais.....	6
Uma Breve História Evolutiva Dos Hominíneos.....	8
Produção De Ferramentas.....	10
Saída Da África II.....	11
A Cultura Neandertal.....	12
Bases Genéticas Do Comportamento E Habilidades Cognitivas.....	13
Polimorfismos Compartilhados E Seleção Balanceadora.....	16
Qual a Dinâmica Evolutiva Que Poderia Sustentar a Hipótese Apresentada Acima? .	18
CAPÍTULO II: JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	20
JUSTIFICATIVA.....	21
OBJETIVOS.....	22
CAPÍTULO III: Searching For Ancient Balanced Polymorphisms Shared Between Neanderthals And Modern Humans.....	23
CAPÍTULO IV: Evolutionary Analysis Of The Human Neurotransmitters Network.....	56
CAPÍTULO V: The Molecular Clock Winder: Assessing The Effects Of Life History And Reproductive Biology On Substitution Rates In Primates.....	64
CAPÍTULO VI: The Evolution Of Tool Making: An Evolutionary Approach From Sapajus Libidinosus.....	84
CAPÍTULO VII: CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS.....	122
REFERÊNCIAS.....	127
ANEXOS.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AVP – Arginina vasopressina

AVPR1a – Receptor de arginina vasopressina 1a

AVPR1b – Receptor de arginina vasopressina 1b

E.Q – coeficiente de encefalização (*encephalization quotient*)

FPKM – fragmentos por kilobase de transcrito por milhões de leituras mapeadas (*fragments per million reads per kb of transcript*)

GABA – ácido gammaminobutírico

GWAS – Estudo de associação genômica ampla (*genome-wide association study*)

Ile - Isoleucina

Ka – Mil anos antes do presente

Leu - Leucina

Ma – Milhões de anos antes do presente

OXT – Oxitocina

OXTR – Receptor da oxitocina

PIC – Phylogenetic Independent Contrast Analysis

Pro - Prolina

SNP–Polimorfismo de nucleotídeo único ou polimorfismo de nucleotídeo simples (*single nucleotide polymorphism*)

Trans-SNPs – polimorfismos compartilhados

VNTR – Repetição em tandem de número variável (*variable number of tandem repeats*)

RESUMO

A história evolutiva do sistema nervoso e suas implicações para o comportamento humano estão repletas de muitos questionamentos ainda sem respostas, mesmo após os resultados do projeto do genoma humano e a melhoria extraordinária dos métodos de nova geração; tanto para nossa quanto para outras espécies modelos. Sendo assim, a busca por respostas configura-se em um tópico não só instigante, como tremendamente desafiador.

Genes associados aos neurotransmissores são encontrados em uma diversidade de eucariotos sem sistema nervoso central, estimulando a indagação sobre quando o complexo sistema nervoso apresentaria o arquétipo biológico para a sua emergência. Ademais, além da presença de um primitivo sistema nervoso desde a origem dos cnidários, são os hominíneos - primatas bípedes dotados de cérebros grandes - que mostram de maneira mais marcante como os comportamentos criativos, inovadores e aprendidos emergem como armas adaptativas poderosas para enfrentar as adversidades e desafios impostos pelo ambiente natural e social.

Nesta tese procurou-se contribuir com respostas a estas e outras questões. Para isso, buscou-se por sinais de forças evolutivas que estariam atuando no genoma, em particular em genes associados com comportamentos adaptativos; desde a origem dos eucariotos unicelulares até o *Homo sapiens*. Dentre as várias abordagens utilizadas, nós fizemos uso de análises populacionais na busca dos mecanismos evolutivos por trás da manutenção de polimorfismos compartilhados (trans-específicos) por humanos arcaicos e modernos, presentes em genes associados com traços comportamentais complexos, os quais incluem “pensamento criativo” e “comportamento inovador”. Mostramos, por exemplo, que alguns desses polimorfismos estão sendo mantidos por pelo menos 400-275 mil (provavelmente por seleção balanceadora), como aqueles associados às doenças psiquiátricas, e que também fazem parte de um repertório genético que sobrepõem-se ao sistema imunológico. Essa variabilidade pode ter desempenhado um papel tanto sobre a plasticidade imunológica, quanto comportamental; dotando as espécies do gênero *Homo* com uma extraordinária capacidade adaptativa comportamental em diferentes nichos ecológicos e contextos sociais.

Em uma outra abordagem, utilizando 238 genomas de eucariotos, mostramos que uma parte representativa dos ortólogos de genes de neurotransmissores já estava presentes no ancestral comum de todos os eucariotos. Curiosamente, o sistema dopaminérgico foi identificado como o

mais representado na raiz dos eucariotos. Ainda, foi possível observar que desde a origem dos peixes não há inovações de ortologia, quando utilizamos a rede humana como parâmetro, sugerindo que a última rodada de duplicação completa do genoma no ancestral comum dos teleósteos provavelmente impulsionou a evolução da rede de neurotransmissores, ou mesmo foi a grande causa para a evolução da complexidade do sistema nervoso observada nesses organismos.

Nossa última abordagem analisa as relações entre as diferentes taxas de mutações dentro da ordem dos primatas e traços de história de vida; como diversidade comportamental, de estratégia reprodutiva, tempo de geração, massa corporal e outros. Diferentemente dos valores observados em chimpanzés (*Pan troglodytes*), que replicaram estimativas anteriores, aqui identificamos que humanos e gorilas não apresentariam taxas de mutações constantes considerando a razão entre cromossomo X/cromossomos autossômicos. Este dado sugere, que, para o estudo da evolução do fenótipo de comportamento sexual, os chimpanzés seriam um bom modelo do putativo ancestral dos grandes macacos. Além disso, é provável que a competição espermática em gorilas e humanos pode ter sido muito mais intensa no passado do que atualmente. Além do mais, comparando os diferentes traços de histórico de vida dos primatas encontramos uma relação inversa entre as taxas de substituição nos cromossomos autossômicos e a razão entre idades de amadurecimento das fêmeas e machos, proporção de tamanho testicular, razão entre tempo de gestação e intervalo de nascimentos, e razão entre tempo de gestação e expectativa média de vida, mesmo quando controlada pelo método de análise filogenética independente de contrastes.

Finalmente, mostramos dados preliminares sobre a variabilidade genética em genes ligados ao comportamento em *Sapajus libidinosus*, uma espécie de macaco do Novo Mundo caracterizada pelo uso inovador de ferramentas e aprendizagem social.

ABSTRACT

The evolutionary history of the nervous system and its implications on human behavior is still full of questions, even in the face of the results from human genome project, and extraordinary new advances in the next generation methods; considering either for humans and other species. Thus, seeking to answer these questions is an exciting and challenging topic to study.

Genes associated with neurotransmitters are found in a diversity of eukaryotes without a central nervous system, stimulating the inquiry into when the complex nervous system would have emerged. Nonetheless, beyond the presence of a primitive nervous system since the origin of cnidarians, the hominins are those which markedly demonstrate how creative, innovative, and learning behaviors make allow them to trespass natural and social challenges.

In this present thesis we sought to contribute to the understanding of these issues. Initially, we searched for signs of evolutionary forces acting on genome, particularly on genes associated with adaptive behaviors; since the origin of unicellular eukaryotes to *Homo sapiens*. Among several used approaches used, we made use of population analyses searching for evolutionary mechanisms behind the maintenance of shared polymorphisms (trans-specific) between archaic and modern humans for genes associated with complex behavioral traits, which include "creative thinking" and "innovative behavior". We were capable to demonstrate that, for example, some of these polymorphisms maintained by at least 400-275 thousand years (probably by balancing selection), such as those associated with psychiatric diseases, are also part of a genetic repertoire that overlaps those observed for immune system. This variability may have played a role in both immunological and behavioral plasticity; endowing species of the genus *Homo* with extraordinary adaptive behavioral capacity in different ecological niches and social contexts.

In another approach, using 238 eukaryotic genomes, we showed that a representative part of neurotransmitter orthologs were already present in the common ancestor of all eukaryotes. Interestingly, the dopaminergic system was identified as the most represented system in the root of eukaryotes. It was also possible to observe that since the origin of fishes there were no orthological innovations when we use the human network as a parameter, suggesting that the last round of whole genome duplication in the common ancestral genome of teleosts probably boosted the evolution of the neurotransmitter network, or even were the cause of its complexity observed in these organisms.

Our final approach analyzes the relationships between different mutation rates within the order of primates and life history traits; such as behavioral diversity, reproductive strategy,

generation time, body mass and others. Differently from the values observed in chimpanzees (*Pan troglodytes*), which replicated previous estimations, we identified that humans and gorillas would not have kept a constant mutation rate considering the X-to-Autosomal ratio. This data suggests that chimpanzees would be a good model for the evolutionary studies of the sexual behavior, as a putative ancestral of the great apes. In addition, it is likely that sperm competition in gorillas and humans may have been much more intense in the past than currently. Moreover, comparing the different traits of primates' life history, we found an antagonistic relationship between autosomal mutation rate and the ratio between females-to-males sexual maturity, proportion of testicular size, ratio between gestation time and interval of births, and the ratio between gestation time and life expectancy, even after controlling by the phylogenetically independent contrast analysis method.

Finally, we show a preliminary data on genetic variability in behavioral genes in the *Sapajus libidinosus*, a species of New World monkey characterized by innovative use of tools and social learning.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

“O homem, com suas nobres qualidades, ainda carrega no corpo a marca indelével de sua origem modesta.”

Charles Darwin.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Considerações Gerais

Em 1871, no livro “*The Descent of Man and Selection in Relation to Sex*” Charles Darwin enfatiza que o sistema nervoso humano, assim como o de qualquer outra estrutura orgânica, faz parte de um processo evoluído (Striedter et al. 2012). Se compararmos o tamanho cerebral da nossa espécie, o *Homo sapiens*, com o dos nossos “parentes primatas mais próximos”, os chimpanzés (*Pan troglodytes*) e bonobos (*Pan paniscus*), verificamos nada menos que um cérebro três vezes maior em humanos. Dito isso, e assumindo a complexidade do *Homo sapiens* quanto à sua capacidade intelectual e habilidades cognitivas, é comum chegar à conclusão de que a chave para entender tais habilidades estaria em seu volumoso cérebro. Entretanto, o volume encefálico, mesmo quando corrigido pelo tamanho do corpo, por si só não justifica nosso comportamento complexo; visto que a organização neuronal e a distribuição dos córtex cerebrais desempenham um papel extremamente relevante (Ponce de León et al. 2016).

Se por um lado é fácil assumir que os humanos modernos possuem destacada capacidade intelectual e cognitiva, por outro a tarefa torna-se extremamente difícil quando analisamos as outras já extintas espécies da linhagem dos hominíneos. Hominíneos podem ser classificados como primatas bípedes pertencentes à linhagem humana, desde o último ancestral comum com os chimpanzés, há cerca de 8 milhões de anos (Ma) (Moorjani et al. 2016a).

Diferentemente da estrutura esquelética, o comportamento não passa por processo de fossilização; porém há um conjunto de dados que podem ser utilizados para inferir quanto a esse fenótipo sobre espécies já extintas. Um desses dados pode ser feito tomando o molde do endocrânio fossilizado, estudando não só seu volume como sua morfologia (Bruner et al. 2003). Outra metodologia é a partir de registros arqueológicos culturais, carregados de símbolos, ou mesmo que desempenhem um papel tecnológico, o que nos fornece possíveis direções quanto aos atributos intelectuais dos nossos ancestrais.

O fim da primeira década do século XXI marca uma revolução para o estudo da temática de evolução humana. Utilizando técnicas de sequenciamento de DNA provindo de restos arqueológicos, foi possível que geneticistas recuperassem o genoma do *Homo neanderthalensis*

(Green et al. 2010; Prüfer et al. 2014; Prüfer et al. 2017) e do espécime de Denisova (Reich et al. 2010; Meyer et al. 2012). A partir de então, foram iniciadas uma série de investigações quanto às diferenças genéticas entre humanos modernos e arcaicos, indo além das comparações morfológicas entre as espécies.

Diante da problemática de compreender o arcabouço molecular envolvido no processo evolutivo do comportamento humano, bem como de suas capacidades cognitivas, a presente Tese de Doutorado utiliza dados moleculares de genômica e populacionais para preencher tais lacunas. Dessa forma, o **Capítulo 3** da presente Tese (Viscardi et al., 2018) apresenta achados que buscam por polimorfismos compartilhados entre populações de humanos arcaicos e modernos disponíveis para compreender a possível contribuição da seleção balanceadora na manutenção da alta variabilidade comportamental dos mesmos. Seguidamente, passamos por uma análise de biologia de sistemas no **Capítulo 4** (Viscardi et al., em preparação) onde o objetivo é compreender a origem do repertório de genes ortólogos associados aos neurotransmissores humanos. O **Capítulo 5** da Tese (Viscardi et al., em preparação), por sua vez, apresenta uma análise a partir do cálculo das taxas mutacionais dentro da ordem dos primatas, relacionando-as com uma série de características fenotípicas de diferentes traços de histórico de vida. O intuito dessa pesquisa é identificar relações que possam elucidar as diferentes estimativas no relógio molecular dos primatas, evidenciando como as estratégias sociais e reprodutivas podem impactar na evolvabilidade das espécies. No **Capítulo 6** apresentamos resultados preliminares sobre a variabilidade de genes associados ao comportamento em duas espécies de macacos do Novo Mundo (mNM): *Sapajus libidinosus* e *Sapajus nigritus*. O estudo visa associar a alta taxa de produção de ferramentas vinculada aos indivíduos *S. libidinosus* que vivem em ambiente de Caatinga, com o padrão da variabilidade em genes candidatos, quando confrontados com indivíduos do grupo controle (*S. nigrii*), que habitam florestas e não produzem artefatos (subtítulo 6.1).

Antes de apresentar os resultados (Capítulos 3-6), no entanto, uma revisão sobre o estado da arte dos tópicos de interesse da presente Tese será apresentada abaixo.

1.2 Uma Breve História Evolutiva Dos Hominíneos

O tamanho absoluto de um cérebro não é uma variável muito adequada para representar a capacidade cognitiva de um indivíduo, ou mesmo para usar de comparação entre espécies. Por exemplo, elefantes e baleias azuis são organismos de cérebros muito grandes, porém não apresentam equivalente complexidade comportamental ao dos humanos modernos, que está acompanhada, dentre outros fatores, de tecnologia sofisticada. Assim, a ciência da paleoantropologia utiliza-se da medida de tamanho cerebral relativo, visto que cérebro e corpo são alometricamente relacionados (Alba 2010). Como exemplo, pode-se destacar a análise comparativa entre o volume cerebral de grandes primatas contemporâneos e dos australopitecíneos - hominíneos habitantes da África há cerca de quatro Ma, com $\sim 400 \text{ cm}^3$ de volume – com o cérebro de tamanho similar ao dos grandes macacos atuais, como os chimpanzés. Contudo, se aplicarmos o coeficiente de encefalização (medida do tamanho do cérebro em relação ao tamanho corporal ou E.Q) as espécies australopitecíneas apresentam um E.Q. médio de 2.5, enquanto os chimpanzés possuem um E.Q. de 2. Diante desses dados, pode-se especular que a expansão cerebral já estava presente, ainda que timidamente, nos *Australopithecus afarensis* (Lewin 2005).

O gênero o qual pertencemos, o *Homo*, surge na África há cerca de 2,5 Ma, com duas espécies que marcam a origem desse ramo: o *H. habilis* e o *H. rudolfensis*, ambas com notável volume cerebral ($\sim 552 \text{ cm}^3$ e $\sim 752 \text{ cm}^3$, respectivamente) se comparado com os australopitecíneos. Apesar de por muitos anos terem sido considerados os primeiros fabricantes de ferramentas, novos achados mostram que as primeiras ferramentas teriam surgido, na verdade, há mais de três milhões de anos (Harmand et al. 2015); o que propõe a possibilidade de sua produção por espécies de volumes cerebrais menores, como os australopitecíneos, algo que comentaremos mais adiante.

Diferentemente dos *Paranthropus*, que foram extintos por volta de 1.2 Ma (Wood e Strait, 2004), o gênero *Homo* colonizou uma parte significativa do globo, sendo hoje representado pela nossa espécie. As primeiras espécies do gênero são conhecidas como habilíneas, representadas pelos já citados *Homo habilis* e *Homo rudolfensis*, ambos com volume de cérebro relativamente maior que dos australopitecíneos. O *Homo erectus*, espécie identificada no século XIX por Eugène Dubois a partir de achados na ilha de Java, na Indonésia, foi o primeiro hominíneo a ter deixado a África, por volta de 1,8 Ma. Porém, devido ao fato de existir fósseis relativamente diferenciados em

diferentes continentes, alguns pesquisadores preferem adotar taxonomias distintas para identificá-los, antes de uma única: *H. ergaster* (encontrado majoritariamente no leste da África), *H. erectus* (África, Ásia e Oceania) e *H. heidelbergensis* (Europa). Seus volumes cerebrais médios são de ~850 cm³, ~1000 cm³ e ~1198 cm³, respectivamente (Lewin, R.2005). Existem ainda outros espécimes com tamanhos cerebrais similares classificados dentro do ramo *H. erectus* (Etler 2000; Schwartz 2004). Sendo assim, alguns especialistas consideram esses espécimes como pertencentes às espécies biológicas separadas (*Homo erectus sensu stricto*), enquanto outros os veem como membros de uma única espécie (*Homo erectus sensu lato*), assumindo, neste último caso, grande variabilidade morfológica dentro da espécie (Schwartz 2004; Baab 2008; Lordkipanidze et al. 2013). Independentemente de discussões taxonômicas a respeito dos primeiros hominíneos que saíram da África, este evento, conhecido como Saída da África I (*Out of Africa I*) marcou a história de nosso gênero, como veremos abaixo.

Colonizar grande parte mundo exigiu resolver uma gama de problemas adaptativos (Cela-Conde e Ayala, 2007). Desse modo, o sucesso do evento Saída da África I provavelmente não teria ocorrido sem o apoio de um aparato tecnológico adequado. Além de possuir um volume cerebral maior ao dos seus ancestrais, o *H. erectus* foi protagonista em transportar as ferramentas produzidas por longas distâncias, além de terem sido identificadas, pela primeira vez nos registros arqueológicos, lanças longas de madeira, sugerindo que eram caçadores (Thieme, 1997; Plummer, 2004; Haidle e Pawlik, 2010), algo inovador comparado aos carniceiros habilíneos. Ainda, outros fatores também devem ter contribuído para uma migração e colonização bem-sucedida, tal como o uso eventual ou sistemático do fogo (Goren-Inbar et al. 2004; Mourre et al. 2010; Berna et al. 2012; Rhodes et al. 2016).

Interessantemente, talvez uma das primeiras evidências de comportamento complexo quanto ao gênero *Homo* encontrada no registro arqueológico se refira ao sítio de Dmanisi, na região do Cáucaso (Georgia). Em 2004, no sítio comentado, a equipe de Lordkipanidze recuperou um crânio e um mandíbula (espécimes D3444 e D3900, respectivamente) de um *Homo erectus* datados de aproximadamente 1,7 milhões de anos de um indivíduo que sobrevivera por pelo menos dois anos, unicamente através do comportamento cooperativo do seu grupo. A evidência está em que o espécime não apresentava nenhum dente para se alimentar, sendo necessário a pré-mastigação por algum outro integrante do grupo (Lordkipanidze et al. 2005).

1.3 Produção De Ferramentas

Uma das características utilizada no passado para definir o gênero *Homo* foi a sua capacidade de produzir ferramentas. As ferramentas mais antigas conhecidas até 2015 datavam de aproximadamente 2.6 milhões de anos, coletados em Gona, na região do Hadar (Etiópia) (Harmand et al. 2015). Curiosamente, estas ferramentas não foram encontradas em contexto de nenhuma espécie do gênero *Homo*, porém pertenciam ao mesmo nível estratigráfico que uma variedade de espécies hominíneas, como o *Australopithecus garhi*, *Australopithecus africanus*, *Australopithecus sediba*, *Paranthropus aethiopicus*, *Paranthropus boisei*, *Paranthropus robustus*, *Homo habilis* e *Homo rudolfensis*. Estas duas últimas espécies citadas, chamadas de habilíneas, por serem dotadas de grande volume cerebral em comparação com os australopitecíneos, acabaram por ser apontadas como as prováveis fabricantes desta primeira indústria lítica. Atualmente, muitos são os debates sobre a possibilidade de alguns australopitecíneos serem os primeiros fabricantes de tais ferramentas (Whiten et al. 2009). Em 2013, artefatos líticos datando de 3.3 milhões de anos atrás, foram encontrados no Quênia, contextualizando as ferramentas com o *A. afarensis* (McPherron et al. 2010; Harmand et al. 2015). Tais descobertas expandem horizontes sugerindo que a base biológica para a produção de ferramentas já estivesse presente antes mesmos do gênero *Homo*. Esta sugestão, apesar de chamar atenção em um primeiro instante, é perfeitamente plausível visto que tanto macacos prego (*Sapajus libidinosus*; Haslam et al. 2016; Proffitt et al. 2016), quanto os chimpanzés (Pruetz e Bertolani, 2007; Sanz e Morgan, 2009) produzem ferramentas com relativa frequência. Curiosamente, os machos adultos da espécie *Sapajus libidinosus* têm grande tolerância com a aproximação dos jovens infantes. Estes jovens escolhem os adultos mais habilidosos como “tutores” para que, por observação, possam aprender as técnicas para produzir e utilizar ferramentas (Ottoni, de Resende e Izar, 2005; Ottoni, Dogo e Izar, 2005; Ottoni e Izar, 2008).

Esses achados em associação com o *A. afarensis*, contribuem para a construção de um quadro lógico da compreensão da capacidade cognitiva de nossos ancestrais. É de conhecimento geral, que há produções de ferramentas e acúmulo de tecnologia por outros primatas, como chimpanzés e macacos prego (Haslam et al. 2016; Proffitt et al. 2016; Falótico et al. 2017). Ainda, simulações computacionais demonstram que para os primeiros estágios do acúmulo de cultura não haveria a necessidade do aumento das capacidades cognitivas (Pradhan et al. 2012). Entretanto, as ferramentas provavelmente contribuíram para o desenvolvimento cognitivo, visto que a própria inovação é indiretamente proveniente do processo de acumulação. Dessa forma, os chimpanzés

mostram que portariam todos os recursos biológicos necessários para produção de ferramentas relativamente simples (Pradhan et al. 2012). Buscando uma filogenia ainda mais distante com nossa espécie, os próprios macacos prego de algumas populações (do gênero *Cebus* e *Sapajus*) utilizam ferramentas para cavar à procura de tubérculos ou mesmo para alcançar pequenas presas em tocas, como aranhas e pequenos roedores. Além disso, usam esses artefatos para atrair parceiros sexuais (Falótico et al. 2017) atirando nos mesmos, possivelmente como forma de chamar a atenção para si. Tal conhecimento abre o debate para as possibilidades do uso das ferramentas muito anterior a alimentação baseada em carne no gênero *Homo*, proposta pela busca do tutano como recurso através da quebra de ossos longos, apresentado anteriormente.

1.4 Saída Da África II

A espécie *Homo sapiens* surge na África há aproximadamente 200-150 mil anos (Ka). A partir de seu continente de origem, os humanos modernos empreenderam uma notável epopeia migratória, que teve como resultado a colonização de todos os continentes, com exceção da Antártida, ainda em épocas pré-Neolíticas. Tal evento é conhecido como Saída da África II (*Out of Africa II*), em uma analogia à primeira emigração africana do *H. erectus* (Saída da África I) (Stewart e Stringer, 2012) como já visto em item anterior da presente Tese. Conquanto, diferente da primeira saída da África, as rotas de migração, bem como os territórios, já estavam ocupadas por outros hominíneos, tais como o Neandertal (*Homo neanderthalensis*) na Europa/Ásia, e outras variantes morfológicas de *H. erectus*, ou mesmo espécies descendentes destes, na Oceania (Stewart e Stringer, 2012).

H. neanderthalensis e *H. sapiens* coabitaram a Europa e parte de Ásia por um período de aproximadamente 20 mil anos (Mellars, 2004; Wang, Farina e Li, 2012). A longa sobreposição temporal e geográfica dessas duas espécies tem permitido especulações sobre as consequências desse provável contato. Miscigenação entre as duas espécies, aculturação e extinção das espécies não-*sapiens* seriam alguns dos ocorridos sugeridos. Alguns estudos paleontológicos e arqueológicos, por exemplo, sustentam contínuos eventos de substituição das espécies arcaicas pela moderna (Swisher et al. 1996), enquanto outras sustentam a hipótese de miscigenação (Zilhão e Trinkaus, 2001; 2002). A paleogenética, por sua vez, vem dando força à hipótese de miscigenação

após a primeira publicação do genoma rascunho do Neanderthal (Green *et al.* 2010) e, posteriormente, seu genoma de alta cobertura (Prüfer *et al.* 2014); embora o tema esteja longe de ser um consenso (Conдеми, Mounier, Giunti, Lari, Caramelli *et al.* 2013). Na região da Sibéria, teria vivido outro hominíneo arcaico considerado uma espécie irmã dos Neandertais. Representado por um molar e uma falange, o espécime de Denisova teve seu genoma sequenciado há seis anos (Reich, *et al.* 2010; Meyer, *et al.* 2012). Sinais de mestiçagem com humanos modernos também foram encontrados a partir do conhecimento desse primeiro genoma. Curiosamente, esse sinal é especificamente marcante quando populações melanésias modernas de Papua Nova Guiné e das ilhas Bougainville são consideradas.

Os últimos refúgios Neandertais na Europa datam por volta de 20 Ka na península Ibérica (Mellars, 2004; Stewart e Stringer, 2012; Wood, *et al.* 2012). Várias hipóteses são propostas para explicar sua extinção, mas as mais comuns são aquelas que justificam a extinção pela inferioridade cognitiva dos Neandertais e de outras espécies arcaicas, quando comparada com a dos humanos modernos. O argumento baseia-se em uma suposta baixa sofisticação de suas ferramentas e especulações quanto a complexidade de suas estruturas sociais (Henshilwood, e Marean, 2003; Mellars, 2004). Considerando essas hipóteses, a defasagem nas habilidades cognitivas teria sido determinante para a extinção dos hominíneos arcaicos que coexistiram com os humanos modernos.

Vale ressaltar, no entanto, que o volume cerebral médio do Neandertal (1512 cm³) é o maior já descrito para um hominíneo, incluindo o *Homo sapiens* (~1355 cm³). Este fato instigante juntamente com outros que veremos no item a seguir, fazem parte de um conjunto de evidências que questionam a suposta defasagem cognitiva de nossos parentes extintos.

1.4.1 A Cultura Neandertal

A fabricação e o uso de ferramentas constituem-se em peças-chaves para inferências sobre a cultura nas espécies de primatas, incluindo nos hominíneos (de Waal, 1999). No entanto, as inúmeras definições de cultura normalmente abrangem um espectro muito maior de elementos. Em 1871 o antropólogo britânico Edward B Tylor, considerado o pai do conceito moderno de cultura, define: “cultura é todo o complexo que inclui o conhecimento, as crenças, a arte, a moral, o direito, os costumes e quaisquer outros hábitos e capacidades adquiridos pelo homem enquanto membro de

uma sociedade” (Dalgarrondo, 2011). Desse modo, a ausência de ferramentas não implica, necessariamente, ausência de cultura, pois existem vários meios de manifestação cultural verbal ou material carregado de significados abstratos e simbólicos que não deixam qualquer tipo de registro (Lewin, 2005), tais como os cantos e danças. Cultura, assim, vem sempre acompanhada de comportamentos sociais e individuais complexos.

Durante o Paleolítico Médio (300-40 Ka), a tecnologia lítica dos Neandertais, conhecida como Musteriense, é marcada pela chamada técnica de *Levallois*, basicamente voltada para produção de lascas em massa, a partir de um núcleo, que são posteriormente melhor trabalhadas. Tal técnica se mantém presente no registro arqueológico até 36 Ka (Bar-Yosef, 2002). Todavia, ainda no Paleolítico Médio, há indícios de que há mais de 200 Ka os Neandertais usavam uma forma complexa de produzir suas ferramentas: queimavam casca de bétula para sintetizar uma espécie de cola e assim produzir ferramentas compostas, demonstrando uma diversidade tecnológica. Curiosamente, uma técnica semelhante é observada muito mais recentemente no registro arqueológico associado ao *H. sapiens* (Roebroeks, e Villa, 2010).

No início do Paleolítico Superior (40-10 Ka), há 36 Ka, surge uma nova indústria representada por lâminas finas, lascas e artefatos feitos de ossos, galhada de cervídeos e marfim, conhecida como *Chatelperronense*. Há um grande debate sobre a originalidade do Neandertal quanto a esta indústria, pois uma tecnologia similar é também encontrada em humanos modernos. Assim, para alguns, a produção de tais artefatos seria resultado do contato e troca cultural com o *H. sapiens* (Zilhão e Trinkaus, 2001; Mellars, 2004; Lewin, 2005).

1.5 Bases Genéticas Do Comportamento e Habilidades Cognitivas

O inglês Francis Galton já reconhecia em 1869 que habilidades cognitivas e comportamentais poderiam ser herdadas (Vallender, 2011). Atualmente, estudos com humanos mostram que tais características, como processamento sensorial, reconhecimento de si, emoções, motivação, aprendizagem, memória, atenção, busca de novidade, função executiva e tolerância com outros indivíduos apresentam alguma base biológica herdável (Vallender, 2011; Vissers et al., 2015; Gilissen et al., 2014; Johnson et al., 2016). Destarte, através do uso da genética e da biologia molecular é possível buscar quais variações genéticas entre e dentro das espécies seriam responsáveis, pelo menos em parte, por esses fenótipos. Igualmente, é sabido que forças evolutivas,

tal como a seleção natural (direcional e/ou balanceadora), atuam sobre os fenótipos, selecionando indivíduos portadores de determinados comportamentos adaptativos, de acordo com as demandas ambientais e ecológicas.

Neurônios são as unidades básicas do sistema nervoso, sendo eles os principais responsáveis pela condução do impulso nervoso através de reações físico-químicas nas sinapses. O termo sinapse tem origem na década de 30 do século XX, cunhado por Charles Sherrington, que a definiu como um local de contato entre dois neurônios. Assim, transmissão sináptica pode ser definida como a passagem de informação entre neurônios, podendo ser elétricas ou químicas. Curiosamente, vertebrados apresentam um número relativamente maior de sinapses químicas do que elétricas quando comparados com invertebrados, algo que é associado com sua maior capacidade de processamento de informações e que, conseqüentemente, permitiu maior complexidade funcional ao sistema nervoso (Lent, 2010). Dentre os genes mais comumente estudados pela genética para compreender a origem do fenótipo comportamental estão os genes codificadores de neuromoduladores, como a vasopressina (AVP) e oxitocina (OXT), genes condificantes para neurotransmissores (e.g. Glutamato e Dopamina), e genes envolvidos na expressão dos seus receptores (Bailey et al. 2007; Vargas-Pinilla et al. 2015; Pare et al. 2016).

Durante o processo de especiação, a espécie derivada e seu ancestral comum podem acabar por compartilhar muitos genes em comum. Genes que são, assim, herdados verticalmente de uma espécie para outra são chamados de ortólogos, enquanto genes que têm em sua origem um evento de duplicação gênica são conhecidos como parálogos (Koonin 2005).

Como exemplo, podem ser citados os neuro-hormônios parálogos OXT e AVP, associados com diversos traços comportamentais complexos, além de possuírem importantes papéis fisiológicos. Em mamíferos placentários, o neuro-hormônio AVP difere do OXT basicamente por mudanças nas posições 3 e 8 (Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly e Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly, respectivamente) (Stoop, 2012; Koehbach *et al.*, 2013); estando separados por uma região intergênica de aproximadamente 10kb, com sua orientação transcricional oposta. Dentre as suas funções conhecidas, esses nona-peptídeos atuam no controle de estresse, agressividade, formação de pares sexuais, cuidado parental, além de outros comportamentos complexos, como veremos mais adiante na presente Tese. Fisiologicamente, OXT atua também na contração uterina e ejeção do leite, enquanto AVP tem papel na homeostase da água (French, 2016). OXT e AVP exercem suas funções através da interação com seus receptores (OXTR; AVP1a, AVP1b e AVPR2, respectivamente). Sendo assim, o estudo do sistema OXT-AVP, como um todo, pode nos auxiliar a

elucidar as bases genéticas que dotam certos animais de comportamentos sociais (ver como exemplo estudos de nosso grupo de pesquisa, Vargas-Pinilla et al., 2015 e Parreiras-e-Silva et al., 2017).

Obviamente, também há outros genes que influenciam direta ou indiretamente os fenótipos comportamentais (Sekar et al. 2016). Genes envolvidos no desenvolvimento do cérebro e transmissão sináptica também são importantes, visto que muitas mutações deletérias têm sido descritas na nossa espécie (Vernes et al., 2007; Sholtis e Noonan, 2010). A título de exemplo, já foram identificados sinais de seleção natural nos genes codificadores dos receptores da serotonina (*HTR2A*) e dopamina (*DRD2* e *DRD4*), bem como no transportador da serotonina *SLC6A4* (*5-HTT*) (Staes et al., 2014, 2016; Taub e Page, 2016). A sequência promotora do gene *SLC6A4*, que apresenta repetições em tandem de número variável (VNTR), possui duas regiões polimórficas conhecidas como PL1 e PL2. Enquanto a região variável PL1 é exclusiva dos grandes macacos (e.g. orangotangos, gorilas, chimpanzés e humanos), a região PL2 é encontrada somente em macacos do Velho Mundo (Dobson e Brent, 2013). Vale destacar que estudos anteriores encontraram repetições em tandem PL2 em um estudo com duas espécies de macacos do Novo Mundo, mas sem identificar a variabilidade dentro das mesmas (Pascale et al., 2012), o que não significa a ausência dessa variabilidade em outras espécies de macacos do Novo Mundo. Variantes nestas regiões têm sido associadas com dominância social e ansiedade em *Macaca fascicularis* (Miller-Butterworth et al., 2008). Como esses polimorfismos estão sendo mantidos por milhares de anos, alguns autores sugerem a possível ação de seleção balanceadora (Dobson e Brent, 2013; Shattuck et al., 2014).

Em humanos e cetáceos, o gene codificador do receptor D4 da dopamina (*DRD4*) também é conhecido por apresentar variação no número de VNTRs no exon 3, a qual já foi associada com o fenótipo de “busca por novidades” (Larsen et al. 2005; Mogensen et al. 2006; Tovo-Rodrigues et al. 2010). Em humanos, alelo de sete repetições já foi associado com o fenótipo descrito acima. Além disso, sinal de seleção positiva há pelo menos 50 mil anos foi identificado, sugerindo a importância do alelo (bem como do fenótipo a ele associado) no processo migratório durante a saída da África II (Ding et al. 2002). Trabalhando com caçadores-coletores da América do Sul, Tovo-Rodrigues e colaboradores (2010) identificaram uma frequência maior do alelo de 7 repetições, indicando que o rápido aumento da sua frequência em ameríndios, poderia estar relacionado às necessidades de rápidas respostas às dinâmicas mudanças de ambiente e escassez de recursos.

Variantes na região promotora do gene do receptor de AVP do tipo 1A (*AVPR1a*) foram também associadas com os fenótipos do comportamento tanto em humanos quanto em chimpanzés,

como o já mencionado “busca de novidades”, além de “resposta à recompensa”, “prevenção de danos” e “comportamentos de dominância” (Donaldson e Young, 2008, 2013; Lutzman et al., 2014). Outras pesquisas também indicaram que em humanos a variação neste gene também está associada ao Espectro Autista (Procyshyn, et al., 2017), o que denota a importância do gene em funções conectivas relacionadas a interação social.

Como comentado anteriormente, existem várias hipóteses para explicar a extinção dos Neandertais, mas normalmente elas se apoiam em uma suposta inferioridade intelectual dos mesmos em comparação ao *H. sapiens*. Assim, muitos dos achados que apontam complexidade cultural dos Neandertais são referidas como erros metodológicos ou aculturação, como no caso citado da indústria *Chatelperronense* (Henshilwood, e Marean, 2003; Lewin, 2005; Mellars, 2004). No entanto, novos achados na arqueologia apontam para uma maior semelhança entre as espécies. Sítios arqueológicos com instigantes pinturas rupestres, com datações do período Neandertal, põem em dúvida a capacidade exclusiva do *H. sapiens* de fazer este tipo de arte (Zilhão, et al., 2010; Pike, et al., 2012). Dados genéticos, por sua vez, indicam situação que favorece uma similaridade entre nossa espécie e os Neandertais/Denisovianos. Por exemplo, os Neandertais teriam as mesmas mutações no gene *FOXP2* encontradas nos humanos modernos. Tais mutações, ausentes nos chimpanzés e nos outros grandes macacos, foram associadas à capacidade da linguagem articulada (Krause, et al., 2007). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que um grande número de alelos derivados, incluindo em genes da cognição, do neurodesenvolvimento e da neurotransmissão, anteriormente conhecidos apenas em *Homo sapiens*, na verdade já estavam presentes nas espécies arcaicas (Paixão-Côrtes, et al 2012; 2013). Assim, esses achados indicam a manutenção desta heterogeneidade há no mínimo 800 Ka, indicando polimorfismos presentes em ambas as espécies. Conjuntamente, estes achados permitem sugerir que o repertório genético para o comportamento complexo do *H. sapiens* possa ter emergido muito antes do que se imaginava e, possivelmente, estaria presente em outras espécies do gênero. A presente tese tem como uma de suas pretensões explorar esta hipótese. Para isso, algumas outras definições e considerações se fazem necessárias, como veremos nos itens a seguir.

1.5.1 Polimorfismos Compartilhados e Seleção Balanceadora

Polimorfismos compartilhados (ou trans-específicos) podem ser identificados quando a espécie A possui 2 alelos (A1 e A2) em um *locus* e a espécie B também possui, em um *locus*

homólogo, os 2 alelos (B1 e B2). Excluindo o surgimento concomitante de variantes em linhagens distintas (evolução paralela), os polimorfismos compartilhados nas espécies derivadas pressupõem um estado polimórfico na espécie ancestral. Estima-se que a perda dos polimorfismos neutros compartilhados entre duas espécies derivadas com tamanhos efetivos médios de 10 mil indivíduos se dê aproximadamente em 340 mil anos, ou 17 mil gerações, considerando gerações de 20 anos. Ainda, é esperado que 1% dos polimorfismos neutros compartilhados sejam mantidos além de 53 mil gerações (Clark, 1997). Entretanto, esse período de tempo pode cair na medida em que o tamanho efetivo das espécies derivadas é menor que 10 mil indivíduos. Outrossim, o modelo só se aplica se os alelos em questão forem seletivamente neutros. Simulações de computador mostram que alelos codominantes, sob a ação da seleção natural, podem ser mantidos por 10 milhões de anos, ou mais, em diferentes espécies relacionadas filogeneticamente. Este parece ser o caso dos alelos do sistema MHC compartilhados entre primatas e roedores (Takahata e Nei 1990). Neste caso clássico envolvendo *loci* do sistema imunológico, os polimorfismos compartilhados envolvem genes cuja função justificaria uma pressão seletiva forte para manter uma alta diversidade no conjunto de alelos/*locus*, tornando o sistema bastante plástico, ao longo de muito tempo. O mecanismo mais comumente associado à manutenção de polimorfismos não neutros compartilhados entre diferentes espécies é a seleção balanceadora, que atua basicamente através da vantagem adaptativa do heterozigoto (alelos codominantes) e da seleção dependente-de-frequência, quando a vantagem adaptativa desaparece na medida em que a frequência de um fenótipo ultrapassa um dado limiar.

Hoje há poucas dúvidas que existe uma base genética para traços complexos. Redes de genes fundamentam o processamento sensorial, das emoções e motivações, além do desenvolvimento neuronal e da plasticidade. Todos esses elementos são essenciais para a geração de comportamentos, sendo que estes programas genéticos variam entre e dentro das espécies, dando origem à uma diversidade comportamental (Bendesky e Bargmann, 2011). Mais que isso, tal diversidade pode estar sendo mantida principalmente por seleção balanceadora se diferentes traços são favorecidos em situações ambientais distintas, onde as pressões seletivas se alteram constantemente (Wolf, et al., 2007; Boon, Réale e Boutin, 2007; Pruitt e Riechert, 2010; Bendesky e Bargmann, 2011). Por exemplo, em um ambiente rico em recursos alimentícios uma alta atividade exploratória é menos vantajosa que uma baixa atividade, pois esta última conserva mais energia (Boon, Réale e Boutin, 2007).

Outros exemplos podem ser citados dentro do grupo dos primatas, como polimorfismos compartilhados entre espécies de primatas do Novo mundo (Atelidae, Pitheciidae e Cebidae) no gene da L-M opsina (Hiwatashi, et al., 2010), relacionado com a visão di/tricromática. Não existe uma clara vantagem em ser tricromático, pois há casos em que ser dicromático é uma vantagem em populações de macacos e símios (detectar insetos que vivem na superfície, ou objetos camuflados pela cor), bem como há casos em que não há diferença entre ser dicromático ou tricromático.

Podemos sugerir que ao identificar sítios sobre seleção balanceadora em grupos humanos, seus valores devem ultrapassar a ancestralidade comum estimada para as populações humanas, visto que o *locus* está mantendo a diversidade desde antes da separação entre as populações. No entanto, um cuidado ainda é necessário na interpretação dos dados diante de que *loci* autossomais têm sua datação em humanos na amplitude de 300-1900 Kya, e o nível de polimorfismo médio em humanos está na ordem de 8×10^{-4} por par de bases (Kreitman e Di Rienzo, 2004).

1.5.1.1 Qual a Dinâmica Evolutiva Que Poderia Sustentar a Hipótese Apresentada Acima?

A seleção natural é conhecida por selecionar traços adaptativos no indivíduo, devido ao seu melhor desempenho quando comparada aos outros membros da mesma população. Com o tempo, alelos dos genes que contribuem para o devido traço irão aumentar em frequência, podendo ocorrer sua fixação (Fijarczyk e Babik, 2015). Entretanto, olhando para uma perspectiva de grupo, é amplamente aceito que a seleção pode operar sobre níveis múltiplos (seleção em multi-nível), algumas vezes apresentando uma covariância significativa entre o traço e o valor adaptativo sobre o nível social do grupo. Essa forma de seleção pode é conhecida por “seleção de grupo” (Gardner, 2015).

Seleção balanceadora pode ser observada ao nível de grupo em exemplos onde o indivíduo coloca sua própria vida em risco para a sobrevivência do grupo (Shettleworth, 2010). Ainda, alguns polimorfismos podem ser interpretados como deletérios a nível individual, porém serem uma vantagem em nível de grupo. Alguns exemplos são conhecidos em humanos e normalmente associados a eventos de migração, alta defesa devido ao comportamento agressivo e etc. O gene *AVPR1B*, é um exemplo de uma complexa seleção balanceadora, associada com

depressão e transtornos de temperamento, sobre a população Africana e Europeia, visto que um dos alelos é fixado em asiáticos (Cagliani, et al., 2009). Genes que influenciam estes traços de personalidade normalmente são associados com doenças psiquiátricas, como de forma bem recorrente ocorre com a esquizofrenia e a já citada depressão. Este conjunto de genes podem ser referidos como “genes do comportamento”.

Considerando toda a trajetória evolutiva dos hominíneos - vista resumidamente nos itens anteriores, e de um provável tamanho efetivo pequeno devido à competição entre as várias espécies e contínuos *bottlenecks* (Huff, et al. 2010) - é possível especular que a seleção natural do tipo balanceadora tenha tido um papel importante na manutenção dos polimorfismos trans-específicos dos sistemas genéticos conectados com habilidades de comportamentos complexos, que tiveram na plasticidade a ferramenta fundamental para o sucesso adaptativo do grupo ao longo do tempo.

CAPÍTULO II
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

*“Nunca tenha certeza de nada, por que
a sabedoria começa com a dívida”*

Sigmund Freud

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICATIVA

Pode-se dizer que o estudo da evolução humana é uma busca para compreender o que faz com que sejamos hoje uma das espécies mais bem-sucedidas do planeta, junto às bactérias e alguns outros organismos. Grande parte desse sucesso foi garantido pela nossa inteligência e capacidade comportamental complexa. A análise dos genomas de espécies do gênero *Homo* extintas nos ajuda a compreender se nossas capacidades cognitivas são únicas ou se já estavam presentes em outros hominíneos que dividiam o planeta conosco até, pelo menos, 18 mil anos atrás. Dessa forma, compreender as causas evolutivas de certos comportamentos faz com que possamos identificar a origem de traços que hoje estão ligados a problemas de saúde que acometem humanos modernos, mas que em no passado eram, quiçá, vantajosos. Entretanto, vale lembrar da multifatorialidade do fenótipo comportamental, a qual faz com que o uso de um ou poucos genes não seja suficiente para compreender o fenótipo como um todo; fazendo jus à aplicação de tecnologias computacionais de biologia de sistemas e análise de múltiplos genomas com abordagens populacionais, além da profundidade temporal que caracteriza os estudos evolutivos.

Trabalhos recentes têm encontrado sinais significantes associados com transtornos psiquiátricos em genes com ações muito basais, como ao transporte de íons de cálcio (Heyes et al. 2015). Não obstante, há o avanço sobre os conhecimentos do repertório de genes reguladores/moduladores do comportamento, verificando-se uma epistasia com genes associados com o sistema imune (Sekar et al. 2016; Sanders et al. 2017). Uma abordagem evolutiva pode ajudar a identificar o porquê de ambos repertórios gênicos estarem conectados com fenótipos comportamentais, bem como podem ajudar a elucidar se tais sinais são biologicamente significantes ou um artefato matemático.

Além disso, abordagens que levam em consideração outras espécies de primatas e animais de modo geral podem trazer luz sobre a emergência de genes homólogos e parálogos de interesse no estudo, bem como sobre seus papéis na emergência de fenótipos exclusivos ou compartilhados entre grupos taxonômicos.

2.2 OBJETIVOS

- I. Buscar polimorfismos compartilhados entre populações de humanos arcaicos e modernos para compreender a possível contribuição da seleção balanceadora na manutenção da variabilidade em traços de comportamento (**Capítulo 3**).
- II. Analisar a origem do repertório associado aos ortólogos em eucariotos de cinco principais sistemas neurotransmissores humanos (GABAérgico, colinérgico, serotoninérgico, dopaminérgico e glutamatérgico), bem como sua plasticidade, abundância e diversidade (**Capítulo 4**).
- III. Inferir a associação entre a taxa de substituição variável em primatas e seus diferentes traços históricos de vida, sexo-específico ou não, para avaliar se os mesmos impactam sobre as inferências do relógio molecular (**Capítulo 5**).
- IV. Caracterizar a diversidade genética de genes relacionados com comportamento social em espécies de *Sapajus libidinosus* e *Sapajus nigritus* com o intuito de contribuir na busca das bases genéticas para a emergência de comportamentos inovadores com relevância adaptativa (**Capítulo 6**).

CAPÍTULO III

Artigo publicado: *SEARCHING FOR ANCIENT BALANCED
POLYMORPHISMS SHARED BETWEEN NEANDERTHALS AND
MODERN HUMANS*

Viscardi LH, Paixão-Côrtes VR, Comas D, Salzano FM, Rovaris D, Bau
CD, Amorim CEG, Bortolini MC.

Revista: *Genetics and Molecular Biology*

*“Insanidade é continuar fazendo sempre a mesma
coisa e esperar resultados diferentes”*

Albert Einstein



Searching for ancient balanced polymorphisms shared between Neanderthals and Modern Humans

Lucas Henriques Viscardi¹, Vanessa Rodrigues Paixão-Côrtés², David Comas³, Francisco Mauro Salzano¹, Diego Rovaris¹, Claiton Dotto Bau¹, Carlos Eduardo G. Amorim^{4,5} and Maria Cátira Bortolini¹

¹*Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

²*Departamento de Biologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA Brazil.*

³*Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF), Departament de Ciències Experimentals i de LaSalut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain.*

⁴*Department of Biological Sciences, Columbia University, New York, NY, U.S.A.*

⁵*Department of Ecology and Evolution, Stony Brook University, Stony Brook, NY, U.S.A.*

Abstract

Hominin evolution is characterized by adaptive solutions often rooted in behavioral and cognitive changes. If balancing selection had an important and long-lasting impact on the evolution of these traits, it can be hypothesized that genes associated with them should carry an excess of shared polymorphisms (trans-SNPs) across recent *Homo* species. In this study, we investigate the role of balancing selection in human evolution using available exomes from modern (*Homo sapiens*) and archaic humans (*H. neanderthalensis* and Denisovan) for an excess of trans-SNP in two gene sets: one associated with the immune system (IMMS) and another one with behavioral system (BEHS). We identified a significant excess of trans-SNPs in IMMS (N=547), of which six of these located within genes previously associated with schizophrenia. No excess of trans-SNPs was found in BEHS, but five genes in this system harbor potential signals for balancing selection and are associated with psychiatric or neurodevelopmental disorders. Our approach evidenced recent *Homo* trans-SNPs that have been previously implicated in psychiatric diseases such as schizophrenia, suggesting that a genetic repertoire common to the immune and behavioral systems could have been maintained by balancing selection starting before the split between archaic and modern humans.

Keywords: Human behavior, evolution, balancing selection, immune genes, behavioral genes.

Received: October 02, 2017; Accepted: November 26, 2017.

Introduction

Many of the fundamental processes at the core of complex human behavior and cognitive abilities, including sensory processing, recognition of self and others, emotions, motivation, learning, memory, attention, vocalization and speech processing, executive function, as well as neural development, may be characterized by at least some degree of heritability (Vallender, 2011; Gilissen *et al.*, 2014; Vissers *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2016). Assuming that genes are partly responsible for these phenotypes, genetic variation between and within species can be expected to give rise to the large behavioral repertoire observed in nature (Bendesky and Bargmann, 2011). Furthermore, the diversity of these traits can be expected to be shaped by the

fundamental forces of microevolution, including genetic drift, directional natural selection (either positive or negative), and balancing selection.

While directional selection tends to reduce variability close to the selected site (Lachance and Tishkoff, 2013), balancing selection results in the persistence of variation in the population or species, even in the face of loss due to drift, leading to an excess of polymorphisms with intermediate frequencies (Nielsen *et al.*, 2009) and increasing genetic diversity around the site of selection (Charlesworth, 2006; Fijarczyk and Babik, 2015). Balancing selection can result from different processes, such as heterozygote advantage (overdominance), negative frequency-dependent selection, and heterogeneity in selective advantage across time or space – all possibly acting in changing environments requiring a fast rate of adaptation (Boon *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2007; Bendesky and Bargmann, 2011; Pruitt and Riechert, 2011; Schaschl *et al.*, 2015; Taub and Page, 2016).

While many cases of directional selection have been reported in the literature, only a handful of examples of balancing selection have been described. This may be due to several factors. On the one hand, balancing selection may be a transient state, leaving marks so subtle that their detection may be difficult using current tests, leading to a large number of false negatives (Fijarczyk and Babik, 2015). On the other hand, most methods rely on the fact that balancing selection will lead to a decreased inter-population diversity. In populations that diverged not long ago, or that are experiencing some level of admixture, however, this pattern will be found at most neutral loci, thereby leading to a large number of false positives. One way of circumventing this issue is by comparison of different species, considering ancient balancing selection, in which most loci should indicate moderate to high divergence, and thus the number of false positives is expected to be smaller.

One of the best-studied targets of balancing selection is the major histocompatibility complex (MHC), which includes many examples of long-term maintenance of trans-species polymorphisms (trans-SNPs), *i.e.* ancient polymorphisms that survived in derived taxa (Takahata and Nei, 1990; Clark, 1997; Grimsley *et al.*, 1998; Ségurel *et al.*, 2013; Azevedo *et al.*, 2015). The study of these trans-SNPs has revealed a common theme, where individuals heterozygous for genes with key roles in the immune system seem to be more effective in their defense against pathogens, while at the same time presenting only a moderate inflammatory response (Cagliani *et al.*, 2008; Leffler *et al.*, 2013; Azevedo *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2015).

Because of the expected loss of shared polymorphic sites over time due to genetic drift, polymorphisms shared between species that diverged a long time ago are rare under neutrality (Clark, 1997). Trans-SNPs common to species separated by a relatively deep evolutionary split, and without recent admixture, are therefore probably adaptive and maintained by balancing selection. Examples of such adaptive trans-SNPs were reported by Leffler *et al.* (2013) and Teixeira *et al.* (2015) in their comparison between humans and the *Pan* genus, which are thought to have diverged about 8 million years ago (Moorjani *et al.*, 2016). In more recently-diverged species, the presence of trans-SNPs must be interpreted with greater caution. For instance, for humans, which have an estimated effective population size (N_e) of $\sim 10,000$ individuals, 1% of neutral trans-SNPs will be preserved in the genome even after 53,000 generations (~ 1.6 million years) (Clark, 1997). Assuming that the split between *Homo sapiens* and *Homo neanderthalensis* occurred around 400,000-275,000 years ago (Endicott *et al.*, 2010; Prüfer *et al.*, 2014), some trans-SNPs occurring in these species are expected to be neutral and occur due to stochastic events. Additionally, the retention of ancestral polymorphisms can be due to introgression, the exchange of genetic material between different species due to hybrid-

ization (Fijarczyk and Babik, 2015). This has been described for the hybridization between archaic humans (including *H. neanderthalensis* and the closely related Denisovans) and some modern human populations (Green *et al.*, 2010; Reich *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2012).

Despite these difficulties, the investigation of trans-SNPs in the genus *Homo* is an exciting research goal. Hominin evolution is characterized by adaptive solutions rooted in behavioral and cognitive changes. For instance, creative thinking promotes change from prevailing modes of thought or expression, a change that can be associated with fitness gain (Nettle, 2006). In addition to the benefits of change over time, there are adaptive advantages to the parallel maintenance of different behavioral strategies within a species (Sih *et al.*, 2004; Korte *et al.*, 2005; Cagliani *et al.*, 2009; Taub and Page, 2016). Assuming a genetic basis for these behavioral strategies, their parallel persistence can be seen as the result of balancing selection. In support of the idea for balancing selection, there have been several reports of polymorphisms in genes with known roles in modulating complex behavior in modern human and other mammals, which have likely persisted through balancing selection (Cagliani *et al.*, 2009; Schaschl *et al.*, 2015; Taub and Page, 2016).

Expanding on this idea, it is of great interest to investigate the role of balancing selection in the evolution of hominin, including human, behavior on a greater scale. If balancing selection has indeed had an important and long-lasting impact on the evolution of behavior in hominins, it can be hypothesized that genes associated with behavior should carry an excess of trans-SNPs across hominin species. Based on this hypothesis, we investigated the role of balancing selection in the evolution of behavior in hominins by studying the pattern of trans-SNPs in genes relevant to these traits in Neanderthals and modern humans.

Importantly, as previously mentioned, many available methods used to detect balancing selection were originally designed to target balancing selection operating over more than $4N_e$ generations (Clark, 1997). Due to the relatively recent split between modern humans and Neanderthals, these methods are ineffective in detecting balancing selection when studying these two species. To overcome this limitation, we implemented an approach that enables the identification of an excess of trans-SNPs in groups of genes of interest in comparison to the exome background (*i.e.* the null distribution), which serves as a control for demographic effects, while we added control for gene length biases, GC content (and thus indirectly mutation rate), number of polymorphisms per gene and background selection. Using this approach, we were able to identify polymorphisms shared between modern humans and Neanderthals, many of which located in genes related to immunology and a few in genes playing a potential role in behavior, including genes that may contribute to personality traits and psychiatric disorders.

Material and Methods

Defining gene sets

To find genes underlying immune and behavioral systems, we defined two target gene sets, which we named IMMS (genes related to the immune system) and BEHS (genes related to behavior). We populated these gene sets by searching the AmiGO database (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/browse.cgi>) using GeneOntology terms directly related to immune system (for IMMS) and behavior (for BEHS; supplementary material Table S1; <http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/browse.cgi>). We further added to the BEHS gene set, genes associated with autism spectrum disorder (Iossifov *et al.*, 2014; Yuen *et al.*, 2015), schizophrenia (Carrera *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2015; Srinivasan *et al.*, 2015), major depression (Cagliani *et al.*, 2009), and finally the OMIM database (<https://www.omim.org>) was also consulted for psychopathology associated genes (*i.e.* schizophrenia, major depressive disorder, autism spectrum disorder, asperger syndrome, attention-deficit disorder, antisocial behavior, and obsessive-compulsive disorder) expanding our total dataset. We then excluded genes that were not available for Neanderthal exome analysis, making for a final count of 1,780 genes in IMMS and 278 in BEHS, with a total of 17,246 analyzed genes including target (IMMS or BEHS, accordingly) and control genes.

Genetic datasets

The high quality exomes of three Neanderthals were retrieved from the Max Planck Institute database (<http://cdna.eva.mpg.de/neandertal/exomes/>; Castellano *et al.*, 2014). Modern human exome data were obtained from phase 3 of the 1000 Genomes Project (The 1000 Genomes Project Consortium, 2015). To avoid any confounding effects due to interbreeding among archaic humans and modern Eurasians (as reported by Green *et al.*, 2010; Reich *et al.*, 2010; Condemi *et al.*, 2013) in our analysis of balancing selection, we used only Yoruba genomes, as they are assumed to have no admixture history with Neanderthals or Denisovans. We included only autosomal single nucleotide biallelic loci, therefore excluding insertions and deletions (InDels), polymorphic sites with more than two alleles, variants on the sex chromosomes and mitochondrial variants. Only loci found to be heterozygous in the Neanderthal exomes were considered for shared and non-shared polymorphisms; this observed heterozygosity at the individual level was assumed to reflect population-wide polymorphism. Regarding the Yoruba (YRI) sample of 108 individuals, we only considered polymorphisms that both ancestral and derived alleles were segregating in this population. Importantly, as these Neanderthal samples from Croatia and Spain dated to more than 40 Kya (Castellano *et*

al., 2014), we do not expect that any Neanderthal polymorphism is a result of modern human introgression.

Due to the spontaneous deamination of 5-methylcytosine, methylated CpG sites are more prone to mutation than other sites, which raises the probability of allelic identity by state rather than by descent (Azevedo *et al.*, 2015). Because of this, we performed all analyses both including and excluding SNPs located within putatively methylated CpG sites (similarly to Leffler *et al.*, 2013).

The SIFT4G Software (Ng and Henikoff, 2003; Vaser *et al.*, 2016) was used to classify SNPs into synonymous vs. nonsynonymous substitutions and to perform a phenotype prediction for the disruption effect of mutations, allied with known references in literature. Polymorphisms within untranslated regions (UTRs) were excluded from all further analyses.

Evaluating the excess of trans-SNPs in gene sets

We searched in each gene for polymorphisms shared between Neanderthal and Yoruba exomes (*i.e.* trans-SNPs). We then compared the number of trans-SNPs in each one of the two target gene sets (IMMS and BEHS) to that of the 10,000 gene sets made according to random permutations of all remaining human genes for which Neanderthal exome sequences were available (total of 17,246 genes). In doing so, we always removed genes already accounted for in the target gene set accordingly. For instance, IMMS has 1,780 genes in its dataset, therefore 10,000 random gene sets were built using 15,466 genes as control. Each of the 10,000 random gene sets consisted of as many genes as the target gene set it was simulating, namely 1,780 genes for the comparison to IMMS and 278 to BEHS. The rationale behind the construction of random gene sets, was to generate a null genomic distribution for trans-SNPs, against which each target gene set was then tested. Statistical significance was determined by assessing the deviation in the number of trans-SNPs in the target gene sets in comparison to the background genomic distribution of trans-SNPs generated with the random gene sets. The bash script was used to run this analysis (https://github.com/cegamorim/excess_transSNPs).

Because all loci in each genome were subject to the same demographic history, this approach implicitly controls for demography. However, it does not automatically control for possible effects of background selection, varying mutation rates across sites, and gene size. These effects are known to affect genetic diversity and may therefore bias our results. To control for these effects, genes in the control sets were matched, on a gene-by-gene basis, to those in the IMMS and BEHS target gene sets for background selection, gene length and GC content as follows: Background selection was measured with the B statistic developed by Mcvicker *et al.* (2009), which was computed based on the expected reduction in nucleotide diversity at a neutral site due to purifying selection at other sites, as a function of re-

combination rates, selected site locations, deleterious mutation rate, and the distribution of selection strengths, and indicates the expected fraction of neutral diversity that is present at a given site. A value close to 0 represents near complete removal of diversity as a result of selection, while a value close to 1 indicates that selection has had little effect on diversity (McVicker *et al.*, 2009). To be matched with a target gene, the value of B for a control gene needed to be within 0.1 units of the value of B for the target gene. Gene size was measured as total exonic length, in accordance with the UCSC build hg19 refGene table (<https://genome.ucsc.edu/>). To be matched, the length of target and control genes needed to be within 400 bp of each other. GC content was calculated considering the gene coordinates described in the refGene table of UCSC build hg19. In a first step, we used BEDTools (Quinlan and Hall 2010) to extract the coding exon sequence based on these coordinates, and then used in-house scripts to determine the GC percentage. To be matched, the GC percentages of target and control genes needed to be within 5% of each other. The criterion for thresholds applied was chosen after many trials where at least one control gene in the exome was found for at least 98% of the target genes in IMMS and BEHS datasets. Those target genes that could not be matched to at least one control gene in the exome were excluded from all further analyses in both the target and control gene sets (Table S2).

All data were handled with *vcftools* 0.1.13 (Danecek *et al.*, 2011) and *bcftools*, as well as using in-house Python and bash scripts. Plots and analyses were implemented in the R environment (www.r-project.org).

Population genetics analyses

In addition to the analysis of trans-SNPs, we considered the classical population genetics statistics Tajima's *D* and *Fst* as potential markers of balancing selection, indicated by an excess of polymorphisms with low population differentiation. While shared polymorphisms can detect long-term balancing selection, Tajima's *D* highlights regions with an excess of (not necessarily shared) polymorphisms, due to balancing selection or population size change. On the other hand, *Fst* estimates genetic differentiation among populations. Both, Tajima's *D* and *Fst* are of interest, since together they indicate potential targets for balancing selection over an intermediate time span, as evaluated using the interval between $0.4 N_e$ and $4 N_e$ (Fijarczyk and Babik, 2015). Tajima's *D* for the YRI population and intercontinental *Fst* scores (Global *Fst*) for Yoruba versus Europeans (CEU) and Asians (ASN) were obtained from the 1000 Genomes Selection Browser 1.0 (<http://hsb.upf.edu/>) (Pybus *et al.*, 2014). It should be stressed that, despite the use of just *H. sapiens* populations, the polymorphisms selected were those shared with Neanderthals. Negative *Fst* values were interpreted as 0. Furthermore, since intermediate allele frequencies are a

hallmark of balancing selection (Nielsen *et al.*, 2009), we retrieved the average heterozygosity and standard error for all trans-SNPs from the dbSNP database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). A threshold for *Fst* of 0.04, as used by Cagliani *et al.* (2013) to represent low values for *Fst* among human populations, and an average heterozygosity greater than 0.400 (as employed by Pakstis *et al.*, 2010) were considered to flag up SNPs potentially affected by balancing selection.

All relevant SNPs identified in our analyses were queried for known associations with psychiatric disease using the GWAS catalog implemented in the UCSC Table Browser and the available literature.

Results

We retrieved 22,832 heterozygous sites from the Neanderthal exome (Castellano *et al.*, 2014), which 4,117 were trans-SNPs (Table S3) found within 2,519 genes. Here trans-SNPs are defined as heterozygous sites in Neanderthals that were also polymorphic in modern humans, represented by Yoruba people, according to the 1000 Genomes phase 3 data (The 1000 Genomes Project Consortium, 2015). We note that when *loci* located within CpG sites are included the numbers of such polymorphisms and genes almost doubles (Table S4), which is expected due to the high mutability of such sites (Kong *et al.*, 2012), some of which will potentially not be trans-SNPs but only identical by state.

We sought to evaluate if gene sets related to the immune system (IMMS; 1,754 genes) and behavior (BEHS; 271 genes) were enriched for these trans-SNPs in comparison to the genome as a whole. To do so, we built and permuted 10,000 random sets of genes to be compared to these, by matching each gene in these two sets of genes to others in the genome, controlling for background selection, gene size, and mutation rate (see Material and Methods), since these factors are known to affect the number of polymorphisms in each gene. Implicitly we were also controlling for demography, since we were comparing target genes to others in the same genome, which were therefore subject to the same demographic history. Moreover, because there is no evidence up to date of interbreeding between archaic and modern humans before *H. sapiens* migrated out of Africa, we used Yoruba samples to control for the effect of archaic introgression (Green *et al.*, 2010; Reich *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2012). Below we describe our findings using this approach for each gene set individually (IMMS and BEHS).

Signals of balancing selection in the Immune System

We identified 547 trans-SNPs in IMMS genes. This number was significantly higher than the null distribution for trans-SNP observed in the 10,000 random permutations of genes from the control set (p -value= 0.016); Table 1,

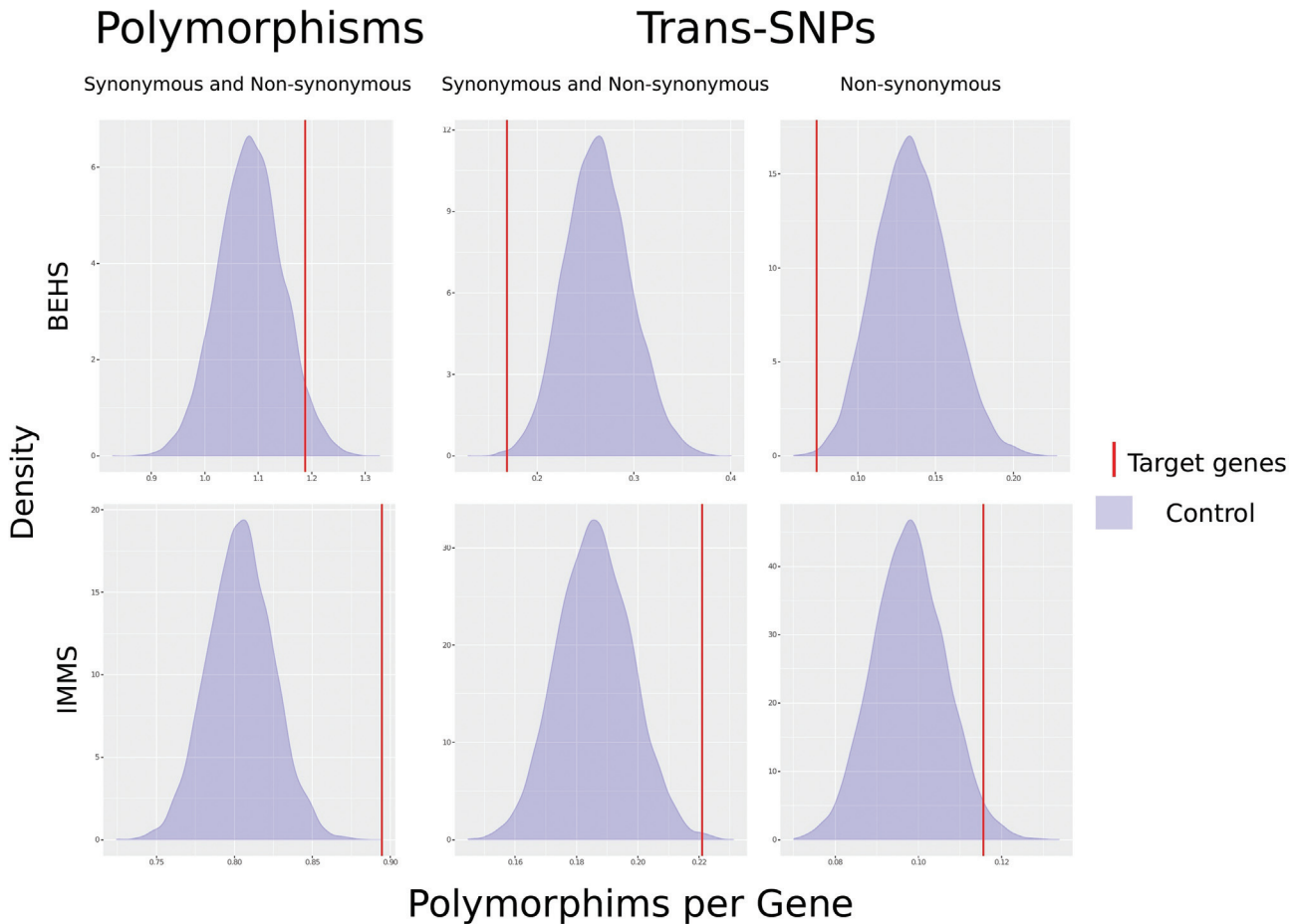
Figure 1 and Figure S1; see Methods). This pattern remains even if we exclude from the analysis the CpG transitions, which are known to present a higher mutation rate (Table S3). This pattern is borderline significant when considering only shared non-synonymous substitutions (297 polymorphisms; p -value = 0.05). These results suggest that in the genus *Homo*, genes underlying immune system function are more likely than non-immune-genes to maintain long-term shared polymorphisms, possibly through balancing selection. Additionally, we found that Neanderthals IMMS genes harbor more heterozygous sites (2,024 polymorphisms; shared or not with modern humans) than the random sets generated by permutation (p -value < 0.001; Figure 1, column “Polymorphisms”; Table S5). Many of these loci have SNP ID numbers (rs) and have thus been found to be at least biallelic in a modern human population. Due to the known hybridization between Neanderthals and some non-African *H. sapiens* populations, it is difficult to determine whether they represent polymorphisms shared since their split from the common ancestral; nevertheless, these findings reinforce that genes of the immune system maintain a high level of heterozygosity in the genus *Homo*.

Six of the 547 trans-SNPs shared between Neanderthals and Yoruba that we identified in IMMS (rs2240464, rs56318802, rs5899, rs118014438, rs377657111, and rs14178; Table 2) are located within genes that were previously associated with schizophrenia by the Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). It is noteworthy that another two of the trans-SNPs in IMMS are found in genes that have been associated with this disorder according to another study: rs28919579 is located in the *CD4* gene, a locus that has been linked to schizophrenia through an imbalance of CD4 cell subtypes, and rs374886374 is located within the *C4A* gene, a potential *MHC* locus that has recently been associated with schizophrenia (Sekar *et al.*, 2016). *C4* is a fundamental element of the classical complement cascade pathway, which rapidly recognizes and eliminates pathogens and cellular debris. In the brain, *C4A* is expressed in neurons and promotes synaptic pruning, which is impaired in schizophrenic patients (Sekar *et al.*, 2016). The possibility that these trans-SNPs have influenced the behavioral plasticity of Neanderthal and modern humans is specula-

Table 1 - Percentiles of the distribution of the mean values of polymorphism per gene in 10 000 random combinations simulating each of the proposed target gene systems (IMMS and BEHS)¹.

Percentile	IMMS			BEHS		
	SNPs	Trans-SNPs NonSyn	Trans-SNPs	SNPs	Trans-SNPs NonSyn	Trans-SNPs
5	0.769932	0.083713	0.166287	0.988971	<u>0.099265</u>	<u>0.209559</u>
10	0.777335	0.086560	0.170273	1.007350	0.106618	0.220588
15	0.782375	0.088838	0.173121	1.022060	0.110294	0.227941
20	0.786446	0.090547	0.175399	1.036760	0.113971	0.235294
25	0.789863	0.091686	0.177677	1.044120	0.117647	0.238971
30	0.792711	0.093394	0.179385	1.055150	0.121324	0.246324
35	0.796128	0.094533	0.181093	1.062500	0.125000	0.250000
40	0.798405	0.095672	0.182802	1.069850	0.128676	0.253676
45	0.801253	0.096811	0.184510	1.077210	0.132353	0.257353
50	0.804100	0.097950	0.185649	1.084560	0.132353	0.261029
55	0.806378	0.098519	0.187358	1.091910	0.136029	0.264706
60	0.809226	0.099658	0.188497	1.099260	0.139706	0.272059
65	0.811503	0.100797	0.190205	1.110290	0.143382	0.275735
70	0.814351	0.101936	0.191913	1.117650	0.147059	0.279412
75	0.817768	0.103645	0.194191	1.125000	0.150735	0.286765
80	0.821185	0.105353	0.196469	1.136030	0.154412	0.290441
85	0.825171	0.106492	0.198178	1.147060	0.158088	0.297794
90	0.830296	0.109339	0.201025	1.161760	0.165441	0.308824
95	0.838269	0.112187	0.206150	1.187500	0.172794	0.319853
100	0.882688	0.133827	0.231207	1.327210	0.227941	0.400735

¹Values close to the mean number of polymorphism per gene for each of the target gene sets (IMMS and BEHS) are in italic and underlined, while significant values are in bold. Mean values for the IMMS gene set: Total Neanderthal SNPs = 0.894647, non-synonymous trans-SNPs = 0.115604, trans-SNPs = 0.220957. Mean value for the BeHS gene set: Total Neanderthal SNPs = 1.1875, non-synonymous trans-SNPs = 0.07353, trans-SNPs = 0.169118.



The Y-axis shows the frequency with which an average number of polymorphisms per gene (shown on the X-axis) occurs in 10,000 random sets of genes matched to genes in our target systems (BEHS or IMMS) with respect to exon length, GC content, B-value and number of polymorphisms (see Material and Methods for details).

Figure 1 - Density distribution of the average number of polymorphisms per gene observed for random sets genes (blue shade) in the Neanderthal samples matched to those included in the immune system (IMMS) and behavioral system (BEHS) target gene sets (red bars).

Table 2 - Trans-SNPs within loci associated with schizophrenia according to the Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014).

Gene name	Chromosome	Position	ID(rs)	Ancestral allele	Derived allele
<i>RERE</i>	1	8419873	rs376434590	T	C
<i>RERE</i>	1	8419874	novel	T	G
<i>RERE</i>	1	8421203	rs13596	T	C
<i>BRINP2</i>	1	177247854	rs31764431	C	G
<i>CYP26B1</i>	2	72361960	rs2241057	A	G
<i>MARS2</i>	2	198570253	rs200490327	G	A
<i>GIGYF2</i>	2	233712227	rs7563724	A	G
<i>STAB1</i>	3	52546872	rs150311081	G	A
<i>STAB1</i>	3	52548136	rs74491782	T	C
<i>PBRM1</i>	3	52643685	rs3755806	T	C
<i>ITIH4</i>	3	52850999	rs2535621	A	G
<i>ITIH4</i>	3	52863155	rs150181495	G	A
<i>MUSTN1</i>	3	52867718	rs2276820	C	T
<i>ATXN7</i>	3	63982082	rs3774729	G	A
<i>KDM3B</i>	5	137754695	rs7726234	T	C
<i>DND1</i>	5	140052271	rs2563333	A	G

Table 2 - cont.

Gene name	Chromosome	Position	ID(rs)	Ancestral allele	Derived allele
<i>PCDHA1</i>	5	140168070	rs2240696	A	G
<i>PCDHA3</i>	5	140182101	rs7701755	G	T
<i>PCDHA4</i>	5	140188383	rs2337987	T	G
<i>PCDHA4</i>	5	140188401	rs2879086	A	G
<i>PCDHA8</i>	5	140221139	rs3756331	G	A
<i>PCDHA8</i>	5	140221195	rs199713478	G	C
<i>GPX5</i>	6	28497245	novel	C	T
<i>GPX5</i>	6	28497279	rs60523386	G	A
<i>SCAND3</i>	6	28541036	novel	C	T
<i>SCAND3</i>	6	28543089	rs41270593	G	T
<i>SRPK2</i>	7	104782888	rs2240464	A	T
<i>SRPK2</i>	7	104844229	rs56318802	C	T
<i>DGKZ</i>	11	46387868	rs1317826	A	G
<i>DGKZ</i>	11	46393138	novel	C	T
<i>F2</i>	11	46747662	rs5899	C	T
<i>ZDHC5</i>	11	57463496	rs140343860	C	T
<i>ZDHC5</i>	11	57466653	novel	G	A
<i>STAT6</i>	12	57499258	rs118014438	C	T
<i>LRP1</i>	12	57548364	rs34574998	T	C
<i>LRP1</i>	12	57575070	rs199672493	C	T
<i>LRP1</i>	12	57592090	rs370217380	G	A
<i>NXP4</i>	12	57619362	rs10783816	G	A
<i>PITPNM2</i>	12	123480138	novel	C	T
<i>CDK2AP1</i>	12	123749780	rs150530930	G	A
<i>XRCC3</i>	14	104165239	novel	G	A
<i>XRCC3</i>	14	104169630	rs138987760	C	T
<i>PLCB2</i>	15	40590134	rs2229690	G	A
<i>PLCB2</i>	15	40594191	rs373064934	A	G
<i>ADAMTSL3</i>	15	84706461	rs950169	C	T
<i>FES</i>	15	91428302	rs377657111	C	T
<i>THAP11</i>	16	67876823	rs28647874	A	G
<i>THAP11</i>	16	67876826	rs3982383	G	A
<i>THAP11</i>	16	67876835	rs151159352	G	A
<i>THAP11</i>	16	67876844	novel	G	A
<i>CTRL</i>	16	67964203	rs1134760	T	C
<i>PSMB10</i>	16	67969531	rs14178	A	G
<i>SLC12A4</i>	16	67979051	rs373093291	G	A
<i>SLC12A4</i>	16	67980969	rs11860125	G	C
<i>PLA2G15</i>	16	68293320	rs3743739	T	C
<i>SMG6</i>	17	2203025	rs1885987	T	G
<i>SMG6</i>	17	2203356	rs35172468	C	G
<i>GID4</i>	17	17948475	rs2955355	G	A
<i>MYO15A</i>	17	18022235	rs200234990	C	T
<i>MYO15A</i>	17	18023897	rs2955365	G	A
<i>TSSK6</i>	19	19625547	rs7250893	A	G
<i>ZNF536</i>	19	31038940	rs199936097	G	A
<i>ZNF536</i>	19	31038995	rs1469705	T	C
<i>ACTR5</i>	20	37377139	rs2254105	C	T
<i>L3MBTL2</i>	22	41610024	rs139451	G	A

Loci are sorted by chromosome position. Genes in bold are those belonging to the IMMS target gene set. Genes shaded in gray are those considered as *Credible causal schizophrenia SNPs* (sets of SNPs that are 99% likely to contain the causal variants) according to the Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014).

tive, potentially a lot so, but these findings suggest that at least part of the common genetic repertoire that links the IMMS with schizophrenia in modern humans has been maintained polymorphic for thousands of years. We note, however, that immune system genes are known to be highly pleiotropic (Cotsapas *et al.*, 2011; Andreassen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015), and this picture may also be true for other traits besides those related to psychiatric disorders. Still, we identified another 60 trans-SNPs located within these 108 loci associated with schizophrenia (Table 2), but that were neither part of our set for IMMS nor BEHS, suggesting that other systems may have trans-SNPs in pleiotropy with schizophrenia.

Potential signals of balancing selection in Behavior System

No excess of trans-SNPs (shared polymorphisms) was found in BEHS genes (51 SNPs in 41 genes; Table 3; Figure 1 and Figure S1). Likewise, and in contrast to the immune system, the number of heterozygous loci found in Neanderthals, shared and non-shared with Yoruba, corresponds to that expected by chance (p -value = 0.1; Figure 1, column “Polymorphisms”). Additionally, Tajima’s D was not significant for positive values (Table 3). In this regard, significant positive values for Tajima’s D would reflect more pairwise differences than segregating sites due to the increased diversity of the region surrounding the selected site, indicating old balancing selection (Nordborg *et al.*, 1996). On the other hand, we found low F_{st} and high average heterozygosity, both important indicators of potential signals of balancing selection, in five trans-SNPs (rs11176013, rs12628, rs310617, rs438042, and rs362331 (Table 3) shared between Neanderthals and Yoruba. All of these SNPs are associated with psychiatric and neurodevelopmental disorders, including schizophrenia. For instance, rs438042, located near the intron/exon boundary of *THBS4* exon 3, is associated with Alzheimer Disease and might be important for splicing, since *THBS4* acts in inflammatory responses and synaptogenesis (Cagliani *et al.*, 2013; Cocchi *et al.*, 2015). Another trans-SNP identified in the BEHS gene set, rs310617, located in the *EEF1A* gene, has been found to be heterozygous in the Denisova specimen. Although the specific role of rs310617 is not known, other substitutions in this gene have been associated with severe intellectual disability and epileptic encephalopathy (Nakajima *et al.*, 2015; Inui *et al.*, 2016).

Discussion

The evolutionary history of hominins is characterized by several notable and peculiar features. Of particular importance to the successful evolutionary trajectory of the genus *Homo* was the emergence of a large brain capable of sustaining complex and plastic adaptive behaviors, as well as cognitive skills. In recent years, a growing body of research has countered the notion that the Neanderthals were

devoid of symbolism and presented lower cognitive abilities and less sophisticated behavior than the early *H. sapiens* of the Paleolithic (Akazawa *et al.*, 1993; Zilhão and Trinkaus, 2002; Zilhão *et al.*, 2010; Pike *et al.*, 2012; Rendu *et al.*, 2013). This is in line with the findings of recent genetic and paleoneurological research. For instance, research by Mounier *et al.* (2016) and Ponce-de-León *et al.* (2016) revealed strong similarities between modern humans and Neanderthals in both endocranial anatomy and general brain development, while a study of 162 genes related to cognition by Paixão-Côrtes *et al.* (2013) identified a genetic repertoire shared between extinct archaic humans and modern humans. Assuming that the use of cognitive skills and complex behavior as an adaptive strategy represent a central element of the human evolutionary trajectory (Cagliani *et al.*, 2009; Schaschl *et al.*, 2015; Taub and Page, 2016), we sought to evaluate whether natural selection, particularly in the form of balancing selection, played any role in the evolution of genes potentially related to human behavior. Examples of a role for balancing selection in behavioral plasticity have been reported from primates (Babb *et al.*, 2010; Claw *et al.*, 2010; Dobson and Brent, 2013; Goto *et al.*, 2016; Taub and Page, 2016), rodents (Lonn *et al.*, 2017) and even arthropods (Fitzpatrick *et al.*, 2007). To detect balanced polymorphisms in genes related to behavior, we implemented an approach based on the search for an excess of shared polymorphisms (trans-SNPs) between archaic and modern humans, in comparison to the genome as a whole.

Our analyses revealed no excess of trans-SNPs in genes known to underlie behavioral traits (captured in our BEHS gene set, see Material and Methods). These findings are consistent with the current knowledge about the genetics underlying *H. sapiens* brain function. Genes expressed in the brain have a large number of functions and the interactions between them are complex (giving rise to basal and specific behavioral phenotypes). Therefore, these genes are subject to functional constraint (Nielsen *et al.*, 2009). Recently, Aggarwala and Voight (2016) developed the concept of genic tolerance to assess the probability of nucleotide substitution in the human genome, based on factors such as population history and selection, among others. In their analysis, genes playing a role in neurodevelopmental and psychiatric disorders were found to have a strong genic intolerance to nucleotide substitution. In the context of functional complexity and constraint, relatively few, key genetic changes can lead to larger effects on certain phenotypes, in response to a specific selective pressure, while at the same time maintaining original functions. Among the results of our analyses, five trans-SNPs located within our set of BEHS (rs11176013, rs12628, rs310617, rs438042, and rs362331; Table 3) presented high average heterozygosity and low F_{st} values, suggesting a homogeneous distribution of both alleles between populations. These results imply that balancing selection did not have a

Table 3 - Trans-species polymorphisms identified in genes of the BEHS gene set.

Gene	SNP	Average heterozygosity	Function	Fst	Tajima' D	Phenotype	Reference1	Denisova heterozygote
<i>ALS2</i>	rs3219156	0.185 +/- 0.240	missense	0.1642	-0.558111591	Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex	Tomiyama <i>et al.</i> , 2008	NO
<i>ALS2</i>	rs3219168	0.158 +/- 0.233	synonymous	0.1191	-0.093457107	Amyotrophic lateral sclerosis	Kress <i>et al.</i> , 2005	NO
<i>ANK2</i>	rs33966911	0.104 +/- 0.203	synonymous	0.1239	-0.750076422	NA	NA	NO
<i>ANKRD11</i>	rs72821356	0.058 +/- 0.160	synonymous	0.0255	-0.931794107	KBG syndrome (OMIM 611192)	NA	NO
<i>ANKRD11</i>	rs60520302	0.072 +/- 0.176	missense	0.0019	-0.931794107	KBG syndrome (OMIM 611192)	NA	NO
<i>APOL2</i>	rs118097350	0.006 +/- 0.054	missense	0.0005	0.301905912	NA	NA	NO
<i>BCL11A</i>	rs7569946	0.282 +/- 0.248	synonymous	0.0742	-0.928248907	Fetal Hemoglobin Level	Bauer <i>et al.</i> , 2013	NO
<i>CACNA2D3</i>	rs17054785	0.181 +/- 0.240	synonymous	0.0766	-0.12464999	NA	NA	NO
<i>CCDC108</i>	rs13403802	0.028 +/- 0.115	missense	0.0467	-0.365570142	NA	NA	NO
<i>CHDI</i>	rs161941	0.417 +/- 0.186	Synonymous	0.3542	-0.774153927	NA	NA	NO
<i>CH3LI</i>	rs140857184	0.013 +/- 0.080	missense	0.0346	-0.860993564	NA	NA	NO
<i>CHLI</i>	rs116261368	0.028 +/- 0.115	missense	0.0409	-0.478853152	NA	NA	NO
<i>CHLI</i>	rs2272522	0.428 +/- 0.175	missense	0.133	-0.478853152	Schizophrenia	Shaltout <i>et al.</i> , 2013	NO
<i>CTNS</i>	rs161400	0.269 +/- 0.249	missense	0.6469	0.188849119	Nephropatic cystinosis	Shahkarami <i>et al.</i> , 2013	NO
<i>CTNS</i>	rs77453839	0.130 +/- 0.219	synonymous	0.2947	0.383526916	Nephropatic cystinosis	Shahkarami <i>et al.</i> , 2013	NO
<i>DBH</i>	rs1108580	0.490 +/- 0.069	synonymous	0.2628	0.111473168	Schizophrenia, TDAH, cocaine dependence, fetal growth, bipolar disorder	Shaltout <i>et al.</i> , 2013	NO
<i>DISC1</i>	rs55795950	0.004 +/- 0.042	missense	0.0094	-0.209468866	Schizophrenia	Khan <i>et al.</i> , 2013	NO
<i>DRD5</i>	rs184288806	0.002 +/- 0.032	synonymous	NA	NA	NA	NA	NO
<i>EEF1A2</i>	rs310617	0.483 +/- 0.090	synonymous	0.0102	0.516242391	Mental retardation, Epileptic encephalopathy (OMIM 602959)	NA	YES
<i>EIF4EBP2</i>	rs3750767	0.029 +/- 0.117	synonymous	0.0332	-0.133346514	NA	NA	NO
<i>GPR153</i>	rs140518856	0.005 +/- 0.049	synonymous	NA	NA	NA	NA	NO
<i>GRM5</i>	rs2306153	0.091 +/- 0.193	synonymous	0.0516	-0.65655565	NA	NA	NO
<i>HOXB8</i>	rs45441492	0.114 +/- 0.210	synonymous	0.1385	-0.957471816	NA	NA	NO
<i>HRAS</i>	rs12628	0.418 +/- 0.185	synonymous	0.0217	-0.20012551	Costello syndrome	Gripp <i>et al.</i> , 2011	NO
<i>HTT</i>	rs363125	0.307 +/- 0.243	missense	0.3302	-0.83813619	Huntington disease (OMIM 613004)	Kay <i>et al.</i> , 2014	NO
<i>HTT</i>	rs362331	0.493 +/- 0.058	missense	0.0336	-0.718349527	Huntington disease (OMIM 613004)	Lombardi <i>et al.</i> , 2009	NO
<i>HTT</i>	rs140124504	0.002 +/- 0.032	synonymous	NA	NA	Huntington disease (OMIM 613004)	NA	NO
<i>HTT</i>	rs138489139	0.002 +/- 0.035	synonymous	NA	NA	Huntington disease (OMIM 613004)	NA	NO
<i>KDM6B</i>	rs11078709	0.490 +/- 0.070	synonymous	0.3901	-1.068036831	NA	NA	NO
<i>KLF12</i>	rs77377545	0.019 +/- 0.096	synonymous	0.026	-0.747818207	Panic disorder syndrome 1 (OMIM 167870)	NA	NO

Table 3 - cont.

Gene	SNP	Average heterozygosity	Function	<i>Fst</i>	Tajima's <i>D</i>	Phenotype	Reference 1	Denisova heterozygote
LRRK2	rs11176013	0.485 +/- 0.084	synonymous	0.0246	0.777713125	Parkinson disease 8 (OMIM 609007)	Mata <i>et al.</i> , 2006	NO
LRRTM1	rs6733871	0.465 +/- 0.128	missense	0.1323	-1.03399393	Schizophrenia	Ludwig <i>et al.</i> , 2009	NO
MC4R	rs2229616	0.032 +/- 0.122	missense	0.01	-1.339833048	Obesity	Heid <i>et al.</i> , 2008	NO
MKKS	rs17852625	0.310 +/- 0.243	synonymous	0.0393	0.147132768	Obesity	Rouskas <i>et al.</i> , 2008	NO
MKKS	rs16991547	0.363 +/- 0.223	synonymous	0.1067	0.147132768	NA	NA	NO
NMUR2	rs4958532	0.215 +/- 0.248	missense	0.1464	-0.701022375	NA	NA	NO
OR4C46	rs11246606	0.363 +/- 0.223	missense	-0.0025	-1.30558338	NA	NA	NO
PAK7	rs55773719	0.013 +/- 0.081	synonymous	0.0145	-0.339650099	NA	NA	NO
PHF2	rs56134753	0.040 +/- 0.135	synonymous	0.0199	-0.264535787	NA	NA	NO
PLCL2	rs7653834	0.496 +/- 0.047	synonymous	0.054	-0.63849307	NA	NA	NO
PRODH	rs139903009	0.004 +/- 0.047	missense	0.0005	0.292869235	Schizophrenia (OMIM 606810)	NA	NO
PRODH	rs4819756	0.342 +/- 0.232	missense	0.3182	0.309595729	Schizophrenia	Kempf <i>et al.</i> , 2008Ota <i>et al.</i> , 2014	NO
PRODH	rs1808320	0.393 +/- 0.205	synonymous	0.1409	0.369538366	Autism, Schizophrenia	autismkb.cbi.pku.edu.cn; Prata <i>et al.</i> , 2006	NO
RGS12	rs80251844	0.088 +/- 0.191	missense	0.1524	-0.829372734	NA	NA	NO
RGS12	rs147416450	0.002 +/- 0.028	missense	NA	NA	NA	NA	NO
RIMS1	rs77121218	0.019 +/- 0.097	synonymous	0.0092	-1.576071446	Cone-rod dystrophy (OMIM 606629)	NA	YES
SCN9A	rs4369876	0.064 +/- 0.167	missense	0.0735	-0.16967483	Basal Pain Sensitivity	Duan <i>et al.</i> , 2015	NO
SHANK1	rs3745521	0.405 +/- 0.196	missense	0.2752	-0.048981111	Specific language impairment (OMIM 606712); Mental retardation (OMIM 611097)	NA	NO
TCF3	rs11882821	0.033 +/- 0.123	synonymous	0.0467	-1.767706279	NA	NA	NO
TEKT5	rs148185751	0.005 +/- 0.051	missense	0.0005	0.183653042	NA	NA	NO
THBS4	rs438042	0.490 +/- 0.069	synonymous	0.0334	0.252034645	Alzheimer Disease	Cagliani <i>et al.</i> , 2013	NO

significant role in the evolution of genes implicated in human behavior as a whole, but may have been important for the evolution of particular genes within this set. Alternatively, our approach may not have had enough statistical power to detect the effect of balancing selection on the evolution of human behavior. That could be the case if frequency dependent selection, rather than overdominance, was the main mode of balancing selection, since our test is best suited to detect overdominance. Alternatively, the signals for balancing selection in the BEHS set may significantly pre- or postdate the evolutionary split between Neanderthals and modern humans.

Another possibility that deserves to be discussed in the light of our results comes from recent findings suggesting an association between behavioral traits and genes previously implicated in the immune response (Power *et al.*, 2015; Sekar *et al.*, 2016). Through our inter-*Homo* exonic trans-SNP approach, we found that genes underlying immune function (found in the IMMS gene set) contain more ancestral polymorphisms than expected by chance in both Neanderthal and modern humans. These genes have played an important immunological defense role during speciation and migration of the genus *Homo* in a probable similar context of their hominin common ancestral. Our results support the idea that the variability of immune genes is both a target and an outcome of balancing selection (Grimsley *et al.*, 1998; Ségurel *et al.*, 2013). Interestingly, and perhaps surprisingly, several studies have revealed a connection between the genetics of the immune system and human behavior. For instance, some of the strongest genetic associations found for schizophrenia at the population level involve variation in the immune system loci (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014; Sekar *et al.*, 2016). It has been suggested that some proteins of the immune system work to promote synaptic pruning (Sekar *et al.*, 2016), which is impaired in schizophrenic patients (Lips *et al.*, 2012). Other mechanisms involved both in the etiology of schizophrenia and in the immune system have also been suggested, including deviant immune responses (Pandarakalam 2013). Some of the IMMS trans-SNPs identified here have previously been found to be associated with schizophrenia in modern humans (rs2240464, rs56318802, rs5899, rs118014438, rs377657111, rs14178, Table 2). Furthermore, the trans-SNP rs374886374 is located in the gene *C4A*, at the *MHC* locus, which has recently also been associated with schizophrenia in a landmark study using several Psychiatric Genomics Consortium cohorts (Sekar *et al.*, 2016; nearly 65,000 individuals; p -value < 10⁻⁸).

Schizophrenia is known to have a high heritability of around 60-80%, and interestingly, it is frequently contextualized in hypotheses that attempt to explain the evolution of modern human complex behavior (Srinivasan *et al.*, 2015). One hypothesis aiming to reconcile the relatively high prevalence (~0.5 to 1%) of this disorder across human

populations with its negative effect on fitness is that balancing selection is maintaining several alleles at loci contributing to creative thinking, a trait that increases fitness. Under unfavorable circumstances, however, the same alleles are thought to increase vulnerability to psychiatric disorders, including schizophrenia (Power *et al.*, 2015; Srinivasan *et al.*, 2015). Our findings contribute to this hypothesis and suggest that some components of the immune genetic repertoire that were maintained polymorphic in both archaic and modern humans could have indirectly influenced the evolution of human behavior. This would represent an extraordinary case of evolutionary co-option, in which IMMS genes under balancing selection harbor ancestral adaptive polymorphisms related to the behavioral plasticity of the genus *Homo*. Allied to our conclusion, recent studies have contributed to unveil the physiological process of autoimmunity in cognition, being proposed as the driving force of cognitive evolution in genus *Homo* (Nataf, 2017).

Finally, a range of other molecular and biological processes certainly play an important role in the evolution of the behavioral plasticity characteristic of *Homo* species, such as gene regulation and epigenetic mechanisms. Moreover, beyond the role of the heterozygote advantage in maintaining these polymorphisms, other forms of natural selection (frequency-dependent, directional, etc.) at multiple levels (*i.e.*, individual, kin, and/or group levels; Polimeni and Reiss, 2003; Wilson and Hölldobler, 2005; Zhang and Perc, 2016), together with the unequivocal role of culture (Mesoudi, 2016), have shaped and, in the case of our species, continue to shape, human evolution. A full exploration of these topics is well beyond the scope of the present study, which intends only to explore and discuss some genetic and evolutionary pieces of this complex puzzle. Future studies may help to build a more complete picture of the evolution of hominin behavior.

Acknowledgments

We thank Alex Mesoudi and two anonymous reviewers for their valuable suggestions on an earlier version of the manuscript, and Ziyue Gao for helpful discussions. Financial assistance was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). CEGA was a fellow of the Science Without Borders program from CAPES foundation (BEX 8279/11-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PDE 201145/2015-4), Brazil.

References

- Aggarwala V and Voight BF (2016) An expanded sequence context model broadly explains variability in polymorphism levels across the human genome. *Nat Genet* 48:349-355.
- Akazawa T, Dodo Y, Muhesen S, Abdul-Salam A, Abe Y, Kondo O and Mizoguchi Y (1993) The Neanderthal Remains from

- Dederiyeh Cave, Syria: Interim Report. *Anthropol Sci* 101:361-387.
- Andreassen OA, Harbo HF, Wang Y, Thompson WK, Schork AJ, Mattingsdal M, Zuber V, Bettella F, Ripke S, Kelsoe JR, *et al.* (2015) Genetic pleiotropy between multiple sclerosis and schizophrenia but not bipolar disorder: Differential involvement of immune-related gene loci. *Mol Psychiatry* 20:207-214.
- Azevedo L, Serrano C, Amorim A and Cooper DN (2015) Trans-species polymorphism in humans and the great apes is generally maintained by balancing selection that modulates the host immune response. *Hum Genomics* 9:21.
- Babb PL, Fernandez-Duque E and Schurr TG (2010) AVPR1A sequence variation in monogamous owl monkeys (*Aotus azarai*) and its implications for the evolution of platyrrhine social behavior. *J Mol Evol* 71:279-297.
- Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, Xu J, Fujiwara Y, Lin C, Shao Z, Canver MC, Smith EC, Pinello L, *et al.* (2013) An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science* 342:253-257.
- Bendesky A and Bargmann CI (2011) Genetic contributions to behavioural diversity at the gene-environment interface. *Nat Rev Genet* 12:809-820.
- Boon AK, Réale D and Boutin S (2007) The interaction between personality, offspring fitness and food abundance in North American red squirrels. *Ecol Lett* 10:1094-1104.
- Cagliani R, Fumagalli M, Riva S, Pozzoli U, Comi GP, Menozzi G, Bresolin N and Sironi M. (2008). The signature of long-standing balancing selection at the human defensin beta-1 promoter. *Genome Biol* 9:R143.
- Cagliani R, Fumagalli M, Pozzoli U, Riva S, Cereda M, Comi GP, Pattini L, Bresolin N and Sironi M (2009) A complex selection signature at the human AVPR1B gene. *BMC Evol Biol* 9:123.
- Cagliani R, Guerini FR, Rubio-Acero R, Baglio F, Forni D, Agliardi C, Griffanti L, Fumagalli M, Pozzoli U, Riva S, *et al.* (2013) Long-standing balancing selection in the THBS4 gene: Influence on sex-specific brain expression and gray matter volumes in Alzheimer disease. *Hum Mutat* 34:743-753.
- Carrera N, Sanjuán J, Moltó MD, Carracedo Á and Costas J (2009) Recent adaptive selection at MAOB and ancestral susceptibility to schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuro-psychiatr Genet* 150:369-374.
- Castellano S, Parra G, Sánchez-Quinto FA, Racimo F, Kuhlwillm M, Kircher M, Sawyer S, Fu Q, Heinze A, Nickel B, *et al.* (2014) Patterns of coding variation in the complete exomes of three Neandertals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:6666-6671.
- Charlesworth D (2006) Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions. *PLoS Genet* 2:e64.
- Clark AG (1997) Neutral behavior of shared polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7730-7734.
- Claw KG, Tito RY, Stone AC and Verrelli BC (2010) Haplotype structure and divergence at human and chimpanzee serotonin transporter and receptor genes: implications for behavioral disorder association analyses. *Mol Biol Evol* 27:1518-1529.
- Cocchi E, Drago A and Serretti A (2015) Hippocampal pruning as a new theory of schizophrenia etiopathogenesis. *Mol Neurobiol* 53:2065-2081.
- Condemi S, Mounier A, Giunti P, Lari M, Caramelli D and Longo L (2013) Possible interbreeding in Late Italian Neanderthals? New data from the Mezzena jaw (Monti Lessini, Verona, Italy). *PLoS One* 8:e59781.
- Cotsapas C, Voight BF, Rossin E, Lage K, Neale BM, Wallace C, Abecasis GR, Barrett JC, Behrens T, Cho J, *et al.* (2011) Pervasive sharing of genetic effects in autoimmune disease. *PLoS Genet* 7:e1002254.
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, Handsaker RE, Lunter G, Marth GT, Sherry ST, *et al.* (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 27:2156-2158.
- Dobson SD and Brent LNJ (2013) On the evolution of the serotonin transporter linked polymorphic region (5-HTTLPR) in primates. *Front Hum Neurosci* 7:588.
- Duan G, Guo S, Zhang Y, Ying Y, Huang P, Wang Q, Zhang L and Zhang X (2015) The effect of SCN9A variation on basal pain sensitivity in the general population: an experimental study in young women. *J Pain* 16:971-980.
- Endicott P, Ho SYW and Stringer C (2010) Using genetic evidence to evaluate four palaeoanthropological hypotheses for the timing of Neanderthal and modern human origins. *J Hum Evol* 59:87-95.
- Fitzpatrick MJ, Feder E, Rower L and Sokolowski MB (2007) Maintaining a behavior polymorphism by frequency-dependent selection on a single gene. *Nature* 447:210-212.
- Fijarczyk A and Babik W (2015) Detecting balancing selection in genomes: Limits and prospects. *Mol Ecol* 24:3529-3545.
- Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BWM, Willemsen MH, Kwint M, Janssen IM, Hoischen A, Schenck A, *et al.* (2014) Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 511:344-347.
- Goto Y, Lee Y, Yamaguchi Y and Jas E (2016) Biological mechanisms underlying evolutionary origins of psychotic and mood disorders. *Neurosci Res* 111:13-24.
- Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MH-Y, *et al.* (2010). A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328:710-722.
- Grimsley C, Mather KA and Ober C (1998) HLA-H: A pseudogene with increased variation due to balancing selection at neighboring loci. *Mol Biol Evol* 15:1581-1588.
- Gripp KW, Stabley DL, Geller PL, Hopkins E, Stevenson DA, Carey JC and Sol-Church K (2011) Molecular confirmation of HRAS p.G12S in siblings with Costello syndrome. *Am J Med Genet Part A* 155:2263-2268.
- Heid IM, Vollmert C, Kronenberg F, Huth C, Ankerst DP, Luchner A, Hinney A, Brönnner G, Wichmann HE, Illig T, *et al.* (2008) Association of the MC4R V103I polymorphism with the metabolic syndrome: The KORA Study. *Obesity* 16:369-376.
- Inui T, Kobayashi S, Ashikari Y, Sato R, Endo W, Uematsu M, Oba H, Saito H, Matsumoto N, Kure S, *et al.* (2016) Two cases of early-onset myoclonic seizures with continuous parietal delta activity caused by EEF1A2 mutations. *Brain Dev* 38:520-524.
- Iossifov I, O'Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, Stessman HA, Witherspoon K, Vives L, Patterson KE, *et al.* (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 13:216-221.

- Johnson MR, Shkura K, Langley SR, Delahaye-Duriez A, Srivastava P, Hill WD, Rackham OJL, Davies G, Harris SE, Moreno-Moral A, *et al.* (2016) Systems genetics identifies a convergent gene network for cognition and neurodevelopmental disease. *Nat Neurosci* 19:223-32.
- Kay C, Skotte NH, Southwell AL and Hayden MR (2014) Personalized gene silencing therapeutics for Huntington disease. *Clin Genet* 86:29-36.
- Kempf L, Nicodemus KK, Kolachana B, Vakkalanka R, Verchinski BA, Egan MF, Straub RE, Mattay VA, Callicott JH, Weinberger DR, *et al.* (2008) Functional polymorphisms in *PRODH* are associated with risk and protection for schizophrenia and fronto-striatal structure and function. *PLoS Genet* 4:e1000252.
- Khan ZA, Chhabra H and Mohan C (2013) Computational analysis of the coding single nucleotide polymorphisms of disrupted in schizophrenia 1 (*DISC 1*) gene. *World J Med Sci* 8:28-35.
- Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Wong W, *et al.* (2012) Rate of *de novo* mutations, father's age, and disease risk. *Nature* 488:471-475.
- Korte SM, Koolhaas JM, Wingfield JC and McEwen BS (2005) The Darwinian concept of stress: Benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev* 29:3-38.
- Kress JA, Kühnlein P, Winter P, Ludolph AC, Kassubek J, Müller U and Sperfeld AD (2005) Novel mutation in the *ALS2* gene in juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 58:800-803.
- Lachance J and Tishkoff SA (2013) Population gnomics of human adaptation. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 44:123-143.
- Leffler EM, Gao Z, Pfeifer S, Segurel L, Auton A, Venn O, Bowden R, Bontrop R, Wall JD, Sella G, *et al.* (2013) Multiple instances of ancient balancing selection shared between humans and chimpanzees. *Science* 339:1578-1582.
- Li J, Cai T, Jiang Y, Chen H, He X, Chen C, Li X, Shao Q, Ran X, Li Z, *et al.* (2015) Genes with *de novo* mutations are shared by four neuropsychiatric disorders discovered from NPdenovo database. *Mol Psychiatry* 21:290-297.
- Lips ES, Cornelisse LN, Toonen RF, Min JL, Hultman CM, Holmans PA, O'Donovan MC, Purcell SM, Smit AB, Verhage M, *et al.* (2012). Functional gene group analysis identifies synaptic gene groups as risk factor for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 17:996-1006.
- Lombardi MS, Jaspers L, Spronkmans C, Gellera C, Taroni F, Di Maria E, Donato SD and Kaemmerer WF (2009) A majority of Huntington's disease patients may be treatable by individualized allele-specific RNA interference. *Exp Neurol* 217:312-319.
- Lonn E, Koskela E, Mappes T, Mokkonen M, Sims AM and Watts PC (2017) Balancing selection maintains polymorphisms at neurogenetic loci in field experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:3690-3695.
- Ludwig KU, Mattheisen M, Mühleisen TW, Roeske D, Schmal C, Breuer R, Schulte-Körne G, Müller-Myhsok B, Nöthen MM, Hoffmann P, *et al.* (2009) Supporting evidence for *LRRTM1* imprinting effects in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 14:743-745.
- Mata IF, Ross OA, Kachergus J, Huerta C, Ribacoba R, Moris G, Blazquez M, Guisasola LM, Salvador C, Martinez C, *et al.* (2006) *LRRK2* mutations are a common cause of Parkinson's disease in Spain. *Eur J Neurol* 13:391-394.
- McVicker G, Gordon D, Davis C and Green P (2009) Widespread genomic signatures of natural selection in hominid evolution. *PLoS Genet* 5: e1000471.
- Mesoudi A (2016) Cultural evolution: Integrating psychology, evolution and culture. *Curr Opin Psychol* 7:17-22.
- Meyer M, Kircher M, Gansauge M-T, Li H, Racimo F, Mallick S, Schraiber JG, Jay F, Prüfer K, de Filippo C, *et al.* (2012). A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. *Science* 338:222-226.
- Moorjani P, Amorim CEG, Arndt PF and Przeworski M (2016) Variation in the molecular clock of primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 38:10607-10612.
- Mounier A, Balzeau A, Caparros M and Grimaud-Hervé D (2016) Brain, calvarium, cladistics: A new approach to an old question, who are modern humans and Neanderthals? *J Hum Evol* 92:22-36.
- Nakajima J, Okamoto N, Tohyama J, Kato M, Arai H, Funahashi O, Tsurusaki Y, Nakashima M, Kawashima H, Saitsu H, *et al.* (2015) *De novo* *EEF1A2* mutations in patients with characteristic facial features, intellectual disability, autistic behaviors and epilepsy. *Clin Genet* 87:356-361.
- Nataf S (2017) Autoimmunity as a driving force of cognitive evolution. *Front Neurosci* 11:582.
- Nettle D (2006) Schizotypy and mental health amongst poets, visual artists, and mathematicians. *J Res Pers* 40:876-890.
- Ng PC and Henikoff S (2003) SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31:3812-3814.
- Nielsen R, Hubisz MJ, Hellmann I, Torgerson D, Andrés AM, Albrechtsen A, Gutenkunst R, Adams MD, Cargill M, Boyko A, *et al.* (2009) Darwinian and demographic forces affecting human protein coding genes. *Genome Res* 19:838-849.
- Nordborg M, Charlesworth B and Charlesworth D (1996) Increased levels of polymorphism surrounding selectively maintained sites in highly selfing species. *Proc R Soc Lond B* 263:1033-1039.
- Ota VK, Bellucco FT, Gadelha A, Santoro ML, Noto C, Christofolini DM, Assunção IB, Yamada KM, Ribeiro-dos-Santos AK, Santos S, *et al.* (2014) *PRODH* polymorphisms, cortical volumes and thickness in schizophrenia. *PLoS One* 9:e87686.
- Paixão-Côrtes VR, Viscardi LH, Salzano FM, Cátira Bortolini M and Hünemeier T (2013) The cognitive ability of extinct hominins: Bringing down the hierarchy using genomic evidences. *Am J Hum Biol* 25:702-705.
- Pakstis AJ, Speed WC, Fang R, Hyland FCL, Furtado MR, Kidd JR and Kidd KK (2010) SNPs for a universal individual identification panel. *Hum Genet* 127:315-324.
- Pandarakalam JP (2013) Is autoimmunity involved in the aetiology of schizophrenia? *Prog Neurol Psychiatry* 17:24-28.
- Pike AWG, Hoffmann DL, Garcia-Diez M, Pettitt PB, Alcolea J, De Balbin R, Gonzalez-Sainz C, de las Heras C, Lasheras JA, Montes R, *et al.* (2012) U-series dating of Paleolithic art in 11 caves in Spain. *Science* 336:1409-1413.
- Polimeni J and Reiss JP (2003) Evolutionary perspectives on schizophrenia. *Can J Psychiatry* 48:34-39.

- Ponce de León MS, Bienvenu T, Akazawa T and Zollhofer CPE (2016) Brain development is similar in Neanderthals and modern humans. *Curr Biol* 26:R665-R666.
- Power RA, Steinberg S, Bjornsdottir G, Rietveld CA, Abdellaoui A, Nivard MM, Johannesson M, Galesloot TE, Hottenga JJ, Willemsen G, *et al.* (2015) Polygenic risk scores for schizophrenia and bipolar disorder predict creativity. *Nat Neurosci* 18:953-955.
- Prata DP, Breen G, Munro J, Sinclair M, Osborne S, Li T, Kerwin R, St Clair D and Collier DA (2006) Bipolar I disorder is not associated with the RGS4, PRODH, COMT and GRK3 genes. *Psychiatr Genet* 16:229-230.
- Prüfer K, Racimo F, Patterson N, Jay F, Sankararaman S, Sawyer S, Heinze A, Renaud G, Sudmant PH, de Filippo C, *et al.* (2014) The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature* 505:43-49.
- Pruitt JNJ and Riechert SSE (2011) How within-group behavioural variation and task efficiency enhance fitness in a social group. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 278:1209-1215.
- Pybus M, Dall'Olio GM, Luisi P, Uzkudun M, Carreño-Torres A, Pavlidis P, Laayouni H, Bertranpetit J and Engelken J (2014) 1000 Genomes Selection Browser 1.0: A genome browser dedicated to signatures of natural selection in modern humans. *Nucleic Acids Res* 42:1-7.
- Quinlan AR and Hall IM (2010) BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26:841-842.
- Reich D, Green RE, Kircher M, Krause J, Patterson N, Durand EY, Viola B, Briggs AW, Stenzel U, Johnson PLF, *et al.* (2010) Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* 468:1053-1060.
- Rendu W, Beauval C, Crevecoeur I, Bayle P, Balzeau A and Bismuth T (2013). Evidence supporting an intentional Neanderthal burial at La Chapelle-aux-Saints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:81-86.
- Rouskas K, Paletas K, Kalogeridis A, Sarigianni M, Ioannidou-Papagiannaki E, Tsapas and Kouvatsi A (2008) Association between BBS6/MKKS gene polymorphisms, obesity and metabolic syndrome in the Greek population. *Int J Obes* 32:1618-1625.
- Schaschl H, Huber S, Schaefer K, Windhager S, Wallner B and Fieder M (2015) Signatures of positive selection in the cis-regulatory sequences of the human oxytocin receptor (OXTR) and arginine vasopressin receptor 1a (AVPR1A) genes. *BMC Evol Biol* 15:85.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511:421-427.
- Ségurel L, Thompson EE, Flutre T, Lovstad J, Venkat A, Susan W, Moyse J, Ross S, Gamble K and Sella G (2013) Correction for Segurel *et al.*, The ABO blood group is a trans-species polymorphism in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6607-6607.
- Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N, Tooley K, Presumey J, Baum M, Van Doren V, *et al.* (2016) Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 530:177-183.
- Shahkarami S, Galehdari H, Ahmadzadeh A, Babaahmadi M and Pedram M. (2013) The first molecular genetics analysis of individuals suffering from nephropatic cystinosis in the Southwestern Iran. *Nefrologia* 33:308-315.
- Shaltout TE, Alali KA, Bushra S, Alkaseri AM, Jose ED, Al-Khainji M, Saleh R, Salama Dahir A, Shaltout H, Al-Abdullah M, *et al.* (2013) Significant association of close homologue of L1 gene polymorphism rs2272522 with schizophrenia in Qatar. *Asia-Pacific Psychiatry* 5:17-23.
- Sih A, Bell A and Johnson JC (2004) Behavioral syndromes: An ecological and evolutionary overview. *Trends Ecol Evol* 19:372-378.
- Srinivasan S, Bettella F, Mattingsdal M, Wang Y, Witoelar A, Schork AJ, Thompson WK, Zuber V, Winsvold BS, Zwart JA, *et al.* (2015) Genetic markers of human Evolution are enriched in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 80:284-292.
- Takahata N and Nei M (1990) Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* 124:967-978.
- Taub DR and Page J (2016) Molecular signatures of natural selection for polymorphic genes of the human dopaminergic and serotonergic systems: A review. *Front Psychol* 7:857.
- Teixeira JC, De Filippo C, Weihmann A, Meneu JR, Racimo F, Dannemann M, Nickel B, Fischer A, Halbwax M, Andre C, *et al.* (2015) Long-term balancing selection in LAD1 maintains a missense trans-species polymorphism in humans, chimpanzees, and bonobos. *Mol Biol Evol* 32:1186-1196.
- The 1000 Genomes Project Consortium (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature* 526:68-74.
- Tomiya H, Kokubo Y, Sasaki R, Li Y, Imamichi Y, Funayama M, Mizuno Y, Hattori N and Kuzuhara S (2008) Mutation analyses in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. *Mov Disord* 23:2344-2348.
- Vallender EJ (2011) Comparative genetic approaches to the evolution of human brain and behavior. *Am J Hum Biol* 23:53-64.
- Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M and Ng PC (2016) SIFT missense predictions for genomes. *Nat Protoc* 11:1-9.
- Vissers LELM, Gilissen C and Veltman JA (2015) Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet* 17:9-18.
- Wang Q, Yang C, Gelernter J and Zhao H (2015) Pervasive pleiotropy between psychiatric disorders and immune disorders revealed by integrative analysis of multiple GWAS. *Hum Genet* 134:1195-1209.
- Wilson EO and Hölldobler B (2005) Eusociality: Origin and consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13367-13371.
- Wolf M, van Doorn GS, Leimar O and Weissing FJ (2007) Life-history trade-offs favour the evolution of animal personalities. *Nature* 447:581-584.
- Yuen RKC, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammiies K, Hoang N, Chrysler C, Nalpathamkalam T, Pellicchia G, Liu Y, *et al.* (2015) Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nat Med* 21:185-191.
- Zhang H and Perc M (2016) Evolution of conditional cooperation under multilevel selection. *Sci Rep* 6:23006.
- Zilhão J and Trinkaus E (2002) Anatomie, contexte archéologique et sépulture de l'enfant Gravettien De L'Abri de Lagar Velho. *Praehistoria* 3:131-145.
- Zilhão J, Angelucci DE, Badal-García E, d'Errico F, Daniel F, Dayet L, Douka K, Higham TFG, Martínez- Sánchez MJ, *et al.* (2010) Symbolic use of marine shells and mineral pig-

ments by Iberian Neandertals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1023-1028.

Supplementary material

The following online material is available for this article:
Figure S1 - Density distribution of the average number of polymorphisms per gene.

Table S1 - GO terms used for target genes playing a role in immune and behavioral systems.

Table S2 - Target genes that could not be matched to at least one similar gene in the exome.

Table S3 - Polymorphisms shared between Neanderthals and modern humans.

Table S4 - Polymorphisms shared between Neanderthals and modern humans, including sites within CpG sites.

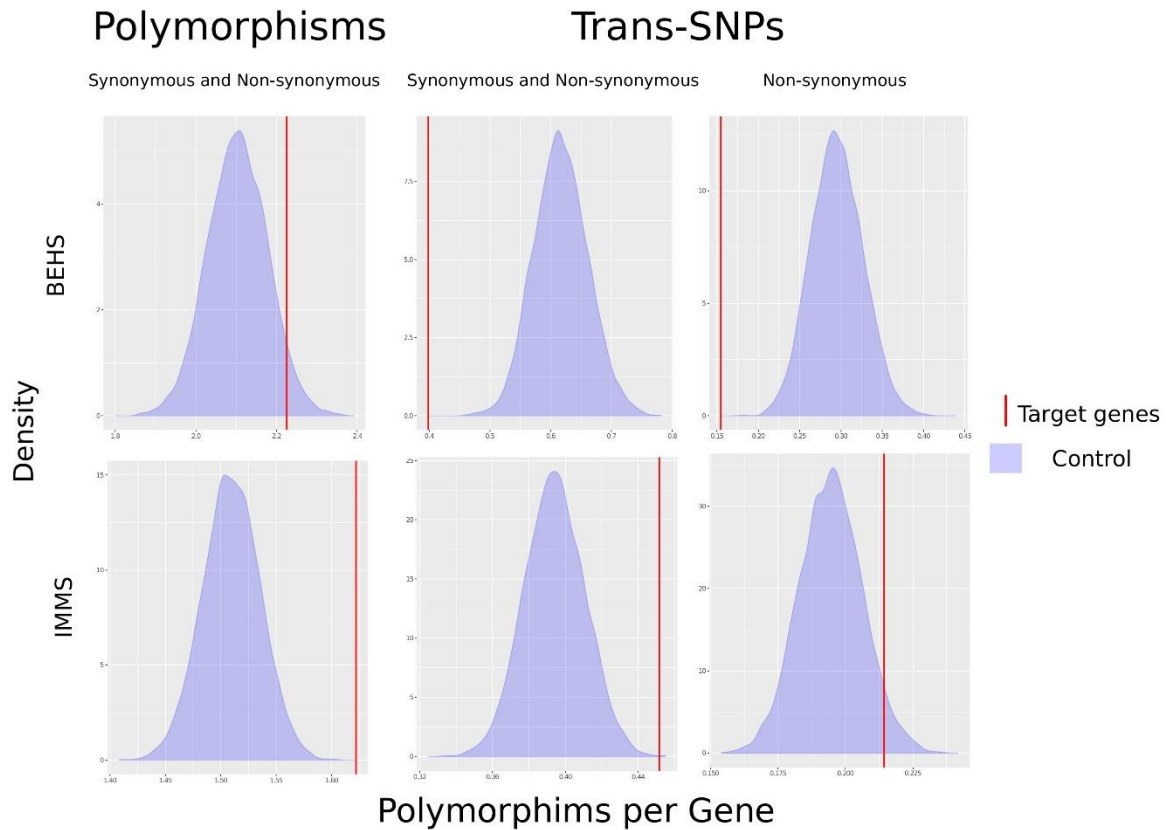
Table S5 - Percentiles of the distribution of the mean values of polymorphism per gene.

Associate Editor: Carlos F.M. Menck

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (type CC-BY), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original article is properly cited.

Supplementary Material to “Searching for ancient balanced polymorphisms shared between Neanderthals and Modern Humans”

Figure S1 - Density distribution of the average number of polymorphisms per gene observed for random sets of genes (blue shade) in the Neanderthal samples matched to those included in the IMMS and BEHS target gene sets (red bars), including genes located in CpG sites.



The Y-axis shows the frequency with which an average number of polymorphisms per gene (shown on the X-axis) occurs in 10,000 random sets of genes matched to genes in our target systems (BEHS or IMMS) with respect to exon length, GC content, B-value and number of polymorphisms (see Material and Methods for details).

Supplementary Material to “Searching for ancient balanced polymorphisms shared between Neanderthals and Modern Humans”

TableS1 - Gene Ontology (GO) terms used for target genes playing a role in immune and behavioral systems.

GO	Description	System
GO:0002118	Aggressive behavior	Behavioral
GO:0002209	Behavioral defense response	Behavioral
GO:0001662	Behavioral fear response	Behavioral
GO:0048266	Behavioral response to pain	Behavioral
GO:0007619	Courtship behavior	Behavioral
GO:0035640/GO:0035641	Exploratory behavior	Behavioral
GO:0008050	Female courtship behavior	Behavioral
GO:0060180	Female mating behavior	Behavioral
GO:0051866	General adaptation syndrome	Behavioral
GO:0007625	Grooming behavior	Behavioral
GO:0002376	Immune system process	Immune
GO:0002121	Inter-male aggressive behavior	Behavioral
GO:0008049	Male courtship behavior	Behavioral
GO:0060179	Male mating behavior	Behavioral
GO:0002125	Maternal aggressive behavior	Behavioral
GO:0042711	Maternal behavior	Behavioral
GO:0007617	Mating behavior	Behavioral
GO:0044705	Multi-organism reproductive behavior	Behavioral
GO:0007621	Negative regulation of female receptivity	Behavioral
GO:0060746	Parental behavior	Behavioral
GO:2000822	Regulation of behavioral fear response	Behavioral
GO:0045924	Regulation of female receptivity	Behavioral
GO:2000821	Regulation of grooming behavior	Behavioral
GO:0033057	Reproductive Behavior	Behavioral
GO:0044704	Single-organism reproductive behavior	Behavioral
GO:0035176	Social Behavior	Behavioral

Supplementary Material to “Searching for ancient balanced polymorphisms shared between Neanderthals and Modern Humans”

Table S2 –Target genes that could not be matched to at least one similar gene in the exome with respect to exon length, B-value, GC content and number of polymorphisms.

Immune System	Behavior System
<i>ACTB</i>	<i>EIF4G1</i>
<i>ACTG1</i>	<i>HTT</i>
<i>APOB</i>	<i>SHANK1*</i>
<i>C4B_2</i>	<i>TRRAP</i>
<i>C4B</i>	<i>WDFY3</i>
<i>CENPE</i>	<i>KDM6B</i>
<i>DYNC1H1</i>	
<i>DYNC2H1</i>	
<i>EP300</i>	
<i>HLA-A</i>	
<i>HLA-B</i>	
<i>HLA-C</i>	
<i>HLA-DQA1</i>	
<i>HLA-DQB1</i>	
<i>HLA-DRB1</i>	
<i>HLA-DRB5</i>	
<i>KMT2A</i>	
<i>LYST</i>	
<i>MAP1A</i>	
<i>MUC4</i>	
<i>NBEAL2</i>	
<i>NCOA6</i>	
<i>NOTCH1*</i>	
<i>PIK3C2G*</i>	
<i>PKHD1L1</i>	
<i>PRKDC</i>	

*Genes excluded only from analyses including CpG sites.

Supplementary Material to “Searching for ancient balanced polymorphisms shared between Neanderthals and Modern Humans”

Table S3 - General description of polymorphisms shared between Neanderthals* and modern humans.

Description	Number of polymorphisms
Input matching reference assembly	4117
Input matching as coding regions	99.95% (4115 out of 4117)
Tolerated	86.33% (3554 out of 4117)
Deleterious	10.54% (434 out of 4117)
Not Scored	3.13% (129 out of 4117)
Nonsynonymous	53.22% (2191 out of 4117)
Synonymous	46.85% (1929 out of 4117)
NonCoding (UTR)	0.48% (2 out of 4117)
Novel	7.68% (316 out of 4117)
rsID	92.32% (3801 out of 4117)
Genes	2519

* Observed heterozygosity at the individual level was assumed to reflect population-wide polymorphism.

Supplementary Material to “Searching for ancient balanced polymorphisms shared between Neanderthals and Modern Humans”

Table S4 - General description of polymorphisms shared between Neanderthals* and modern humans, including sites within CpG sites.

Description	Number of polymorphisms
Input matching reference assembly	8387
Input matching as coding regions	99.9% (8382 out of 8387)
Tolerated	84.49% (7086 out of 8387)
Deleterious	12.72% (1067 out of 8387)
Not Scored	2.79% (234 out of 8387)
Nonsynonymous	49.81% (4175 out of 8382)
Synonymous	50.19% (4207 out of 8382)
NonCoding (UTR) and lincRNA	5.96 x 10 ⁻⁴ (5 out of 8387)
Novel	11.42% (958 out of 8387)
rsID	88.58% (7429 out of 8387)
Genes	4900

* Observed heterozygosity at the individual level was assumed to reflect population-wide polymorphism.

Supplementary Material to “Searching for ancient balanced polymorphisms shared between Neanderthals and Modern Humans”

Table S5 - Percentiles of the distribution of the mean values of polymorphism per gene in 10,000 random combinations simulating each of the proposed target gene systems (IMMS and BEHS), including sites within CpG sites¹.

Percentile	IMMS			BEHS		
	SNPs	Shared NonSyn	Shared SNPs	SNPs	Shared NonSyn	Shared SNPs
%						
5	1.466360	0.175599	0.367161	1.981550	<u>0.243542</u>	<u>0.546125</u>
10	1.476050	0.179590	0.372862	2.007380	0.254613	0.560886
15	1.482330	0.182440	0.376853	2.025830	0.261993	0.568266
20	1.487460	0.184721	0.379704	2.040590	0.269373	0.579336
25	1.492020	0.187001	0.382554	2.051660	0.273063	0.586716
30	1.496010	0.188712	0.385405	2.066420	0.276753	0.594096
35	1.499430	0.189852	0.387685	2.073800	0.284133	0.597786
40	1.502850	0.191562	0.389966	2.084870	0.287823	0.605166
45	1.506270	0.193273	0.391676	2.095940	0.291513	0.608856
50	1.509690	0.194413	0.393957	2.103320	0.295203	0.616236
55	1.513110	0.196123	0.396237	2.114390	0.298893	0.619926
60	1.516530	0.197263	0.397948	2.121770	0.302583	0.627306

Percentile	IMMS			BEHS		
65	1.519950	0.198974	0.400228	2.132840	0.306273	0.634686
70	1.523380	0.200684	0.402509	2.143910	0.309963	0.638376
75	1.527370	0.202395	0.405359	2.154980	0.317343	0.645756
80	1.531360	0.204675	0.408210	2.166050	0.321033	0.653137
85	1.536490	0.206956	0.411631	2.180810	0.328413	0.664207
90	1.542817	0.209806	0.416192	2.199260	0.335793	0.675277
95	1.552450	0.213797	0.421352	2.225090	0.346863	0.690037
100	1.606040	0.241733	0.454960	2.391140	0.439114	0.782288

¹ Values close to the mean number of polymorphism per gene for each of the target gene sets (IMMS and BEHS) are in italic and underlined, while significant values are in bold. Mean values for the IMMS gene set: Shared and non-shared SNPs = 1.62201, Shared non-synonymous polymorphisms = 0.214367, Shared SNPs = 0.451539; Mean values for the BEHS gene set: 2.225090, 0.154982, 0.398524.

CAPÍTULO IV

Manuscrito em fase final de redação: *EVOLUTIONARY ANALYSIS OF THE HUMAN NEUROTRANSMITTERS NETWORK*

Viscardi LH, Imperato D, Bortolini MC, Dalmolin RJ

Possível revista: *Molecular Biology Evolution*

*“Quanto mais atrás possas ver, mais
afrente verás”
Winston Churchill*

Evolutionary Analysis of the Human Neurotransmitters Network

Lucas Henriques Viscardi^{a*}, Danilo Imparato^{b*}, Maria Cátira Bortolini^{a§}, Rodrigo Juliani Dalmolin^{b§}

*these authors contributed equally to this work

^aDepartamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil; ^bBioinformatics Multidisciplinary Environment, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

Biochemistry Department, UFRN

§To whom correspondence should be addressed: rodrigo.dalmolin@imd.ufrn.br or maria.bortolini@ufrgs.br.

ABSTRACT

It has been proposed that the last common ancestor of all synapses emerged right before the Cnidarians. However, the presence of other synaptic elements (*e.g.* neurotransmitters) in a handful of taxa within eukaryotes raises the question of when the network of nervous system would be already established in evolution. Here, we searched for the origin of genes associated with the evolution of human synapses and their interaction for five major neurotransmitter systems (GABA, Glutamate, Serotonin, Dopamine and Acetylcholine). We tracked down the origin of each component of the gene/protein interaction network following the phylogenetic tree, searching for orthologs in 238 eukaryotes. Our outcome indicated that a representative part of the orthologs from the whole network were already present in the common ancestral of all eukaryotes. The dopaminergic system was identified as the most representative system in the basal root of eukaryotes, with most of its orthologs being exclusively from dopaminergic system. The nervous system is marked by the origin of a great group of neuro-exclusive genes, identified in root leading to the Cnidarians, corroborating previous studies. Importantly, by two approaches we were able to discriminate neuro-exclusivity in the network topology, mainly identified in the periphery. Furthermore, no innovations regarding the archetype of orthologs groups can be observe after the origin of fishes, suggesting the whole-genome duplication could be one of the great causes for the evolution of nervous-system complexity.

1. Introduction

The evolution of the first proto-synapses dates back to around 1.036 Mya, right before the emergence of nervous system in the origin of eumetazoans (Ryan and Grant 2009; Zakon 2012). One of the earliest organisms in animal evolution with a nervous system is the *Nematostella vectensis*, a Cnidarian with a simple and diffuse nerve net throughout the animal's body (Krishnan and Schioth 2015). However, some studies that assume ctenophores as a sister group of eumetazoan propose that nerve cells have independent origins in a cnidarian/bilaterian common ancestor and in the ctenophores. Besides, it is also proposed that such structures were present in the common ancestor of all animals and posteriorly lost in Porifera and Placozoa (Moroz et al. 2014; Moroz 2015; Pisani et al. 2015). Regardless origin of nerve structure, the most ancient pre- and postsynaptic orthologs are claim to be associated with glutamate, the most abundant excitatory neurotransmitter in the brain of vertebrates (Gou et al. 2012), and with the γ -aminobutyric acid (GABA) (Gou et al. 2012; Moroz et al. 2014). GABA and glutamate neurotransmitters present antagonistic functions within nervous system: while GABA exerts inhibitory functions, the glutamate promotes excitation (Gou et al. 2012). Previous studies demonstrated that metazoans without nervous systems (*e.g* sponges and placozoans), and even unicellular eukaryotes, may carry some synaptic components as part of cell-cell signal transmission mechanisms (Leys 2015). In fact, many metazoan genes involved with postsynaptic signaling pathways as well as synaptic plasticity play role in environmental response pathways in unicellular organisms (El-Sayed et al. 2005; Achim and Arendt 2014; Ryan 2014; Krishnan and Schioth 2015). Mechanism by which presynaptic proteins required for secretion of neurotransmitters, and other several synaptic protein homologs, are found in the closest relatives of metazoans, the choanoflagellates (Burkhardt 2015). As Glutamate and GABA, the neurotransmitter serotonin is also found early in evolution, like algae, fungi, molds and plants (Azmitia 2010). Serotonin is commonly associated as mediator of particular behaviors (*e.g.* feeding, sex, sleep, and learning) (Brummett et al. 2008; Dobson and Brent 2013). However, the original functions of serotonin are speculated to be associated within the pathway of removing excess of O₂ from the cell due to its origin from the tryptophan processing by enzymes commonly used in anaerobic organisms (Azmitia 2010); with some authors suggesting its origin in the mitochondrial immediate ancestor (Andrews et al. 2015). Most of the gene families involved with G-protein-coupled receptor (GPCR)

signaling were already present in the last common ancestor of eukaryotes (de Mendoza et al. 2014). GPCRs are involved in a considerable number of processes, including neurotransmission, and synapse formation and development. The presence, even after the transition to multicellularity, of a conserved signaling transduction (de Mendoza et al. 2014) highlights the importance to analyze novelties within the network of proteins that interact with such machinery along the evolution leading to modern humans (Bosch et al. 2017).

The evolution and origin of nervous system have always called the attention of physical anthropologists and geneticists due to the complex behavior and large proportion of the *Homo sapiens* brain. Although several studies were handled throughout candidate gene analyses (Dorus et al. 2004), and genome comparisons (Wu et al. 2006; de Mendoza et al. 2014; Burkhardt 2015; Krishnan and Schioth 2015), there is a gap in the understanding about the evolution of gene interaction network of human neuronal system. Recently, genome-wide association studies (GWAS) searching for genetic variants associated with many diseases, have successively identified only minuscule influences on disease (Boyle et al. 2017; Callaway 2017). Additionally, the probable early origin of some neurotransmitters, like glutamate, GABA and serotonin, clouds the analyses from GWAS as they can be playing role in other several functions than neurotransmission.

At molecular level, no work has been deeply discussed about the evolutionary network of synaptic neurotransmitters that gave rise to the current human neuronal system. Throughout the analysis of biochemical neurotransmission pathway and its evolution it would be possible to identify important genes in the neurotransmitter network that emerged as a limestone for our current nervous system. In this study, we inferred the ancestral gene network playing role in the evolution of human synapses, since the putative last-common ancestor of eukaryotes for the five major neurotransmitters (GABA, Glutamate, Serotonin, Dopamine and Acetylcholine). We tracked down the origin of each node of the current neurotransmitter network following the phylogeny of eukaryotic evolutionary tree, searching for orthologues of compared species. Still, it was possible to observe the major peak events in gene arisen through eukaryotic evolutionary tree, with the last elements emerging in fishes.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Synaptic neurotransmission genes selection

Human neurotransmission genes used throughout this work were retrieved from KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathway Database API (<http://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi>) as being present in one of the following available nervous systems pathways: Cholinergic synapse (hsa04725), Dopaminergic synapse (hsa04728), GABAergic synapse (hsa04727), Glutamatergic synapse (hsa04724), and Serotonergic synapse (hsa04726), yielding a list of 322 unique Entrez Gene identifiers.

2.2 Synaptic neurotransmission gene network

Entrez Gene identifiers were mapped to ENSEMBL Protein and HGNC Symbol and queried against STRING 10.5, a database that gathers direct and indirect protein-protein interactions from multiple sources (Szklarczyk et al. 2017). 319 of the initial 322 genes were found in STRING 10.5 and therefore remained in subsequent analysis (supplementary table 1, Supplementary Material online). Interactions were filtered for high confidence scores (0.7 or greater) computed from STRING's experimental and database evidence channels (von Mering et al. 2005) and then used to produce a force-directed layout via RedeR, an R-based package available at Bioconductor (Castro et al. 2012). Visualizations were plotted using ggplot2.

2.3 Evolutionary Rooting Analysis

To address the history of genes and their corresponding neurotransmission pathways, an evolutionary rooting analysis was carried out using geneplast, a Bioconductor R package developed for evolutionary analysis based on orthologous groups distribution (Dalmolin et al. 2011; Dalmolin 2015). All genes contained annotation for at least one cluster of orthologous groups (COG) such that we assume a one-to-many relationship between COG IDs (91) and genes. Geneplast determines the most probable evolutionary root of an orthologous group by analyzing the distribution of its genes in a given species tree. In this work we used a manually curated tree spanning all 238 STRING eukaryotes (Supplementary Fig. 1, Supplementary Material online).

2.4 Genes neuro-exclusivity

2.4.1 Neurological pathways

All pathways in which neurotransmission genes took part were manually annotated as being neurologically related or not (supplementary table 2, Supplementary Material online). For each gene, the ratio between its number of neural pathways and its total number of pathways was calculated to quantify neuro-exclusivity (supplementary table 3; Supplementary Material online). We named this estimation as Neurological Pathway Ratio (NPR), with genes with ratio equals to one (1) classified as Neuro-exclusive (NE). Genes within broad base metabolism pathways “Pathways in cancer” (path:hsa05200), “Transcriptional misregulation in cancer” (path:hsa05202) and “Metabolic pathways” (path:hsa01100) were excluded from NE group.

2.4.2 Neurological expression

All tissue-based human expression data available at EBI’s Expression Atlas (Petryszak et al. 2015) platform was collected, consisting of 9 RNA-Seq projects and covering a total of 120 different tissues (E-MTAB-513, E-MTAB-2836, E-MTAB-2919, E-MTAB-3358, E-MTAB-3708, E-MTAB-3716, E-MTAB-4344, E-MTAB-4840, E-MTAB-5214). We manually annotated each tissue as being part of the central nervous system (CNS) or not. Fragments per million reads per kb of transcript (FPKM) gene expression across projects was first compiled into an average by tissue. We then filtered out averages lower than 0.5 (supplementary table 4; Supplementary Material online; Kellis et al. 2014). For each gene, a ratio between the sum of its expression in CNS tissues and the sum of its expression in all tissues was calculated to quantify neuro-exclusivity. Here, we named this measure as Neurological Tissue Expression Ratio (NTER).

2.5 Abundance

Gene abundance was calculated by averaging the number of genes per neurotransmission orthologous groups present in each species. We also computed abundance values for each synaptic pathway as a way to decompose their contribution to the overall abundance trend.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Neurotransmitter gene Network Composition

Our analysis started by selecting human genes involved with synaptic transmission. We selected 322 genes by accessing the five major neurotransmitter systems (dopaminergic, glutamatergic, serotonergic, cholinergic, and GABAergic) in KEGG database (supplementary table S1; Supplementary Material online). Among the 322 genes, 319 have protein-protein interaction information in STRING database (see methods for PPI parameters). Fig. 1 shows the human neurotransmitter gene network, with 291 genes in the largest connected component, 17 genes in small isolated networks, and 11 not connected genes. Several genes play roles in more than one synaptic system (Fig. 1). About 10% of the network (31 nodes) are composed by genes that play role in all the five synaptic systems, most of them coding for G-protein, calcium voltage-gated channel subunits, protein kinases, and adenylate cyclase. Those genes are involved with downstream signaling cascade of synaptic transmission. The network core is enriched by genes simultaneously belonging to at least three synaptic systems (55 network nodes; Fig. 1A).

Cholinergic, serotonergic, and glutamatergic systems have very similar number of genes when compared among each other (111, 112, and 113, respectively). Dopaminergic system has the larger number of genes, totaling 131 nodes. Among them, 56 nodes are exclusively related to dopaminergic synapses (Fig. 1B). GABAergic is the smaller system with 87 genes, being 36 genes exclusive to GABAergic synapses. Dopaminergic-related nodes are found throughout the network and more than 98% of them are in the network main component. GABAergic-exclusive genes are mainly found at the network periphery and less than 80% of them are present in the largest connected component. GABA is known to mainly exert inhibitory function except during brain maturation development (Ben-Ari 2002). On the other hand, glutamate, serotonin, dopamine and acetylcholine can be either excitatory or inhibitory, depending on the tissue of expression and receptor which they interact). Even the main excitatory neurotransmitter in brain, the glutamate, can present eventual roles as inhibitor (Liu and Wilson 2013), or during its decreased excitation due to the excitatory function of acetylcholine, as a possible form of neuronal plasticity (Belousov et al. 2001).

Therefore, the similar number of orthologs observed in such systems can be indicated as a reflection of their function overlapping, likewise their multifunctionality.

3.2 Human neurotransmitter gene network evolution

Glutamate and GABA are the primary excitatory and inhibitory, and also the most abundant neurotransmitters (Luján et al. 2005; Yang et al. 2011), suggesting that they systems would be more prevalent in the root of eukaryotes than other neurotransmitters. Intriguingly, dopaminergic system is the most widely represented neurotransmitter system in the early roots of the eukaryotic evolutionary tree, with almost half of them uniquely associated with dopaminergic system. Six gene families can be observed at the origin of Eukarya: the CALM, GSK, KIF5, MAPK, PPP1, and PPP2 gene families. Those orthologs families are known to regulate (Moron et al. 2003; Chen et al. 2008; Salcedo-tello et al. 2011; Ehrich et al. 2015) dopamine. However, the same orthologs play also several cellular functions associated with cellular processes - e.g. cell shape, cell regulation, cell division, intracellular transport, spatial and temporal organization of molecules and organelles – and essential pathways (Li et al. 2011; Reddy and Day 2011; Xu et al. 2017; Saidi et al. 2018). Importantly, dopamine is known to present a reasonable degree of evolvability in its receptors (Callier et al. 2003), and differences in its pathway even between close related species, as between humans and old world monkeys (Su et al. 2014). Still, although we expect functional similarity among orthologues (Chen and Jeong 2000) their function can be influenced by the own evolutionary history of both organism and orthologs (Studer and Robinson-Rechavi 2009) which it is relevant to be aware that this linear association is not clear. Thus, although it is possible to speculate that dopamine participated as part of these several cellular essential processes during evolution - while other major neurotransmitters did not – this dopamine-exclusive framework in the origin of the network it is possible that this is a matter only considering *Homo sapiens*. This would explain the current difficulties in candidate-gene researches of dopamine related disorders, as its pathways present nuances that have been established since the common ancestor of eukaryotes in more general but also essential cell functions. Nonetheless, if this framework reflect the real exclusivity of dopamine in the origin of eukaryotes, it would *per se* why paralogous of dopaminergic system are kept in many species despite lacking conservation in their sequence, and lack redundant functions (Yamamoto et al. 2015).

From Protozoa to Metazoans, especially Cnidarians, we observe a progressive emergence of orthologs, which is followed by a stationary period until cephalochordates (Fig. 2). With most of human orthologs found in cephalochordates, few genes emerge after this taxon, being the whole network completed in the origin of fishes (represented here by the group of Actinopterygii; supplementary table 5 and 6; Supplementary Material online).

Although a handful of the network genes were already represented in the origin of eukaryotic tree, the first orthologs of receptors for neurotransmitters were two GABA receptors (*GABBR1* and *GABBR2*) at the common ancestor of Heterokontophyta and the Glutamate Metabotropic receptor gene family (**mGluRs**) at the common ancestor of Choanoflagellate. Still, some receptor-like for GABA orthologs could be identified in early eukaryotes, like the Alveolata (*GABARAP*, *GABARAP1*, *GABARAP2*). These receptor-like genes play a role in intracellular transport of GABA(A) receptors, interacting with the cytoskeleton during the apoptosis and autophagy, which is associated with host defense in mammals (Sasai et al. 2017). However, they are not essential for GABA receptor targeting to the synapse, at least according to knockout models (O'Sullivan et al. 2005), suggesting a late role in synapse development. Importantly, regardless previous GABA receptor-like genes commented, no other neurotransmitter receptor ortholog is found prior to the origin of the Poriferans (Fig. 2). According to our data mGluRs emerged earlier than the firsts Glutamate Ionotropic Receptors (**iGluRs**) genes, but orthologs for iGluRs were already found in *Oscarella carmela* (Burkhardt 2015; Leys 2015), an absent specie in STRING database. This leads to the conclusion that some orthologs for mGluRs and iGluRs probably have evolved both in the common ancestor of Choanoflagellates and Porifera. This is aligned with the proposal that some neurotransmitters are phylogenetically ancient, evolving prior to the appearance of neurons (Azmitia 2010). In evolutionary terms, the glutamate is expected to be the first neurotransmitter to appear in the evolution of eukaryotes. Different from other neurotransmitters, like GABA which is derived from the own glutamate (Albrecht et al. 2010) or as serotonin from the tryptophan, Glutamate is an amino acid *per se* and its cooptation as a neurotransmitter would be the most parsimony path expected, being currently the primary fast excitatory neurotransmitter in the nervous system (Willard and Koochekpour 2013).

We identified the first orthologs for dopamine and serotonin receptors in the common ancestor of the Porifera, while genes coding for acetylcholine receptors, specifically the muscarinic acetylcholine receptors (*CHRM*), were found in the Placozoa (supplementary table 5 and 6;

Supplementary Material online). Following the phylogeny, orthologs coding for GABA, serotonin and nicotinic acetylcholine receptors (*CHRN*) were identified in the common ancestor of Cnidarians, being the latest human orthologs receptors to emerge in the whole dataset. Furthermore, 38 new orthologs were found within the Cnidaria (supplementary table 6; Supplementary Material online), 18 from GABAergic system and a whole module of Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha (*CHRNA*) and Beta (*CHRNB*) localized in the peripheral region of network topology. Importantly, both set of genes play role in the reward system (Sousa et al. 2011; Berrettini and Doyle 2012) a crucial mechanism implicated in memory and learning.

3.3 Neuro-exclusive genes origin

Most of the neurotransmission genes take part of the neurotransmission pathway as responsible for signal transduction or playing also role in a variety of other pathways. Although this is an important part of the whole process, we must discriminate those genes exclusively involved in neurotransmission, as our main question is to search for the main biological background coopted during the evolution of neuronal system. In order to verify neuro-exclusive identification reliability, we discriminated non-neuro-exclusive from neuro-exclusive according to two approaches: by neural pathways ratio, and a complementary analysis using neural tissue expression ratio (Fig. 3). The NPR analysis discriminated 76 NE genes, which are those only identified in pathways associated with neurotransmission. For the NTER analysis we considered continue values of tissue expression ratio, which measures relatedness of a gene with the network and not the neuro-exclusivity *per se*. NPR analysis presented basically the same distribution of those genes with higher ratios for the NTER analysis in the network (Fig. 3). This strength the idea that the neuro-exclusive genes are found, generally, in the periphery of the network.

In figure 2 it is possible to observe that more non-neuro-exclusive genes (NNE) appear as the majority of orthologs since the origin of eukaryotes. This scenario radically changes right before the origin of Cnidarians, with emergence of many NE genes, being them preponderant at this point in evolutionary tree. Therefore, NE genes emerged late in the evolution compared with NNE, which can be speculated as the reason for their peripheral distribution. Particularly, Cnidarians are the first eukaryotes in the tree of life to have nervous system (Ryan and Grant 2009; Bosch et al. 2017), implying that the emergence of NE genes played crucial role during the evolution diffused nerve net of such organisms. Still, it should be stressed that some important NE

genes were also already present in the common ancestor of all eukaryotes like *DLG4*, *SHANK* gene family, and *SLC38A1*.

3.4 Neurotransmitter network dynamics

The distribution of orthologs throughout Eukarya highlights two peaks of values for abundance: i) in the origin of eukaryotes, and ii) in the branch leading to the metazoans. These values suggest that current orthologs playing role in neurotransmission were probably essential for the adaptive process of Protozoa and Cnidarians, contributing for their success in order to other organisms. It is noteworthy that the respective roots are followed by decreasing values of abundance, suggesting more stabilizing periods for neurotransmitter genes, and events of species expansion.

High abundance values, however, can be a consequence from duplication events that occurred much after the origin of the COG itself, leading to false positives. To avoid such artifact, abundance distribution must be verified through normalization by the number of paralogues *per* COG presented in each specie (Fig. 4). After normalization, five major events can be highlighted, following their respective origin: 1) the origin of eukaryotes; 2) the highest abundance peaks in *Trichomonas sp.*; 3) the origin of plants (disregarding algae; Heterokontophyta); and 4) a peak in the origin of Echinodermata (*Strongylocentrotus purpuratus*), followed by 5) a plateau in the fishes (vertebrata origin). The high abundance verified in plants is expected due their polyploidy. The plateau observed in the root of vertebrata allow us to infer that the increase in behavioral diversity and complexity throughout the vertebrata branch would be handle by an increase in the number of paralogues or isoforms rather than new gene families of orthologs. Interestingly, as discussed above, the origin of neurotransmitter receptors dates back to the Cnidarians. However, according to the abundance of such genes, they only reach high abundance after the emergence of Echinodermata, and followed by a plateau in fishes, implying that the system probably afforded advantage promoting duplication not in Cnidarians, but in fishes. From the archetype of cellular signaling observed in the origin of unicellular eukaryotes to the emergence of vertebrates there are several duplication events leading to new orthologs groups. For instance, teleost lineage is known to have passed through whole genome duplication (WGD) about 350 million years ago (Pasquier et al. 2016). WGD events are common associated with adaptive radiations and evolutionary innovations. Regardless the effect of WGD of teleost fishes observed for

neurotransmitter in our data, after the common ancestral of vertebrates, no other orthologous groups emerge. Therefore, the vertiginous neuronal complexity observed throughout the evolution of vertebrates is probably a product of the WGD. However, the opposite direction is also imaginable, as the success of NE genes in Cnidarians probably gave advantage over other organisms, which were followed by the WGD, leading to a handful of duplicated NE genes observed in vertebrates. Finally, it is possible that at this peculiar point in the evolution, regarding neurotransmitter systems analyzed here, novelty was major driven by subtle changes in a highly conserved set of genes, and/or by alternative splicing, which can narrow, enlarge or regulate interaction within the system.

CONCLUSION

System biology allows us to observed from a privileged point of view. Its interdisciplinary grants contribution to filling the gaps of knowledge and integrate uncountable areas of science. This is the first scientific approach of nervous system by matters of system biology integrating the evolutionary interaction of five major neurotransmitters. Our analyses demonstrate that the origin of Cnidarians was a landmark event in the emergence of the neuro-exclusive-genes, implying that the biological background for the evolution of human nervous system has its roots in the time of the nervous system origins *per se*; marked by the emergence of several orthologs coding for neuro-receptors. Besides, since the almost completeness of neurotransmitter network identified in Cnidarians, only few novelties (new orthologs) are observed. No innovations in the archetype of orthologs were observed after the origin of fishes and other vertebrates. Importantly, the observed abundance in the origin of vertebrates indicates that the last round of genome duplication probably boosted the evolution of neurotransmitter network or even were one of the great causes for the evolution of nervous-system complexity.

FIGURES

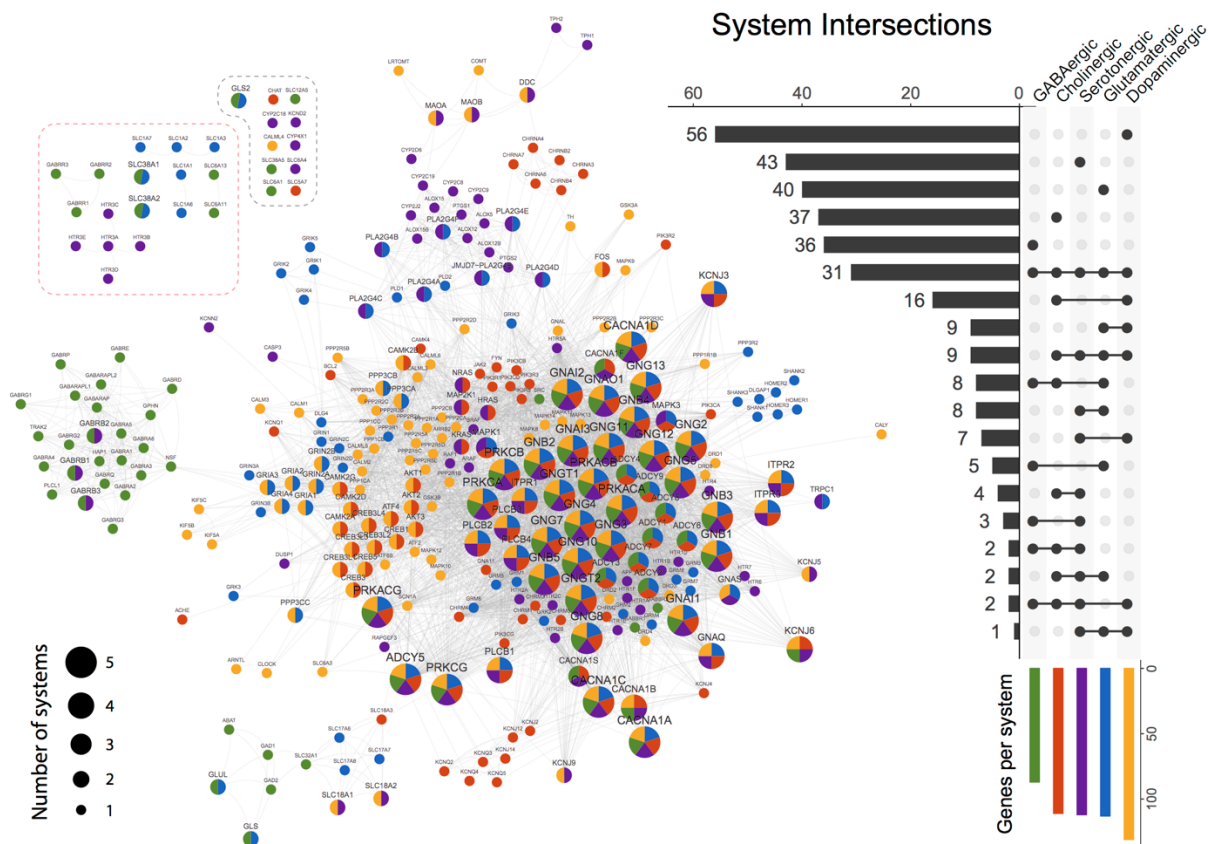


Fig. 1. Human Neurotransmitter gene network. Diagram of gene-gene interaction involved in neurotransmission according to STRING 10.5. Nodes (represented by circles) characterize the orthologs used in this study. The size (bottom left) and color combination (bottom right) of the nodes increases according to the number and type of neurotransmitter systems that it participates, respectively. A schematic description of system intersections (top right) shows the number of orthologs playing role in one or more neurotransmitter systems. Gene-gene interaction is represented in the diagram by their edge, plotted as gray line linking each node. Genes circled by dashed lines represent genes playing role in neurotransmission but present no gene-gene interaction with the main network according to the parameters used in this study (see material and methods): Red dashed lines separate small isolated networks of 17 genes, and dashed grey lines 11 not connected genes.

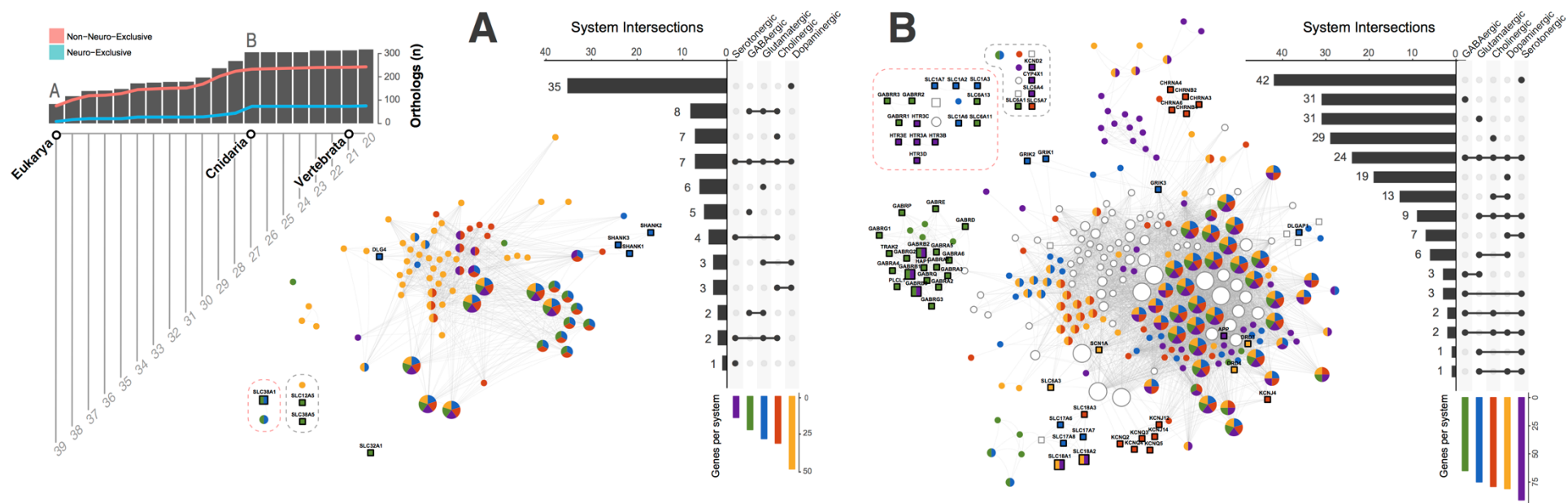


Fig. 2. Comparison between Human Neurotransmitter gene networks in the origin of Eukarya with the last common ancestor of Cnidaria. (A) Network constructed on neuro-orthologs identified in the root of the eukaryotic phylogenetic tree. Circle and squares differentiate those nodes representing non-neuro- and neuro- exclusive, respectively. The size (bottom left) and color combination (bottom right) of the nodes increases according to the number and type of neurotransmitter systems that it participates, respectively. Distribution of neurotransmitter system orthologs (top left) according to the roots inferred in the species tree (plotted below). The followed species tree is plotted only for roots that carry events of orthologs emergence. Red line indicates the distribution only for non-neuro-exclusive genes while blue line represents neuro-exclusive genes distribution. (B) Network constructed on genes identified since the root of the eukaryotic phylogenetic tree to the origin of Cnidarians. White circles represent orthologs that were already present in the putatively common ancestor of eukaryotes (network A). Genes circled by dashed lines represent genes playing role in neurotransmission but with no gene-gene interaction according to the parameters used in this study (see material and methods).

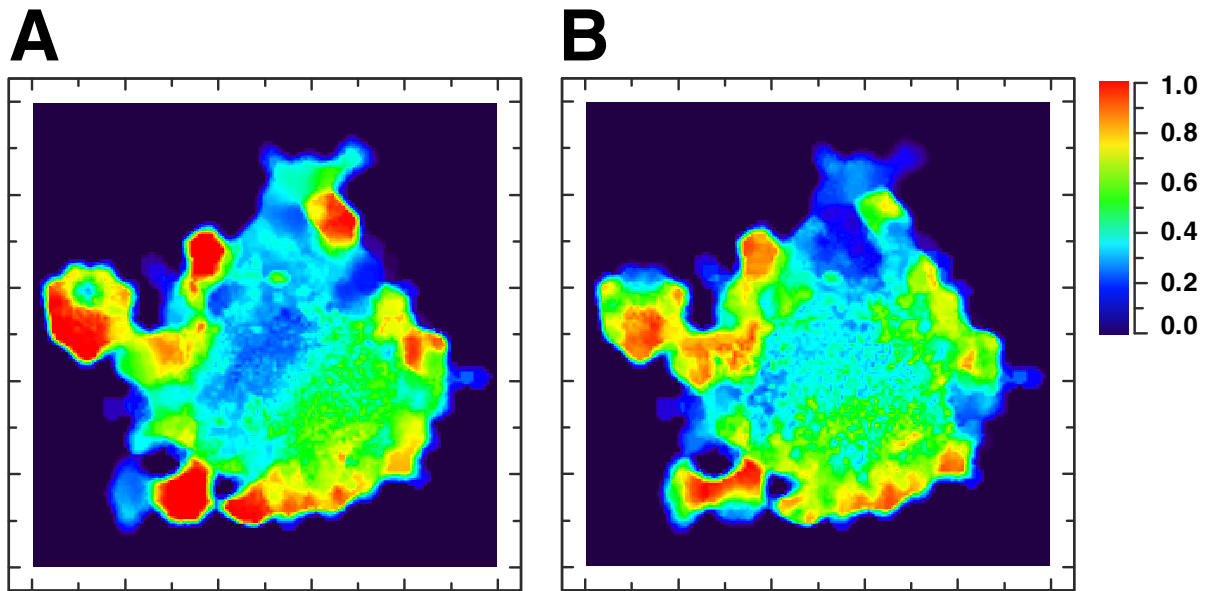


Fig. 3. RedeR plot for neuro-exclusive distribution throughout the neurotransmitter network. (A) Neuro-exclusive genes discriminated according to Neurological Pathway; and (B) quantitative distribution of Neuro-exclusivity Neurological Tissue Expression Ratio (see methods).

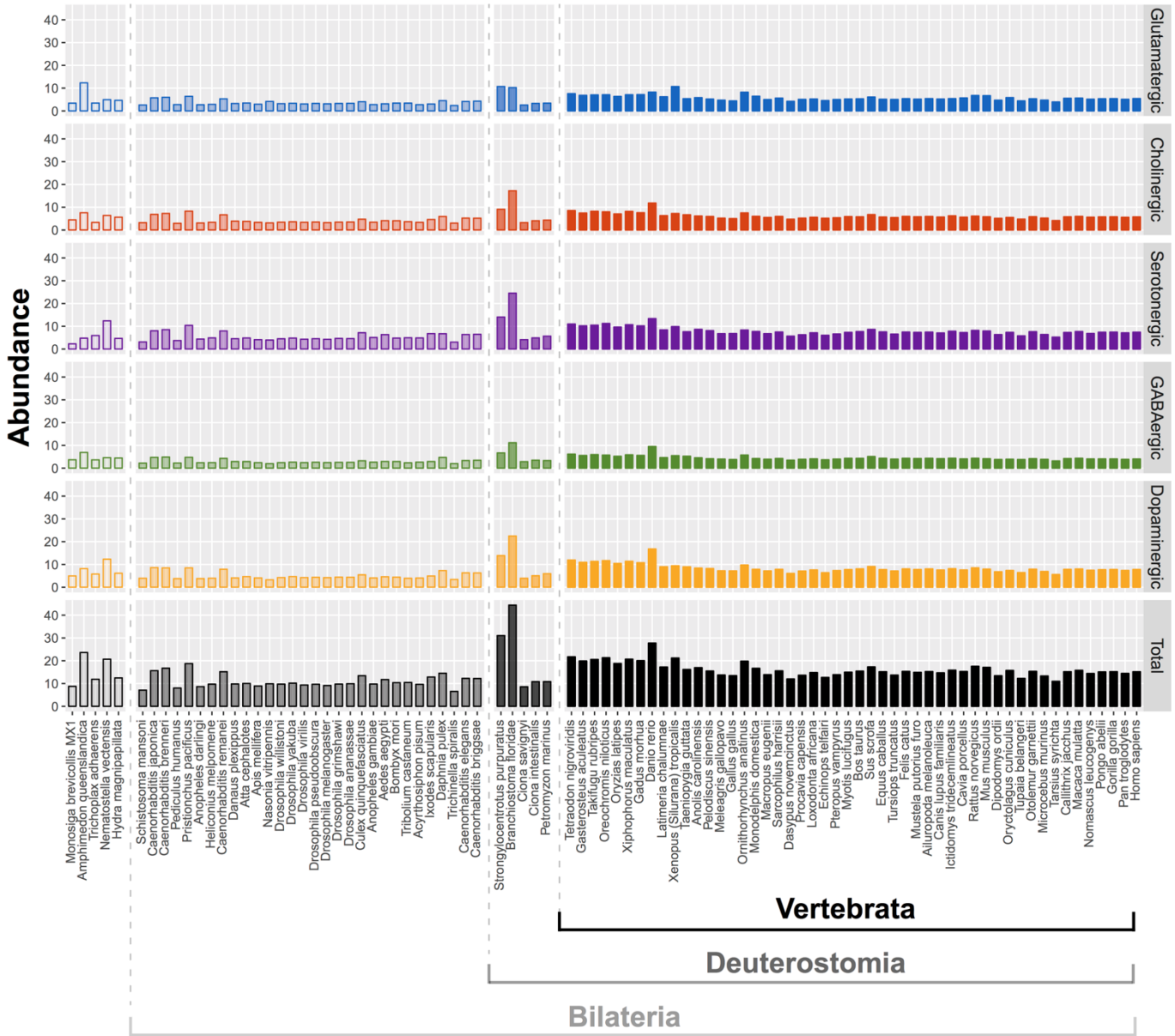


Fig. 4. Abundance distribution of neurotransmitter orthologs. Transparent colors represent group of Apokoikozoa, while light, smoked and dark colors follow the phylogeny of bilateria, deuterostomia and vertebrata, respectively. Abundance distribution considering all neurotransmitter system, as well as individually is discriminated by color and named in the right corner of their respective plot. Abundance values were normalized applying a ratio of the number of paralogues for each family of orthologous groups of proteins (COG) and plotted by specie. The Y-axis shows the mean value of paralogues for each COG found in the respective specie identified in the X-axis.

References

- Achim K, Arendt D. 2014. Structural evolution of cell types by step-wise assembly of cellular modules. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 27:102–108.
- Albrecht J, Sidoryk-Wegrzynowicz M, Zielinska M, Aschner M. 2010. Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biol.* 6:263–276.
- Andrews PW, Bharwani A, Lee KR, Fox M, Thomson JAJ. 2015. Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 51:164–188.
- Azmitia EC. 2010. CHAPTER 1.1 - Evolution of Serotonin: Sunlight to Suicide. In: Müller CP, Jacobs BLBT-H of BN, editors. Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin. Vol. 21. Elsevier. p. 3–22.
- Belousov AB, O'Hara BF, Denisova J V. 2001. Acetylcholine becomes the major excitatory neurotransmitter in the hypothalamus in vitro in the absence of glutamate excitation. *J. Neurosci.* 21:2015–2027.
- Ben-Ari Y. 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:728.
- Berrettini WH, Doyle GA. 2012. The CHRNA5-A3-B4 gene cluster in nicotine addiction. *Mol. Psychiatry.* 17:856–866.
- Bosch TCG, Klimovich A, Domazet-Lošo T, Gründer S, Holstein TW, Jékely G, Miller DJ, Murillo-Rincon AP, Rentsch F, Richards GS, et al. 2017. Back to the Basics: Cnidarians Start to Fire. *Trends Neurosci.* 40:92–105.
- Boyle EA, Li YI, Pritchard JK. 2017. An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. *Cell* 169:1177–1186.
- Brummett BH, Boyle SH, Siegler IC, Kuhn CM, Ashley-Koch A, Jonassaint CR, Z?chner S, Collins A, Williams RB. 2008. Effects of environmental stress and gender on associations among symptoms of depression and the serotonin transporter gene linked polymorphic region (5-HTTLPR). *Behav. Genet.* 38:34–43.
- Burkhardt P. 2015. The origin and evolution of synaptic proteins - choanoflagellates lead the way. *J. Exp. Biol.* 218:506–514.
- Callaway E. 2017. Genome studies attract criticism: Geneticists question ability of genome-wide association studies to find useful disease links. *Nature* 546:463.
- Callier S, Snapyan M, Le Crom S, Prou D, Vincent J-D, Vernier P. 2003. Evolution and

cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol. Cell* 95:489–502.

Castro MAA, Wang X, Fletcher MNC, Meyer KB, Markowitz F. 2012. RedeR: R/Bioconductor package for representing modular structures, nested networks and multiple levels of hierarchical associations. *Genome Biol.* 13:R29.

Chen R, Jeong S-S. 2000. Functional prediction: Identification of protein orthologs and paralogs. *Protein Sci.* 9:2344–2353.

Chen S, Owens GC, Edelman DB. 2008. Dopamine Inhibits Mitochondrial Motility in Hippocampal Neurons. *PLoS One* 3:e2804.

Dalmolin RJ. 2015. Geneplast: evolutionary rooting and plasticity inference. R Packag. version 1.0.0.

Dalmolin RJS, Castro M a a, Rybarczyk Filho JL, Souza LHT, de Almeida RMC, Moreira JCF. 2011. Evolutionary plasticity determination by orthologous groups distribution. *Biol. Direct* 6:22.

Dobson SD, Brent LNJ. 2013. On the evolution of the serotonin transporter linked polymorphic region (5-HTTLPR) in primates. *Front. Hum. Neurosci.* 7:588.

Dorus S, Vallender EJ, Evans PD, Anderson JR, Gilbert SL, Mahowald M, Wyckoff GJ, Malcom CM, Lahn BT. 2004. Accelerated evolution of nervous system genes in the origin of *Homo sapiens*. *Cell* 119:1027–1040.

Ehrich JM, Messinger DI, Knakal CR, Kuhar JR, Schattauer SS, Bruchas MR, Zweifel LS, Kieffer BL, Phillips PEM, Chavkin C. 2015. Kappa Opioid Receptor-Induced Aversion Requires p38 MAPK Activation in VTA Dopamine Neurons. *J. Neurosci.* 35:12917–12931.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A-N, Ghedin E, Wortley EA, Delcher AL, Blandin G, et al. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309:409–415.

Gou Z-H, Wang X, Wang W. 2012. Evolution of neurotransmitter gamma-aminobutyric acid, glutamate and their receptors. *Dongwuxue. Yanjiu.* 33:E75-81.

Kellis M, Wold B, Snyder MP, Bernstein BE, Kundaje A, Marinov GK, Ward LD, Birney E, Crawford GE, Dekker J, et al. 2014. Defining functional DNA elements in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:6131–6138.

Krishnan A, Schioth HB. 2015. The role of G protein-coupled receptors in the early evolution of neurotransmission and the nervous system. *J. Exp. Biol.* 218:562–571.

Leys SP. 2015. Elements of a “nervous system” in sponges. *J. Exp. Biol.* 218:581–591.

Li M, Liu J, Zhang C. 2011. Evolutionary History of the Vertebrate Mitogen Activated

Protein Kinases Family. Matz M V, editor. *PLoS One* 6:e26999.

Liu WW, Wilson RI. 2013. Glutamate is an inhibitory neurotransmitter in the *Drosophila* olfactory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:10294–10299.

Luján R, Shigemoto R and López-Benedito G. 2005. Glutamate and GABA Receptor Signalling in the Developing Brain. *Neuroscience* 130:567-580.

de Mendoza A, Sebé-Pedrós A, Ruiz-Trillo I. 2014. The Evolution of the GPCR Signaling System in Eukaryotes: Modularity, Conservation, and the Transition to Metazoan Multicellularity. *Genome Biol. Evol.* 6:606–619.

von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, Foglierini M, Jouffre N, Huynen MA, Bork P. 2005. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res.* 33:D433-437.

Moron JA, Zakharova I, Ferrer J V, Merrill GA, Hope B, Lafer EM, Lin ZC, Wang JB, Javitch JA, Galli A, et al. 2003. Mitogen-activated protein kinase regulates dopamine transporter surface expression and dopamine transport capacity. *J. Neurosci.* 23:8480–8488.

Moroz LL. 2015. Convergent evolution of neural systems in ctenophores. *J. Exp. Biol.* 218:598–611.

Moroz LL, Kocot KM, Citarella MR, Dosung S, Norekian TP, Povolotskaya IS, Grigorenko AP, Dailey C, Berezikov E, Buckley KM, et al. 2014. The ctenophore genome and the evolutionary origins of neural systems. *Nature* 510:109–114.

O’Sullivan GA, Kneussel M, Elazar Z, Betz H. 2005. GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse. *Eur. J. Neurosci.* 22:2644–2648.

Pasquier J, Cabau C, Nguyen T, Jouanno E, Severac D, Braasch I, Journot L, Pontarotti P, Klopp C, Postlethwait JH, et al. 2016. Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database. *BMC Genomics* 17:368.

Petryszak R, Keays M, Tang YA, Fonseca NA, Barrera E, Burdett T, Füllgrabe A, Fuentes AM-P, Jupp S, Koskinen S, et al. 2015. Expression Atlas update—an integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants. *Nucleic Acids Res.* 44:D746-D752.

Pisani D, Pett W, Dohrmann M, Feuda R, Rota-Stabelli O, Philippe H, Lartillot N, Wörheide G. 2015. Genomic data do not support comb jellies as the sister group to all other animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112:15402–15407.

Reddy ASN, Day IS. 2011. Microtubule Motor Proteins in the Eukaryotic Green Lineage: Functions and Regulation BT - The Plant Cytoskeleton. In: Liu B, editor. New York, NY: Springer New York. p. 119–141.

- Ryan JF. 2014. Did the ctenophore nervous system evolve independently? *Zoology* 117:225-226.
- Ryan TJ, Grant SGN. 2009. The origin and evolution of synapses. *Nat Rev Neurosci* 10:701–712.
- Saidi Y, Hearn TJ, Coates JC. 2018. Function and evolution of ‘green’ GSK3/Shaggy-like kinases. *Trends Plant Sci.* 17:39–46.
- Salcedo-tello P, Ortiz-matamoros A, Arias C. 2011. GSK3 Function in the Brain during Development , Neuronal Plasticity , and Neurodegeneration. *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2011: 189728.
- Sasai M, Sakaguchi N, Ma JS, Nakamura S, Kawabata T, Bando H, Lee Y, Saitoh T, Akira S, Iwasaki A, et al. 2017. Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense. *Nat. Immunol.* 18:899–910.
- Sousa NO, Grevet EH, Salgado C a I, Silva KL, Victor MM, Karam RG, Vitola ES, Picon F a., Zeni GD, Rohde L a., et al. 2011. Smoking and ADHD: An evaluation of self medication and behavioral disinhibition models based on comorbidity and personality patterns. *J. Psychiatr. Res.* 45:829–834.
- Studer RA, Robinson-Rechavi M. 2009. How confident can we be that orthologs are similar, but paralogs differ? *Trends Genet.* 25:210–216.
- Su P, Li S, Chen S, Lipina T V, Wang M, Lai TKY, Lee FHF, Zhang H, Zhai D, Ferguson SSG, et al. 2014. A dopamine D2 receptor-DISC1 protein complex may contribute to antipsychotic-like effects. *Neuron.* 84:1302–1316.
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, et al. 2017. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* 45:D362–D368.
- Willard SS, Koochekpour S. 2013. Glutamate, Glutamate Receptors, and Downstream Signaling Pathways. *Int. J. Biol. Sci.* 9:948–959.
- Wu Q, Gu X, Wang Y, Li N, Liu X, Wu C, Yu L, Gu X. 2006. Neurotransmitter inactivation is important for the origin of nerve system in animal early evolution: a suggestion from genomic comparison. *Prog. Neurobiol.* 78:390–395.
- Xu C, Liu R, Zhang Q, Chen X, Qian Y, Fang W. 2017. The Diversification of Evolutionarily Conserved MAPK Cascades Correlates with the Evolution of Fungal Species and Development of Lifestyles. *Genome Biol. Evol.* 9:311–322.
- Yamamoto K, Fontaine R, Pasqualini C, Vernier P. 2015. Classification of Dopamine

Receptor Genes in Vertebrates: Nine Subtypes in Osteichthyes. *Brain. Behav. Evol.* 86:164–175.

Yang J, Sykora P, Wilson III DM, Mattson MP, Bohr VA. 2011. The Excitatory Neurotransmitter Glutamate Stimulates DNA Repair to Increase Neuronal Resiliency. *Mech Ageing Dev.* 132: 405-411.

Zakon HH. 2012. Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: the first 800 million years. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 Suppl:10619–10625.

Supplementary Material

-Tables

(Online:<https://www.dropbox.com/sh/4pl55zauo3qgfla/AAA0sLEtOJfToGXxaZpBXlva?dl=0>)

Table S1. Genes from Five Neurotransmission Systems Accordingly to KEGG Pathway database.

Table S2. KEGG pathways used in this study and their respective categorization regarding neuro or non-neural association.

Table S3. Ratio between the number of neural pathways and its total number of pathways for each gene.

Table S4. Expression Ration according to EBI's Expression Atlas.

Table S5. Neurotransmitter genes annotation according to geneplast analysis

Table S6. Numeric distribution of genes throughout reference roots used in this research.

-Figures

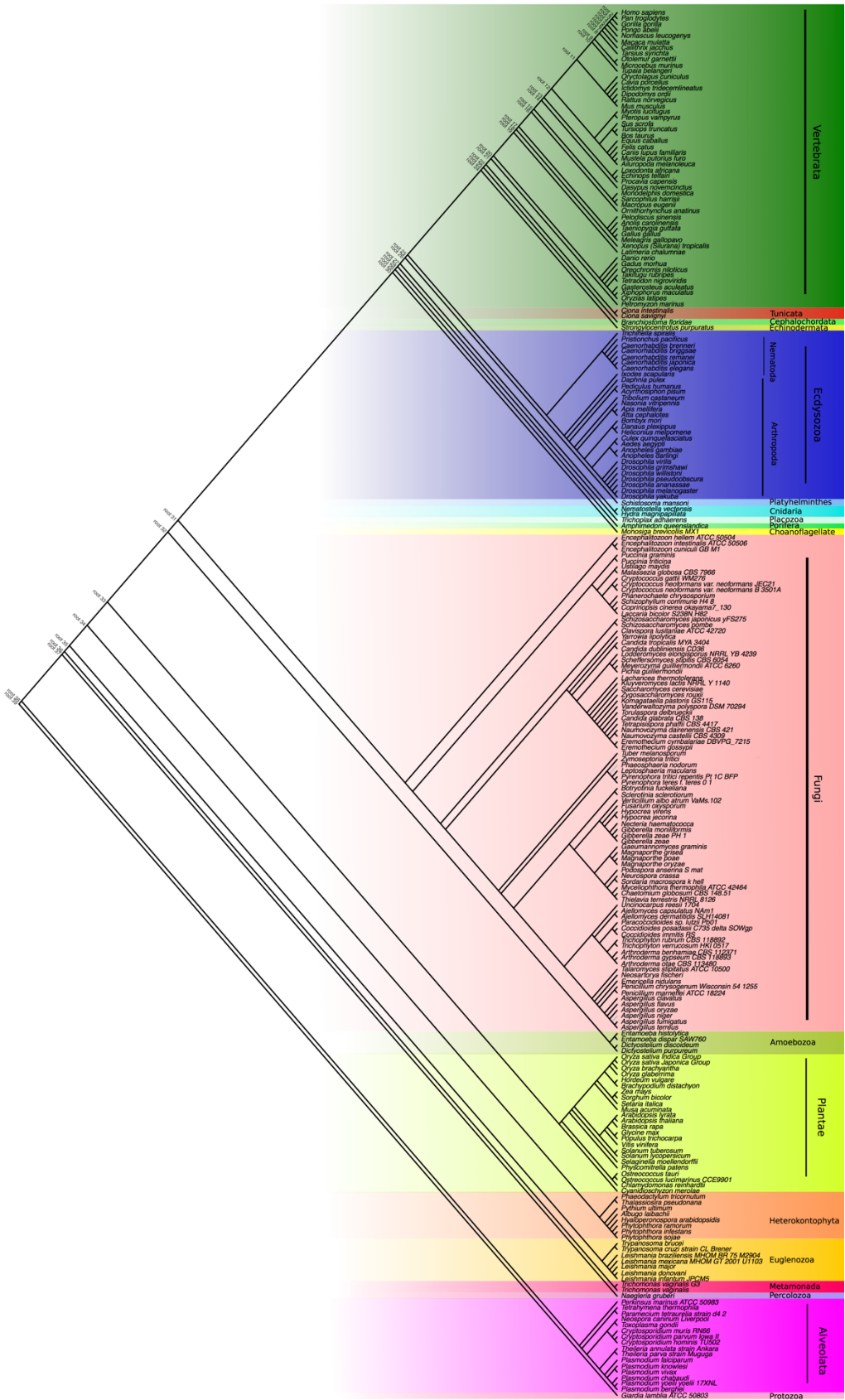


Fig S1. Phylogenetic evolutionary tree of eukaryotes used in this study.

CAPÍTULO V

Manuscrito em redação: *THE MOLECULAR CLOCK WINDER:
ASSESSING THE EFFECTS OF LIFE HISTORY AND REPRODUCTIVE
BIOLOGY ON SUBSTITUTION RATES IN PRIMATES*

Viscardi LH, Paixão-Côrtes VR, Reales GM, Bortolini MC and
Amorim EG.

Possível revista: *Proceeding of National Academic of Science USA* ou
American Journal of Physical Anthropology

*“O tempo é muito lento para os que esperam
Muito rápido para os que têm medo
Muito longo para os que lamentam
Muito curto para os que festejam
Mas, para os que amam, o tempo é eterno.”*

Henry Van Dyke

The Molecular Clock Winder: Assessing the Effects of Life History and Reproductive Biology on Substitution Rates in Primates

Lucas Henriques Viscardi¹, Vanessa Rodrigues Paixão-Côrtes², Guillermo Reales¹, Maria Cátira Bortolini¹, and Carlos Eduardo G. Amorim³

1. Laboratório de Evolução Humana e Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 91501-970.
2. Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, 40170-115.
3. Department of Ecology and Evolution, University of California, Los Angeles, California, 90095

ABSTRACT (250/250)

Objectives: Primates are known to present a marked variation in substitution rates, tending to be the lowest in great apes. This is credited to differences in life history across species and sexes. Here, we sought to assess the causes for this variation and test long-standing theories related to the molecular clock in primate evolution, such as the hominoid slowdown.

Materials and Methods: We estimated genome-wide neutral substitution rates for 16 primate species from multi-species alignments, using a phylogenetic method that allows for variation in substitution rates across sites and lineages. We further evaluated the relationship between 24 life history traits (sex-specific or not) and this variation, using Independent Contrast Analysis.

Results: We confirm previous observations of a large variation in autosomal neutral substitution rates in primates and show that this variation correlates with life history traits variation. We observe that male mutation bias is pervasive across primates and its intensity correlates with the competition between males in different species. Furthermore, for gorilla and humans the observed ratio of X-to-autosomal substitution rates is lower than expected considering the biology of the present-day species.

Discussion: Our data give support to the hypothesis of the hominoid substitution rate slowdown and points out to the effect of differences in reproductive biology between species and sexes on the molecular clock. The discrepancies observed between X-to-autosomal substitution rates among

great apes can be explained by changes in life history traits across time, particularly in chimpanzees, which seem to have had weaker sperm competition in the past.

KEYWORDS: Hominoid substitution rate slowdown, Male mutation bias, Molecular clock, Mutation rate, X-to-Autosomal ratio

INTRODUCTION

Mutations are the primordial source of genetic variation in any organism, and thus are the basis of both genetic adaptations and disease. Moreover, mutation rates have been widely used in phylogenetic and anthropological studies as molecular clocks to date events in evolution, especially for those species for which other forms of dating (*e.g.* the fossil record) are not available (Amster & Sella, 2016; Garland, Harvey, & Ives, 1992; Kumar, 2005; Lee, Rodrigue, & Thorne, 2015; Moorjani, Amorim, Arndt, & Przeworski, 2016). Yet, little is known about the exact nature of mutations and what factors influence their occurrence (Ségurel, Wyman, & Przeworski, 2014).

Notably, mutation rates are known to vary significantly across primates (Moorjani, Amorim, et al., 2016), being unexpectedly low among great apes (known in the literature as the hominoid substitution rate slowdown hypothesis). This is thought to be caused by the effect of varying life history traits across species (Moorjani, Gao, & Przeworski, 2016; Sayres, Venditti, Pagel, & Makova, 2011), and it invalidates the key assumption of steadiness of the molecular clock. Notwithstanding, recent comparative genomic studies have failed to find the basis for the variation in substitution rates in the order Primate (for instance, Moorjani et al., 2016), as opposed to what have been shown to other taxa (Siepel et al., 2005). Moreover, in mammals, we observe higher mutation rates in males than in females, what is thought to be caused by the greater number of rounds of replication experienced by the gametes in former (Ellegren & Parsch, 2007). This effect is known as the male mutation bias and implies that most of the mutations derive from errors during DNA replication.

In present study, we used whole-genome multi-species alignments to estimate neutral substitution rates on the autosomes and sex chromosomes in 16 primate species. We compiled an extensive list with 24 life history traits (sex-specific or not) for these species and assessed the association between the variation in these traits and that in neutral substitution rates using over 59 Mb of DNA sequence. We show that variation in substitution rates in the autosomes correlates negatively with female-to-male sex maturity ratios, testicle weight to body size ratio, gestational period to average lifespan, and interbirth interval to gestational period (p -values = 0.0293, 0.0004, 0.0126, and 0.0277 respectively), even after correcting for phylogenetic dependence using Independent Contrast Analysis (Felsenstein, 1985). Our findings highlight the effect of differences

in reproductive biology between sexes on the variation of neutral substitution rates and divergence between primate species. We also show how neutral substitution rates on sex chromosomes compare to those of autosomes, and how this can inform us about past reproductive biology and mutational mechanisms. We achieved these results using a genomic approach including a larger number of loci than previous studies (now including the sex chromosomes in addition to the autosomes), with a larger number of primate species (including all for which there is a reference genome sequence to date), and also conducting an extensive literature review to include 24 life history traits for a large number of primate species.

MATERIAL AND METHODS

Genetic data

We estimated the autosomal substitution rate for different mutation types using a 17-primate whole-genome sequence alignment (part of a 20-way mammalian phylogeny; table S1), mapped to the human reference genome hg38 with the Multiz pipeline (Blanchette et al., 2004; Karolchik et al., 2014). To estimate substitution rates on the autosomes, X and Y-chromosomes, we used the general unrestricted single nucleotide model implemented in Phylofit (Siepel & Haussler, 2004) and considered the mouse as the outgroup.

Out of the 17 primate species available in this dataset, we excluded one, namely *Nomascus leucogenys* (gibbon), because of the state of its genome assembly – relatively preliminary in comparison to others – and the fact that its genome is subject to fast karyotype evolution (Carbone et al., 2014), which could have an impact mapping accuracy. Moreover, because incomplete lineage sorting (ILS) is observed between *Gorilla gorilla* (gorilla), *Pan paniscus* (bonobo), and *Pan Troglodytes* (chimpanzee) (Hobolth, Dutheil, Hawks, Schierup, & Mailund, 2011; Prüfer et al., 2012), we focused the main analyses of this paper on the latter, considering a total of 14 primates at a time, using the gorilla and bonobo to confirm results generated with the chimpanzee.

Data processing

To minimize effects of natural selection, we masked Conserved/constrained elements (C), coding Exons (E), and Transposable elements (T). We refer to this mask as “CET”. These annotations were downloaded from UCSC browser (Supplementary Table S1). Conserved elements were annotated using phastCons (Siepel et al., 2005) based on a 20-way multiple alignments that includes human, as the reference genome, and other 16 primates. Preferentially, coding exons were retrieved from the NCBI RNA reference sequences collection annotation (refGene) in the UCSC genome browser. For species missing annotation for NCBI we searched annotation in GENSCAN (see details on Supplementary Table S1). We removed repetitive regions including Long Terminal

Repeat elements (LTR), interspersed nuclear elements (LINE and SINE), and DNA repeat elements, as identified by RepeatMasker (Smit A, Hubley R, & Green P; 2004). This yielded a total of 59,214,802 bp of autosomal sequence for downstream analyses (Table S2).

For the sex chromosomes, in addition to using the CET mask, we also excluded the pseudoautosomal regions (PAR) (Link, Aguilar-Gómez, Ramírez-Suástegui, Hurst, & Cortez, 2017). Narang & Sayres (2016) noted that, due to background selection, divergence on the autosomes relative to the distance to genes increases on a different pace than that on the X chromosome, causing the overestimation of male mutation bias near genes, the effect of which is undetected 800 kb away from them (Narang & Sayres, 2016). To control for such bias, 800 kb from 3' and 5' flanking regions of genes were removed from autosomes and X chromosome in X-to-autosome analyses, leaving a total of 53,529,414 bp for posterior analyses.

Finally, we also filtered out missing data, i.e., any base pair that was aligned to a gap or a missing site in at least one of the primate species.

Statistical analyses

We used PhyloFit to estimate putatively neutral substitution rates from these multi-species alignments, considering the general unrestricted single nucleotide model (Siepel & Haussler, 2004). This analysis was performed with the expectation maximization (EM) algorithm (option -E) with medium precision for convergence. PhyloFit considers the possibility of substitution rate variation across lineage and accounts for recurrent substitutions at a site in estimating branch lengths in the phylogeny. Error estimates were calculated with the option “-e” for each chromosome.

Closely related species share a recent evolutionary ancestral history, and therefore may carry more similar biological traits than more distantly related ones (a phenomenon known as phylogenetic dependence). Thus, statistical phenotypical trait analyses between species without taking phylogeny into account can augment type I error due to overestimation of degrees of freedom, artificially increasing significant results (Felsenstein, 1985; Welch & Waxman, 2008). In this study, we made use of the Phylogenetically Independent Contrasts (PIC) approach, implemented with the Analysis of Phylogenetic and Evolution (APE) package (Paradis, Claude, & Strimmer, 2004) in R version 3.3.1 (<http://cran.r-project.org/>) to control for shared ancestry (Garland, Bennett, & Rezende, 2005). PIC uses species phylogeny to transform interspecific data into independent and identically distributed values, called contrasts, which allows the use of standard statistical analyses, such as regression and correlation (Felsenstein, 1985). Additionally, we used the Phylogenetic Tools for Comparative Biology package (phytools; Revell, 2011), also in R, to construct and edit phylogenetic trees. We applied Garland et al. (1992) recommendations

regarding the evaluation of the relationship between the standardized independent contrasts through ordinary least squares regression analysis, setting regression lines to pass through the origin ($n-1$ contrasts). Regression analyses were handled using *lm* function in R. Life traits information were retrieved from available literature (Moorjani, Amorim, et al., 2016; Saltzman, Tardif, & Rutherford, 2011; Schmitz et al., 2016; Yoder et al., 2016) and from data available in The Animal Diversity Web database (<http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/>), and WildscreenArkive (<http://www.arkive.org/>). Importantly, aiming to analyze relationship between life history traits with substitution rate in extant species, we only used substitution rates estimated for the external branches, but considered the internal branches to calculate the contrasts in PIC analysis. The same approach was considered to analyze the relationship between life history traits and X-to-Autosome ratio.

RESULTS

Variation in autosomal substitution rates in primates

We observe substantial variation in the autosomal substitution rates across primates, indicated by the variable branch lengths in Figure 1. In general, we see smaller branch lengths in Apes (average root-to-tip length = 0.2022), intermediate values in Old World Monkeys (OWM, 0.2103) and New World Monkeys (NWM, 0.2296), and the longest branch lengths (thus larger number of substitutions) among the Prosimians (0.2453). The variance in these estimates is extremely small, in the order of $1e-8$ or less across the different chromosomes, as expected from large genomic datasets.

These observations confirms previous findings generated with a similar approach, considering a smaller dataset of primate species (Moorjani, Amorim, et al., 2016), but here we were able to identify a relationship between four life history traits and autosomal substitution rate, even when controlling for phylogeny (Table 1), what was not observed before. These are (i) testicle weight to body size ratio (Adjusted- R^2 0.6910; negative skew, p -value=0.0005), (ii) female to male sexual maturity ratio (Adjusted- R^2 = 0.2827, negative skew; p -value=0.0293), (iii) the ratio between interbirth interval to gestational period (Adjusted- R^2 0.3096; negative skew p -value=0.0227); and (iv) gestational period to average lifespan ratio (Adjusted- R^2 0.3685; positive skew, p -value=0.0126).

Relative testicle mass is considered a good proxy for sperm competition (Wong, 2014). Strikingly, it was the only significant association after Bonferroni correction for multiple testing. Nonetheless, after removing the outlier in this analysis (Figure 2A) for testicle-to-body mass ratio

(namely, the mouse lemur) the significance is lost, and the relationship becomes direct (i.e. the Adjusted-R² value becomes positive).

Our results show that as female to male sexual maturity decreases (meaning that males reach sexual maturity relatively later in relation to their partners), substitution rates increase (Figure 2B), suggesting that changes in the relative sexual maturity have an impact on the genetic background. Sexual maturity is mediated by several external factors, including genetics, ecology and socio-demography (Onyango, Gesquiere, Altmann, & Alberts, 2013). In primates, females commonly mature earlier than males (Onyango et al., 2013), what is shown in Table S3 by most sexual maturity ratios being below one. The observed statistical association indicates that as more similar the sexual maturity ages of females and males are (thus ratio near one), the overall autosomal substitution rate is expected to decrease. This could potentially be related with a paternal age effect, according to which younger males will have less mutations accumulated in their germline in comparison to older males (Goriely & Wilkie, 2012; Penrose, 1955), which is the consequence of the continuous cell divisions in the male germline post-puberty. In this regard, our results suggest that, else being equal, when males reproduce earlier (and therefore as sexual maturity ratio approaches the value of one) there are fewer substitutions genome-wide.

There is a negative relationship between interbirth interval to gestational period ratio and autosomal substitution rate (Figure 2C). This means that fewer mutations in the germline will be observed as females invest more time in gestation, with the concomitant compensation of shorter interbirth period. Another way to approach this relationship is that species with similar gestational period and interbirth interval have a higher substitution rate. In our data (Table 1), we see that these species (the ones with this ratio close to one and high substitution rate) are mainly the small primates: the squirrel monkey, marmoset, bushbaby and tarsier (*i.e.* all except the mouse lemur). Strikingly these are also the species with shorter generation time amongst all primates (Table 1). In this regard, we note that the relationship between generation time and substitution rates has been observed for other taxa (Hwang & Green, 2004) and even in primates, when using smaller datasets (Li, Ellsworth, Krushkal, Chang, & Hewett-Emmett, 1996). Although the causal relationship is unclear according to our analysis, the fact that individuals with shorter gestational length and shorter interval between births also have shorter generation time could potentially suggest an effect of generation length on substitution rates: if mutations occur primarily due to errors during DNA replication, species with short generations are subject to more rounds of DNA replication per unit time in comparison to those with longer generations, and as a consequence of that the former will present larger yearly mutation rates than the latter (Thomas, Welch, Lanfear, & Bromham, 2010). This relationship is strengthened by the positive relationship observed between gestational period to averaged lifespan in captivity (Figure 2D), according to which species with proportional shorter

lifespan and also short gestational period are those previously scored for lower interbirth intervals proportional to gestation analysis, i.e. the small primates (except for the green monkey).

Sex biased substitution rate variation in primates

While each autosome spend the same amount of time in the female and male germlines, the X chromosome spends more time in the female germline and the Y is only seen in males (except if there is any aneuploidy) (Miyata, Hayashida, Kuma, Mitsuyasu, & Yasunaga, 1987). Therefore, the ratio between the number of substitutions identified on the sex chromosomes relative to the ones on the autosomes reflect sex biases in mutational processes and dynamics (Sayres et al., 2011), and thus can inform us about the differences in the reproductive biology and behavior of the different sexes. If there is equal participation of male and female to the mutational input, we would expect to see an X-to-autosomes substitution rate ratio (henceforth referred to as “X:A ratio”) equals to one. Figure 1 shows estimated divergence for autosomes with their ratio relative to that on the X chromosomes (in the form of X:A ratio) indicated in parenthesis for inner and external branches. Generally, males contribute more to nucleotide variability, indicated by an X:A ratio < 1 (Figure 1). However, the degree of sex bias is not the same across primates: in NWM and Prosimians we observe relatively more equal contribution from females and males (X:A ratio ranges from 0.835 to 0.853), than in OWM and great apes (0.653 to 0.739; Table 3). Data for the Y chromosome, although limited to four species (namely *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Callithrix jacchus*, and *Chlorocebus sabaesus*), strengths this hypothesis of a male mutation bias (Figure 3).

Curiously, the X:A ratio estimated in our study for humans is lower than previously estimated (Amster & Sella, 2016; Patterson, Richter, Gnerre, Lander, & Reich, 2006; Presgraves & Yi, 2009). The estimates for the chimpanzee, however, match these previous studies. Although we were not able to identify the causes for such discrepancy in humans, we believe that it can be either true (see Discussion below) or it may be an artifact introduced by the fact the multi-species alignment considered humans as the reference species.

The variance in the branch length estimates using the X chromosome ($s^2 = 1.75e-8$) is in the same order of magnitude of those for the autosomes, which is 1.49e-8 in average. To rule out any possible bias related to differences in error in estimates for the X versus the autosomes, we recalculated X:A ratio using chromosomes 9 and 14, which have similar sequence length (1.34Mb, versus 1.39Mb on the X) and variance estimates ($s^2 = 1.80e-8$) to that of the X chromosomes, respectively. In doing so, our results are qualitatively identical to the setting where we analyze all autosomes together. In what follows, we discuss the results considering the full dataset.

DISCUSSION

Cross-taxa studies suggested that the unsteadiness of the molecular clock, *i.e.* the variation in substitution rates across lineages, was due to the effect of different metabolic rates (Lanfear, Thomas, Welch, Brey, & Bromham, 2007), variable body size, as well as differences in the generation length across species (Martin & Palumbi, 1993). For primates, however, the reason for the observed variation in substitution rates remains to be established (Moorjani, et al., 2016). We re-assessed this issue by using a larger number of species than previous studies on primates ($N = 14$) and a larger number of life history traits (a total of 24; Table 1). We found that the variation in four life history traits is significantly associated with the variation in autosomal substitution rates in primates (Table 1). Curiously, none of these is generation length, but are related to differences in the reproductive biology across species and sexes. We note, however, that generation length may be correlated with some of these life history traits for which we found statistical association with substitution rates, and therefore this may indicate an indirect effect of generation time, as noted above.

One pattern that stand out from these analyses is the widespread presence of a male mutation bias in the different primate species. A larger contribution of males for the total number of substitutions in a lineage may be related to the biology of spermatogenesis, which entails constant production of sperm after puberty, in contrast to the oogenesis, in which the female germline is subjected to a single cell division after birth (Berlin et al., 2006). In addition to that, we observe more intense sperm competition in some organisms, like in the *Macaca* genus, other O WM (Dhole & Servedio, 2014; Harcourt, 1995), and the chimpanzee (Wong, 2014), what is expected to further increase mutation rates per generation. In this regard, we show, for instance, that male mutation bias is pervasive across primates, indicated by a much larger proportion of substitutions on the Y chromosome relative to other chromosomes. The lack of significant association between substitution rate variation and relative testes size (after the removal of an outlier) indicates that, even after analyzing for a greater number of species (as suggested by Sayres et al., 2011), the significant relationship between such trait and mutation rate is not observed. Two alternative proposals by Sayres et al. (2011) is that sperm competition would have relatively little effect on the sex-averaged substitution rates in mammals either (a) because females have evolved a mechanism to compensate for any increase in the mutation rate in males; or (b) the mutational rate influenced by sperm competition may be weak and undetectable.

In our data, differences in mating strategies across species (*e.g.* van Schaik, 2016; Wolfe, 2015) may explain the different degrees of male mutation bias (see X:A ratio in Fig 1). For instance, in promiscuous species such as chimpanzee (which is polygynandrous), we observe a larger number of substitutions on the Y chromosome. For a species as the green monkey

(*Chrolocebus sabaues*), which displays polygyny as strategy and the marmoset (*Callithrix jacchus*), a polygynandrous specie, but with monogamy prevailing in captive environment, the number of substitutions on the Y chromosome are relatively smaller. For polyandrous and polygynandrous species, multiple males have to compete to fertilize eggs, generating more sperm competition compared with monogamous and polygynous species, where little or no sperm competition occurs (Martin, 2007).

We note that primate life traits and other social behaviors should be considered cautiously, as they are a simplification of the reality found in nature. For instance, some authors have found evidence of changes in the normal group composition and mating system, as cases of polygamy in Callitrichinae, as a consequence of habitat saturation (Dietz, Baker, & Allendorf, 2005; for a recent discussion see Garber, Porter, Spross, & Di Fiore, 2016). Despite these difficulties, we adopted here the general classification presented in (Saltzman, Tardif, & Rutherford, 2011; Schmitz et al., 2016; Yoder et al., 2016) and from data available in The Animal Diversity Web database.

Furthermore, the observed ratio of X-to-autosomal substitution rates for gorillas and humans differs markedly from the expected based on a robust analytical model (Amster and Sella, 2016), but not for chimpanzees (Table 2). Since this model considers values for traits observed in present-day species, these discrepancies could potentially be explained by changes in life history traits across time. For instance, one of the possibilities is that sperm competition in humans and gorillas may have been more intense in the past, comparable to that of present-day chimpanzees. In other words, this suggests that gorilla (*Gorilla gorilla*) and humans (*Homo sapiens*) were probably subject to a radical change in their mating system, from a more competitive situation for the males (e.g. polyandrous, when a female takes two or more male as sexual partner at the same time) to the current status of polygyny, and as a socially monogamous species (extra-pair paternity is relatively low and the long-term arrangement between just an adult male and an adult female is frequent (Fernández-Duque, Valeggia & Mendoza, 2009; Lukas & Clutton-Brock, 2013), respectively. This is interesting since bonobo (*Pan paniscus*), our most common relative together with chimpanzee (*Pan troglodytes*), is polyandrous, while chimpanzee is polygynandrous (multiple males mate with multiple females). Furthermore, due such mating system, bonobos present equal sex maturity ratio, with males and females reaching sexual maturity with same age (Table S3). Some studies also point out to an earlier puberty in bonobos females relative to chimpanzees (Behringer, Deschner, Deimel, Stevens, & Hohmann, 2014). Importantly, puberty differs from sexual maturity; the former being characterized by the beginning of the reproductive activity, whilst sexual maturity is when the sexual capacity is accompanied by other physical and behavioral changes which characterizes an adult individual, resulting in the mating capacity and seminal parameters consistent with the full reproduction (Souza, Cruz, Teixeira Neto, Nunes, & Cruz, 2011). Moreover, values observed in the

gorilla and bonobo substitution rate estimation are very similar to that of humans (Table 2), when compared to chimpanzee. This is in accordance with the similarity between X-to-autosomal substitution rate of gorilla, bonobo and humans, leading to the parsimonious explanation that the common ancestor of great apes was probably polygynandrous and that sperm competition in chimpanzees might have arisen only recently as a derivate trait.

Conclusion

We confirm previous observations that differences in life history traits between primates are implicated with large variation in autosomal neutral substitution rates and a widespread male mutation bias. Intriguingly, the observed ratio of X-to-autosomal substitution rates observed among great apes suggest different mating strategies present in their most recent common ancestral, with chimpanzee passing by a fast/radical strategy change more recently, since the split from bonobo. Finally, our data points out to the effect of differences in reproductive biology between species and sexes on the molecular clock giving support to the hypothesis of the hominoid substitution rate slowdown.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Guy Amster, Melissa Wilson-Sayres and Tim Webster for helpful discussions during the preparation of the manuscript, and Adam Siepel and Melissa Hubisz for advice on running PhyloFit.

REFERENCES

- Aslam H, Schneiders A, Perret M, Weinbauer GF, Hodges JK. (2002). Quantitative assessment of testicular germ cell production and kinematic and morphometric parameters of ejaculated sperm in the gray mouse lemur, *Microcebus murinus*. *Reproduction*, 123:323–332.
- Amster, G., & Sella, G. (2016). Life history effects on the molecular clock of autosomes and sex chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 1588–1593.
- Behringer, V., Deschner, T., Deimel, C., Stevens, J. M. G., & Hohmann, G. (2014). Age-related changes in urinary testosterone levels suggest differences in puberty onset and divergent life history strategies in bonobos and chimpanzees. *Hormones and Behavior*, 66, 525–533.
- Berlin, S., Brandstrom, M., Backstrom, N., Axelsson, E., Smith, N. G. C., & Ellegren, H. (2006). Substitution rate heterogeneity and the male mutation bias. *Journal of Molecular Evolution*, 62, 226–233.

Blanchette, M., Kent, W. J., Riemer, C., Elnitski, L., Smit, A. F. A., Roskin, K. M., ... Miller, W. (2004). Aligning multiple genomic sequences with the threaded blockset aligner. *Genome Research*, 14, 708–715.

Carbone, L., Harris, R. A., Gnerre, S., Veeramah, K. R., Lorente-Galdos, B., Huddleston, J., ... Gibbs, R. A. (2014). Gibbon genome and the fast karyotype evolution of small apes. *Nature*, 513, 195–201.

Dhole, S., & Servedio, M. R. (2014). Sperm Competition and the Evolution of Seminal Fluid Composition. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 1–12.

Dietz, J. M., Baker, A. J., & Allendorf, T. D. (1995). Correlates of molt in golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). *American Journal of Primatology*, 36, 277–284.

Dixon A.F. 2012 Primate Sexuality: Comparative Studies of the Prosimians, Monkeys, Apes, and Humans. 2nd Edition, New York, Oxford University Press.

Ellegren, H., & Parsch, J. (2007). The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nat Rev Genet*, 8.

Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist*, 125, 1–15.

Fernández-Duque E., Valeggia C.R. & Mendoza S.P. (2009). The neuroendocrinology of primate maternal behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35:1192-1204.

Garber, P. A., Porter, L. M., Spross, J., & Di Fiore, A. (2016). Tamarins: Insights into monogamous and non-monogamous single female social and breeding systems. *American Journal of Primatology*, 78, 298–314.

Garland, T. J., Bennett, A. F., & Rezende, E. L. (2005). Phylogenetic approaches in comparative physiology. *The Journal of Experimental Biology*, 208, 3015–3035.

Garland T. J., Harvey, P. H., & Ives, A. R. (1992). Procedures for the Analysis of Comparative Data Using Phylogenetically Independent Contrasts. *Systematic Biology*, 41, 18–32.

Garratt M, Gaillard J, Brooks R.C. & Lemaître, J. (2013). Diversification of the eutherian placenta is associated with changes in the pace of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 7760-7765.

Goriely, A., & Wilkie, A. O. M. (2012). Paternal age effect mutations and selfish spermatogonial selection: causes and consequences for human disease. *American Journal of Human Genetics*, 90, 175–200.

Harcourt, A. H., Harvey, P. H., Larson, S. G. & Short, R. V. (1981). Testis weight, body weight and breeding system in primates. *Nature*, 293, 55–57.

Harcourt, A. H. (1995). Sexual selection and sperm competition in primates: What are male genitalia good for? *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 4, 121–129.

Hobolth, A., Dutheil, J. Y., Hawks, J., Schierup, M. H., & Mailund, T. (2011). Incomplete lineage sorting patterns among human, chimpanzee, and orangutan suggest recent orangutan speciation and widespread selection. *Genome Research*, 21, 349–356.

Hwang, D. G., & Green, P. (2004). Bayesian Markov chain Monte Carlo sequence analysis reveals varying neutral substitution patterns in mammalian evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 13994–14001.

Karolchik, D., Barber, G. P., Casper, J., Clawson, H., Cline, M. S., Diekhans, M., ... Kent, W. J. (2014). The UCSC Genome Browser database: 2014 update. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D764-70.

Kenagy, G. J. & Trombulak, G. C. (1986). Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy*, 67, 1–22.

Kumar, S. (2005). Molecular clocks: four decades of evolution. *Nature Reviews Genetics*, 6, 654.

Lanfear, R., Thomas, J. A., Welch, J. J., Brey, T., & Bromham, L. (2007). Metabolic rate does not calibrate the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 15388 LP-15393.

Lee, H.-J., Rodrigue, N., & Thorne, J. L. (2015). Relaxing the Molecular Clock to Different Degrees for Different Substitution Types. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 1948–1961.

Li, W. H., Ellsworth, D. L., Krushkal, J., Chang, B. H., & Hewett-Emmett, D. (1996). Rates of nucleotide substitution in primates and rodents and the generation-time effect hypothesis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5, 182–187.

Link, V., Aguilar-Gómez, D., Ramírez-Suástegui, C., Hurst, L. D., & Cortez, D. (2017). Male Mutation Bias Is the Main Force Shaping Chromosomal Substitution Rates in Monotreme Mammals. *Genome Biology and Evolution*, 9, 2198–2210.

Lukas D., Clutton-Brock T.H. (2013). The evolution of social monogamy in mammals. *Science*. 341:526-530.

Macdonald D.W. (1982). Notes on the size and composition of groups of proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *Folia Primatologica*. 37,95-98.

Martin, A. P., & Palumbi, S. R. (1993). Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 4087–4091.

Martin, R. D. (2007). The evolution of human reproduction: a primatological perspective. *American Journal of Physical Anthropology*, Suppl 45, 59–84.

- Millar, M.R., Sharpe, R.M., Weinbauer, G.F., Fraser, H.M. & Saunders, P.T.K. (2001). Marmoset Spermatogenesis: organization similarities to the human. *International Journal of Andrology*, 23, 266-277.
- Miyata, T., Hayashida, H., Kuma, K., Mitsuyasu, K., & Yasunaga, T. (1987). Male-driven molecular evolution: a model and nucleotide sequence analysis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 52, 863–867.
- Moorjani, P., Amorim, C. E. G., Arndt, P. F., & Przeworski, M. (2016). Variation in the molecular clock of primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 10607–10612.
- Moorjani, P., Gao, Z., & Przeworski, M. (2016). Human Germline Mutation and the Erratic Evolutionary Clock. *PLOS Biology*, 14, e2000744.
- Narang, P., & Sayres, M. A. W. (2016). Variable Autosomal and X Divergence Near and Far from Genes Affects Estimates of Male Mutation Bias in Great Apes. *Genome Biology and Evolution*, 8, 3393–3405.
- Onyango, P. O., Gesquiere, L. R., Altmann, J., & Alberts, S. C. (2013). Puberty and dispersal in a wild primate population. *Hormones and Behavior*, 64, 240–249.
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics*, 20, 289–290.
- Patterson, N., Richter, D. J., Gnerre, S., Lander, E. S., & Reich, D. (2006). Genetic evidence for complex speciation of humans and chimpanzees. *Nature*, 441, 1103.
- Penrose, L. S. (1955). Parental age and mutation. *Lancet*, 269, 312–313.
- Perez, S.I., Tejedor, M.F., Novo, N.M., & Aristide, L. (2013). Divergence Times and the Evolutionary Radiation of New World Monkeys (Platyrrhini, Primates): An Analysis of Fossil and Molecular Data. *PLoS ONE*, 8, e68029.
- Presgraves, D. C., & Yi, S. V. (2009). Doubts about complex speciation between humans and chimpanzees. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 533–540.
- Prüfer, K., Munch, K., Hellmann, I., Akagi, K., Miller, J. R., Walenz, B., ... Pääbo, S. (2012). The bonobo genome compared with the chimpanzee and human genomes. *Nature*, 486(7404):527-31.
- Revell, L. J. (2011). phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 217–223.
- Saltzman, W., Tardif, S. D., & Rutherford, J. N. (2011). Chapter 13:Hormones and Reproductive Cycles in Primates . in *Mammals*, Volume 5, Elsevier, 291-327.

Sayres, M. A. W., Venditti, C., Pagel, M., & Makova, K. D. (2011). Do variations in substitution rates and male mutation bias correlate with life-history traits? A study of 32 mammalian genomes. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 65, 2800–2815.

Schmitz, J., Noll, A., Raabe, C. A., Churakov, G., Voss, R., Kiefmann, M., ... Warren, W. C. (2016). Genome sequence of the basal haplorrhine primate *Tarsius syrichta* reveals unusual insertions. *Nature Communications*, 7, 12997.

Ségurel, L., Wyman, M. J., & Przeworski, M. (2014). Determinants of Mutation Rate Variation in the Human Germline. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 15, 47–70.

Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J. S., Hinrichs, A. S., Hou, M., Rosenbloom, K., ... Haussler, D. (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Research*, 15, 1034–1050.

Siepel, A., & Haussler, D. (2004). Phylogenetic estimation of context-dependent substitution rates by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 468–488.

Smit AFA, Hubley R, Green P. RepeatMasker Open-3.0. 1996–2010, <http://www.repeatmasker.org>.

Souza, L. E. B. de, Cruz, J. F. da, Teixeira Neto, M. R., Nunes, R. de C. S., & Cruz, M. H. C. (2011). Puberty and sexual maturity in Anglo-Nubian male goats raised in semi-intensive system. *R. Bras. Zootec.* 40,1533-1539.

Schaik, C. P. (2016). Mating Systems and Sexuality in Primates. In *The Primate Origins of Human Nature*, C. P. Schaik (Ed.).

Schwartz, G.T. & Dean, M.C. (2005). Sexual dimorphism in modern human permanent teeth. *American Journal of Physical Anthropology*, 128, 312-317.

Thomas, J. A., Welch, J. J., Lanfear, R., & Bromham, L. (2010). A Generation Time Effect on the Rate of Molecular Evolution in Invertebrates. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 1173–1180.

Turner, T.R., Cramer, J.D., Nisbett, A. & Gray, J.P. (2016) A Comparison of Adult Body Size Between Captive and Wild Vervet Monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaues*) on the Island of St. Kitts. *Primates*, 57, 211-220.

Welch, J. J., & Waxman, D. (2008). Calculating independent contrasts for the comparative study of substitution rates. *Journal of Theoretical Biology*, 251, 667–678.

Wolfe, L. D. (2015). Primate mating systems. In *The International Encyclopedia of Human Sexuality* (eds A. Bolin and P. Whelehan).

Wong A (2014) Covariance between testes size and substitution rates in primates. *Molecular Biology and Evolution*, 31, 1432–1436.

Yoder, A. D., Campbell, C. R., Blanco, M. B., dos Reis, M., Ganzhorn, J. U., Goodman, S. M., ... Weisrock, D. W. (2016). Geogenetic patterns in mouse lemurs (genus *Microcebus*) reveal the ghosts of Madagascar's forests past. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 8049–8056.

Zhou, X., Wang, B., Pan, Q., Zhang, J., Kumar, S., Sun, X., ... Li, M. (2014). Whole-genome sequencing of the snub-nosed monkey provides insights into folivory and evolutionary history. *Nature Genetics*, 46, 1303-1310.

Table 1. Regression results according to least squares analysis controlled for phylogenetic dependence using the autosomal. R2 and slope coefficients (beta) for the simple regression models are shown. Significant two-tailed p values are marked in bold.

Trait	Autosome substitution rate					Available Species
	Regression			Correlation		
	R ²	P value	β	R ²	P value	
Body size (kg) ^{1,2}	-0.0679	0.6845	-0.0002	0.0642	0.835	14
Body size male (kg) ^{1,2}	-0.0700	0.7058	-0.0001	-0.0156	0.9597	14
Body size female (kg) ^{1,2}	-0.0715	0.7220	-0.0002	0.1192	0.6980	14
Body size dimorphism ^{1,2}	-0.0826	0.9277	-0.0008	-0.2552	0.4001	14
Length Male (cm) ¹	-0.0901	0.9291	0.0000	0.1402	0.6477	13
Length Female (cm) ¹	-0.0899	0.9223	0.0000	0.1205	0.6950	13
Length Male to Female ¹	-0.0909	0.9968	-0.0001	0.2322	0.4453	13
Interbirth Interval (days) ^{1,3}	-0.0210	0.4088	0.0000	-0.2919	0.3332	14
Gestational Period (days) ^{1,3}	0.1825	0.0717	0.0002	0.5268	0.0643	14
Interbirth/Gestation ^{1,3}	0.3096	0.0227	-0.0043	-0.6355	0.0196	14
Average Lifespan in Captivity	-0.0459	0.5244	-0.0003	0.0524	0.8649	14
Gestation/lifespan ¹	0.3685	0.0126	1.3635	0.5679	0.0429	14
Litter per Year	-0.0491	0.5429	-0.0039	-0.0707	0.8186	14
Sexual Maturity Male (months) ¹	-0.0800	0.8502	0.0000	-0.0808	0.7929	14
Sexual Maturity Female (months) ¹	-0.0310	0.4503	-0.0001	-0.1758	0.5657	14
Female to Male Age at Puberty ^{1,3,4}	0.2827	0.0293	-0.0209	-0.5104	0.0747	14
Group size ^{1,5}	-0.0798	0.7433	0.0001	-0.0753	0.8161	13
Litter Size ^{1,6}	0.1500	0.0946	-0.0135	-0.3812	0.1987	14

Table 1. (continued)

Weaning age (days) ^{1,3}	-0.0808	0.8694	0.0000	0.0317	0.9182	14
Canine Dimorphism ^{1,7,8}	-0.0984	0.9056	-0.0016	-0.2253	0.5053	12
Spermatogenic Cycle (days) ^{1,9,10}	-0.0468	0.4491	-0.0021	0.0617	0.8846	9
Ratio Testes weight to Body size ^{11,12,13,14}	0.6910	0.0005	-0.0112	-0.8553	0.0008	12
Generation Time (years) ^{15,16,17,18,19}	-0.0456	0.4872	-0.0009	-0.1004	0.7689	12
Ovarian Cycle (days) ²⁰	-0.0320	0.4357	-0.0005	-0.2206	0.5146	12

R²: adjuster R-squared (absolute values); β : slope (direction of relationship) ; CI: Confidence Interval; Slope indicates positive or negative relationship. Regression result removing outlier for testes weight to body size = R:0.1825; p=0.07167, beta=0.0002212; and correlation: R=0.0917; CI: -0.5708644 0.6819709 ;p=0.801.

1:ADW: Animal Diversity Web; 2:Arkive.org: Wildscreen Arkive; 3:Qi et al. 2008; 4: Amster and Sella 2016; 5: Macdonald, 1982; 6: Garratt et al. 2013; 7: Schwartz and Dean, 2005; 8: Turner et al. 2016; 9: Amster and Sella 2016; 10: Millar et al.2000; 11: Harcourt et al 1981; 12: Kenagy and Trombulak 1986; 13: Aslam et al 2002; 14: Dixson and Anderson 2004; 15: Perez et al. 2013; 16: Zhou et al. 2014; 17: Schmitz et al. 2016; 18: Yoder et al. 2016; 19: Moorjani et al. 2017; 20: Saltzman et al. 2010.

Table 2. X-to-Autosome ratios on the terminal branch. Because of Incomplete Lineage Sorting, *Pan troglodytes*, *Pan paniscus*, and *Gorilla gorilla* were considered separately. The corresponding great ape genome used for calculations is indicated on the header.

Species	This Study			Amster and Sella, 2016	Presgraves and Yi, 2009
	panTro4	panPan1	gorGor3		
<i>Homo sapiens</i>	0.6852	0.6811	0.7676	0.8	0.7850
<i>Pan Troglodytes</i>	0.7805	-	-	0.75	0.792
<i>Pan paniscus</i>	-	0.6661	-	-	-
<i>Gorilla gorilla</i>	-	-	0.7624	0.9	0.884
<i>Pongo abelli</i>	0.7514	0.7632	0.7640	-	0.8920

panTro4: *Pan troglodytes*; panPan1: *Pan paniscus*; gorGor3: *Gorilla gorilla*.

Table 3. Average tip distance across primates.

	Autossomal U1a	X Chromosome U1a	ChrX-Autossomal U1a
Human	0.0057	0.0039	0.6852
Great Apes	0.009	0.0067	0.739
Old World Monkeys	0.0054	0.0035	0.6529
New World Monkeys	0.0299	0.0249	0.8349
Prosimians	0.1105	0.0948	0.8529

Figure 1. Phylogenetic tree with 14 primates. Branch lengths reflect the relative number of neutral substitutions per site along each lineage. Phylogenetic tree was based on autosomal divergence and X-to-Autosomal ratio are indicated in parenthesis right of the terminal branches and left to the internal branches. Pro:Prosimians; NWM:New World Monkeys; OWM:Old World Monkeys; HOM: Hominidae

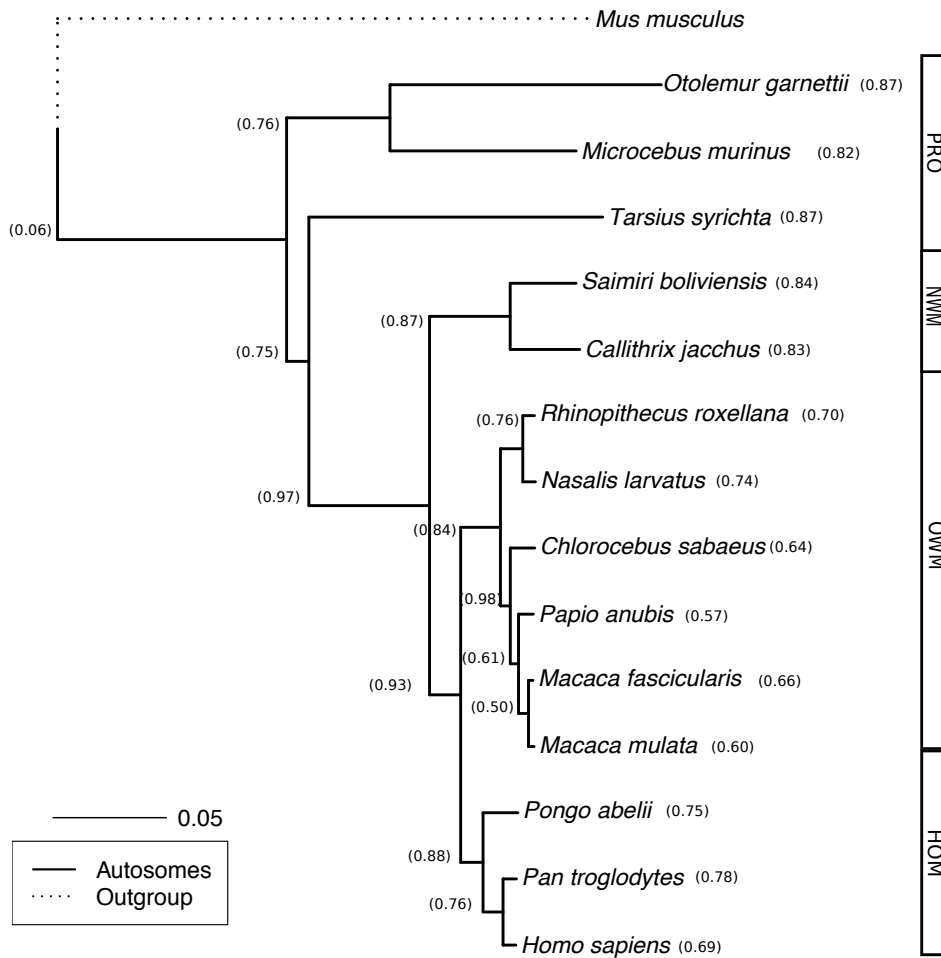


Figure 2. Phylogenetically independent contrasts of life history traits versus autosomal substitution rate. Relationship between phylogenetically independent contrasts of life history traits (x-axis) versus Autosomal Substitution Rate (y-axis) are shown for the four traits that presented significant regression on substitution rates (see Table 1).

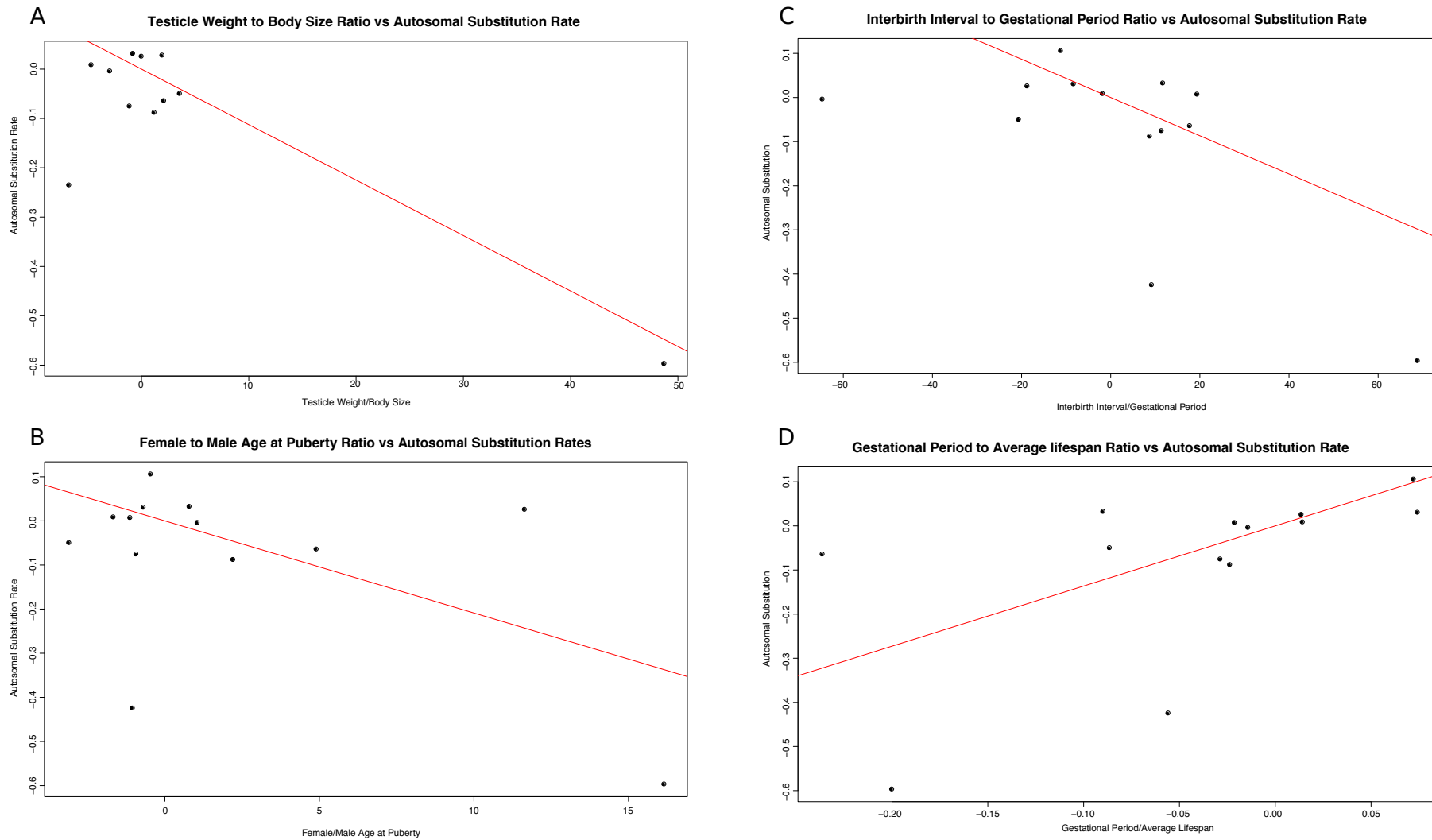
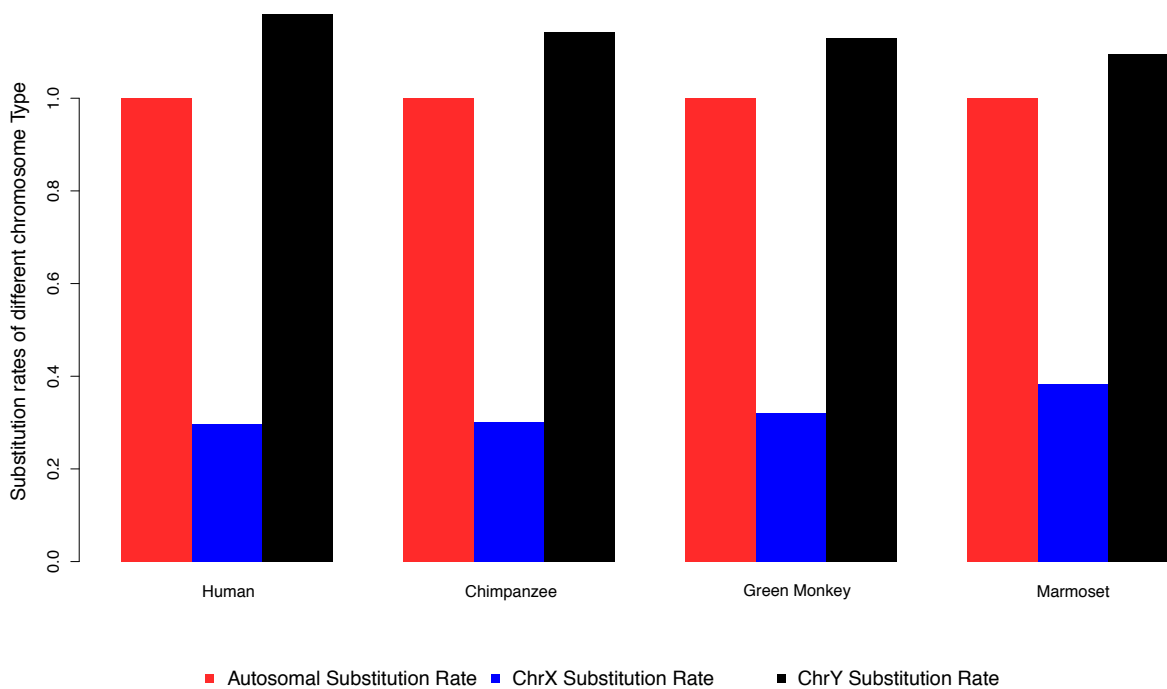


Figure 3. Relative substitution rates on sex chromosomes and autosomes. We estimated neutral substitution for four primates for which Y chromosome data was available in UCSC databank, namely *Homo sapiens*/Human (monogamous), *Pan troglodytes*/Chimpanzee (polygynandrous), *Chlorocebus sabaesus*/Green Monkey (polygynous) and *Callithrix jacchus*/Marmoset (polyandrous). The value plotted corresponds to the substitution rate on the sex chromosomes normalized by the rates observed on the autosomes for a given species.



SUPPLEMENTARY FILES

(ONLINE: <https://www.dropbox.com/sh/z3mpwfbkund0g6h/AADSngImqhPS93NPmZt1kI5Ia?dl=0>)

Table S1. Online source of annotations for transposable elements, coding exons, and conserved sites (*i.e.* the CET mask).

Table S2. Autosomal substitution rates and X chromosome 14-primate whole-genome sequence alignment.

Table S3. Phylogenetic Independent Contrast analysis of 24 life history traits and substitution rates.

Table S4. Substitution rates on sex chromosomes and autosomes for four primate species with different reproduction strategies.

FILES

Autosomal_tree.tre

Input_figure1_Autosome.txt

Input_figure1_X-chromosome.txt

input_FigureS2_barplot_No_PAR_800kb.txt

Figure1.R

Figure 2.R

life_history_traits_completed_U1a.txt

Tree_CET_U1a_Autosome_chrX_Ratio_noPar_800kb_terminal_Branches_normalized.txt

Tree_CET_U1a_terminal_Branches_normalized.txt

X_tree.tre

CAPÍTULO VI

Resultados e discussão preliminares: *THE EVOLUTION OF TOOL MAKING: AN EVOLUTIONARY APPROACH FROM SAPAJUS LIBIDINOSUS*

Viscardi LH, Falótico T, Fam B, Jacovas CV, Vargas-Pinilla P, Szyrwelski BE, Amorim EG, Salzano FM, Paixão-Côrtes VR, Freitas T, Ottoni E, and Bortollini MC

“Dê um peixe a um homem faminto e você o alimentará por um dia. Ensine-o a pescar, e você o estará alimentando pelo resto da vida.”
Provérbio Chinês

Durante a elaboração da presente Tese de Doutorado foi possível iniciar uma colaboração com o Instituto de Psicologia de Universidade de São Paulo (USP) através dos pesquisadores Prof. Dr. Eduardo Ottoni e Dr. Tiago Falótico com intuito de criar o projeto “Cultura nos macacos-pregos (*Sapajus libidinosus*): as bases genéticas de comportamentos evolutivos inovadores”. O presente Capítulo pretende apresentar brevemente os resultados preliminares do referido projeto.

INTRODUÇÃO

Como comentado na introdução da presente Tese, os humanos possuem uma habilidade sofisticada de produzir e utilizar ferramentas. Em meados da década de 60, descobertas de fósseis na Garganta de Olduvai, na Tanzânia, levaram à descrição da primeira espécie do nosso gênero. Neste contexto, foram descobertos uma mão e um pé de um hominíneo pelo casal de arqueólogos Louis e Mary Leakey, e sua equipe, batizando-os como pertencentes a uma nova espécie, o *Homo habilis*. O nome tem como inspiração sua morfologia que proporcionariam ao seu portador uma hábil capacidade de manufaturar ferramentas (Johanson e Edgar, 1996).

Em 1971 a primatóloga britânica Jane Goodall publica o livro *In The Shadow of Man*, levando tanto para comunidade científica quanto ao público leigo o relato de comportamentos dos chimpanzés (*Pan troglodytes*) em ambiente selvagem, no Parque Nacional de Gombe (Tanzânia), por cerca de dez anos (Goodall, 1971). A pesquisadora trouxe os conhecimentos de que chimpanzés fabricavam e utilizavam ferramentas em seu ambiente natural e como esta informação era transmitida para outros membros do grupo, uma característica relacionada à presença de cultura. Após sua publicação, sucessivos trabalhos corroboraram a idéia da existência de costumes sociais particulares e culturas diferenciadas entre as comunidades de chimpanzé (Vogel, 1999; Mercader et al., 2002; Waal, 2005; Matsuzawa, 2005; Pennisi, 2006; Whiten et al., 2005, 2007), do mesmo modo que em outras espécies de primatas (*Pongo pygmaeus*; Schaik et al., 2003; *Macaca fascicularis aurea*; Malaivijitnond et al., 2007). Desde então, o termo “cultura” passou a não ser utilizado somente para humanos, mas também para outros primatas (Schaik et al., 2003; Whiten et al., 2005; Pennisi, 2006; Whiten et al., 2007; Cohen, 2007).

Existem inúmeras definições de cultura (Hofstede, 2005), porém todas carregam elementos básicos como inovação, transmissão e retenção do conhecimento, seja no sentido horizontal (entre membros não aparentados), quanto no vertical (genitores-prole), exatamente como tem sido descrito entre primatas não-hominíneos, particularmente entre aqueles que vivem em

grupos sociais. Além disso, indivíduos com perfis inovadores dentro de um grupo social podem impulsionar revoluções tecnológicas. Para que uma inovação adaptativa seja mantida – e assim tenha alguma significância evolutiva - ela deve ser possível de ser transmitida (herdada) através das interações sociais e de aprendizado. Entretanto, os outros indivíduos somente serão aptos a absorver tal inovação se forem dotados de um repertório genético mínimo contribuinte para as capacidades cognitivas.

A esfera do conhecimento voltada para o estudo da cultura dos primatas não humanos foi batizada de *Cultural Primatology*. Sua origem emergiu como uma proposta de estudos, cada vez mais oportuna e necessária, com o objetivo de ampliar os conhecimentos sobre as tradições culturais, e suas diferenças, nas distintas espécies de símios, como os chimpanzés (Matzusaawa, 2005; Leca et al., 2016; McGrew, 2017). Dentre os debates da área, uma das grandes perguntas seria em quais condições ambientais e ecológicas ocorreram pressões seletivas que promoveram a emergência de traços culturais adaptativos. A escassez de alimentos ricos em nutrientes, como pequenos insetos e animais, frutas e sementes, algo mais frequentemente observado em ambientes abertos (savanas) do que fechados (matas e florestas), por exemplo, são frequentemente citados como agentes/elementos que impulsionariam o uso de ferramentas para obtenção de recursos (Koops et al., 2014).

Há 30 anos a partir de observações de macacos-prego (gêneros *Cebus* e *Sapajus*) em cativeiro (Westergaard e Fragazy, 1987), os debates científicos foram ampliados devido às extraordinárias descobertas que mostraram que os mesmos eram também capazes de produzir e manipular ferramentas. Posteriormente, o comportamento foi também observado em ambientes naturais, onde indivíduos destas espécies de forma espontânea e rotineira fabricavam e utilizavam materiais líticos em vários locais, incluindo a espécie *Sapajus libidinosus* da Serra da Capivara, no estado do Piauí no nordeste brasileiro (Otoni e Izar, 2008; Haslam et al., 2016; Proffitt et al., 2016). Os macacos pregos da Serra da Capivara aparentam ter a cultura lítica mais sofisticada, e não somente usam artefatos como ferramentas (bigorna e martelo para quebrar frutos encapsulados e “pás” para cavar) mas também para exibições sexuais (Falótico e Otoni, 2013; Proffitt et al., 2016 e referências lá citadas). Dentre os materiais líticos encontrados também estão alguns artefatos que são encontrados em um contexto arqueológico, poderiam ser potencialmente interpretados como o resultado da produção intencional de ferramenta de origem hominínea (Proffitt et al., 2016). Todavia, tais artefatos são, na verdade, lascas de fratura concoidal (com gume cortante) originadas de uma forma supostamente não intencional ou controlada pelos macaco-pregos citados, devido a seus hábitos rotineiros de uso do material lítico. Respectivo ao comportamento sexual, observou-se durante dois anos que três fêmeas de um grupo de *Sapajus libidinosus* da Serra da Capivara tinham o hábito de jogar pedras nos machos durante a sua fase proceptiva. Tal comportamento foi

posteriormente replicado por outras fêmeas no mesmo grupo. A ausência aparente deste comportamento em outros grupos levou a equipe de pesquisa a sugerir a difusão de um novo comportamento ou tradição dentro deste grupo social de macacos-prego (Falótico e Ottoni, 2013). Dessa forma, o complexo e diverso uso de ferramentas faz com que o *Sapajus libidinosus* da Serra da Capivara esteja atualmente em meio a lista das raras espécies capazes de desenvolver cultura, visto que alguns autores estimam que os mesmos o estariam fazendo há cerca de 700 anos (Haslam et al., 2016).

Nossa linhagem hominínea desenvolveu sua tecnologia lítica diante de um ambiente de savana, onde os recursos naturais eram escassos (Harmand et al. 2015). Curiosamente, os outros dois primatas que desenvolveram ferramentas com uso amplo e complexo, como o *Pan troglodytes verus* (Pruetz et al. 2015) e o *Sapajus libidinosus* (Haslam et al. 2016) também encontram-se em um ambiente homólogo aos nossos ancestrais hominíneos. Assim, pretendemos responder a seguinte pergunta: existe um repertório genético específico que permitiu a emergência de comportamentos adaptativos no ambiente da caatinga da Serra da Capivara e seria a pressão desse ambiente responsável pelo surgimento e manutenção da cultura do *Sapajus libidinosus*?

Sendo assim, seis genes candidatos foram selecionados para serem investigados nos *Sapajus libidinosus* da Serra da Capivara: *OXT*, *OXTR*, *AVPR1a* e *AVPR1b*, *SLC6A4* e *DRD4*. Para isso, iremos comparar as marcas genômicas dos *S. libidinosus* da Serra da Capivara que produzem e utilizam ferramentas (hábeis) com aqueles que não produzem (não-hábeis), seja dentro de mesmo bando quanto entre populações, incluindo de outras regiões brasileiras e um grupo controle da espécie *S. nigritus*, bem como com outros Primatas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Estocagem de Material

Foram coletados indivíduos de espécie *Sapajus libidinosus* e *Sapajus nigritus*. nas regiões Nordeste e Sul do Brasil, especificamente, provenientes do Parque da Serra da Capivara (*S. libidinosus* e *nigritus*) e da região da Mata Atlântica do Rio Grande do Sul (*S. nigritus*). As coletas do material biológico foram feitas mediante a diretriz de menor intervenção e contando com as devidas licenças (48323-1 e 59019-1; ver anexos). Duas abordagens não invasivas para coleta de material biológico para posterior extração de DNA de boa qualidade foram empregadas:

a) A coleta de pelos permite que se tenha uma quantidade significativa de DNA (Henry e Russello, 2011). Um protocolo estabelecido por Visalberghi et al (2015) demonstrou ser eficiente a extração de DNA de qualidade a partir de pelos coletados em um grupo total de 44 indivíduos da espécie *Sapajus sp.* O método baseia-se em uma armadilha em formato de tubo, onde no interior de sua abertura é coberto por fitas adesivas (~19mm) e com alimento (*e.g* nozes) no seu fundo. Três diferentes tubos são construídos, apresentando os diâmetros de 3.3, 2.6, e 2.0 cm e comprimentos de 18, 27 e 34 cm, respectivamente. O indivíduo ao colocar seu braço dentro do recipiente para pegar o alimento acaba por ter pelos presos nas fitas, que posteriormente são coletadas e armazenadas em um freezer a -20 C°. Junto com as armadilhas foram colocadas câmeras, com gatilhos de disparo, para a posterior identificação dos indivíduos coletados. Também se pretende fazer observações a distância dos sítios com as armadilhas.

b) Coleta de fezes também foi efetuada para garantir informação do máximo possível de indivíduos dos grupos. As fezes após coletadas podem ser armazenadas por até duas semanas em freezer de a -80 C°, o que garante um DNA de qualidade após a extração.

c) Amostras de grupos controle (diversas espécies de macacos do Novo Mundo) já foram coletadas e o DNA extraído. As mesmas fazem parte da coleção de mNM do Laboratório de Evolução Humana e Molecular (LEHM), sob a responsabilidade da Profa. Maria Cátira Bortolini. O uso dessa coleção para projetos desta natureza foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (data da aprovação: 25 de novembro de 2014). Para fazermos uso de uma espécie mais proximamente relacionada com o *Sapajus libidinosus*, utilizamos a coleção de *Sapajus nigritus* sob a responsabilidade do Prof. Thales Freitas.

Extração de DNA

As amostras de DNA foram extraídas com kit específico de reagentes para extração de DNA para amostras capilares (DNA Investigator Kit – Qiagen; ou NucleoSpin* Tissue – Macherey Negal, MN) e de fezes (Stool Kit - Qiagen), de modo a obter material de alta qualidade para a geração da biblioteca de DNA. As amostras foram analisadas em gel de agarose com a adição de corante para DNA (GelRed®), na concentração de 1% e após visualizadas em transiluminador UV, para checar o sucesso da extração; as amostras de DNA foram então quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop® - Uniscience) e diluídas para uma concentração de 25ng/uL.

Genes Candidatos e Sequenciamento

O *primers* foram desenhados a partir do genoma de referência do *Cebus capucinus* (NCBI:txid1737458) e considerando regiões conservadas das espécies *Saimiri boliviensis* (NCBI:txid39432) e *Callithrix jacchus* (NCBI:txid9483); todos disponíveis no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências de *Cebus capucinus*, quando disponíveis, foram preferencialmente escolhidas em lugar dos outros dois genomas de referência, visto sua proximidade filogenética com o gênero *Sapajus*. Os *primers* desenhados foram testados através da ferramenta *in silico*-PCR do UCSC genome (<https://genome.ucsc.edu/>).

Para o gene *SLC6A4*, será utilizado os *primers* desenhados para região polimórfica PL2 que é encontrada em macacos do Velho e do Novo mundo (ver tabela 1) de acordo com o apresentado em Chakraborty et al. (2010).

Na região promotora de *AVPR1a*, dois elementos repetitivos conhecidos como RS3 já foram descritos, dentre os quais o chamado DupB, localizado entre -3382 à -3729 pares de base de distância do início do sítio de transcrição do gene *AVPR1a* (Donaldson e Young, 2013; Latzman et al., 2014). Trabalhos anteriores têm demonstrado que os Macacos do Novo Mundo não apresentam esses microssatélites (Ren et al., 2014). Em contrapartida, uma segunda região de interesse selecionada chama-se “RS2”, um microssatélite localizado na região intrônica próxima a porção 3’ do exon 1 do referido gene, apesar da região já ter sido descrita (Thibonnier et al. 2000; Meyer-Lindenberg et al., 2011), nenhum trabalho já fora publicado associando a região com comportamento. Esta abordagem nos abre uma possibilidade para testarmos esta região em macacos do Novo Mundo é um mecanismo análogo ao RS3 quanto a influência no fenótipo comportamental.

Considerando o gene *DRD4*, será utilizado um par de *primers* descritos por Kustanovich et al. (2004), gerando um segmento cerca de aproximadamente 353 pares de base, que se encontra a jusante da região 3’ do exon 3 do referido gene. O mesmo será adaptado para macacos do Novo Mundo utilizando-se como referência o genoma do *Cebus capucinus*, disponível no NCBI.

Primers utilizados para a amplificação da região codificadora dos genes *OXT* e *OXTR*, tal como a região promotora do gene *OXTR* foram os mesmos descritos em Vargas-Pinilla et al., (2015).

As regiões de interesse amplificadas foram sequenciadas através do método Sanger. Ainda, a qualidade do sequenciamento para cada região será verificada através das informações obtidas pelo cromatograma através do software Geneious 8 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012)

Dados Fenotípicos

Indivíduos *Sapajus libidinosus* da Serra da Capivara, bem como de outras regiões, vem sendo monitorados há muitos anos (ver Haslam et al., 2016, e referências lá contidas). Desse modo, muitos os individuais já estão disponíveis para análise. Por exemplo, dentre as variáveis de interesse, a habilidade de fabricar e usar ferramentas é chave para este estudo. Por exemplo, Ottoni et al. (2005) e Ottoni e Izar (2008) demonstraram que os indivíduos do gênero *Sapajus/Cebus* mais hábeis eram os mais frequentemente observados pelos jovens infantes, o que permite estabelecer um parâmetro objetivo de categorização fenotípica para os indivíduos. Além disso, recentemente comportamentos inovadores foram descritos em fêmeas que arremessavam pedras nos machos no período reprodutivo (Falótico e Ottoni, 2013). Os últimos autores consideraram os arremessos em um período de 10 minutos como um único evento, de modo que o comportamento de cada fêmea (identificadas por um nome próprio) pode ser quantificado.

Análises dos Dados

Abordagem Populacional (intra-específica: *Sapajus libidinosus*) em Genes Candidatos

Os dados populacionais serão utilizados para compreendermos a distribuição dos alelos e sua relação com a variabilidade dos fenótipos comportamentais de interesse. Para isso, é necessário primeiramente calcular o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}), ou *inbreeding*, e se o grupo de interesse difere quanto a sua estrutura genética do grupo controle através da estimativa de índice de fixação, ou F_{ST} , para remover qualquer viés estatístico posterior. Assim, deve-se obter durante as coletas o conhecimento de parentesco das amostras coletadas, junto com outras variáveis como sexo, idade, local etc. Estas, somadas a estatísticas sumárias, como diversidade genética (π) e haplotípica (h), e equilíbrio de Hardy-Weinberg serão calculadas para os genes de interesse usando o programa Arlequin (Excoffier et al. 2005) e o DnaSP (Rozas et al. 2003).

Em complementação à análise do coeficiente de endocruzamento anterior, iremos aplicar corridas de homozigosidade, ou *runs of homozygosity* (ROH), estimadas através do programa Plink (Purcell et al. 2007). Nesta análise de ROH, trechos longos de DNA (1000kb) escaneados por *sliding window*, com um mínimo de 20 SNPs por trecho, permitindo no máximo 2 SNPs faltantes em cada indivíduo e nenhum heterozigoto serão considerados. O limiar de densidade de SNPs será configurada para 50SNPs/kb.

As frequências alélicas dos grupos populacionais, que serão construídos considerando variáveis de interesse (por exemplo: hábeis vs não-hábeis, machos vs fêmeas, *S. libidinosus* da Serra da Capivara vs *S. libidinosus* de outra região, fêmeas que arremessam pedras nos machos vs fêmeas que não arremessa, etc), serão comparadas através da análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier et al., 1992), também implementada no programa Arlequin. Ademais, o teste exato de Fisher será aplicado comparando as variantes fenotípicas com as genotípicas dos indivíduos - por exemplo, se são portadores de diferentes alelos e se produzem ou não ferramentas - em plataforma R.

RESULTADOS PRELIMINARES RELATIVOS AOS GENES *AVPR1A* E *AVPR1B*

Os primeiros resultados provindos do sequenciamento da região codificadora dos genes *AVPR1a* e *AVPR1b* mostram a existência de um possível polimorfismo na posição 62 do *AVPR1b* (figura 1). Este sítio está localizado na região intracelular (ICL) 1 do receptor. Dois alelos foram encontrados nas 3 amostras de *Sapajus libidinosus* já estudadas: Prolina (Pro) ou Leucina (Leu) são encontrados nesta posição, indicando provável polimorfismo. Três amostras de *Sapajus nigritus* apresentaram apenas o alelo Leu. Interessantemente, o alelo Pro tem sido descrito no *Homo sapiens*, e mesmo com muito baixa frequência permitiu a identificação do locus como sendo polimórfico em humanos (rs782317607). Infelizmente não é possível identificar a população humana em que o alelo Pro ocorre. O alelo com maior frequência (Leu) é também aquele que caracteriza os chimpanzés, bonobos, gorilas e orangotangos (*Pan troglodytes*, *Pan paniscus*, *Gorilla gorilla* e *Pongo abelli*), além dos neandertais e o homem de Denisova (Fam et al., 2018; sob revisão). Todos os outros macacos do Novo Mundo (tabela x) já investigados carregam uma Pro na posição, exceto, *Sapajus xanthosternos*, *Sapajus robustus* e *Cebus capucinus*, família Cebidae, que carregam uma Leu (Fam et al., 2018; sob revisão). *Brachyteles arachnoides*, família Atelidae também carrega uma Leu. Como são raros os estudos populacionais (exceto considerando nossa própria espécie) é difícil saber se o mesmo polimorfismo está ou não presente nas outras espécies de primatas, incluindo as do gênero *Sapajus* e *Cebus*. Não obstante, o fato dos dois alelos estarem segregando em *Sapajus libidinosus* indica a possibilidade de dois cenários: polimorfismo trans-específico ou mutação convergente. Aparentemente parece ser convergência já que a mutação que leva ao surgimento da Pro, e por consequência do polimorfismo na nossa espécie (CTG, Leu>CCG, Pro) é diferente daquela que leva ao surgimento da Pro no ramo dos macacos do Novo Mundo (CTG, Leu >CCA, Pro). Ainda, Fam et al. (2018; sob revisão) encontraram a posição 62 associada com cuidado

machos, com a aproximação dos jovens infantes, indispensável para que os mesmos possam, por observação, aprender as técnicas para produzir e utilizar ferramentas (Otoni et al., 2005; de Resende et al., 2008; Otoni e Izar, 2008). Vale destacar, que um dos *Sapajus libidinosus* com a Pro na posição 62 de AVPR1b é o macho alfa do bando (chamado de Torto), caracterizado como sendo extremamente tolerante com filhotes e fêmeas (Tiago Falótico, comunicação pessoal). Já o macho (chamado de Assustado) que apresenta uma Leu, é um macho de comportamento periférico.

Finalmente, o papel do AVPR1b na ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA) através da liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e modulação da biossíntese de glicocorticoides está bem estabelecido. Seu efeito sobre comportamentos sociais, como

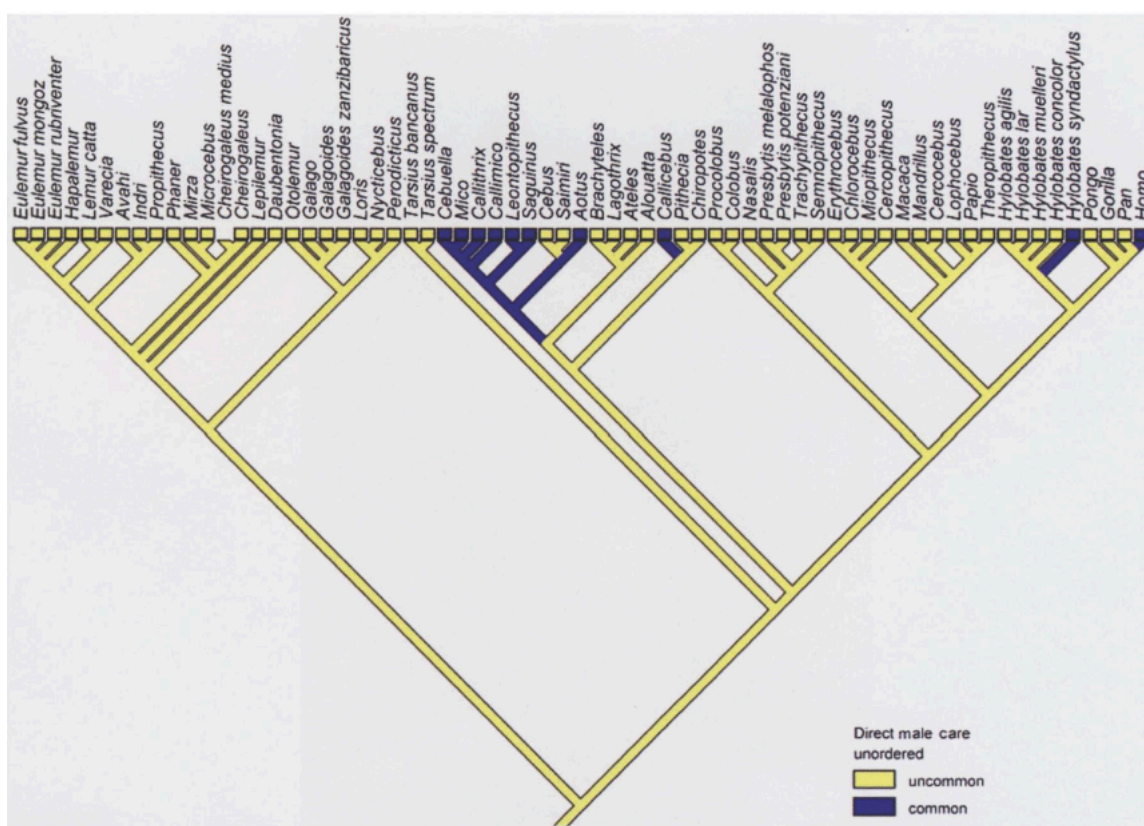


Figura 2. Filogenia dos primatas e a presença de cuidado paternal. Ramos em azul indicam aquelas espécies com cuidado paternal mais frequente (fonte: Fernandez-Duque et al. 2009).

agressão, ansiedade e interação pais-filhotes, tem sido estudado principalmente em roedores. Por exemplo, camundongos machos nocauteados para AVPR1b apresentaram níveis reduzidos de agressão, ansiedade e estresse, mas realizavam normalmente outras atividades tais como

comportamento sexual e atividades que envolviam cognição, indicando uma instigante especificidade funcional desse receptor.

Ademais, na posição 150 localizada na ICL 2 de AVPR1b, um indivíduo *Sapajus libidinosus* apresenta uma Treonina (Thr), enquanto os dois outros apresentam uma Isoleucina (Ile), indicando também um possível polimorfismo que deve ser melhor investigado.

No que diz respeito ao gene *AVPR1a*, uma das regiões de maior interesse é a região intrônica de microssatélite RS2. Apesar de termos até o momento poucas amostras sequenciadas, foi possível observar uma clara separação quanto à composição da unidade de repetição: a combinação citosina-timina (CT) é observada homogeneamente entre o grupo controle (*Sapajus nigritus*), enquanto os indivíduos *Sapajus libidinosus* do Parque Nacional da Serra da Capivara têm, além de CT, a combinação guanina-timina (GT) (figura 3). Contudo, tal microssatélite não apresenta associações fenotípicas descritas na literatura, algo que seria pioneiro no presente trabalho. No entanto, trabalhos anteriores com o microssatélite RS3, na região promotora de *AVPR1a*, em macacos do Velho Mundo têm enriquecido a literatura acadêmica frequentemente (Latzman et al., 2014; Ren, 2014; Staes et al., 2016). Por exemplo, Staes et al. (2016) descobriram que os bonobos homozigotos para alelos RS3 mais curtos eram menos peripatórios (*assertiveness*) e mais abertos (*openness*), indicando menor nível de ansiedade e mais tolerância (alelos RS3 mais longos estão associados ao aumento da transcrição de *AVPR1a*). O microssatélite RS3 não é encontrado em macacos do Novo Mundo, enquanto o RS2 é ausente nos macacos do Velho Mundo, justificando a necessidade de aprofundamento da pesquisa com relação a este tipo marcador, esteja ele localizado em região potencialmente funcional ou não.

Como um trabalho ainda em andamento, é compreensível as lacunas ainda presentes nos resultados, de modo que não podemos chegar a uma conclusão, mesmo que preliminar, satisfatória. Não obstante as limitações de um estudo em andamento, os resultados apresentados acima indicam distinções dentro e entre as espécies comparadas para os dois receptores já investigados, indicando perspectivas animadora.

TABELAS

Tabela 1. Genes Candidatos e suas associações com fenótipos comportamentos.

Genes	Fenótipos	Referências
<i>OXT</i>	Formação de parceiros, cuidado parental, comportamento de cuidados com infantes não aparentados	Vargas-Pinilla et al., 2015, 2016
<i>OXTR</i>	Formação de parceiros, cuidado parental, comportamento de cuidados com infantes não aparentados	Vargas-Pinilla et al., 2015,2016
<i>DRD4</i>	Busca de Novidades	Kustanovich et al., 2004
<i>SLC6A4</i>	Ansiedade, Busca de Novidades, Hiperatividade	Staes et al., 2014, 2016; Taub e Page, 2016
<i>AVPR1a</i>	Busca de Novidades, Dominância	Hopkins et al. 2012

Tabela 2. Primers

Gene	Primers	Referências
AVPR1a (~421 bp) (Intronic Region) RS2	<i>Forward</i> (58°C) GTGTCAGCAGCGTGAAGTC	Este estudo
	<i>Reverse</i> (58.3°C) TCTGGCTGACTCTAAGACACAGT	
DRD4 (~359 bp) (Exonic Region)	<i>Forward</i> (61.0°C) AGGACCCTCATGGCCTTG	Este estudo
	<i>Reverse</i> (61.4°C) CTGCTCTACTGGGCCACGT	
OXT	<i>Forward</i> (59.82°C) CCAGCGCACCCGCACCAT <i>Reverse</i> (60.15°C) GCTAGGGACTCACCTTGCG	Este estudo
OXR	<i>Forward</i> 1. CGTAAAGGGCTCGAAGGCCG 2. TGCTGTGGGACATCACCT 3. CTGCTGCAACCCCTGGATCTA	Vargas-Pinilla et al., 2015, 2016

	<p><i>Reverse</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ATGCCACCCACCTGCAAGTAC 2. TCCCAGACGCTCCACATCTG 3. AGAACACTGGACTTCCTGACCCA 	
<i>SLC6A4 (5HTTPR)</i>	<p><i>Forward</i></p> <p>TCGACTGGCGTTGCCGCTCTGAATGC (Humano)</p> <p>CGTAGGCATTGCTACTCTGAATGC (Sagui)</p>	<p>Chakraborty et al., 2010 (Humano)</p> <p>Este estudo (Sagui)</p>
	<p><i>Reverse</i></p> <p>GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC (Humano)</p> <p>GGACGGAGCTGGACAACCAT (Sagui)</p>	

REFERÊNCIAS

- Bendesky, A., Bargmann, C.I. (2011). Genetic contributions to behavioural diversity at the gene–environment interface. *Nature Reviews Genetics*, 12:809–820.
- Chakraborty, S., Chakraborty, D., Mukherjee, O., Jain, S., Ramakrishnan, U., Sinha, A. (2010). Genetic polymorphism in the serotonin transporter promoter region and ecological success in macaques. *Behav Genet.* 40(5):672-679.
- Cohen, J. (2007). Animal behavior. The world through a chimp's eyes. *Science*, 316:44-45.
- Danecek, P., Adam, A., Abecasis, G., Albers, C.A., Banks, E., DePristo, M.A., Handsaker, R.E., Lunter, G., Marth, G.T., Sherry, S.T., McVean, G., Durbin, R., 1000 Genomes Project Analysis Group (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15): 2156-2158
- Davey, J.W. e Blaxter, M.L. (2010). RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics*, 9(5): 416-423.
- Ding, Y.C., Chi, H.C., Grady, D.L., Morishima, A., Kidd, .JR., Kidd, K.K., Flodman, P., Spence, M.A., Schuck, S., Swanson, J.M., Zhang, Y.P., Moyzis, R.K. (2002). Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:309–314.
- Dobson, S. D., e Brent, L. J. N. (2013). On the evolution of the serotonin transporter linked polymorphic region (5-HTTLPR) in primates. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7:588.
- Donaldson, Z. R., e Young, L. J. (2008). Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5903), 900–904.
- Donaldson, Z. R., e Young, L. J. (2013). The Relative Contribution of Proximal 5' Flanking Sequence and Microsatellite Variation on Brain Vasopressin 1a Receptor (Avpr1a) Gene Expression and Behavior. *PLOS Genetics*, 9(8), e1003729.
- Etter, P. D., Bassham, S., Hohenlohe, P.A, Johnson, E. A, E Cresko, W. A. (2012). SNP Discovery and Genotyping for Evolutionary Genetics Using RAD Sequencing. In *Molecular Methods for Evolutionary Genetics, Methods in Molecular Biology*, vol. 772 (Vol. 772, pp. 157–178).
- Excoffier, L., Smouse P.E., Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1:e47–e50

- Falótico, T., Ottoni, E.B. (2013). Stone throwing as a sexual display in wild female bearded capuchin monkeys, *Sapajus libidinosus*. PLoS One 8(11):e79535.
- Fernandez-Duque E, Valeggia CR and Mendoza SP (2009) The Biology of Paternal Care in Human and Nonhuman Primates. *Annu Rev Anthropol* 38:115–130.
- Gilissen, C. et al. (2014). Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 511: 344–347.
- Goodall, J. (1971). *In the shadow of man*. Houghton Mifflin Company, New York.
- Haslam, M., Luncz, L.V., Staff, R.A., Bradshaw, F., Ottoni, E.B.; Falótico, T. (2016) Pre-Columbian monkey tools. *Current Biology*. 26 (13): R521–R522.
- Henry, P., e Russello, M. A. (2011). Obtaining high-quality DNA from elusive small mammals using low-tech hair snares. *European Journal of Wildlife Research*, 57(3), 429–435.
- Hockings, K. J., Bryson-Morrison, N., Carvalho, S., Fujisawa, M., Humle, T., McGrew, W. C., ... Matsuzawa, T. (2015). Tools to tipple: ethanol ingestion by wild chimpanzees using leaf-sponges. *Royal Society Open Science*, 2(6): 150150.
- Hofstede, G. (2005) *Cultures and organization: Software of the mind* (2nd Edition). McGraw Hill, New York.
- Johanson, B. e Edgar, B. (1996) *From Lucy to language*. Simon and Schuster Editions, New York.
- Johnson, M. R. et al. (2016). Systems genetics identifies a convergent gene network for cognition and neurodevelopmental disease. *Nature Neuroscience* 19, 223–32.
- Kaiser et al (2000) Dopamine D4 receptor 48-bp repeat polymorphism: no association with response to antipsychotic treatment, but association with catatonic schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 5:418-424.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C et al. (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649.
- Koonin E V (2005) Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu Rev Genet* 39:309–338. doi: 10.1146/annurev.genet.39.073003.114725.
- Koops, K., Visalberghi, E., van Schaik C.P. (2014). The ecology of primate material culture. *Biology Letters*. 10(11):20140508.
- Kustanovich, V., Ishii, J., Crawford, L., Yang, M., McGough, J.J., McCracken, J.T., et al. (2004). Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in

- ADHD: confirmation of association of ADHD with DRD4 and DRD5. *Molecular Psychiatry* 9:711–717.
- Latzman, R. D., Hopkins, W. D., Keebaugh, A. C., e Young, L. J. (2014). Personality in chimpanzees (*Pan troglodytes*): Exploring the hierarchical structure and associations with the vasopressin V1A receptor gene. *PLoS ONE*, 9(4).
- Leca JB, Gunst N, Pelletier AN, Vasey PL, Nahallage CA, Watanabe K, Huffman MA. (2016). A multidisciplinary view on cultural primatology: behavioral innovations and traditions in Japanese macaques. *Primates*.;57(3):333-338.
- Lee AG, Cool DR, Grunwald WC, et al. (2011). A novel form of oxytocin in New World monkeys. *Biol Lett.* 7(4):584-587.
- Li H, Durbin R. (2009a) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25:1754–1760.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. (2009b). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25:2078–2079.
- Malaivijitnond, S., Lekprayoon, C., Tandavanittj, N., Panha, S., Cheewatham, C., Hamada, Y. (2007). Stonetool usage by Thai long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *American Journal of Primatology*. 69, 227–233.
- Mannu, M. e Ottoni, E. B. (2009). The enhanced tool-kit of two groups of wild bearded capuchin monkeys in the Caatinga: tool making, associative use, and secondary tools. *Am. J. Primatol.* 71, 242–251.
- Matsuzawa, T. (2005). Primate viewing. Chimpanzee behavior shows remarkable regional variation. *Nature* 434: 21-22.
- McGrew, W.C. (2017). Field studies of *Pan troglodytes* reviewed and comprehensively mapped, focussing on Japan's contribution to cultural primatology. *Primates*. 58(1):237-258.
- Mercader, J., Panger, M., Boesch, C. (2002). Excavation of a chimpanzee stone tool site in the african rainforest. *Science*. 296:1380.
- Meyer-Lindenberg, A., Domes, G., Kirsch, P. and Heinrichs, M. (2011). Oxytocin and vasopressina in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nature Reviews Neuroscience*. 12(9):524-538.
- Oakley, K. P. (1957). *Man the tool-maker*. Chicago Natural History Museum Press, Chicago.
- Ottoni, E. B., Dogo, B., e Izar, P. (2005). Watching the best nutcrackers: what capuchin monkeys (*Cebus apella*) know about others's tool-using skills. *Anim Cogn* 24: 215-219.

- Otoni, E. B., e Izar, P. (2008). Capuchin monkey tool use: Overview and implications. *Evolutionary Anthropology*, 17(4):171-178.
- Pennisi, E. (2006). Social animals prove their smarts. *Science* 312:1734-1738.
- Procyshyn, T.L., Hurd, P.L., Crespi, B.J. (2017). Association testing of vasopressin receptor 1a microsatellite polymorphisms in non-clinical autism spectrum phenotypes. *Autism Res.* doi: 10.1002/aur.1716.
- Proffitt, T., Luncz, L. V., Falótico, T., Otoni, E. B., de la Torre, I., e Haslam, M. (2016). Wild monkeys flake stone tools. *Nature*, 539 (7627): 85–88.
- Pruetz, J. D., e Bertolani, P. (2007). Savanna Chimpanzees, *Pan troglodytes verus*, Hunt with Tools. *Current Biology*, 17(5), 412–417.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira M, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker P, Daly MJ, Sham PC. (2007). PLINK: A Tool Set for Whole-Genome and Population-Based Linkage Analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81.
- Ren, D. (2014). Genetic Diversity of Microsatellite RS3 in AVPR1a Promoter Region in Primates. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 1(4), 3.
- Resende, B.D, Otoni, E. (2002). Ontogeny of nutcracking behavior in semifree-ranging group of tufted capuchin monkeys. Abstract of the XIXth Congress of the International primatology Society 3190320.
- Rozas, J., Sanchez-Delbarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R. (2003). DnaSP: DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19:2496–2497
- Sasaki, T., Biro, D. (2017). Cumulative culture can emerge from collective intelligence in animal groups. *Nat Commun.* 8:15049.
- Schaik, C. P., Ancrenaz, M., Borgen, G., Galdikas, B., Knott, C. D., Singleton, I., Suzuki, A., Utami, S. S., Merrill, M. (2003). Orangutan cultures and the evolution of material culture. *Science* 299: 102-105.
- Shattuck, M. R., Satkoski-Trask, J., Deinard, A., Tito, R. Y., Smith, D. G., e Malhi, R. S. (2014). The evolutionary history of SLC6A4 and the role of plasticity in macaca. *American Journal of Physical Anthropology*, 153(4), 605–616.
- Singer, T., Tusche, A. (2014). Understanding others: brains mechanisms of theory of mind and empathy. *Neuroeconomics*. Elsevier.
- Staes, N., Stevens, J. M. G., Helsen, P., Hillyer, M., Korody, M., e Eens, M. (2014). Oxytocin and Vasopressin Receptor Gene Variation as a Proximate Base for Inter- and Intraspecific Behavioral Differences in Bonobos and Chimpanzees. *PLoS ONE*, 9(11), e113364.

- Staes, N., Weiss, A., Helsen, P., Korody, M., Eens, M., e Stevens, J. M. G. (2016). Bonobo personality traits are heritable and associated with vasopressin receptor gene 1a variation. *Scientific Reports*, 6, 38193.
- Schuch, J.B., Paixão-Côrtes, V.R., Friedrich, D.C., Tovo-Rodrigues, L. (2016). The contribution of protein intrinsic disorder to understand the role of genetic variants uncovered by autism spectrum disorders exome studies. *American Journal of Medical Genetics B: Neuropsychiatric Geneticis*, 171B(3):479-91
- Taub, D. R., e Page, J. (2016). Molecular signatures of natural selection for polymorphic genes of the human dopaminergic and serotonergic systems: A review. *Frontiers in Psychology*. 7:857.
- Tovo-Rodrigues, L., Callegari-Jacques, S.M., Petzl-Erler, M.L., Tsuneto, L., Salzano, F.M., Hutz, M.H. (2010). Dopamine Receptor D4 Allele Distribution in Amerindians: A Reflection of Past Behavior Differences? *American Journal of Physical Anthropology*. 143(3): 458-464.
- Vargas-Pinilla, P., Paixão-Côrtes, V.R., Paré, P., Tovo-Rodrigues, L., Vieira, C.M.A.G., Xavier, A., Comas, D., Pissinatti, A., Sinigaglia, M., Rigo, M.M., Fioravanti Vieira G., Lucion, A.B., Salzano, F.M. e Bortolini, M.C. (2015). Evolutionary pattern in the OXT-OXTR system in primates: Coevolution and positive selection footprints. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 112(1): 88-93.
- Vargas-Pinilla, P., Babb, P., Nunes, L. , Paré, P., Rosa, G., Felkl, A., Longo, D., Salzano, F.M., Paixão-Côrtes, V.R., Gonçalves, G.L., Bortolini, M.C. (2016). Progesterone Response Element Variation in the OXTR Promoter Region and Paternal Care in New World Monkeys. *Behavior genetics*. 47(1): 77-87.
- Visalberghi, Elisabetta, Di Bernardi, Cecilia, Marino, Luca A., Fragaszy, Dorothy, Izar, Patricia (2017) Female Bearded Capuchin Monkeys (*Sapajus libidinosus*) Use Objects to Solicit the Sexual Partner. *Journal of Comparative Psychology*.
- Vallender, E. J. (2011). Comparative genetic approaches to the evolution of human brain and behavior. *American Journal of Human Biology*. 23: 53–64.
- Vissers, L. E. L. M., Gilissen, C. e Veltman, J. A. (2015). Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nature Reviews Genetics*. 17: 9–18
- Vogel, G. (1999). Chimps in the wild show stirrings of culture. *Science* 284:2070-2073.
- Waal, F. B. (2005). A century of getting to know the chimpanzee. *Nature* 437: 56-59.
- Westergaard, G.C., Fragaszy, D.M. (1987). The manufacture and use of tools by capuchin monkeys (*Cebus apella*). *J. Comp Psycho* 101: 159-168.

Whiten, A., Horner, V., Wall, F.B. (2005). Conformity to cultural norms of tool use in chimpanzees. *Nature* 437: 737-740.

Whiten, A., Spiteri, A., Horner, V., Bonnie K.E., Lambeth, S.P., Schapiro, S.J., Wall, F.B. (2007). Transmission of multiple traditions within and between chimpanzee groups. *Current Biology*. 17(12): 1038-1043.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas”

Friedrich Nietzsche

Estudar a natureza do comportamento animal é uma tarefa desafiadora, vista sua enorme complexidade. Assim, abordagens multi e interdisciplinar muitas vezes são requeridas e indispensáveis para que o conhecimento sobre o tema avance. Com base nisso, foi desenvolvida a presente Tese. Discussões específicas mais compactas sobre os achados estão presentes no artigo e nos manuscritos já apresentados, de modo que neste seguinte item buscou-se discorrer sobre os achados de um modo mais amplo e integrativo. Não obstante, alguma sobreposição e repetição com o que já fora dito e comentado é inevitável.

Ao longo da presente Tese foi possível demonstrar que humanos modernos e arcaicos carregam uma quantidade relevante polimorfismos compartilhados revelando a possível contribuição da seleção balanceadora na manutenção dos mesmos (**Capítulo 3**). Não obstante, apesar da dinâmica do trabalho ter-se voltado para os genes envolvidos diretamente no comportamento e desenvolvimento cerebral, os achados mais instigantes foram encontrados nos genes associados ao sistema imune, sistema onde a seleção balanceadora tem deixado marcas bem conhecidas, e que tem sido recentemente associado com traços comportamentais complexos (Sekar et al., 2016; Sanders et al., 2017).

No **Capítulo 4** achados sobre genes ortólogos de cinco dos principais sistemas neurotransmissores humanos (GABAérgico, colinérgico, serotoninérgico, dopaminérgico e glutamatérgico), bem como sua abundância em eucariotos foram descritos. Vale destacar que os estudos de interação de redes podem diferir entre redes metabólicas, as quais compõem diferentes classes de moléculas como enzimas, substratos e cofatores, e aquelas envolvendo somente interações proteína-proteína. Uma das variações de interação de redes é a interação gênica, onde cada nó é um gene e as arestas representam a interação entre seus produtos proteicos (Harrington et al., 2008). Quanto mais conectado um nó proteico é, mais importante ele se apresenta para o funcionamento celular normal e mais provavelmente a sua falta acarretará na letalidade do organismo (Liu et al., 2006). Se determinado gene apresenta uma grande importância, ele está submetido à seleção purificadora, sendo possível uma nova especificação somente após sua duplicação, onde o segundo acumulará mutações mais facilmente. Genes com maior número de conexões, provavelmente são aqueles mais antigos, apresentando, dessa forma, maior grau de nó na análise de rede. Especificamente, neurotransmissores têm sua via de sinalização bem anotada, o que nos permite estudar as perdas e ganhos de interações consequentes de modificações na sequência de aminoácidos.

Devido à história evolutiva compartilhada entre os genes ortólogos, é esperado que uma gama destes, mesmo que em organismos diferentes, seja normalmente associada à funções semelhantes (Chen e Jeong, 2000). No entanto, essa associação torna-se controversa no momento que o tempo de divergência entre as espécies e mutações acumuladas nos genes ortólogos influenciam sua similaridade funcional (Studer e Robinson-Rechavi, 2009). Assim, qualquer associação entre genes envolvidos com neurotransmissão em humanos, não apresenta, necessariamente, uma associação genótipo/fenótipo direta quando seu ortólogo é identificado em outros organismos. Desse modo, através da utilização dos recursos promovidos pela Biologia de Sistemas, foi possível delinear um cenário sobre o processo evolutivo que deu origem às rotas de interação de genes envolvidos na sinalização de neurotransmissores hoje reconhecidos e identificados no *Homo sapiens* (**Capítulo 4**).

Neste trabalho, corroboramos estudos anteriores que sugerem a origem do sistema nervoso seria encontrada no ramo dos Cnidários, - grupo que surgiu, provavelmente, há 580 milhões de anos - onde há um pico no surgimento de genes neuro-exclusivos, especialmente codificadores para receptores de neurotransmissores. Também identificamos que genes neuro-exclusivos são encontrados em regiões mais periféricas da rede, provavelmente por terem sido incorporados mais tardiamente à rede e com funcionalidades mais específicas.

A rede dos cinco sistemas de neurotransmissores, praticamente completa na origem dos Cnidários, atinge seu *plateau* na origem dos peixes há cerca de 530 Ma, sendo basicamente mantida ao longo dos vertebrados. Curiosamente, esse *plateau* se destaca por marcar um grande evento caracterizado por aumento na abundância dos genes, ou seja, eles estariam presentes em um grande grupo de organismos, de diferentes grupos taxonômicos, demonstrando o sucesso adaptativo deste repertório de famílias de ortólogos.

É importante ressaltar que são conhecidos três eventos de duplicação de todo o genoma ao longo da evolução dos vertebrados, onde os dois primeiros ocorreram, provavelmente, no ancestral comum a todos os vertebrados (Dehal e Boore, 2005), e a uma terceira no ramo dos peixes teleósteos há cerca de 350 Ma (Opazo et al., 2013; Pasquier et al., 2016). Devido a esse último evento ter sido observado em peixes, a interpretação de nossos dados pode levantar indagações quanto ao aumento da abundância observada nos vertebrados, ou seja, se esta estaria relacionada diretamente ao evento de duplicação e não ao sucesso adaptativo do conjunto dos genes do comportamento. Em consequente, é de grande valia ser ressaltado que independentemente de tal evento, foi observado um sutil aumento na abundância relativa nos vertebrados em comparação aos seus ancestrais e que este *plateau* é mantido em primatas. Dessa forma, o arcabouço biológico que

permitiu o desenvolvimento de fenótipos comportamentais complexos em humanos já estava presente nos ancestrais comuns a peixes e humanos, e as novidades comportamentais posteriores seriam oriundas de mudanças pontuais, mas com um provável efeito adaptativo relevante.

Inferir a associação entre a taxa de substituição variável em primatas e seus diferentes traços históricos de vida é o trabalho que compõe o **Capítulo 5**. Nele, demonstramos que, de acordo com a razão entre as taxas de substituição calculadas para o cromossomo sexual X e os autossômicos, observamos menores valores X/A para humanos e gorilas quando comparados com estudos anteriores (Presgraves e Yi, 2009; Amster e Sella, 2016). Esse valor sugere que a competição espermática em gorilas e humanos pode ter sido muito mais intensa no passado do que atualmente. Ou seja, machos humanos e gorilas competiam mais com outros machos pela cópula com as fêmeas, ou mesmo para efetivamente fecundá-la, o que acarretaria em uma seleção sobre uma produção de esperma mais intensa (Presgraves e Yi, 2009), ou mesmo sobre o encurtamento no tempo de geração dos machos para uma reprodução mais rápida e por um tempo mais prolongado (Moorjani et al., 2016b). Não obstante, diferentemente do que observamos nos chimpanzés atuais e que foi replicado em nosso trabalho e estimado em trabalhos anteriores, humanos e gorilas não mantêm suas taxas X/A constantes, sugerindo que para o estudo da evolução do fenótipo de comportamento sexual os chimpanzés seriam um bom modelo do ancestral putativo da linhagem dos grandes macacos, incluindo os *Homo*.

Ainda, comparando os diferentes traços de histórico de vida dos primatas nós encontramos uma correlação negativa entre as taxas de substituição nos cromossomos autossômicos e a razão entre idades de amadurecimento entre fêmeas e machos ($p = 0.0293$); e em outros três traços de história de vida, mesmo quando controlada pelo método de análise filogenética independente de contraste (PIC, *Phylogenetic Independent Contrast Analysis*).

Quando comparamos as taxas de substituições dos cromossomos sexuais Y e X, e os autossômicos observamos um padrão claro de maior acúmulo de mutações nos cromossomos Y, seguido pelos autossômicos e, então, pelo cromossomo X. Isso ocorre devido à uma maior produção de espermatozoides (em maior quantidade e de forma constante) quando comparados aos óvulos (por volta da 16ª a 20ª semana de gestação, o feto feminino possui o número máximo de óvulos que terá durante a sua vida), o que leva a maiores chances de erros de replicação durante a espermatogênese do que oogênese, algo já bem conhecido e bastante reportado na literatura.

Já no **Capítulo 6** descrevemos de maneira preliminar a variabilidade intra e interespecífica encontrada em genes relacionados ao comportamento social, e o potencial dessas

como parte do repertório genético por trás da emergência de fenótipos comportamentais adaptativos (uso de ferramentas) em *Sapajus libidinosus*. Finalizamos parafraseando um dizer da psicologia da *Gestal*: “o todo é maior que a soma de suas partes”. Apesar das críticas à teoria citada, a frase advém do incontestável fato de que só se pode pretender compreender o comportamento animal, incluindo humano, através de um conjunto amplo e robusto de informações oriundas da observação acurada e da rigorosa análise científica. Na presente Tese desenvolvemos abordagens que nos ajudaram a compreensão da evolução de comportamentos adaptativos complexos, incluindo pensamento criativo, presentes no gênero *Homo* em um período de, há pelo menos, ~500Kya. Além disso, investigamos as diferenças e semelhanças em sistemas genéticos neurotransmissores, considerando profundidade de tempo evolutivo, visando compreender aspectos únicos do nosso comportamento. Ainda, identificamos que traços comportamentais no que tange às estratégias reprodutivas dentro da ordem dos primatas acabam por impactar sobre às taxas de substituição nucleotídicas identificadas no genoma das espécies desse clado. Por conseguinte, os trabalhos expostos se complementam, pois apresentam tanto abordagem micro quanto macroevolutivas, contribuindo desse modo, em uníssonos, para revelar as bases genéticas por trás de comportamentos adaptativos e como tais comportamentos podem, em um ciclo natural vigoroso, influenciar a evolvibilidade das espécies.

Como perspectivas futuras podemos dizer que devido a majoritária característica de processamento e análise de dados da presente Tese de Doutorado, não foi possível desenvolver ensaios experimentais para, por exemplo, verificar o impacto dos polimorfismos compartilhados entre humanos e neandertais sobre o fenótipo comportamental. Outrossim, nos demais estudos aqui apresentados, abordagens adicionais *in silico* e também *in vitro* e/ou *in vivo* podem ser idealizadas, de modo que podemos vislumbrar novos e instigantes resultados a partir daqueles aqui relatados.

8. REFERÊNCIAS

- Alba DM (2010) Cognitive inferences in fossil apes (Primates, Hominoidea): Does encephalization reflect intelligence? *J Anthropol Sci* 88:11–48.
- Amster G and Sella G (2016) Life history effects on the molecular clock of autosomes and sex chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:1588–1593.
- Baab KL (2008) The taxonomic implications of cranial shape variation in *Homo erectus*. *J Hum Evol* 54:827–847.
- Bailey JN, Breidenthal SE, Jorgensen MJ, McCracken JT and Fairbanks L a (2007) The association of DRD4 and novelty seeking is found in a nonhuman primate model. *Psychiatr Genet* 17:23–27.
- Bar-Yosef O (2002) The upper paleolithic revolution. *Annu. Ver. Anthropol.* 31:363–393.
- Bendesky A and Bargmann CI (2011) Genetic contributions to behavioural diversity at the gene-environment interface. *Nat Rev Genet* 12:809–820.
- Berna F, Goldberg P, Horwitz LK, Brink J, Holt S, Bamford M and Chazan M (2012) PNAS Plus: Microstratigraphic evidence of in situ fire in the Acheulean strata of Wonderwerk Cave, Northern Cape province, South Africa. *Proc Natl Acad Sci* 109:E1215–E1220.
- Boon AK, Réale D and Boutin S (2007) The interaction between personality, offspring fitness and food abundance in North American red squirrels. *Ecol Lett* 10:1094–1104.
- Bruner E, Manzi G and Arsuaga JL (2003) Encephalization and allometric trajectories in the genus *Homo*: evidence from the Neandertal and modern lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15335–15340.
- Cagliani R, Fumagalli M, Pozzoli U, Riva S, Cereda M, Comi GP, Pattini L, Bresolin N and Sironi M (2009) A complex selection signature at the human AVPR1B gene. *BMC Evol Biol* 9:123.
- Cela-Conde CJ e Ayala FJ (2007) *Human Evolution: Trails from the Past*. Oxford, Oxford University Press, 437 p.
- Charlesworth D (2006) Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions. *PLoS Genet* 2:e64.
- Chen R and Jeong SS (2000) Functional prediction: identification of protein orthologs and paralogs. *Protein Sci* 9:2344–53.

Clark AG (1997) Neutral behavior of shared polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7730-7734.

Dalgalarrondo P (2005) *Evolução do Cérebro: sistema nervoso, psicologia e psicopatologia sob a perspectiva evolucionista*. Artmed, Porto Alegre. 462 p.

de Resende BD, Ottoni EB and Fragaszy DM (2008) Ontogeny of manipulative behavior and nut-cracking in young tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*): a perception-action perspective. *Dev Sci* 11:828–840.

De Waal FBM (1999) Cultural primatology comes of age. *Nature* 399:635-636.

Dehal P and Boore JL (2005) Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol*.

Ding Y-C, Chi H-C, Grady DL, Morishima A, Kidd JR, Kidd KK, Flodman P, Spence MA, Schuck S, Swanson JM et al. (2002) Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:309–314.

Dobson SD and Brent LNJ (2013a) On the evolution of the serotonin transporter linked polymorphic region (5-HTTLPR) in primates. *Front Hum Neurosci* 7:588.

Donaldson ZR and Young LJ (2008) Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* 322:900–904.

Donaldson ZR and Young LJ (2013) The Relative Contribution of Proximal 5' Flanking Sequence and Microsatellite Variation on Brain Vasopressin 1a Receptor (*Avpr1a*) Gene Expression and Behavior. *PLOS Genet* 9:e1003729.

Etler D a (2000) *Homo erectus in East Asia : Human Ancestor or Evolutionary Dead-End? Box 1 : Pleistocene hominid phylogenies : multilinear and recent out of Africa theories*. *Changes* 4:37–50.

Falótico T, Siqueira JO and Ottoni EB (2017) Digging up food: excavation stone tool use by wild capuchin monkeys. *Sci Rep* 7:6278.

Fijarczyk A and Babik W (2015) Detecting balancing selection in genomes: Limits and prospects. *Mol Ecol* 24:3529-3545.

French JA, Taylor JH, Mustoe AC and Cavanaugh J (2016) Neuropeptide diversity and the regulation of social behavior in New World primates. *Front Neuroendocrinol* 42:18-39.

Gardner A (2015) The genetical theory of multilevel selection. *J Evol Biol* 28:305-319.

Gilissen C, Hahir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bom BWM, Willemsen MH, Kwint M, Janssen IM, Hoischen A, Schenck A, et al. (2014) Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 511:344-347.

Goren-Inbar N, Alpers N, Kislev ME, Simchoni O, Melamed Y, Ben-Nun A and Werker E (2004) Evidence of hominin control of fire at Gesher Benot Ya'aqov, Israel. *Science* 304:725–727.

Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MH-Y et al. (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328:710–722.

Haidle MN and Pawlik AF (2010) The earliest settlement of Germany: Is there anything out there? *Quat Int* 223–224:143–153.

Harmand S, Lewis JE, Feibel CS, Lepre CJ, Prat S, Lenoble A, Boës X, Quinn RL, Brenet M, Arroyo A et al. (2015) 3.3-million-year-old stone tools from Lomekwi 3, West Turkana, Kenya. *Nature* 521:310–315.

Harrington ED, Jensen LJ and Bork P (2008) Predicting biological networks from genomic data. *FEBS Lett* 582:1251–1258.

Haslam M, Luncz L V., Staff RA, Bradshaw F, Ottoni EB and Falótico T (2016) Pre-Columbian monkey tools. *Curr Biol* 26:R521–R522. doi: 10.1016/j.cub.2016.05.046

Henshilwood, C., & Marean, C. (2003). The Origin of Modern Human Behavior: Critique of the Models and Their Test Implications. *Curr Anthropol*, 44(5), 627-651. doi:10.1086/377665

Heyes S, Pratt WS, Rees E, Dahimene S, Ferron L, Owen MJ and Dolphin AC (2015) Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and neurological disorders. *Prog Neurobiol*.

Hiwatashi T, Okabe Y, Tsutsui T, Hiramatsu C, Melin AD, Oota H, Schaffner CM, Aureli F, Fedigan LM, Innan H, e Kawamura (2010) Na explicit signature of balancing selection for color-vision variation in New World monkeys. *Mol Biol Evol* 27(2):453-464.

Kreitman M, Di Rienzo A (2004) Balancing claims for balancing selection. *Trends Genet* 20(7):300-304.

Johnson MR, Shkura K, Langley SR, Delahaye-Duriez A, Srivastava P, Hill WD, Rackham OJL, Davies G, Harris SE, Moreno-Moral A, et al. (2016) Systems genetics identifies a convergent gene network for cognition and neurodevelopmental disease. *Nat Neurosci* 19:223-32.

Krause J, Lalueza-Fox C, Orlando L, Enard W, Green RE, Burbano HA, et al. The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with Neandertals. *Curr Biol*. 2007; 17(21):1908–1912.

Koehbach J, O'Brien M, Muttenthaler M, Miazzo M, Akcan M, Elliott AG, Daly NL, Harvey PJ, Arrowsmith S, Gunasekera S, Smith TJ, Wray S, Göransson U, Dawson PE, Craik DJ, Freissmuth M, Gruber CW. (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* 110(52):21183-21188.

Larsen SA, Mogensen L, Dietz R, Baagøe HJ, Andersen M, Werge T and Rasmussen HB (2005) Identification and characterization of tandem repeats in exon III of dopamine receptor D4 (DRD4) genes from different mammalian species. *DNA Cell Biol* 24:795–804. doi: 10.1089/dna.2005.24.795

Latzman RD, Hopkins WD, Keebaugh AC and Young LJ (2014) Personality in chimpanzees (*Pan troglodytes*): Exploring the hierarchical structure and associations with the vasopressin V1A receptor gene. *PLoS One* 9:e95741. doi: 10.1371/journal.pone.0095741

Lent R (2010) *Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência*. 2a edição. Atheneu, Rio de Janeiro, 786 p.

Lewin R (2005) *Human Evolution*. 5 a edição. Blackwell Publishing, Oxford, 277 p.

Liu J, Perumal NB, Oldfield CJ, Su EW, Uversky VN and Dunker a. K (2006) Intrinsic disorder in transcription factors. *Biochemistry* 45:6873–6888. doi: 10.1021/bi0602718

Lordkipanidze D, de León MS, Margvelashvili A, Rak Y, Rightmire GP, Vekua A and Zollikofer CPE (2013) A Complete Skull from Dmanisi, Georgia, and the Evolutionary Biology of Early Homo. *Science* (80-) 342:326–331.

Lordkipanidze D, Vekua A, Ferring R, Rightmire GP, Agusti J, Kiladze G, Mouskhelishvili A, Nioradze M, Ponce de León MS, Tappen M et al. (2005) Anthropology: the earliest toothless hominin skull. *Nature* 434:717–718.

McPherron SP, Alemseged Z, Marean CW, Wynn JG, Reed D, Geraads D, Bobe R and Béarat HA (2010) Evidence for stone-tool-assisted consumption of animal tissues before 3.39 million years ago at Dikika, Ethiopia. *Nature* 466:857–860.

Meyer M, Kircher M, Gansauge M-T, Li H, Racimo F, Mallick S, Schraiber JG, Jay F, Prüfer K, de Filippo C et al. (2012) A High-Coverage Genome Sequence from an Archaic Denisovan Individual. *Science* (80-) 338:222–226.

Mellars P (2004) Neanderthals and the modern human colonization of Europe. *Nature* 432(7016): 461-465.

Miller-Butterworth CM, Kaplan JR, Shaffer J, Devlin B, Manuck SB and Ferrell RE (2008) Sequence variation in the primate dopamine transporter gene and its relationship to social dominance. *Mol Biol Evol* 25:18–28.

Mogensen L, Kinze CC, Werge T and Rasmussen HB (2006) Identification and characterization of a tandem repeat in exon III of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene in cetaceans. *J Hered* 97:279–284.

Moorjani P, Amorim CEG, Arndt PF and Przeworski M (2016a) Variation in the molecular clock of primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:10607–10612.

Moorjani P, Gao Z and Przeworski M (2016b) Human Germline Mutation and the Erratic Evolutionary Clock. *PLOS Biol* 14:e2000744.

Mourre V, Villa P and Henshilwood CS (2010) Early use of pressure flaking on lithic artifacts at Blombos Cave, South Africa. *Science* 330:659–662.

Opazo JC, Butts GT, Nery MF, Storz JF and Hoffmann FG (2013) Whole-Genome Duplication and the Functional Diversification of Teleost Fish Hemoglobins. *Mol Biol Evol* 30:140–153.

Otoni EB, de Resende BD and Izar P (2005) Watching the best nutcrackers: what capuchin monkeys (*Cebus apella*) know about others' tool-using skills. *Anim Cogn* 8:215–219.

Otoni, E. B., Dogo, B., e Izar, P. (2005). Watching the best nutcrackers: what capuchin monkeys (*Cebus apella*) know about others's tool-using skills. *Anim Cogn* 24: 215-219.

Otoni EB e Izar P (2008) Capuchin monkey tool use: Overview and implications. *Evol Anthropol* 17:171–178. doi: 10.1002/evan.20185

Paixão-Côrtes VR, Viscardi LH, Salzano FM, Hünemeier T, Bortolini MC (2012) *Homo sapiens*, *Homo neanderthalensis* and the Denisova specimen: new insights on their evolutionary histories using whole-genome comparisons. *Genet Mol Biol*. 2012. 35. pp. 904-911.

Paixão-Côrtes VR, Viscardi LH, Salzano FM, Cátira Bortolini M and Hünemeier T (2013) The cognitive ability of extinct hominins: Bringing down the hierarchy using genomic evidences. *Am J Hum Biol* 25:702-705.

Pare P, Paixao-Cortes VR, Tovo-Rodrigues L, Vargas-Pinilla P, Viscardi LH, Salzano FM, Henkes LE and Bortolini MC (2016) Oxytocin and arginine vasopressin receptor evolution: implications for adaptive novelties in placental mammals. *Genet Mol Biol* 39:646–657.

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 U S A*. 114(34):9044-9049.

Pascale E, Lucarelli M, Passarelli F, Laviola G (2012) Monomorphic region of serotonin transporter promoter gene in New World Monkeys. *Am J Prim* 74(11):1028-1034.

Pasquier J, Cabau C, Nguyen T, Jouanno E, Severac D, Braasch I, Journot L, Pontarotti P, Klopp C, Postlethwait JH et al. (2016) Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database. *BMC Genomics* 17:368.

Pike AWG, Hoffmann DL, Garcia-Diez M, Pettitt PB, Alcolea J, De Balbin R, Gonzalez-Sainz C, de las Heras C, Lasheras JA, Montes R, et al. (2012) U-series dating of Paleolithic art in 11 caves in Spain. *Science* 336:1409-1413.

Plummer T (2004) Flaked stones and old bones: Biological and cultural evolution at the dawn of technology. *Yearb Phys Anthropol* 47:118–164.

Ponce de León MS, Bienvenu T, Akazawa T and Zollikofer CPE (2016) Brain development is similar in Neanderthals and modern humans. *Curr Biol* 26:R665–R666.

Pradhan GR, Tennie C and van Schaik CP (2012) Social organization and the evolution of cumulative technology in apes and hominins. *J Hum Evol* 63:180–190.

Presgraves DC and Yi S V (2009) Doubts about complex speciation between humans and chimpanzees. *Trends Ecol Evol* 24:533–540.

Procyshyn, T.L., Hurd, P.L., Crespi, B.J. (2016). Association testing of vasopressin receptor 1a microsatellite polymorphisms in non-clinical autism spectrum phenotypes. *Autism Res.* doi: 10.1002/aur.1716. Proffitt T, Luncz L V., Falótico T, Ottoni EB, de la Torre I and Haslam M (2017) Wild monkeys flake stone tools. *Nature* 539:85–88.

Pruitt JNJ and Riechert SSE (2011) How within-group behavioural variation and task efficiency enhance fitness in a social group. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 278:1209-1215.

Pruetz JD and Bertolani P (2007) Savanna Chimpanzees, *Pan troglodytes verus*, Hunt with Tools. *Curr Biol* 17:412–417.

Pruetz JD, Bertolani P, Ontl KB, Lindshield S, Shelley M and Wessling EG (2015) New evidence on the tool-assisted hunting exhibited by chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) in a savannah habitat at Fongoli, Sénégal. *R Soc Open Sci*.

Prüfer K, de Filippo C, Grote S, Mafessoni F, Korlević P, Hajdinjak M, Vernot B, Skov L, Hsieh P, Peyrégne S et al. (2017) A high-coverage Neandertal genome from Vindija Cave in Croatia. *Science* 358(6363):655-658.

Prüfer K, Racimo F, Patterson N, Jay F, Sankararaman S, Sawyer S, Heinze A, Renaud G, Sudmant PH, de Filippo C et al. (2014) The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature* 505:43–49.

Reich D, Green RE, Kircher M, Krause J, Patterson N, Durand EY, Viola B, Briggs AW, Stenzel U, Johnson PLF et al. (2010) Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* 468:1053–1060.

Rhodes SE, Walker MJ, López-Jiménez A, López-Martínez M, Haber-Uriarte M, Fernández-Jalvo Y and Chazan M (2016) Fire in the Early Palaeolithic: Evidence from burnt small mammal bones at Cueva Negra del Estrecho del Río Quípar, Murcia, Spain. *J Archaeol Sci Reports* 9:427–436.

Roebroeks W e Villa P (2011) On the earliest evidence for habitual use of fire in Europe. *PNAS* 108: 209-214.

Sanders AR, Drigalenko EI, Duan J, Moy W, Freda J, Göring HHH and Gejman P V (2017) Transcriptome sequencing study implicates immune-related genes differentially expressed in schizophrenia: new data and a meta-analysis. *Transl Psychiatry* 7:e1093.

Sanz CM and Morgan DB (2009) Flexible and Persistent Tool-using Strategies in Honey-gathering by Wild Chimpanzees. *Int J Primatol* 30:411–427.

Schwartz JH (2004) Anthropology. Getting to know *Homo erectus*. *Science* 305:53–54.

Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N, Tooley K, Presumey J, Baum M, Van Doren V et al. (2016) Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 530:177–183.

Shattuck MR, Satkoski-Trask J, Deinard A, Tito RY, Smith DG and Malhi RS (2014) The evolutionary history of SLC6A4 and the role of plasticity in macaca. *Am J Phys Anthropol* 153:605–616.

Shettleworth SJ (2010) *Cognition, evolution, and behavior*. Oxford University Press, Oxford, 720 p.

Sholtis SJ and Noonan JP (2010) Gene regulation and the origins of human biological uniqueness. *Trends Genet* 26:110–118.

Staes N, Koski SE, Helsen P, Franssen E, Eens M and Stevens JMG (2015) Chimpanzee sociability is associated with vasopressin (*Avpr1a*) but not oxytocin receptor gene (*OXTR*) variation. *Horm Behav* 75:84–90.

Staes N, Stevens JMG, Helsen P, Hillyer M, Korody M and Eens M (2014) Oxytocin and Vasopressin Receptor Gene Variation as a Proximate Base for Inter- and Intraspecific Behavioral Differences in Bonobos and Chimpanzees. *PLoS One* 9:e113364.

Staes N, Weiss A, Helsen P, Korody M, Eens M and Stevens JMG (2016) Bonobo personality traits are heritable and associated with vasopressin receptor gene 1a variation. *Sci Rep* 6:38193.

Stewart JR e Stringer CB (2012) Human evolution out of Africa: the role of regugia and climate change. *Science* 335 (6074):1317-1321.

Striedter GF, Avise JC and Ayala FJ (2012) In the light of evolution VI: Brain and behavior. *Proc Natl Acad Sci* 109:10607–10611.

Stoop R (2012) Neuromodulation by oxytocin and vasopressina. *Neuron* 76(1):142-159.

Studer RA and Robinson-Rechavi M (2009) How confident can we be that orthologs are similar, but paralogs differ? *Trends Genet* 25:210–216.

Swisher CC, Rink WJ, Antón SC, Schwarcz HP, Curtis GH, Suprijo Widiastoro A (1996) Latest *Homo erectus* of Java: Potential Contemporaneity with *Homo sapiens* in Southeast Asia. *Science* 274 (5294): 1870-1874.

Takahata N and Nei M (1990) Allelic genealogy under over- dominant and frequency-dependent selection and polymor- phism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* 124:967-978.

Taub DR and Page J (2016) Molecular signatures of natural selection for polymorphic genes of the human dopaminergic and serotonergic systems: A review. *Front Psychol* 7:857.

Thieme H (1997) Lower Palaeolithic hunting spears from Germany. *Nature* 385:807–810.

Tovo-Rodrigues L, Callegari-Jacques SM, Petzl-Erler ML, Tsuneto L, Salzano FM and Hutz MH (2010) Dopamine receptor D4 allele distribution in Amerindians: A reflection of past behavior differences? *Am J Phys Anthropol* 143:458–464.

Vallender EJ (2011) Comparative genetic approaches to the evolution of human brain and behavior. *Am J Hum Biol* 23:53-64.

Vargas-Pinilla P, Paixão-Côrtes VR, Paré P, Tovo-Rodrigues L, Vieira CM de AG, 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* 112:88–93.

Vernes SC, Spiteri E, Nicod J, Groszer M, Taylor JM, Davies KE, Geschwind DH and Fisher SE (2007) High-throughput analysis of promoter occupancy reveals direct neural targets of FOXP2, a gene mutated in speech and language disorders. *Am J Hum Genet* 81:1232–1250.

Viscardi, Lucas Henriques et al. Searching for ancient balanced polymorphisms shared between Neanderthals and Modern Humans. *Genet Mol Biol.* 2018 Jan-Mar;41(1):67-81.

Vissers LELM, Gilissen C and Veltman JA (2015) Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Ver Genet* 17:9-18.

Whiten A, Schick K and Toth N (2009) The evolution and cultural transmission of percussive technology: integrating evidence from palaeoanthropology and primatology. *J Hum Evol* 57:420–435.

Wolf M, van Doorn GS, Leimar O and Weissing FJ (2007) Life-history trade-offs favour the evolution of animal personalities. *Nature* 447:581-584.

Wood B e Strait D (2004) Patterns of resource use in early Homo and Paranthropus. *J Hum Evol* 46:119–162.

Zilhão, J e Trinkaus, E (2001) Troubling the Neandertals: A Reply to Langbroek's 'The Trouble with Neandertals'. *Archaeo Dial* 8 (2): 135-142.

Zilhão, J e Trinkaus, E (2002) Anatomie , Contexte Archéologique Et Sépulture De L ' Enfant Gravettien De L ' Abri De Lagar Velho. *Praehistoria* 3: 131-145.

Zilhão J, Angelucci DE, Badal-García E, d'Errico F, Daniel F, Dayet L, Douka K, Higham TFG, Martínez- Sánchez MJ, et al. (2010) Symbolic use of marine shells and mineral pigments by Iberian Neandertals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1023-1028.

ANEXOS

ANEXO I

A versão completa do manuscrito pode ser acessada em: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0323>.



Oxytocin and arginine vasopressin receptor evolution: implications for adaptive novelties in placental mammals

Pamela Paré^{1,*}, Vanessa R. Paixão-Côrtes^{2,*}, Luciana Tovo-Rodrigues³, Pedro Vargas-Pinilla¹, Lucas Henriques Viscardi¹, Francisco Mauro Salzano¹, Luiz E. Henkes⁴ and Maria Catira Bortolini¹

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil.

³Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Curitibanos, SC, Brazil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil.

Abstract

Oxytocin receptor (*OXTR*) and arginine vasopressin receptors (*AVPR1a*, *AVPR1b*, and *AVPR2*) are paralogous genes that emerged through duplication events; along the evolutionary timeline, owing to speciation, numerous orthologues emerged as well. In order to elucidate the evolutionary forces that shaped these four genes in placental mammals and to reveal specific aspects of their protein structures, 35 species were selected. Specifically, we investigated their molecular evolutionary history and intrinsic protein disorder content, and identified the presence of short linear interaction motifs. *OXTR* seems to be under evolutionary constraint in placental mammals, whereas *AVPR1a*, *AVPR1b*, and *AVPR2* exhibit higher evolutionary rates, suggesting that they have been under relaxed or experienced positive selection. In addition, we describe here, for the first time, that the *OXTR*, *AVPR1a*, *AVPR1b*, and *AVPR2* mammalian orthologues preserve their disorder content, while this condition varies among the paralogues. Finally, our results reveal the presence of short linear interaction motifs, indicating possible functional adaptations related to physiological and/or behavioral taxa-specific traits.

Keywords: Oxytocin receptor, Arginine vasopressin receptors, molecular evolution, protein disorder, interaction motifs.

Received: December 18, 2015; Accepted: February 28, 2016.

Introduction

Genome and tandem duplication events have an important role in biological evolution (Van de Peer *et al.*, 2009). These processes give rise to paralogous genes, which can evolve by speciation along the evolutionary timeline, thus giving rise to orthologous genes (Fitch, 1970; Gabaldón and Koonin, 2013). As result of these processes, so-called “gene families” emerge, whose members may retain similar or identical functions, but might also diverge extensively, resulting in adaptive novelties (Neduva and Russell, 2005; Huang and Sarai, 2012). The emergence and differentiation of the paralogous neuroendocrine non-peptides oxytocin (OXT) and vasopressin (AVP; Gwee *et*

al., 2009), as well of their paralogous receptors (*OXTR* and *AVPR1a*, *AVPR1b*, *AVPR2*, respectively) illustrate this phenomenon (Yamaguchi *et al.*, 2012; Lagman *et al.*, 2013).

The OXT peptide is comprised of a nine amino acid sequence (Lee *et al.*, 2009), differing in only two amino acids from its paralogue, AVP. These nonapeptides, produced in their highest quantities in the brain, mediate both similar and distinct functions through their interactions with their native receptors (*OXTR*; *AVPR1a*, *AVPR1b*, and *AVPR2*), which are produced in various organs and tissues (Barberis *et al.*, 1998). Some level of cross-reaction among OXT and AVP with their non-native receptors occurs as well, but with distinct affinities (Zingg and Laporte, 2003; Slusarz *et al.*, 2013). For instance, the synthesis of *OXTR* in the uterus and mammary glands guarantees uterine contraction and milk ejection in placental mammals (Kimura *et al.*, 1998; Gimpl and Fahrenholz, 2001), whereas *AVPR1a*

Send correspondence to Maria Catira Bortolini. Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: maria.bortolini@ufrgs.br

*These authors contributed equally to this work.

ANEXO II

A versão completa do manuscrito pode ser acessada em: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-006>



Oxytocin and arginine vasopressin systems in the domestication process

Bibiana S. O. Fam¹, Pamela Paré¹, Aline B. Felkl¹, Pedro Vargas-Pinilla¹, Vanessa R. Paixão-Côrtes¹, Lucas Henriques Viscardi¹ and Maria Cátira Bortolini¹

¹*Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

Abstract

Domestication is of unquestionable importance to the technological revolution that has given rise to modern human societies. In this study, we analyzed the DNA and protein sequences of six genes of the oxytocin and arginine vasopressin systems (*OXT-OXTR*; *AVP-AVPR1a*, *AVPR1b* and *AVPR2*) in 40 placental mammals. These systems play an important role in the control of physiology and behavior. According to our analyses, neutrality does not explain the pattern of molecular evolution found in some of these genes. We observed specific sites under positive selection in *AVPR1b* ($\omega = 1.429$, $p = 0.001$) and *AVPR2* ($\omega = 1.49$, $p = 0.001$), suggesting that they could be involved in behavior and physiological changes, including those related to the domestication process. Furthermore, *AVPR1a*, which plays a role in social behavior, is under relaxed selective constraint in domesticated species. These results provide new insights into the nature of the domestication process and its impact on the OXT-AVP system.

Keywords: Oxytocin and receptors, vasopressin and receptors, animal domestication, molecular evolution, positive selection.

Received: May 4, 2017; Accepted: October 1, 2017.

Introduction

The phenomenon of domestication did not go unnoticed by Charles Darwin. With *The Variation of Animals and Plants under Domestication*, published in January 1868, he devoted a whole book to the mechanisms underlying this intriguing process (Darwin, 1868). It is now well known that the complex process of animal domestication involves systematic selective pressures imposed by humans according to their needs and wishes. In a classic experiment modeling domestication, Russian researchers subjected silver foxes to rigorous artificial selection for tameness and correlated traits over more than 50 years. Although part of the lineages retained their ancestral traits, foxes selected for tamability showed a loss of wild-type behavior within relatively few generations, acquiring several classical morphological attributes of domesticated animals such as white spotting, floppy ears, and curly tails (Trut *et al.*, 2009). The selection of traits, such as tameness and the reduction of innate stress, aggression, fear and anxiety, allowed domesticated animals to coexist and coevolve with humans within their constructed niches. This complex process arguably contributed to the rapid spread of our species across the globe, as well as facilitating the emergence of our civilization (Künzl and Sachser, 1999; Wiener and Wilkinson, 2011; Wright, 2015).

In recent years, a picture of the genetic basis for domestication has started to emerge (Schubert *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2015; Marsden *et al.*, 2016). Genes of the immune system, neuronal development and behavior were shown to have been co-opted as part of the domestication process (Albert *et al.*, 2012; Wright, 2015). For instance, gray wolves (*Canis lupus lupus*) and dogs (*Canis lupus familiaris*) are highly differentiated in their expression of serotonin receptor genes, consistent with behavioral changes as part of domestication (Li *et al.*, 2013). Importantly, domestication can lead to both the rapid fixation of alleles associated with phenotypes of interest and a relaxation of selective constraints previously imposed by natural selection, as has been described for dogs, horses (*Equus caballus*) and cows (*Bos taurus*) (Zeder, 2012).

In placental mammals, the paralogous nonapeptides oxytocin (OXT: Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly) and arginine vasopressin (AVP: Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly) play an important role in physiological and behavioral functions, such as water homeostasis, vasoconstriction, lactation, uterine contractions, parental care, control of aggression, anxiety and stress (Gimpl and Fahrenholz, 2001; Cagliani *et al.*, 2009; Young and Flanagan-Cato, 2012; McCall and Singer, 2012). In addition to the respective nonapeptides, the genes *OXT* and *AVP* encode the carrier protein neurophysin (NP) and a signal peptide (SP). While the nonapeptides OXT and AVP are relatively well conserved in placental mammals, neurophysin and the signal peptide are more variable. The patterns of variation found in the portion of the *OXT* and *AVP* genes encoding

Send correspondence to: Maria Cátira Bortolini. Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: maria.bortolini@ufrgs.br.

ANEXO III




Leonardo Augusto Luvison Araújo (Org.)

EVOLUÇÃO BIOLÓGICA

da pesquisa ao ensino





Este é um livro que possui pelo menos três virtudes. 1) Antes desta edição, ele amadureceu por vários anos, através do Curso de Biologia Evolutiva, organizado e ministrado por um grupo de estudantes de pós-graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; alguns deles hoje são Mestres ou Doutores em suas respectivas áreas. 2) Cada capítulo foi cuidadosamente preparado por aqueles que ministraram o curso, sempre com um viés de pesquisa e ensino. Além disso, cada capítulo foi escrito por especialistas nas diferentes áreas abordadas, o que é uma garantia de alta qualidade e atualidade dos temas. 3) Ele é dedicado aos Professores de Ensino Fundamental e Médio; esta foi a ideia que prevaleceu desde o primeiro Curso de Biologia Evolutiva, em 2014. Portanto, o leitor tem em mãos uma obra de referência, onde poderá buscar os conhecimentos que lhe interessem e eventualmente, aprofundá-los, “garimpando” a bibliografia ao final de cada capítulo. O tema da Evolução Biológica é um dos mais apaixonantes, desde que Lamarck, Darwin e Wallace desenvolveram suas ideias iniciais no século XIX. Muitos outros os seguiram e hoje, nas primeiras décadas do século XXI, o tema não poderia ser mais espetacular.

Aldo Mellender de Araújo

Departamento de Genética, UFRGS

Presidente da Associação Brasileira de Filosofia e História da Biologia (ABFHIB)



Editora fi
www.editorafi.org



Diagramação e capa: Lucas Fontella Margoni

Ilustração de capa: Internet

Revisão Ortográfica e Textual: Letícia Santos Rodrigues.



Todos os livros publicados pela Editora Fi estão sob os direitos da Creative Commons 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pt_BR



Associação Brasileira de Editores Científicos

<http://www.abecbrasil.org.br>

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

ARÁUJO, Leonardo Augusto Luvison (Org.).

Evolução Biológica: da pesquisa ao ensino [recurso eletrônico] / Leonardo Augusto Luvison Araújo (Org.) - Porto Alegre, RS: Editora Fi, 2017.

520 p.

ISBN - 978-85-5696-240-9

Disponível em: <http://www.editorafi.org>

1. Evolução Biológica; 2. Ensino; 3. Divulgação Científica. 4. História da Ciência. I: Curso de Biologia Evolutiva da UFRGS. I. Título.

CDD-570

Índices para catálogo sistemático:

1. Biologia 570

A HISTÓRIA EVOLUTIVA DOS HOMINÍNEOS: DO BIPEDALISMO AO SIMBOLISMO

Lucas Henriques Viscardi

Trazer o tema evolução humana ao debate sempre desperta o interesse da comunidade leiga e científica pelo simples fato de estarmos falando de nós mesmos. Entretanto, esse olhar normalmente acaba por ser carregado de vieses, especialmente fora do ambiente acadêmico, retratando a espécie humana como o “produto final” da evolução, como se fossemos o ápice do progresso da natureza. Mesmo no meio acadêmico, ainda nos deparamos com alguns pesquisadores que pensam assim, claro que não com os mesmos discursos que o público leigo, mas que fazem um distanciamento maior que o necessário entre o homem e a natureza. Sem tirar o mérito de nossa fantástica capacidade cognitiva, o objetivo do presente capítulo é apresentar, brevemente, nossa história evolutiva, tentando mostrar ao leitor as atuações da seleção natural e as respostas biológicas e culturais dos nossos ancestrais. Dentre os temas, abordaremos a evolução do bipedalismo, expansão do cérebro e os eventos de migração que ocorreram durante a história evolutiva humana.

Bipedalismo

Provavelmente, a imagem mais icônica quando falamos de evolução humana é a que retrata uma escala evolutiva do chimpanzé até um organismo cada vez mais ereto, tendo a nossa espécie como ponto final. Apesar de ser uma imagem que contém diversos erros, é inegável que ela retrata muito bem que, ao compararmos humanos aos outros primatas, uma das primeiras observações é sobre o nosso andar bípede. De acordo com o registro fóssil, os primeiros hominíneos (integrantes da linhagem que leva à origem dos humanos) com postura bípede seriam o

PSICOLOGIA EVOLUTIVA E GENÉTICA: ASPECTOS EVOLUTIVOS DA DEPRESSÃO, ESQUIZOFRENIA E SEXUALIDADE

Lucas Henriques Viscardi

“O homem pode fazer o que quer,
mas não pode querer o que quer”.

Arthur Schopenhauer

Psicologia e medicina evolutiva são duas áreas que se baseiam na variabilidade genômica dos indivíduos para compreender as origens evolutivas de um determinado comportamento e/ou doença. É importante comentar aqui que a busca por esse entendimento não é um substituto para a compreensão das causas imediatas da doença, mas são explicações sinérgicas que auxiliam na busca tanto de causas quanto de curas (Nesse, 2011). Aqui focaremos nos temas que abrangem a psicologia evolutiva, mas que, por sua vez, têm implicações diretas sobre a área da saúde. Três fenótipos são apresentados em seus aspectos evolutivos: **depressão**, **esquizofrenia** e a polêmica questão da influência genética sobre a **sexualidade**. A psicologia evolutiva resume-se na união do arcabouço da Síntese Moderna da Evolução, provinda do campo da Biologia Evolutiva, com os estudos da psicologia cognitiva. Entretanto, falar da contribuição biológica para a formação da nossa personalidade ou mesmo da nossa sexualidade é, com certeza, um caminho pedregoso para debatermos em ciência. Para seguir nesse raciocínio, convido você a se perguntar, assim como a frase acima de Schopenhauer comenta: você pode querer (escolher) o que quer? Você sabe por que tem certos desejos, prazeres, vícios e etc.? Pois o objetivo da psicologia evolutiva é exatamente entender o porquê de agirmos das mais diversas formas.

ANEXO IV – Licença SISBIO: coleta de fezes



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 48323-1	Data da Emissão: 05/05/2015 17:25	Data para Revalidação*: 03/06/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Tiago Falótico	CPF: 279.374.628-25
Título do Projeto: Correlações endócrinas do uso de ferramentas em macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>)	
Nome da Instituição : Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo	CNPJ: 63.025.530/0010-03

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material (fezes)	06/2015	07/2015
2	Análise das amostras da primeira coleta	07/2015	08/2015
3	Coleta de amostras adicionais	09/2015	11/2015
4	Análise das amostras adicionais	12/2015	01/2016
5	Análise de dados e elaboração de relatórios/artigos	02/2016	05/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	O Pesquisador deve retirar todo equipamento/materiais utilizados quando do término das visitas de campo.
2	O pesquisador estrangeiro Jurgi Cristóbal Azkarate possui vínculo de Registro de expedição científica só estará contemplado pela Autorização Sisbio mediante a emissão de autorização do MCT, concedida por meio de Portaria ministerial.

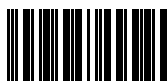
Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Jurgi Cristóbal Azkarate	Pesquisador		AC039567 ES-	Estrangeira
2	Eduardo Benedicto Ottoni	Pesquisador	035.488.068-30	8368122 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 25427891





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 48323-1	Data da Emissão: 05/05/2015 17:25	Data para Revalidação*: 03/06/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Tiago Falótico	CPF: 279.374.628-25
Título do Projeto: Correlações endócrinas do uso de ferramentas em macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>)	
Nome da Instituição : Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo	CNPJ: 63.025.530/0010-03

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PI	PARQUE NACIONAL DA SERRA DA CAPIVARA	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Sapajus libidinosus</i>
2	Observação e gravação de imagem ou som	<i>Sapajus libidinosus</i>

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primatas)	Fezes
2	Método de captura/coleta (Primatas)	Outros métodos de captura/coleta (Sem captura, somente coleta de fezes)
3	Método de marcação (Primatas)	Foto-identificação

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	University of Cambridge	





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 48323-1	Data da Emissão: 05/05/2015 17:25	Data para Revalidação*: 03/06/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Tiago Falótico	CPF: 279.374.628-25
Título do Projeto: Correlações endócrinas do uso de ferramentas em macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>)	
Nome da Instituição : Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo	CNPJ: 63.025.530/0010-03

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 25427891



ANEXO V – Licença SISBIO: coleta de pelos



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59019-1	Data da Emissão: 23/06/2017 16:31	Data para Revalidação*: 23/07/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Tiago Falótico	CPF: 279.374.628-25
Título do Projeto: Genética comportamental de macacos-prego (<i>Sapajus spp.</i>)	
Nome da Instituição : Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo	CNPJ: 63.025.530/0010-03

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material - RPPN Rio do Brasil	07/2017	07/2017
2	Coleta de dados comportamentais - Todos os sítios	07/2017	12/2018
3	Coleta de material - Serra da Capivara/Serra das Confusões	09/2017	12/2017
4	Coleta de material - RPPN Rio do Brasil/ PARNA Pau Brasil	01/2018	07/2018
5	Análise material	01/2018	12/2018

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Michele Pereira Verderane	Pesquisadora	278.841.378-52	320268974 spp-SP	Brasileira
2	Mariana Dutra Fogaça	Pesquisadora	320.510.398-01	22329472X ssp-SP	Brasileira
3	Paulo Henrique Módena Coutinho	Pesquisador	284.185.388-80	32637503-x SSP-SP	Brasileira
4	Lucas Henriques Viscardi	Pesquisador	018.171.000-50	1079449615 Sjs/II-RS	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PI	PARQUE NACIONAL DA SERRA DA CAPIVARA	UC Federal
2		PI	PARQUE NACIONAL DA SERRA DAS CONFUSOES	UC Federal
3	PORTO SEGURO	BA	RPPN Rio do Brasil	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 92991441





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59019-1	Data da Emissão: 23/06/2017 16:31	Data para Revalidação*: 23/07/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Tiago Falótico	CPF: 279.374.628-25
Título do Projeto: Genética comportamental de macacos-prego (<i>Sapajus spp.</i>)	
Nome da Instituição : Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo	CNPJ: 63.025.530/0010-03

4	BA	PARQUE NACIONAL DO PAU BRASIL	UC Federal
---	----	-------------------------------	------------

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Sapajus robustus</i> , <i>Sapajus libidinosus</i>
2	Observação e gravação de imagem ou som de taxon em UC federal	<i>Sapajus robustus</i> , <i>Sapajus libidinosus</i>

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primatas)	Pêlo, Fezes
2	Método de captura/coleta (Primatas)	Outros métodos de captura/coleta(Armadilha de pelo)
3	Método de marcação (Primatas)	Foto-identificação

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo	



