

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**EVOLUÇÃO DOS GENES *OXTR*, *AVPR1a*, *AVPR1b* e
AVPR2 NOS CONTEXTOS DE SELEÇÃO NATURAL E
ARTIFICIAL (DOMESTICAÇÃO).**

Dissertação para a obtenção de título de mestre em Genética e Biologia Molecular

Bibiana Sampaio de Oliveira Fam

Orientação: Maria Cátira Bortolini

Porto Alegre, março de 2018.

Bibiana Sampaio de Oliveira Fam

**EVOLUÇÃO DOS GENES *OXTR*, *AVPR1a*, *AVPR1b* e *AVPR2* NOS
CONTEXTOS DE SELEÇÃO NATURAL E ARTIFICIAL
(DOMESTICAÇÃO).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Genética e Biologia molecular.

Porto Alegre, março de 2018.

Porto Alegre, março de 2018.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Evolução Humana e Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com o fomento do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela CAPES.

AGRADECIMENTOS

Meu sincero agradecimento à professora Maria Cátira Bortolini por ter me recebido em seu laboratório e ter proporcionado toda a estrutura e apoio necessários para que os projetos se desenvolvessem de maneira produtiva e principalmente por ter compartilhado comigo seu conhecimento e sua experiência no campo da Genética e da Biologia Evolutiva.

Agradeço à professora Vanessa Rodrigues Paixão-Côrtes por toda a dedicação e suporte necessário para com o trabalho, suas contribuições foram fundamentais.

Ao professor Francisco Mauro Salzano que é um exemplo a todos com sua dedicação incansável.

Aos colegas do departamento de Genética, que tanto contribuíram para a minha formação profissional, mas acima de tudo pelos bons momentos de convivência. Principalmente aos colegas do Laboratório de Evolução Humana e Molecular: Pamela Laiz Paré da Rosa, Lucas Henriques Viscardi, Pedro Vargas Pinilla, Guillermo Reales, Vanessa Jacovas, Rafael Bisso-Machado, Gislene Lopo Gonçalves, Aline Felkl, Danaê Longo e Tiago Ferraz.

Ao técnico Clênio Machado pelo apoio necessário para o bom andamento de toda a parte de bancada.

A todos os professores do PPGBM que contribuíram para o meu crescimento profissional através de sua dedicação para com seus alunos.

Agradeço também aos meus familiares pelo amor e apoio incondicional. Aos meus pais Paulo Brockmann de Oliveira e Erbene Sampaio de Oliveira pelo exemplo de integridade. Ao meu marido Bruno Franzoi Fam e aos meus filhos Lucas de Oliveira Fam e Guilherme de Oliveira Fam por todo afeto, apoio e compreensão em todos os momentos.

“Felicidade é a certeza de que a nossa vida não está se passando inutilmente”

Érico Veríssimo

RESUMO

O sistema da Oxitocina-Vasopressina (OXT-AVP) é composto pelos neurohormônios e seus quatro receptores (OXTR, AVPR1a, AVPR1b e AVPR2). Além de suas relevantes funções fisiológicas durante o período reprodutivo e na homeostasia este sistema desempenha funções importantes na modulação de comportamentos sociais complexos. No presente diferentes espécies de mamíferos placentários foram analisadas para os seis genes deste sistema buscando investigar o papel destes genes durante o processo de domesticação animal. A comparação entre espécies domesticadas com seus ancestrais, quando disponível, ou com espécies selvagens filogeneticamente mais próximas revelou que este sistema está potencialmente envolvido na adaptação ao ambiente antrópico. Como consequência, assinaturas genéticas similares apareceram em espécies domesticadas pertencentes a grupos taxonômicos distintos que foram sujeitos a similar pressão de seleção artificial. Especificamente *AVPR2* mostra sinal de seleção positiva possivelmente pela alteração na disponibilidade de recursos hídricos e alimentares no ambiente antrópico. *AVPR1b* também apresentou sinal de seleção positiva demonstrando sua possível relevância na redução da agressividade e maior controle sobre o estresse, indispensável para o processo de domesticação. Além disso, fornecemos dados originais sobre a variabilidade de *AVPR1b* em primatas do Novo Mundo, com destaque para a deleção nas posições 245-248 da cadeia de aminoácidos do receptor.

ABSTRACT

The Oxytocin-Vasopressin system is composed by two neurohormones (OXT and AVP) and their four receptors (OXTR, AVPR1a, AVPR1b and AVPR2). In addition to their important physiological functions in homeostasis and during reproductive period, this system plays important role modulating complex social behaviors. In the present study different species of placental mammals were analyzed for the six genes of the neurohormones and receptors mentioned above, to investigate their role in the animal domestication process. The comparison between domesticated mammals species with their wild ancestral when available or with their phylogenetically closest wild relatives, revealed that this system is potentially involved in the adaptation to the anthropic environment. As consequence, similar genetic signatures appear in domesticated species belonging to distinct taxonomic groups, which were subjected to a similar artificial selection pressure. Specifically, AVPR2 shows signal of positive selection possibly due to differential food and water resources in anthropic environment. AVPR1b also presented signal of positive selection indicating the a possible relevance in the stress control and aggressiveness, traits indispensable during animal domestication process. Furthermore we presented original data regarding variability of AVPR1b in New World primates, highlighting a deletion at positions 245-248 on this receptor amino acid chain.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
CAPÍTULO I.....	12
I.1. O sistema OXT-AVP.....	12
I.2. O comportamento social em primatas do Novo Mundo e o sistema OXT/AVP	19
I.3. O processo de domesticação animal.....	23
I.4. Bases genéticas da domesticação animal.....	27
CAPÍTULO II.....	31
II.1. Objetivos gerais.....	31
II.2. Objetivos específicos.....	31
CAPÍTULO III.....	32
III. 1. ARTIGO NO PRELO.....	32
Abstract.....	33
Introduction.....	34
Material and Methods.....	37
Results and Discussion.....	40
Conclusion.....	45
Acknowledgegments.....	45
References.....	46
Figure 1.....	52
Table 1.....	53
III. 2. DADOS ADICIONAIS:.....	56
CAPÍTULO IV.....	61
CAPÍTULO V.....	65

ACTH- Hormônio adrenocorticotrófico

AVP- Vasopressina

AVPR1a- Receptor de Vasopressina do tipo 1a

AVPR1b- Receptor de vasopressina do tipo 1b

AVPR2- Receptor de vasopressina do tipo 2

GPCRs- Receptores acoplados a proteína G

NP- Neurofisina

OXT- Oxitocina

OXTR- Receptor de oxitocina

PS- Peptídeo Sinal

PVN- Núcleo Paraventricular

SNC- Sistema Nervoso Central

SON- Núcleo Supra-óptico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Snakeplot do Propeptideo dos neurohormônios OXT (a) e AVP (b) (Fonte: <http://wlab.ethz.ch/protter/start/>; Omasits et al. 2014).

Figura 2. Snakeplot representando os receptores do Sistema OXT-AVP: a. OXTR; b. AVPR1a; c. AVPR1b; d. AVPR2 (Fonte: <http://wlab.ethz.ch/protter/start/>; Omasits et al. 2014).

Figura 3. Filogenia dos primatas do Novo Mundo utilizada nas análises de evolução molecular do *AVPR1b* (Fonte: www.timetree.org; Kumar et al. 2017).

CAPÍTULO III.1.

Figure 1. Snake plot of (A) AVPR1b and (B) AVPR2 (Reference: www.gpcrdb.org).

Figure S1. Phylogenetic trees of 26 species of mammals based on the analysis of *AVP*, 1: mirrored tree, 2: phylogenetic tree.

Figure S2. Phylogenetic trees of 32 species of mammals based on the analysis of *AVPR1a*, 1: mirrored tree, 2: phylogenetic tree.

Figure S3. Phylogenetic trees of 36 species of mammals based on the analysis of *AVPR1b*, 1: mirrored tree, 2: phylogenetic tree.

Figure S4. Phylogenetic trees of 30 species of mammals based on the analysis of *AVPR2*, 1: mirrored tree, 2: phylogenetic tree.

Figure S5. Phylogenetic trees of 26 species of mammals based on the analysis of *OXT*, 1: mirrored tree, 2: phylogenetic tree.

Figure S6. Phylogenetic trees of 26 species of mammals based on the analysis of *OXTR*, 1: mirrored tree, 2: phylogenetic tree.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III.1.

Table 1. Sites within AVPR1B and AVPR2 with a high probability (> 90%) of being under positive selection (ω value > 1 for Model 8) in domesticated animals.

Table S1. Species of wild and domestic placental mammals available in genome data banks and used in the analyses.

Table S2. Estimated parameters under different codon substitution models for *OXT* and *AVP* system genes.*

Table S3. *OXT-AVP* system amino acid positions with moderately radical

Table S4. Results of the Clade D analysis.

CAPÍTULO III.1.

Tabela 1. Espécies de primatas analisadas e suas respectivas referências.

Tabela 2. Primers utilizados para amplificar a região codificante do gene AVPR1b em 20 espécies de primatas Platyrrhini através de reação de PCR

Tabela 3. Alinhamento de AVPR1b ilustrando a deleção nas posições 245-248. Os pontos representam aminoácidos idênticos à sequência de referência *Homo sapiens*, as deleções são representadas por um traço, as espécies de primatas Platyrrhini estão destacadas em azul.

INTRODUÇÃO

I. 1. O sistema OXT-AVP

O sistema Oxitocina-Vasopressina (OXT-AVP) está envolvido na modulação de características fundamentais em mamíferos placentário uma vez que está diretamente relacionado ao sucesso reprodutivo destas espécies, atuando tanto em traços fisiológicos durante o parto e amamentação quanto em traços comportamentais tais como a ligação entre os pares reprodutivos e o cuidado parental (Rilling and Young, 2014). Este sistema é composto por seis genes, o *OXT* e o *AVP* responsáveis pela transcrição dos dois nonapeptídeos Oxitocina (OXT) e Vasopressina (AVP), além dos genes *OXTR*, *AVPR1a*, *AVPR1b* e *AVPR2* responsáveis pela expressão dos quatro receptores. Os parálogo *OXT* e *AVP* estão presentes no mesmo cromossomo (20 em humanos; Gimpl and Fahrenholz, 2001), porém são transcritos em direções opostas (enquanto o *OXT* encontra-se na fita *forward*, o *AVP* encontra-se na fita *reverse*) e apresentam uma região intergênica que é bem variável entre os mamíferos placentários (Zerbino *et al.*, 2018) Os dois genes possuem 3 exons codificantes responsáveis pela transcrição não só dos nonapeptídeos mas também pela transcrição do Peptídeo Sinal (SP), proteína importante para a sinalização celular, e pela transcrição da Neurofisina (NF), proteína transportadora dos nonapeptídeos; Koshimizu *et al.*, 2012). O *OXT* apresenta 375 pares de bases codificantes resultando em um propeptídeo com 125 aminoácidos, sendo que os primeiros 19 aminoácidos correspondem ao PS, seguido pelo nonapeptídeo OXT e pela Neurofisina I (Fig. 1.a). Já o *AVP* possui 492 pares de bases codificantes resultando em um produto de 164 aminoácidos onde os primeiros 19 aminoácidos traduzidos também correspondem ao PS, seguido pela neurohormônio AVP, pela Neurofisina 2, e pela Copeptina (Fig. 1.b). Os peptídeos adjacentes aos neurohormônios OXT e AVP são relevantes para o transporte e sinalização dos nonapeptídeos sendo parte

importante no processo de distribuição tanto no sistema nervoso central quanto no tecido periférico (Gimpl *et al.*, 2001).

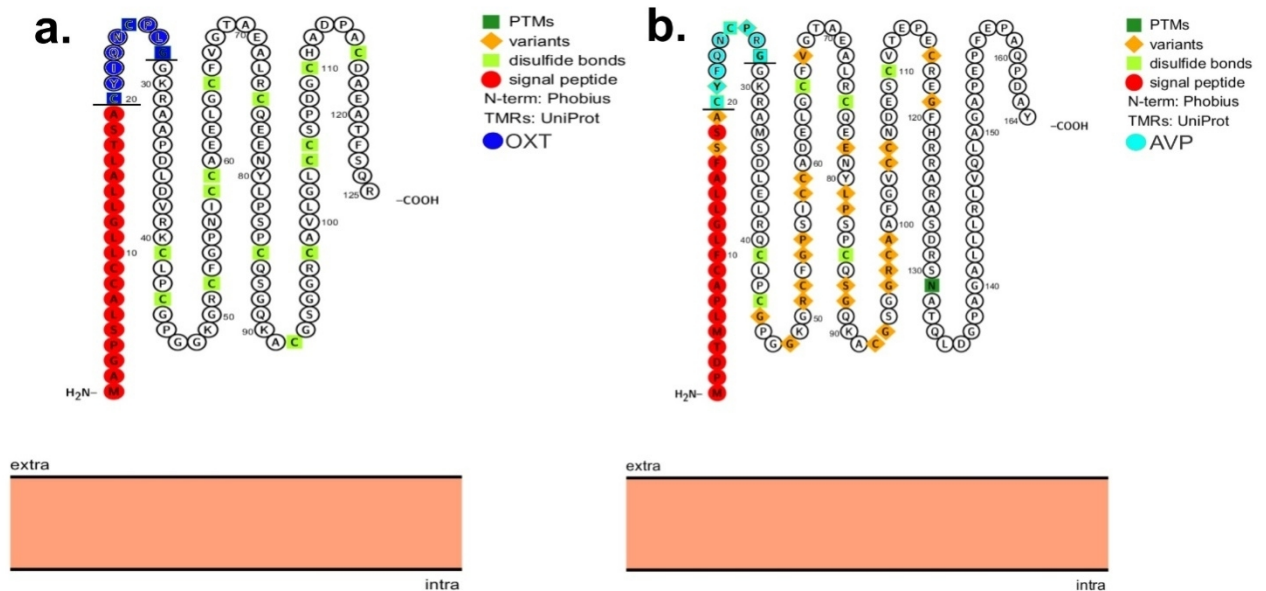


Figura 1. Snakeplot do Propeptideo dos neurohormônios OXT (a) e AVP (b) (Fonte: <http://wlab.ethz.ch/protter/start/>; (Omasits *et al.* 2014).

Os genes *OXT* e *AVP* são expressos no sistema nervoso central, em neurônios magnocelulares dos núcleos supraóptico (SO) e paraventricular (PV) do hipotálamo e são liberados na corrente sanguínea através da glândula pituitária (Koshimizu *et al.*, 2012). Desempenham funções fisiológicas relevantes e cada vez mais despertam o interesse de pesquisadores pelo seu papel como moduladores de comportamentos sociais complexos, como cuidado parental, interação social, reconhecimento de pares, controle de ansiedade e agressividade (Aspé-Sánchez *et al.*, 2016; French *et al.*, 2016; Feldman, 2017; French *et al.*, 2017). Estes neurohormônios e alguns de seus receptores são associados a transtornos psiquiátricos associados a disfunções sociais como o autismo, esquizofrenia e depressão (Gimpl *et al.*, 2001; French *et al.*, 2016). Devido ao diferente padrão de distribuição das redes neuronais em machos e fêmeas a expressão de comportamentos sociais pode apresentar diferentes padrões de acordo com o sexo (Goodson and Bass, 2001; Terranova *et al.*, 2017).

Diferentes estudos *in vivo* demonstram a importância deste sistema em uma série de comportamentos sociais complexos em roedores. A administração de AVP em roedores foi capaz de estimular a agressividade em machos via estimulação dos receptores AVPR1a assim como a administração do antagonista é capaz de reduzir a agressividade em machos (Ferris and Potegal, 1988). Interessantemente em fêmeas a administração do antagonista do receptor AVPR1a não demonstrou redução na agressividade (Gutzler *et al.*, 2010). Porém tanto em machos quanto em fêmeas a administração de AVP provocou um aumento da agressividade e alterações na memória social (Ferris *et al.*, 1985; Le Moal *et al.*, 1987; Gutzler *et al.*, 2010). A administração de OXT também está relacionada a diferentes padrões comportamentais em roedores, modulando a memória sexual, o cuidado materno e o comportamento sexual em fêmeas (Gimpl e Fahrenholz, 2001 e referências inclusas)

O AVP foi detectado pela primeira vez em 1895 mas foi apenas em 1952 que Vigneaud e colegas foram capazes de isolar o nonapeptídeo AVP (Oliver e Schaefer, 1895; Du Vigneaud, 1952). Já as funções básicas da OXT durante o trabalho de parto foram identificadas pela primeira vez em 1906 e em 1953 o hormônio foi isolado. Porém a sua estrutura molecular só foi elucidada anos mais tarde (Dale 1906; Du Vigneaud *et al.*, 1953; Ivell e Richter, 1984), e desde então muitos estudos *in vitro* e *in vivo* vêm elucidando suas diversas funções.

OXT e AVP são peptídeos cíclicos pois formam pontes bissulfídica entre os dois resíduos de Cys nas posições 1 e 6, sendo que eles diferem entre si nas posições 3 e 8 (Koehbach *et al.*, 2013). Estima-se que a família gênica destes pequenos peptídeos, compostos por apenas nove aminoácidos, tenham uma origem antiga. Teriam surgido através de pelo menos dois eventos de duplicação genômica/gênica a aproximadamente 600 milhões de anos (Donaldson e Young, 2008; Di Giglio *et al.*, 2017). É possível encontrar peptídeos homólogos ao OXT (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly) e a AVP (Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly) em grupos basais como invertebrados e ao longo de todos os grupos de vertebrados. Em insetos a forma mais comum encontrada é a Inotocina (Cys-Leu-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly), já a Conopressina (Cys-Phe/Ile-Ile-Arg-Asn-Cys-Pro-Lys/Arg-Gly) é encontrada em invertebrados como moluscos e

sanguessugas e a Anepressina (Cys-Phe-Val-Arg-Asn-Cys-Pro-Thr-Gly) em anelídeos (Donaldson e Young, 2008; Wallis, 2012). Em vertebrados a Vasotocina (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly) é considerada como ancestral de AVP e OXT, sendo encontrada em diversos organismos como peixes, anfíbios, répteis e aves. Peptídeos semelhantes a OXT também são encontrados em diferentes vertebrados como a Isotocina (Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly) encontrada em alguns clados de peixes e a Mesotocina (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly) presente em clados de anfíbios, répteis e aves. Entre mamíferos placentários ainda há variações nestes peptídeos, marsupiais apresentam a Fenilpressina (Cys-Phe-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly), enquanto alguns clados de marsupiais e espécies pertencentes à família Suidae apresentam ainda uma outra variante de AVP, a Lisipressina (Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly; Gimpl *et al.*, 2001; Donaldson and Young, 2008; Stoop, 2012; Wallis, 2012). No que diz respeito a OXT, uma surpreendente variação em macacos do Novo Mundo quebrou o paradigma de que OXT não varia em mamíferos placentários (detalhes desses achados serão visto em item abaixo).

A presença de uma única forma de nonapeptídeo em peixes agnatos, a Vasotocina é considerado como evidência de que a origem destes dois nonapeptídeos se deu por um evento de duplicação gênica *in tandem* ocorrido a aproximadamente ~600 milhões de anos atrás (Archer *et al.*, 1995). A filogenia dos receptores (AVPR1a, AVPR1b e AVPR2; OXTR, receptores de AVP e OXT respectivamente) foi recentemente estabelecida por Yamashita e Kitano (2013). Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa (Paré *et al.*, 2016) aprofundou as relações e a história evolutiva dos 4 receptores indicando também possíveis alterações com possível significado evolutivo.

O funcionamento adequado de OXT e AVP está intrinsecamente relacionado à interação com seus receptores (Fig. 2.) que estão distribuídos em diversos tecidos celulares de acordo com suas funções (Koshimizu *et al.* 2012; Koehbach *et al.*, 2013). O Receptor de OXT (OXTR) e o receptor de AVP do tipo 1a (AVPR1a) são os receptores que apresentam maior distribuição em tecidos periféricos além do sistema nervoso central, como musculatura, pulmões, e coração (Yamashita e Kitano, 2013). Já os receptores de AVP do tipo 1b (AVPR1b) e do tipo 2 (AVPR2)

apresentam a sua distribuição mais restrita, enquanto o AVPR1b é expresso principalmente no sistema nervoso central o AVPR2 tem sua distribuição restrita aos rins (Yamashita e Kitano, 2013).

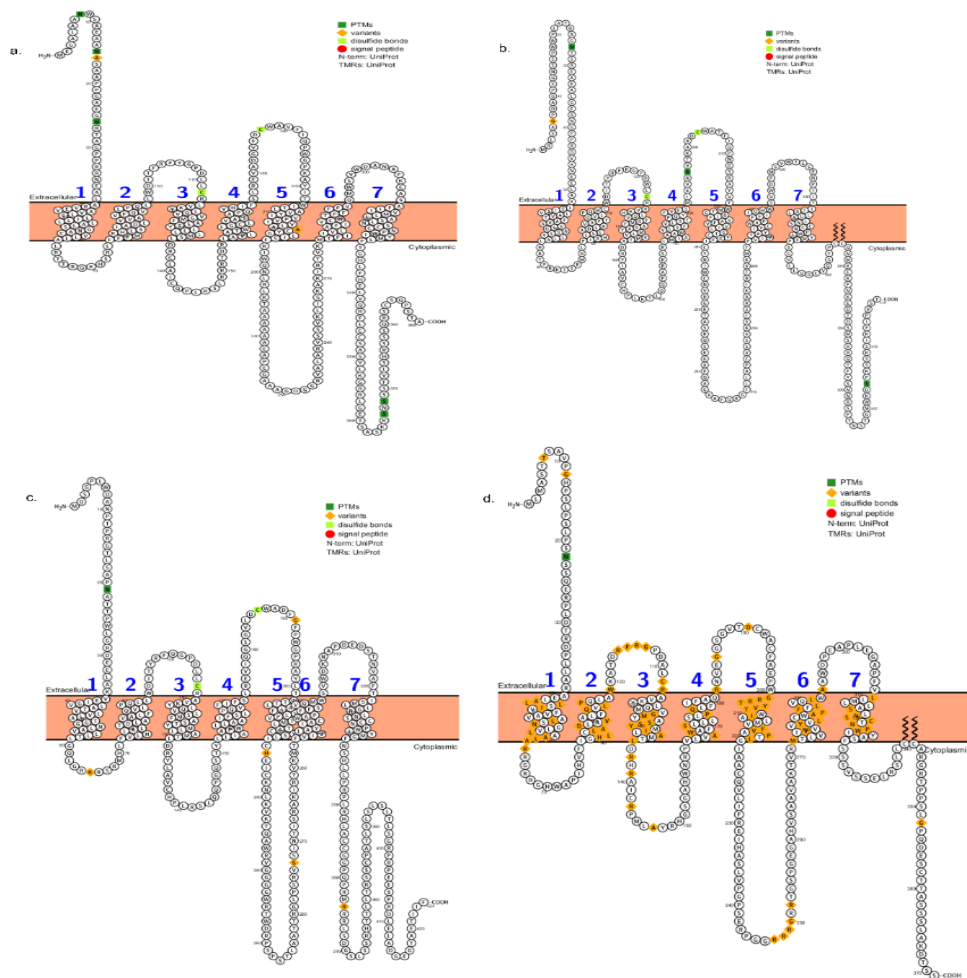


Figura 2. Snakeplot representando os receptores do Sistema OXT-AVP: a. OXTR; b. AVPR1a; c. AVPR1b; d. AVPR2 (Fonte: <http://wlab.ethz.ch/protter/start/>; Omasits *et al.*, 2014).

Os genes responsáveis pela transcrição destes receptores encontram-se todos em cromossomos diferentes. *OXTR* encontra-se no cromossomo 3p25 em humanos e possui 1167 pares de bases codificantes distribuídos em 4 exon gerando um produto de 389 aminoácidos (Fig. 2.a.). *OXTR* é amplamente expresso no Sistema Nervoso Central (SNC) e em tecidos periféricos como útero e glândulas mamárias. Através da interação com OXT garante a contração uterina

durante o parto e a ejeção do leite, bem como comportamentos como cuidado parental, ligação entre pares, dentre outras características relevantes para um sucesso reprodutivo em mamíferos placentários (Gimpl *et al.*, 2001; Cavanaugh *et al.*, 2016). A expressão do *OXTR* durante o período reprodutivo apresenta variações, sendo duas vezes maior no útero e este aumento é mantido nas glândulas mamárias durante todo o período de lactação (Zingg e Laporte, 2003). Nosso grupo de pesquisa descreveu variações táxon-específicas de *OXTR* em macacos do Novo Mundo que estariam coevoluindo com variantes de *OXT* descritas por nosso grupo de pesquisa (ver detalhes em itens abaixo; Vargas-Pinilla *et al.*, 2015).

Em humanos o *AVPR1a* está localizado no cromossomo 12q14-15 e possui 1234 pares de bases distribuídos em 2 exons codificantes gerando um produto de 418 aminoácidos (Fig. 2.b.), é expresso também não só no SNC, mas amplamente em tecidos periféricos. Através do AVP medeia uma série de características fisiológicas e comportamentais como a contração da musculatura lisa, atuando na regulação da pressão arterial. Modificação neste gene estão relacionadas também a comportamentos sociais complexos como reconhecimento e memória social (Heckel e Fink, 2008; Koshimizu *et al.*, 2012). Polimorfismos associados a regiões não codificantes do *AVPR1a* foram associados a comportamentos sociais como monogamia social em roedores (Barrett *et al.*, 2013) e também a diferentes traços de personalidade importantes para a sociabilidade em primatas (Staes *et al.*, 2015).

O *AVPR1b* está localizado no cromossomo 1q32 possui 1272 pb codificantes distribuídos em 2 exons, que gera um produto de 424 aminoácidos (Fig. 2.c.). O receptor *AVPR1b* tem uma distribuição mais restrita ao sistema nervoso central tendo uma atuação relevante em traços comportamentais como o comportamento social, agressividade e controle do estresse pois medeia a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH; Caldwell *et al.*, 2008; Stevenson e Caldwell, 2012). A administração do antagonista de *AVPR1b* em roedores bem como o nocaute do gene demonstraram uma redução da agressividade e da capacidade de reconhecimento social (Wersinger *et al.*, 2002; Wersinger *et al.*, 2007; Pagani *et al.*, 2014).

Já o *AVPR2*, o único localizado no cromossomo Xq28, possui 1113 pb codificantes distribuídos em 4 exons, gerando um produto de 371 aminoácidos (Fig. 2.d.). A expressão de *AVPR2* é restrita ao sistema renal e possui uma função primariamente fisiológica, regulando a homeostasia, fundamental para a manutenção da pressão osmótica e vascular (Yamashita e Kitano, 2013; Juul *et al.*, 2014).

Devido ao alto grau de homologia entre os peptídeos e os receptores há uma ligação cruzada entre *OXT* e os receptores de *AVP*, e vice-versa, porém com diferentes graus de afinidade (Gimpl e Fahrenholz, 2001; Koshimizu *et al.*, 2012). Estes receptores, semelhantes a outros acoplados à proteína G, possuem sete domínios transmembrana que além da função estrutural e de ancoragem à membrana são relevantes na interação com o ligante (TM1-TM7), quatro alças extracelulares (N-terminal, ECL1-ECL3) que são importantes para a interação com os peptídeos e quatro alças intracelulares (C-terminal, ICL1-ICL3) que são relevantes para a interação com a proteína G (Ocampo Daza *et al.*, 2012; Wacker *et al.*, 2017). A via de sinalização intracelular depende da interação com outras proteínas como proteínas quinases, β -arrestinas, a qual promovem a internalização da membrana, e principalmente via proteína G, podendo assumir diferentes respostas de acordo com a via de sinalização intracelular, estimulando tanto a via da Adenil ciclase e produção do AMP cíclico através das subunidades de proteína G_s , mobilizando a liberação de cálcio (Ca^{++}) do retículo endoplasmático através das subunidades de proteína G_q (Busnelli *et al.*, 2012; Koshimizu *et al.*, 2012). É interessante observar que dos quatro receptores do sistema apenas o receptor *AVPR2* ativa a via do AMPc enquanto *AVPR1a*, *AVPR1b* e *OXTR* possuem uma sinalização através da liberação de ^{+}Ca . Recentemente o modelo de seletividade funcional, ou agonismo tendencioso descrito por Costa–Neto e colaboradores (2016) em que moléculas diferentes desencadeiam diferentes caminhos na cascata de sinalização celular em um determinado receptor.

Dados sobre o nível da variabilidade dos genes *OXT*, *AVP*, *OXTR* e *AVPR1a* em macacos do Novo Mundo já são relativamente bem conhecidos devido aos esforços de nosso grupo de pesquisa (ver mais detalhes no item

abaixo; Vargas-Pinilla *et al.*, 2015) e de outros pesquisadores (Ren *et al.*, 2014; Babb *et al.*, 2015; Vargas-Pinilla *et al.*, 2015; French *et al.*, 2016).

I. 2. O comportamento social em primatas do Novo Mundo e o sistema OXT/AVP

Tradicionalmente os primatas são divididos em dois grandes subgrupos, Strepsirrhini que abrange os lemuriformes, um grupo com atual distribuição na Ásia e África, e Haplorrhini que compreende os primatas Catarrhini e Platyrrhini. Seus registros fósseis indicam uma origem antiga da ordem Primates a aproximadamente 80-90 milhões de anos (Tavaré *et al.*, 2002). Primatas do Novo Mundo divergiram de outros grupos a aproximadamente 43 milhões de anos (Fig. 3.). Atualmente apresentam uma ampla distribuição de fenótipos comportamentais considerando as 75 espécies e 16 gêneros distribuídos em 3 famílias (*Cebidae*, *Atelidae* e *Pitheciidae*) de primatas conhecidos neste grupo (Perelman *et al.*, 2011; Schneider e Sampaio, 2015).

Com uma distribuição geográfica que abrange toda a região Neotropical, os Platyrrhineos apresentam comportamentos raros dentre os primatas e os mamíferos em geral como a monogamia social e o cuidado paterno da prole. Entre mamíferos placentários a monogamia social ocorre em aproximadamente 6% das espécies e o cuidado paterno em somente 3-9% das espécies. Interessantemente a prevalência de monogamia social em primatas do Novo Mundo chega a 62% das espécies (Lukas e Clutton-Brock, 2014; French *et al.*, 2016). É importante ressaltar que as espécies de primatas que apresentam estes diferentes traços reprodutivos também são espécies que apresentam uma redução do tamanho corporal e parto gemelar, indicando um cenário em que comportamentos “cuidadores” poderiam representar vantagem adaptativa.

Enquanto a chamada Vasopressina Arg⁸AVP é bem conservada em mamíferos placentários apresentando somente uma variante Lys⁸AVP em Suidae descrita até o momento (Caldwell *et al.*, 2008a; Wallis, 2012), seis novas variantes de OXT foram descritas recentemente por nosso grupo de pesquisa e outros autores em macacos do Novo Mundo: além da forma mais basal Leu⁸OXT, as

variantes Pro⁸OXT (diversos gênero da família Cebidae) (Lee *et al.*, 2011), Val³Pro⁸OXT (família Cebidae, gênero *Saguinus*), Ala⁸OXT e Thr⁸OXT (Pitheciidae, gêneros *Cacajao* e *Chiropotes*) foram descritas por nosso grupo (Vargas-Pinilla *et al.*, 2015), enquanto Phe²OXT (Atelidae, gênero *Alouatta*) foi descrita por Ren *et al.* (2015), o que definitivamente quebrou o paradigma de que Leu⁸OXT estaria presente em todos os mamíferos placentários. Interessantemente, AVP tem a mesma sequência de aminoácidos nos táxons de macacos onde as variantes de OXT foram descritas. Algumas dessas variantes estariam com sinal de seleção positiva e foram associadas a emergência de comportamentos reprodutivos adaptativos como a monogamia social e o cuidado paterno, bem como parto gemelar em clados de macacos do Novo Mundo particularmente nos Callitrichineos (Ren *et al.*, 2015; Vargas-Pinilla *et al.*, 2015). Baseado no postulado de Stoop (2012), pode-se argumentar que as alterações que são encontradas entre as variantes de OXT em primatas do Novo Mundo são mais drásticas do que as mudanças encontradas entre a Mesotocina e a Isotocina por exemplo, já que a alteração de Leucina para uma Prolina, na posição 8 de OXT, representa uma grande alteração na hidrofobicidade. Mais recentemente nosso grupo de pesquisa conduziu experimentos *in vitro* e *in vivo* comparando duas dessas variantes (a denominada Cebidae Pro⁸OXT e a *Saguinus* Val³Pro⁸OXT) com Leu⁸OXT e AVP (Parreiras-e-Silva *et al.*, 2017). As variantes foram sintetizadas e testadas com relação a vários parâmetros, considerando sua interação com os receptores humanos OXTR e AVPR1a, disponíveis comercialmente. Foi demonstrado que as variantes citadas acima são agonistas igualmente eficientes, quando comparadas com Leu⁸OXT, na mediação de rotas dependentes da proteína G, mas que apresentam uma capacidade reduzida para o recrutamento das β -arrestinas 1 e 2, diminuindo ou mesmo impedindo a internalização de OXTR, tendo assim um possível e relevante impacto na dessensibilização de todo o sistema (Parreiras-e-Silva *et al.*, 2017). *Saguinus* Val³Pro⁸OXT também mostrou recrutamento reduzido de β -arrestinas após a interação com o receptor AVPR1a. A capacidade de ambas variantes estimular o cuidado paterno em ratos também foi mostrada no nosso estudo (Parreiras-e-Silva *et al.*, 2017). Esses resultados apresentaram, pela primeira vez, um modelo

natural para o conceito de agonismo com seletividade funcional (Costa-Neto, *et al.*, 2016), com prováveis implicações evolutivas (Parreiras-e-Silva *et al.*, 2017). Para os testes *in vivo*, as variantes foram administradas via *spray* intranasal em 48 casais de ratos WTG (*Rattus norvegicus*). De acordo com parâmetros e protocolos bem estabelecidos para estudos de comportamento foi possível observar um aumento do comportamento materno, bem como cuidados paternos incomuns em ratos, conforme medidos por testes específicos (Parreiras-e-Silva *et al.*, 2017).

Recentemente os achados de nosso grupo foram destacados e corroborados por Mustoe e colaboradores (2018, *in press*) onde experimentos com o receptor de primatas Callitrichineos demonstraram que a variante Pro⁸OXT também possui maior afinidade ao OXTR do que a Leu⁸OXT. Em conjunto, esses estudos demonstram a funcionalidade das variantes de OXT bem como os diferentes padrões de dessensibilização e internalização que as diferentes variantes são capazes de induzir nos receptores OXTR e AVPR1a, o qual denota sua funcionalidade e possível impacto evolutivo.

Como visto acima, exceto pelos dados de genomas de algumas espécies (*Callithrix jacchus*, *Cebus capucinus*, *Saimiri boliviensis*, *Aotus nancymae*, todas pertencentes à família Cebidae), pouco se sabe sobre a variação em primatas do Novo Mundo considerando os genes dos receptores *AVPR1b* e *AVPR2*. Desse modo, um dos objetivos da presente Dissertação é produzir dados originais que preencham essa lacuna, particularmente considerando o gene *AVPR1b*, importante mediador de comportamentos sociais complexos.

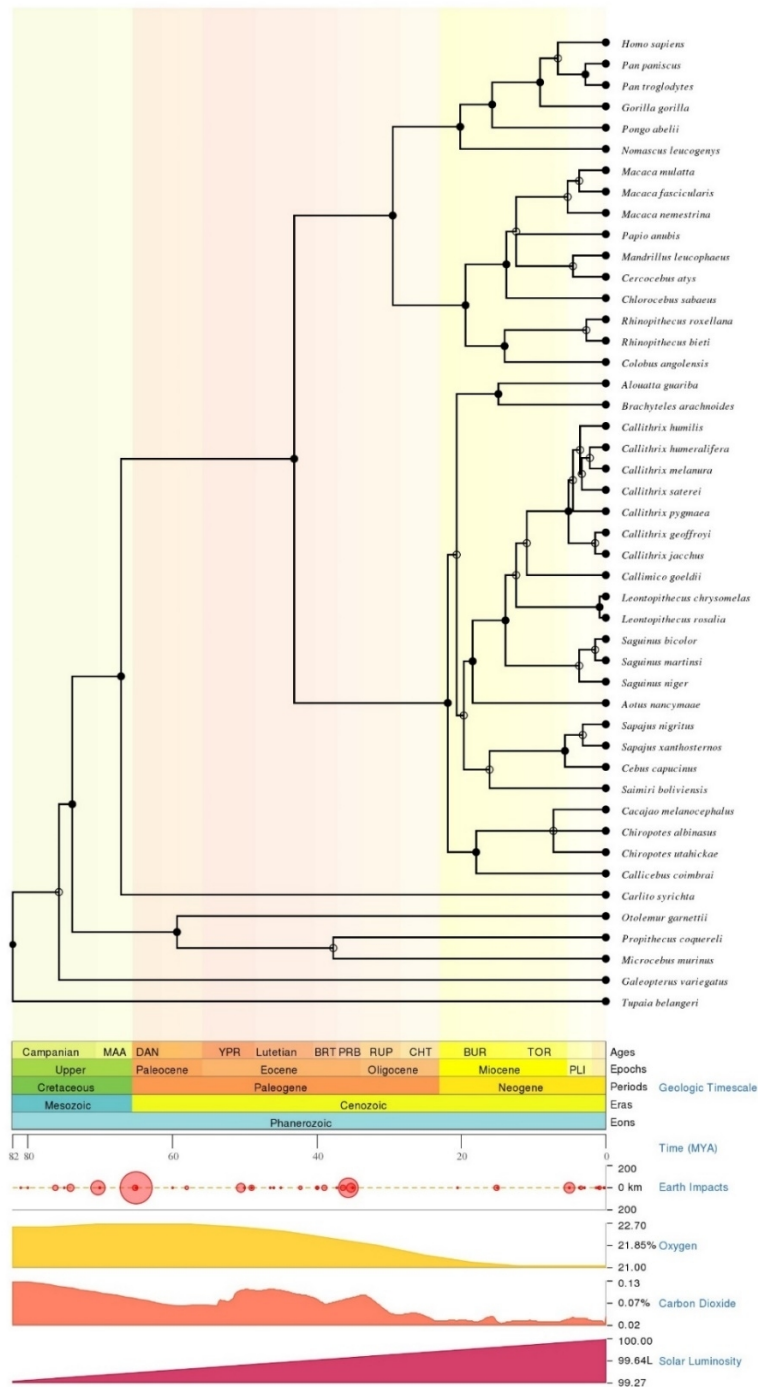


Figura 3. Filogenia com as espécies de primatas do Novo Mundo utilizada nas análises de evolução molecular do *AVPR1b* (Fonte: www.timetree.org; (Kumar et al., 2017)).

I. 3. O processo de domesticação animal

A domesticação, tanto de plantas quanto de animais, mudou profundamente o curso da evolução humana, pois foi a partir do início deste processo que as primeiras populações se tornaram sedentárias, gerando grandes transformações nos seus modos de vida e dieta. Muitos pesquisadores defendem que foi na revolução do Neolítico que se sedimentaram os alicerces para as grandes civilizações (Larson e Burger, 2013; Larson e Fuller, 2014).

Algumas espécies de animais tiveram extensivas modificações ao longo do processo de domesticação e adaptação ao ambiente antrópico devido à intensa seleção artificial promovida pelo *Homo sapiens* moderno (Zeder *et al.*, 2006), desse modo é esperado a emergência de particularidades genéticas que fazem dessas espécies alvos instigantes para a investigação científica.

A domesticação ocorreu por diferentes interesses, pois visava suprir diferentes necessidades, não só alimentares, mas também para a produção de roupas, ferramentas e para a tração animal. Pode-se afirmar que ao longo do processo motivações afetivas também contribuíram para a domesticação, já que alguns desses animais também são desejados pela companhia, diversão e proteção. Nesse processo evolutivo particular diversas espécies de animais se tornaram adaptadas à vida próxima aos seres humanos, em especial devido a uma reprodução direcionada visando à manutenção de características de interesse, em outras palavras, um processo que pode ser definido como de seleção artificial.

O processo selecionou animais que apresentavam características fenotípicas específicas, particularmente um repertório comportamental de menor agressividade, maior facilidade de doma, maior flexibilidade na resposta ao estresse, e ciclos de vida e reprodutivos relativamente rápidos comparados a dos humanos (Driscoll *et al.*, 2009). Neste contexto, alguns genes mostram-se bons candidatos para serem estudados visto que podem ter sido cooptados durante o processo de domesticação, justamente por seu já conhecido papel na modulação de comportamentos relacionados com algumas das características descritas acima. A seleção artificial promovida pelos humanos que culminou com a

domesticação de diferentes espécies animais ocorreu em locais e períodos históricos distintos, com destaque para o Neolítico e regiões do Oriente Médio, atuais Iraque conhecido pelas terras férteis, ou Crescente Fértil, banhadas pelos rios Tigres e Eufrates, bem como a Turquia (Zeder, 2012a).

A relação entre os humanos e outros animais é antiga, mas até a domesticação do cão (*Canis lupus familiaris*) ela era basicamente relacionada com a caça, sendo fortuita qualquer outra forma de interação. O cão foi a primeira espécie animal a ser domesticada em um período em que o modo de subsistência ainda era baseado na caça e coleta e as populações humanas não haviam passado pelo processo de sedentarização (Larson *et al.*, 2012). Estima-se que a divergência entre cães e lobos (*Canis lupus*) ocorreu a pelo menos a 27.000 anos (Skoglund *et al.*, 2015), porém a datação e a localização geográfica dos eventos de domesticação são constantemente discutidos. Atualmente considera-se que houve eventos de domesticação do cão em diferentes pontos geográficos, pelo menos um na Europa e outro na Ásia (Morey, 2014). Os ancestrais das demais espécies domesticadas encontradas atualmente, incluindo caprinos, bovinos, felinos, e pequenos roedores datam de épocas mais recentes, especialmente durante a chamada revolução Neolítica (entre 12 e 6 mil anos antes do presente; Zeder, 2012b).

Registros arqueológicos e dados moleculares cada vez mais têm permitindo resgatar detalhes e particularidades da domesticação, inclusive mostrando que houve múltiplos eventos a partir da mesma espécie selvagem e que houve também períodos de fluxo gênico entre os animais domesticados e não-domesticados (Freedman *et al.*, 2014; Larson *et al.*, 2014; Frantz *et al.*, 2016). Como já mencionado, a emergência dos cães domésticos a partir dos lobos é o evento mais antigo de domesticação já registrado, ocorrendo antes da sedentarização dos humanos modernos. Vilà *et al.*, (1997) propôs que a domesticação de linhagens de lobos ocorreu a cerca de 100.000 anos atrás, através de análises de mtDNA. Esta controversa hipótese foi contestada por diversos pesquisadores; Freedman *et al.*, (2014) comparando o genoma de lobos com raças caninas mais antigas datam a divergência em épocas bem mais recentes, entre 11.000-16.000 anos atrás. Mais recentemente, a partir do

sequenciamento do paleogenoma de um lobo de 35.000 anos foi possível sugerir que a domesticação de cães ocorreu entre 27.000-40.000 anos (Skoglund *et al.*, 2015). Já Frantz *et al.*, (2016) datou a divergência entre cães e lobos entre 20.000 e 60.000 anos e revelou uma separação profunda entre raças caninas modernas do leste da Ásia e da Europa. Os últimos autores também sugeriram que o fluxo gênico entre as diferentes linhagens pode ter fornecido parte do repertório genético para o extraordinário grau de diversidade fenotípica do cão doméstico, e que a seleção de raças caninas para funções específicas começou por volta de 5.000 anos atrás. Foi na era Vitoriana, no entanto, que emergiu o maior número de raças hoje reconhecidas.

Bovinos, caprinos e suínos, por sua vez, tiveram processos de domesticação semelhantes, com prováveis múltiplos eventos e posteriores migrações com populações humanas, dando origem às atuais linhagens. Pinturas rupestres já indicavam a importância do gado para a humanidade com a representação do Auroch (*Bos primigenius*), ancestral dos bovinos domesticados atuais *Bos taurus* e *Bos indicus*. Pelo menos um evento de domesticação dos bovinos ocorreu por volta de 10.000 anos no vale do Eufrates. Edwards *et al.*, (2007) através do sequenciamento de DNA genômico e mitocondrial sugeriram que as diferentes linhagens de bovinos podem ter surgido de eventos de cruzamento entre Auroch selvagens e animais domesticados após esse primeiro evento de domesticação, enquanto Beja-Pereira *et al.*, (2006) mostrou que houve eventos de domesticação independentes de Aurochs na África.

Há indícios que apontam que os primeiros rebanhos de caprinos já existiam a aproximadamente 10.000 anos no Crescente Fértil, e que esses animais domesticados tornaram-se comuns na região provendo fonte constante de lã, couro, carne e leite. Por volta de 5.000 anos caprinos domesticados já tinham chego ao Mediterrâneo (Price, 2002; Zeder *et al.*, 2006). A domesticação de suínos (*Sus domesticus*), por sua vez, ocorreu por volta de 9.000 anos na região de Anatólia, atual Turquia, a partir da espécie selvagem *sus scrofa* (Driscoll *et al.*, 2009). Análises moleculares permitiram identificar sua presença na Europa por volta de 7.500 anos e um fluxo gênico entre linhagens já domesticadas e selvagens (Larson *et al.*, 2007; Larson e Burger, 2013; Frantz *et al.*, 2015). Teriam

ocorrido ainda outros eventos de domesticação independente a aproximadamente 5.000 anos no sudeste da Ásia, na China e provavelmente na Índia (Kanginakudru *et al.*, 2008).

De acordo com evidências arqueológicas e genéticas a domesticação dos cavalos atuais (*Equus caballus*) também se deu múltiplas vezes ao longo do tempo na região central da Eurásia por volta de 5.500 anos atrás (Vilà *et al.*, 1997; Levine, 1999; Lindgren *et al.*, 2004). Os estudos ainda sugerem eventos de fluxo gênico entre populações domesticadas e o ancestral selvagem (*Equus ferus*), hoje extinto (Warmuth *et al.*, 2012). Gatos (*Felis silvestris catus*) também apresentam uma antiga relação com o homem. Os primeiros registros arqueológicos apontam que há aproximadamente 9.700 anos no Crescente Fértil, os gatos já habitavam recintos juntos com humanos. Teriam sido domesticados a partir do gato selvagem africano (*Felis silvestris lybica*; Driscoll *et al.*, 2009; Montague *et al.*, 2014). Diferente de outros animais, foram esses felinos que elegeram habitats urbanos, pois existia uma enorme oferta de roedores que lhes proporcionava alimento abundante. Ao mesmo tempo, a proximidade com humanos, afastava predadores naturais e lhes conferia abrigo. Populações humanas, em seus iniciais e insalubres núcleos urbanos, os toleravam e até os desejavam, pois, os gatos serviam como agentes eficientes no controle das pragas, em especial de ratos (Zeder, 2012b). A evolução para um animal de companhia se deu posteriormente. Interessantemente, estudos genéticos indicam que durante a domesticação dos gatos, houve forte pressão de seleção para genes relacionados à caça, em especial aqueles ligados a visão, audição e olfato (Zeder *et al.*, 2006; Driscoll *et al.*, 2009; Montague *et al.*, 2014).

De qualquer modo, a pressão de seleção artificial na domesticação animal envolve inicialmente comportamento. Animais domesticados apresentam menor agressividade, redução do medo, menor resposta de fuga, maior facilidade de doma e menor comportamento exploratório que seus respectivos selvagens (Price, 1999; Albert *et al.*, 2009). Torna-se então extremamente desafiador, a busca por elementos que fazem parte do repertório genético por trás de traços de comportamento especialmente selecionados em processos de domesticação animal.

I.4. Bases genéticas da domesticação animal

O extensivo processo de domesticação animal deixou marcas profundas nas principais espécies de animais domesticados. Diversos autores defendem que durante o processo o conjunto de características comuns encontradas nas espécies que passaram por este processo pode ser denominada como fenótipo da domesticação ou síndrome da domesticação. Este conjunto de características morfológicas e comportamentais são resultados da intensiva seleção por indivíduos mais dóceis com facilidade de doma e que portavam outras características de interesse. Mesmo quando são analisadas espécies de mamíferos filogeneticamente distantes como Carnívoros ou Artiodáctilos domesticados pode-se encontrar um conjunto de características comuns como uma redução do volume corporal, gracilização do esqueleto, coloração de cobertura mais conspícua e manchada, pelos mais enrolados, rabos e orelhas caídas (Zeder, 2012b; Larson *et al.*, 2014). Esses fatos denotam que há por trás do processo de domesticação dos mamíferos um similar repertório genético que foi cooptado diante de uma pressão seletiva similar.

Sendo assim, muitos estudos têm buscado desvendar as bases genéticas da domesticação. Uma das abordagens usadas é a comparação entre linhagens domesticadas e seus ancestrais selvagens. Partindo do pressuposto que as espécies selvagens representam um repertório gênico ancestral e as espécies domesticadas representam as características genéticas derivadas é possível identificar elementos genéticos conectados com o chamado fenótipo da domesticação. No entanto, muitas das espécies ancestrais dos principais animais domesticados estão extintas ou são desconhecidas o que representa um desafio nesse tipo de estudo. Assim, o uso de espécies filogeneticamente próximas, ou mesmo algumas linhagens domesticadas conhecidas por ainda preservarem características da espécie ancestral são utilizadas nas investigações.

Porém, identificar o conjunto completo de variantes genéticas envolvidas na domesticação, bem como detectar sinal de seleção nos genomas das espécies domesticadas, não são tarefas triviais, visto a complexidade do cenário. Basicamente, a domesticação, via seleção artificial pode ocorrer por três

mecanismos não mutuamente excludentes: 1) Mudanças nas frequências de alelos de pequeno efeito em muitos loci, como previsto no tradicional modelo genético quantitativo; 2) Mudança em poucos genes de maior efeito e 3) Mudanças físicas, que não alteram a sequência do DNA, como modificações epigenéticas herdáveis (Christie *et al.*, 2016).

Alguns genes envolvidos em traços morfológicos, fisiológicos e/ou comportamentais envolvidos no processo de domesticação já foram identificados. Por exemplo, os genes relacionados com a rota da pigmentação, *MC1R* e *KIT*, apresentam forte sinal de seleção em animais domesticados (Wiener e Wilkinson, 2011), sendo a coloração conspícua e malhada considerada por muitos autores um dos fenótipos da domesticação. O papel de vários genes de interesse agropecuário também já é bem documentada. Por exemplo, Wiener e Wilkinson analisaram dados genéticos de nove raças de gado e propuseram que o gene da miostatina (*GDF-8*) foi cooptado durante a seleção artificial para produção de carne, assim como há sinal de seleção nos genes *ABCG2* e *DGAT1* em gado leiteiro (Wiener e Wilkinson, 2011), o primeiro codificador de uma proteína transmembrana associada entre outras coisas à proteção do feto contra xenobióticos, enquanto o segundo é codificador de uma proteína envolvida na síntese de triglicerídios essencial para a formação de tecido adiposo.

A busca por genes relacionados ao comportamento também é um foco constante, já que uma conduta dócil na presença de humanos é uma condição básica para iniciar a domesticação de uma espécie selvagem. Albert *et al.*, (2009) compararam os níveis de expressão gênica cerebral entre ratos (*Rattus norvegicus*) submetidos a um modelo de domesticação (selecionados para a docilidade durante mais de 60 gerações). Eles identificaram algum locus para traços quantitativos (QTL) associados à mansidão/agressão, e níveis diferentes de neurotransmissores, hormônios, além de mudanças morfológicas quando ratos “domesticados” foram comparados com selvagens.

A domesticação de raposas da espécie selvagem *Vulpes vulpes* iniciou na década de 1950 através de seleção artificial promovida pelo pesquisador russo Dimitri Belyaev. Buscando entender a domesticação de cães a partir de lobos, o Dr. Belyaev já postulava que o elemento inicial chave a ser selecionado era a

domabilidade para com os humanos. Uma vez que as bases do comportamento são genéticas, a seleção de mansidão significaria a seleção de alterações genéticas que promoviam alterações fisiológicas em especial nos sistemas neuroquímicos que modulam o comportamento. Dr. Belyaev decidiu então testar sua teoria domesticando o raposas *Vulpes vulpes*, em particular, a raposa prateada, uma linhagem diferenciada daquela da cor da raposa vermelha. Ele submeteu uma população destas a forte pressão de seleção para domesticidade inerente (Belyaev *et al.*, 1985). De acordo com Trut *et al.*, (2009), Dr. Belyaev separou as raposas em três categorias: Classe III, envolvia as raposas que fogem da domesticação, mordiam e eram ariscas; as de Classe II deixavam-se pegar, mas não manifestavam resposta emocional amigável, enquanto as de classe I, além de deixarem-se pegar, balançavam a cauda e choramingavam, buscando atenção para poder lambar e cheirar os pesquisadores. Os experimentos prosseguem até hoje, sendo que de 70-80% dos filhotes da classe I já nascem dóceis e com caracteres secundários associados a domesticação. De acordo com Trut *et al.*, (2009), como previa o Dr. Belyaev, demonstraram a importância do papel dos neurohormônios nesse processo, pois constataram que as raposas domesticadas tinham uma diminuição da resposta ao estresse relacionada ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) em relação a seu ancestral selvagem. Vale lembrar que os produtos dos genes que codificam neurotransmissores e receptores relacionados ao eixo HPA estão relacionados dentre outras coisas ao estresse, humor e emoções.

Terenina *et al.*, (2013), na mesma direção, demonstraram que há uma correlação entre a expressão de neurohormônios e seus receptores no padrão de carcaças de porcos. Os autores encontraram uma associação significativa entre SNPs nos genes *HTR2C*, *SLC6A4*, *MAOA*, *DRD3*, *CRHR1*, *AVPR1a*, *AVPR1b*, *CREM* e *NR3C1* e qualidade de carcaças. Nesse mesmo trabalho houve associação do gene *AVPR1b*, codificador de um dos receptores da vasopressina (AVP), com o nível de cortisol no plasma ao abate, bem como a presença de SNPs que estão associados a um maior grau de agressividade, isto porque AVP modula a comunicação entre neurônios, via eixo HPA (Terenina *et al.*, 2013).

A importância de AVP e de OXT na modulação de comportamentos sociais em cães domesticados foi também evidenciada por MacLean *et al.*, (2017). Os autores demonstraram que cães selecionados para docilidade apresentaram maiores índices plasmáticos de OXT e cães com maior frequência de comportamento agressivo apresentaram maiores índices de AVP plasmáticos quando comparados ao grupo controle. Esses achados como um todo colocam os genes do sistema OXT-AVP como candidatos para estudos sobre o repertório genético da domesticação animal.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

II. 1. Objetivos gerais

Descrever a diversidade e o padrão de evolução molecular para o sistema OXT-AVP analisando as variações nos neurohormônios OXT e AVP bem como de seus receptores (OXTR, AVPR1a, AVPR1b e AVPR2) em contextos de seleção natural e artificial (domesticação).

II. 2. Objetivos específicos

(a) Analisar se o padrão de diversidade molecular encontrado entre espécies de mamíferos domesticados e seus possíveis ancestrais selvagens, bem como suas possíveis implicações fisiológicas e comportamentais durante a adaptação ao ambiente antrópico.

(b) Efetuar a caracterização do *AVPR1b* em 20 espécies de primatas do novo mundo que não possuem genoma publicado e compreender os processos evolutivos que atuam no receptor AVPR1b .

CAPÍTULO III

RESULTADOS

III. 1. ARTIGO NO PRELO.

Revista: *Genetic and Molecular Biology*

III. 2. DADOS ADICIONAIS:

AVPR1b variation and the emergence of adaptive phenotypes in platyrrhini monkeys

Abaixo pode ser encontrado dados originais para o gene do receptor AVPR1b, em amostras de macacos do Novo Mundo, que foram gerados para a presente Dissertação e cujas análises estão em andamento. Como visto anteriormente, AVPR1b é um dos receptores de AVP. Vários estudos com camundongos nocauteados para *AVPR1b* e outras investigações que aplicaram antagonistas de AVPR1b demonstraram uma diminuição da liberação de ACTH e corticosterona, bem como algumas mudanças comportamentais, incluindo um menor nível de agressão, ansiedade e estresse, particularmente em homens. Curiosamente, outros comportamentos permaneceram inalterados (Koshimizu *et al.*, 2012; Pagani *et al.*, 2014; Roper *et al.*, 2010; Roper *et al.*, 2011; Stevenson and Caldwell, 2012; Tanoue *et al.*, 2004; Wersinger *et al.*, 2002, Witchey *et al.*, 2016). Além disso, os camundongos nocauteados para AVPR1b, seja em machos ou fêmeas, diferiram em sua ativação de áreas cerebrais relacionadas a comportamentos agressivos e memória de reconhecimento social (Witchey *et al.*, 2016), reforçando a idéia de que o papel de AVPR1b é sexo-específico.

Com base nesses achados, pode-se postular a hipótese de que a capacidade de controlar a agressão e a ansiedade pode ser essencial num contexto em que os machos - ambos relacionados e não relacionados - prestam cuidados diretos aos filhotes, colocando o gene AVPR1b como alvo potencial para mudanças de provável impacto funcional e evolutivo. Assim investigamos a variação de AVPR1b em 20 espécies de Platyrrhini.

Foram investigadas amostras de sangue e / ou tecido de 20 indivíduos representando 20 espécies de macacos do Novo Mundo e mais dados obtidos de bancos públicos (Tabela 1). Dezesete delas foram fornecidos pelo Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ). Uma amostra de tecido de um indivíduo de *Alouatta guariba* foi fornecida por Alexandre Uarth Christoff, curador do Museu

de Ciências Naturais da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA-Canoas). Este projeto foi registrado no sistema oficial brasileiro, que permite a coleta de material biológico de unidades de conservação para fins de pesquisa (SISBIO número 63551462). Também foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (data da aprovação: 25 de novembro de 2014). O DNA foi extraído usando o QuiagenDNeasy Blood & Tissue Kit® de acordo com as instruções do fabricante. Os *primers* foram projetados para flanquear todos os exons de *AVPR1b*, usando os programas FastPCR e Primer3 (Tabela 2). A amplificação por PCR foi realizada nas seguintes condições: um passo de desnaturação inicial a 94 ° C durante 5 minutos precedeu 35 ciclos de 30s a 94 ° C, 30s a cada temperatura de recozimento do iniciador e um passo de extensão de 45s a 72 ° C, seguido por uma extensão final por 10 minutos a 72 ° C. O sucesso da amplificação foi verificado por eletroforese em um gel de agarose a 2%, corado com GelRed™, seguido por um exame sob luz ultravioleta. Um marcador molecular de baixa massa de 100 pb foi utilizado como controle. Os produtos amplificados foram purificados após a exonuclease I e os protocolos de fosfatase alcalina (Amersham Biosciences).

As leituras foram obtidas na plataforma Illumina e verificadas através do Codon Code Aligner (versão 4.0). Nossas análises incluíram ainda as sequências codificadoras de *AVPR1b* de 34 espécies de outros primatas, bem como de duas espécies de ordens de mamíferos placentários filogeneticamente próximas aos Primatas, que foram utilizadas como grupos externos (*Tupaia chinensis*, Scandentia, *Galeopterus variegates*, Dermoptera). Os dados foram coletados da GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), Ensembl (). As sequências foram alinhadas usando o algoritmo MUSCLE conforme implementado no MEGA 6.0 (Edgar, 2004; Tamura et al, 2013). A comparação das sequências originais e da literatura mostraram várias modificações, dentre as quais uma deleção nas sequências de *AVPR1b* dos macacos do Novo Mundo, nas posições de aminoácidos 245 e 248 (Tabela 3).

Análises e estudos futuros, a partir desses achados, irão investigar a relevância funcional e evolutiva dos mesmos. Além disso, esses achados irão

integrar análises considerando os dados de outros genes do sistema OXT/AVP para as mesmas espécies.

Tabela1. Espécies de primatas analisadas e suas respectivas referências.

Grupo	Espécie	AVPR1b	Grupo	Espécie	AVPR1b
Catarrhini	<i>Cercocebus atys</i>	XM_012039814.1	Platyrrhini	<i>Callithrix geoffroyi</i>	This study
	<i>Chlorocebus sabaeus</i>	XM_007988695.1		<i>Callithrix jacchus</i>	XM_002760726.2
	<i>Colobus angolensis</i>	XM_011937372.1		<i>Callithrix kuhlii</i>	N/A
	<i>Gorilla gorilla</i>	XM_004028271.2		<i>Callithrix penicillata</i>	N/A
	<i>Homo sapiens</i>	NM_000707.3		<i>Cebuella pygmaea</i>	This study
	<i>Macaca fascicularis</i>	NM_001287703.1		<i>Chiropotes albinasus</i>	This study
	<i>Macaca mulatta</i>	NM_001246222.1		<i>Chiropotes chiropotes</i>	N/A
	<i>Macaca nemestrina</i>	XM_011746878.1		<i>Chiropotes utahicki</i>	This study
	<i>Mandrillus leucophaeus</i>	XM_012001007.1		<i>Lagothrix lagotricha</i>	N/A
	<i>Nomascus leucogenys</i>	XM_003272950.3		<i>Lagothrix poeppiggi</i>	N/A
	<i>Pan paniscus</i>	XM_003822930.3		<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	This study
	<i>Pan troglodytes</i>	XM_525039.5		<i>Leontopithecus rosalia</i>	This study
	<i>Papio anubis</i>	XM_003893207.2		<i>Mico argeta</i>	N/A
	<i>Papio hamadryas</i>	N/A		<i>Mico humeralifer</i>	This study
	<i>Pongo abelii</i>	XM_009238636.1		<i>Mico melanura</i>	This study
	<i>Pongo pygmaeus</i>	N/A		<i>Mico saterei</i>	This study
	<i>Rhinopithecus bieti</i>	XM_017880841.1		<i>Pithecia pithecia</i>	N/A
	<i>Rhinopithecus roxellana</i>	XM_010362490.1		<i>Propithecus coquereli</i>	XM_012657858.1
	Platyrrhini	<i>Alouatta caraya</i>		N/A	<i>Saguinus bicolor</i>
<i>Alouatta guariba</i>		This study	<i>Saguinus martinsi</i>	This study	
<i>Aotus azarai</i>		N/A	<i>Saguinus midas</i>	N/A	
<i>Aotus nancymae</i>		XM_012459204.1	<i>Saguinus niger</i>	This study	
<i>Ateles belzebuth</i>		N/A	<i>Saimiri boliviensis</i>	XM_003930448.2	
<i>Ateles geoffroyi</i>		N/A	<i>Saimiri sciureus</i>	N/A	
<i>Brachyteles arachnoides</i>		This study	<i>Sapajus apella</i>	N/A	
<i>Brachyteles hypoxanthus</i>		N/A	<i>Sapajus capucinus</i>	XM_017525482.1	
<i>Cacajao calvus</i>		N/A	<i>Sapajus robustus</i>	This study	
<i>Cacajao melanocephalus</i>		This study	<i>Sapajus xanthosternos</i>	This study	
<i>Callibella humilis</i>		This study	Strepsirrhini	<i>Microcebus murinus</i>	XM_012761001.1
<i>Callicebus coimbrai</i>		This study		<i>Otolemur garnettii</i>	XM_003792217.1
<i>Callicebus cupreus</i>		N/A		<i>Tarsius syrichta</i>	XM_008053930.1
<i>Callimico goeldii</i>		This study	Dermoptera	<i>Galeopterus variegatus</i>	XM_008573081.1
		Scandentia	<i>Tupaia belangeri chinensis</i>	XM_006159267.1	

Tabela 2. Primers utilizados para amplificar a região codificante do gene *AVPR1b* em 20 espécies de primatas Platyrrhini através de reação de PCR.

Foward (5´-3´)	Reverse (3´-5´)	Amplicon
ATCCACACCCTCCCTCCATC	CATGTAGGTGGAGGGCGAACA	416
ACATCACCTTCCGCTTCCAG	ATGAAGACCTGAGGGAGGCT	229
ACGGGTCTACCTYACCTGGA	CGGACCACATCTGGACACTG	229
TCCATGCTTTTGGGCAACCT	CACTGAGGGTTAGGCTGAGG	229

Tabela 3. Alinhamento do *AVPR1b* ilustrando a deleção nas posições 245-248. Os pontos representam aminoácidos idênticos à sequência de referência *Homo sapiens*, as deleções são representadas por um traço, as espécies de primatas Platyrrhini estão destacadas em azul.

	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257
<i>Homo sapiens</i>	G	W	R	T	W	D	R	P	S	P	S	T	L	A	A
<i>Pan paniscus</i>	V	S	.	.
<i>Pan troglodytes</i>	V	S	.	.
<i>Pongo abelii</i>	H	S	V	.
<i>Gorilla gorilla</i>	S	.	.
<i>Papio anubis</i>	A	S	.	.
<i>Rhinopithecus bieti</i>	A	S	.	.
<i>Rhinopithecus roxellana</i>	A	S	.	.
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	A	S	.	.
<i>Cercocebus atys</i>	A	S	.	.
<i>Macaca fascicularis</i>	A	S	.	.
<i>Macaca mulatta</i>	A	S	.	.
<i>Macaca nemestrina</i>	A	S	.	.
<i>Colobus angolensis</i>	A	S	.	.
<i>Chlorocebus sabaeus</i>	A	S	.	.
<i>Nomascus leucogenys</i>	N	.	S	.	.	.	A	S	V	.
<i>Cebuella pygmaea</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Callibella humilis</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Callithrix jacchus</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Callithrix geoffroyi</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Callimico goeldii</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	L	A	P	V	.
<i>Mico melanura</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Mico saterei</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Mico humeralifer</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Saguinus martinsi</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Saguinus bicolor</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Saguinus niger</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Leontopithecus rosalia</i>	N	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Aotus nancymae</i>	S	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Saimiri boliviensis</i>	S	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Sapajus capucinus</i>	S	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.

<i>Sapajus xanthosternos</i>	S	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Sapajus robustus</i>	S	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Brachyteles arachnoides</i>	S	.	-	-	-	-	.	H	.	.	.	A	P	V	.
<i>Alouatta quariba</i>	S	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	.	V	.
<i>Cacajao melanocephalus</i>	S	.	-	-	-	-	.	R	P	V	.
<i>Chiropotes albinasus</i>	S	.	-	-	-	-	.	R	P	V	.
<i>Chiropotes utahickae</i>	S	.	-	-	-	-	.	R	P	V	.
<i>Callicebus coimbrai</i>	S	.	-	-	-	-	.	R	.	.	.	A	P	V	.
<i>Tarsius syrichta</i>	A	K	L	.	.	.	A	P	.
<i>Microcebus murinus</i>	C	A	P	.
<i>Propithecus coquereli</i>	C	A	P	.
<i>Otolemur garnettii</i>	C	A	G	V	P	V	G
<i>Tupaia chinensis</i>	.	.	.	A	.	.	.	S	.	.	.	A	P	.	.
<i>Galeopterus variegatus</i>	S	.	Q	.	.	N	T	A	P	.	.

CONCLUSÃO

Um dos maiores desafios das Ciências Biomédicas na atualidade é conseguir conectar variações em nível do genoma com aquelas em nível de fenótipos. Somado a isso, o desafio se torna ainda maior quando se busca conectar esses achados com cenários evolutivos. Nosso grupo de pesquisa tem contribuído nessa área de conhecimento através de diferentes estudos com o sistema OXT-AVP, onde foi possível conectar mudanças genéticas táxon-específicas com fenótipos adaptativos táxon-específicos (Vargas-Pinila et al., 2015, 2017; Parreiras-e-Silva et al., 2017).

Seguindo essa mesma linha de investigação e considerando ainda a estratégia de genes (ou sistemas genéticos) candidatos, os estudos apresentados na presente Dissertação buscaram identificar variações no repertório genético de diferentes espécies de mamíferos placentários em pelo menos dois instigantes e relativamente diferentes cenários evolutivos: considerando espécies sob o rigor da seleção artificial e outras representando animais selvagens. Para isso foi analisado o padrão de diversidade dos genes *OXT* e *AVP*, bem como de seus receptores (*OXTR*, *AVPR1a*, *AVPR1b* e *AVP2*).

O capítulo III da presente Dissertação apresenta discussões específicas referentes aos resultados obtidos sobre o papel dos genes acima mencionados durante o processo de domesticação de mamíferos placentário. É importante ressaltar o desafio que é trabalhar com as bases genéticas do processo de domesticação animal, uma vez que a maioria das espécies ancestrais das principais espécies de animais estão extintas ou são desconhecidas. Além disso, é esperado que um conjunto de genes (e suas variantes e combinações) sejam responsáveis pelo fenótipo da domesticação.

Neste projeto foi possível explorar sequências codificadoras genes candidatos de espécies ancestrais (paleogenomas) de algumas importantes

espécies de mamíferos domesticados através da recuperação de bancos de dados. Além disso, espécies de mamíferos selvagens proximamente relacionadas àquelas domesticadas foram também consideradas

Vale destacar alguns achados, como por exemplo que mudanças genéticas táxon-específicas nos receptores AVPR1b e AVPR2 estariam sob seleção positiva comparando quando o conjunto de espécies domésticas é comparado com aquele de espécies selvagens. Com base na função conhecida desses genes, esses achados podem ser associados a modificações fisiológicas e/ou comportamentais necessárias para que animais domesticados possam coexistir e coevoluir com os seres humanos em seus nichos construídos. Por exemplo, descrevemos a presença de uma serina na posição 257 de AVPR2 em 67% das espécies domesticadas consideradas, sendo que elas são identificadas com diferentes grupos taxonômicos (Ordens Rodentia e Lagomorpha). Esse exemplo ilustra como variantes nos mesmos genes é uma maneira parcimoniosa de fenótipos particulares emergirem quando populações de diferentes espécies são submetidas a pressão seletiva similar. Por outro lado, também foram observadas algumas diferenças instigantes no repertório genético da domesticação, o que também é esperado quando ocorre evolução paralela.

Nossas análises mostraram também que os genes *OXT*, *AVP* e *AVPR1a* estão sob um padrão geral de seleção purificadora. *OXTR* parece estar sob uma restrição evolutiva no conjunto de mamíferos considerados aqui, corroborando nossos estudos anteriores (Paré et al., 2016). No entanto, apesar deste padrão geral em mamíferos placentários, há evidências de que tanto *OXT* quanto *OXTR* estejam sob seleção positiva em alguns ramos de macacos do Novo Mundo, onde formas novas e possivelmente adaptativas de *OXT* e de *OXTR* foram descritas (Vargas-Pinilla et al., 2015, 2016; Parreiras-e-Silva, 2017).

Como um todo esses achados forneceram novos dados sobre o papel desempenhado por essa família gênica durante o processo de domesticação. Onde, provavelmente atuou mediando características primordiais como docilidade e tolerância ao homem, bem como em características fisiológicas como homeostase de água e controle do estresse.

Já os achados brevemente apresentados no capítulo III, e que não foram discutidos aqui foram introduzidos no corpo da presente Dissertação com o objetivo de salientar o esforço empregado para que mais informações sobre os receptores sejam conhecidas em espécies de primatas não representadas em bancos de dados públicos. Buscou-se assim suprir uma lacuna na literatura científica sobre a variação molecular de AVPR1b, pois apenas *Callithrix jacchus*, *Cebus capucinus*, *Saimiri boliviensis*, *Aotus nancymae* (todas espécies pertencentes à família Cebidae) tem seu genomas conhecidos.

Sendo assim, dados parciais sobre a diversidade de AVPR1b de 20 espécies de primatas Platyrrhinos foram apresentados. Destaque para a deleção nas posições 245-248 de AVPR1b, presente somente em macacos do Novo Mundo. Futuros estudos irão determinar a relevância destes e outros achados.

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFIA

- Albert FW, Carlborg Ö, Plyusnina I, Besnier F, Hedwig D, Lautenschläger S, Lorenz D, McIntosh J, Neumann C, Richter H et al (2009) Genetic architecture of tameness in a rat model of animal domestication. *Genetics* 182:541–554. doi: 10.1534/genetics.109.102186
- Archer R, Chauvet J and Chauvet MT (1995) *Man and the Chimaera: Selective versus Neutral Oxytocin Evolution*. Plenum Press 615–627.
- Aspé-Sánchez M, Moreno M, Rivera MI, Rossi A and Ewer J (2016) Oxytocin and Vasopressin Receptor Gene Polymorphisms: Role in Social and Psychiatric Traits. *Front Neurosci*. doi: 10.3389/fnins.2015.00510
- Babb PL, Fernandez-Duque E and Schurr TG (2015) Oxytocin receptor gene sequences in owl monkeys and other primates show remarkable interspecific regulatory and protein coding variation. *Mol Phylogenet Evol* 91:160–177.
- Barrett CE, Keebaugh AC, Ahern TH, Bass CE, Terwilliger EF and Young LJ (2013) Variation in vasopressin receptor (Avpr1a) expression creates diversity in behaviors related to monogamy in prairie voles. *Horm Behav* 63:518–526. doi: 10.1016/j.yhbeh.2013.01.005
- Beja-Pereira A, Caramelli D, Lalueza-Fox C, Vernesi C, Ferrand N, Casoli A, Goyache F, Royo LJ, Conti S, Lari M et al. (2006) The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8113–8118. doi: Doi 10.1073/Pnas.0509210103
- Belyaev DK, Plyusnina IZ and Trut LN (1985) Domestication in the silver fox (*Vulpes fulvus* Desm): Changes in physiological boundaries of the sensitive period of primary socialization. *Appl Anim Behav Sci* 13:359–370. doi: 10.1016/0168-1591(85)90015-2
- Brüne M (2007) On human self-domestication, psychiatry, and eugenics. *Philos Ethics, Humanit Med* 2:21. doi: 10.1186/1747-5341-2-21
- Busnelli M, Saulière A, Manning M, Bouvier M, Galés C and Chini B (2012)

- Functional selective oxytocin-derived agonists discriminate between individual G protein family subtypes. *J Biol Chem* 287:3617–3629. doi: 10.1074/jbc.M111.277178
- Caldwell HK, Lee H-J, Macbeth AH and Young WS (2008a) Vasopressin: Behavioral Roles of an “Original” Neuropeptide. *Prog Neurobiol* 84:1–24. doi: 10.1016/j.surg.2006.10.010.Use
- Caldwell HK, Wersinger SR and Young WS (2008b) The role of the vasopressin 1b receptor in aggression and other social behaviours. *Prog Brain Res* 170:65–72. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00406-8
- Cavanaugh J, Carp SB, Rock CM and French JA (2016) Oxytocin modulates behavioral and physiological responses to a stressor in marmoset monkeys. *Psychoneuroendocrinology* 66:22–30. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.12.027
- Dale HH (1906) On some physiological actions of ergot. *J Physiol* 34:163–206. doi: 10.1113/jphysiol.1906.sp001148
- Dewsbury DA (1978) *Comparative Animal Behavior*. doi: 10.1037/10909-000
- Di Giglio MG, Muttenthaler M, Harpsøe K, Liutkeviciute Z, Keov P, Eder T, Rattei T, Arrowsmith S, Wray S, Marek A et al. (2017) Development of a human vasopressin V1a-receptor antagonist from an evolutionary-related insect neuropeptide. *Sci Rep* 7:41002. doi: 10.1038/srep41002
- Díaz-Muñoz SL and Bales KL (2016) “Monogamy” in Primates: Variability, Trends, and Synthesis: Introduction to special issue on Primate Monogamy. *Am J Primatol* 78:283–287. doi: 10.1002/ajp.22463
- Donaldson ZR and Young LJ (2008) Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* (80-) 322:900–904. doi: 10.1126/science.1158668
- Driscoll CA, Macdonald DW and O’Brien SJ (2009) From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 Suppl:9971–8. doi: 10.1073/pnas.0901586106
- Du Vigneaud V, Ressler C and Trippett S (1953) The Sequence of Amino Acids in Oxytocin, with a proposal for the structure of Oxytocin. *J Biol Chem* 205:949–957.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340

- Edwards CJ, Bollongino R, Scheu A, Chamberlain A, Tresset A, Vigne J-D, Baird JF, Larson G, Ho SYW, Heupink TH et al. (2007) Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs. *Proc R Soc B Biol Sci* 274:1377–1385. doi: 10.1098/rspb.2007.0020
- Enattah NS, Jensen TGK, Nielsen M, Lewinski R, Kuokkanen M, Rasinpera H, El-Shanti H, Seo JK, Alifrangis M, Khalil IF et al. (2008) Independent Introduction of Two Lactase-Persistence Alleles into Human Populations Reflects Different History of Adaptation to Milk Culture. *Am J Hum Genet* 82:57–72. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.09.012
- Feldman R (2017) The Neurobiology of Human Attachments. *Trends Cogn Sci* 21:80–99. doi: 10.1016/j.tics.2016.11.007
- Ferris CF, Pollock J, Albers HE and Leeman SE (1985) Inhibition of flank-marking behavior in golden hamsters by microinjection of a vasopressin antagonist into the hypothalamus. *Neurosci Lett* 55:239–243. doi: 10.1016/0304-3940(85)90027-8
- Ferris CF and Potegal M (1988) Vasopressin receptor blockade in the anterior hypothalamus suppresses aggression in hamsters. *Physiol Behav* 44:235–239. doi: 10.1016/0031-9384(88)90144-8
- Frantz LAF, Mullin VE, Pionnier-Capitan M, Lebrasseur O, Ollivier M, Perri A, Linderholm A, Mattiangeli V, Teasdale MD, Dimopoulos EA et al. (2016) Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science*. doi: 10.1126/science.aaf3161
- Frantz LAF, Schraiber JG, Madsen O, Megens H-J, Cagan A, Bosse M, Paudel Y, Crooijmans RPMA, Larson G and Groenen MAM (2015) Evidence of long-term gene flow and selection during domestication from analyses of Eurasian wild and domestic pig genomes. *Nat Genet* 47:1141–1148. doi: 10.1038/ng.3394
- Freedman AH, Gronau I, Schweizer RM, Ortega-Del Vecchyo D, Han E, Silva PM, Galaverni M, Fan Z, Marx P, Lorente-Galdos B et al. (2014) Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.1004016

- French JA, Cavanaugh J, Mustoe AC, Carp SB and Womack SL (2017) Social Monogamy in Nonhuman Primates: Phylogeny, Phenotype, and Physiology. *J Sex Res* 1–25. doi: 10.1080/00224499.2017.1339774
- French JA, Taylor JH, Mustoe AC and Cavanaugh J (2016) Neuropeptide diversity and the regulation of social behavior in New World primates. *Front Neuroendocrinol*. doi: 10.1016/j.yfrne.2016.03.004
- Gerbault P, Liebert A, Itan Y, Powell A, Currat M, Burger J, Swallow DM and Thomas MG (2011) Evolution of lactase persistence: an example of human niche construction. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 366:863–877. doi: 10.1098/rstb.2010.0268
- Gimpl G and Fahrenholz F (2001) The Oxytocin Receptor System : Structure , Function , and Regulation. *Physiol Rev* 81:629–683.
- Gomez-Marin A, Paton JJ, Kampff AR, Costa RM and Mainen ZF (2014) Big behavioral data: psychology, ethology and the foundations of neuroscience. *Nat Neurosci* 17:1455–1462. doi: 10.1038/nn.3812
- Goodson JL and Bass AH (2001) Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. *Brain Res Brain Res Rev* 35:246–65.
- Gutzler SJ, Karom M, Erwin WD and Albers HE (2010) Arginine-vasopressin and the regulation of aggression in female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Eur J Neurosci* 31:no-no. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07190.x
- Heckel G and Fink S (2008) Evolution of the arginine vasopressin 1a receptor and implications for mammalian social behaviour. *Prog Brain Res* 170:321–330. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00426-3
- Itan Y, Jones BL, Ingram CJE, Swallow DM and Thomas MG (2010) A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. *BMC Evol Biol* 10:36. doi: 10.1186/1471-2148-10-36
- Ivell R and Richter D (1984) Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2006–10.
- Juul K V., Bichet DG, Nielsen S and Norgaard JP (2014) The physiological and pathophysiological functions of renal and extrarenal vasopressin V2 receptors. *AJP Ren Physiol* 306:F931–F940. doi:

10.1152/ajprenal.00604.2013

- Kanginakudru S, Metta M, Jakati RD and Nagaraju J (2008) Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestication of modern day chicken. *BMC Evol Biol* 8:174. doi: 10.1186/1471-2148-8-174
- Koehbach J, Stockner T, Bergmayr C, Muttenthaler M and Gruber CW (2013) Insights into the molecular evolution of oxytocin receptor ligand binding. *Biochem Soc Trans* 41:197–204. doi: 10.1042/BST20120256
- Koshimizu T, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H and Tanoue A (2012) Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev* 92:1813–64. doi: 10.1152/physrev.00035.2011
- Kumar S, Stecher G, Suleski M and Hedges SB (2017) TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times. *Mol Biol Evol* 34:1812–1819. doi: 10.1093/molbev/msx116
- Larson G, Albarella U, Dobney K, Rowley-Conwy P, Schibler J, Tresset A, Vigne J-D, Edwards CJ, Schlumbaum A, Dinu A et al. (2007) Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15276–15281. doi: 10.1073/pnas.0703411104
- Larson G and Burger J (2013) A population genetics view of animal domestication. *Trends Genet* 29:197–205. doi: 10.1016/j.tig.2013.01.003
- Larson G and Fuller DQ (2014) The Evolution of Animal Domestication. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 45:115–136. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-110512-135813
- Larson G, Karlsson EK, Perri A, Webster MT, Ho SYW, Peters J, Stahl PW, Piper PJ, Lingaas F, Fredholm M et al. (2012) Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:8878–83. doi: 10.1073/pnas.1203005109
- Larson G, Piperno DR, Allaby RG, Purugganan MD, Andersson L, Arroyo-Kalin M, Barton L, Climer Vigueira C, Denham T, Dobney K et al. (2014) Current perspectives and the future of domestication studies. *Proc Natl Acad Sci* 111:6139–6146. doi: 10.1073/pnas.1323964111
- Le Moal M, Dantzer R, Michaud B and Koob GF (1987) Centrally injected arginine vasopressin (AVP) facilitates social memory in rats. *Neurosci Lett* 77:353–359. doi: 10.1016/0304-3940(87)90527-1

- Lee AG, Cool DR, Grunwald WC, Neal DE, Buckmaster CL, Cheng MY, Hyde SA, Lyons DM and Parker KJ (2011) A novel form of oxytocin in New World monkeys. *Biol Lett* 7:584–587. doi: 10.1098/rsbl.2011.0107
- Levine M a (1999) Botai and the Orgins of Horse Domestication. *J Anthropol Archaeol* 18:29–78. doi: 10.1006/jaar.1998.0332
- Lindgren G, Backström N, Swinburne JE, Hellborg L, Einarsson A, Sandberg K, Cothran EG, Vilà C, Binns MM and Ellegren H (2004) Limited number of patriline in horse domestication. *Nat Genet* 36:335–6. doi: 10.1038/ng1326
- Lukas D and Clutton-Brock T (2014) Evolution of social monogamy in primates is not consistently associated with male infanticide. *Proc Natl Acad Sci* 111:E1674–E1674. doi: 10.1073/pnas.1401012111
- MacLean EL, Gesquiere LR, Gruen ME, Sherman BL, Martin WL and Carter CS (2017) Endogenous Oxytocin, Vasopressin, and Aggression in Domestic Dogs. *Front Psychol* 8:1613. doi: 10.3389/fpsyg.2017.01613
- Montague MJ, Li G, Gandolfi B, Khan R, Aken BL, Searle SMJ, Minx P, Hillier LW, Koboldt DC, Davis BW et al. (2014) Comparative analysis of the domestic cat genome reveals genetic signatures underlying feline biology and domestication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:17230–5. doi: 10.1073/pnas.1410083111
- Morey DF (2014) In search of Paleolithic dogs: A quest with mixed results. *J Archaeol Sci*. doi: 10.1016/j.jas.2014.08.015
- Ocampo Daza D, Lewicka M and Larhammar D (2012) The oxytocin/vasopressin receptor family has at least five members in the gnathostome lineage, including two distinct V2 subtypes. *Gen Comp Endocrinol* 175:135–143. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.10.011
- Oliver G and Schaefer EA (1895) The physiological Effects of extracts of the Suprarenal capsules *J Physiol* 18:230–276. doi: 10.1113/jphysiol.1895.sp000564
- Omasits U, Ahrens CH, Müller S and Wollscheid B (2014) Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 30:884–886. doi: 10.1093/bioinformatics/btt607
- Pagani JH, Zhao M, Cui Z, Williams Avram SK, Caruana DA, Dudek SM and

- Young WS (2014) Role of the vasopressin 1b receptor in rodent aggressive behavior and synaptic plasticity in hippocampal area CA2. *Mol Psychiatry* 20:490–499. doi: 10.1038/mp.2014.47
- Peng Y, Shi H, Qi X, Xiao C, Zhong H, Ma RZ and Su B (2010) The ADH1B Arg47His polymorphism in east Asian populations and expansion of rice domestication in history. *BMC Evol Biol* 10:15. doi: 10.1186/1471-2148-10-15
- Perelman P, Johnson WE, Roos C, Seuánez HN, Horvath JE, Moreira MAM, Kessing B, Pontius J, Roelke M, Rumpler Y et al. (2011) A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 7:1–17. doi: 10.1371/journal.pgen.1001342
- Price EO (2002) *Animal domestication and behavior*. CABI Publ. doi: 10.1079/9780851995977.0000
- Price EO (1999) Behavioral development in animals undergoing domestication. *Appl Anim Behav Sci* 65:245–271. doi: 10.1016/S0168-1591(99)00087-8
- Ren D, Chin KR and French JA (2014) Molecular variation in AVP and AVPR1a in New World monkeys (primates, platyrrhini): Evolution and implications for social monogamy. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0111638
- Ren D, Lu G, Moriyama H and Mustoe AC (2015) Genetic Diversity in Oxytocin Ligands and Receptors in New World Monkeys. *PLoS One* 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0125775
- Rilling JK and Young LJ (2014) The biology of mammalian parenting and its effect on offspring social development. *Science* (80-) 345:771–776. doi: 10.1126/science.1252723
- Roper J, O'Carroll A-M, Young W and Lolait S (2011) The vasopressin Avpr1b receptor: molecular and pharmacological studies. *Stress* 14:98–115. doi: 10.3109/10253890.2010.512376
- Roper JA, Craighead M, O'Carroll AM and Lolait SJ (2010) Attenuated stress response to acute restraint and forced swimming stress in arginine vasopressin 1b receptor subtype (Avpr1b) receptor knockout mice and wild-type mice treated with a novel Avpr1b receptor antagonist. *J Neuroendocrinol* 22:1173–1180. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.02070.x

- Schneider H and Sampaio I (2015) The systematics and evolution of New World primates - A review. *Mol Phylogenet Evol* 82:348–357. doi: 10.1016/j.ympev.2013.10.017
- Skoglund P, Ersmark E, Palkopoulou E and Dalén L (2015) Ancient Wolf Genome Reveals an Early Divergence of Domestic Dog Ancestors and Admixture into High-Latitude Breeds. *Curr Biol* 1515–1519. doi: 10.1016/j.cub.2015.04.019
- 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. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.08.006
- Stevenson EL and Caldwell HK (2012) The vasopressin 1b receptor and the neural regulation of social behavior. *Horm Behav* 61:277–282. doi: 10.1016/j.yhbeh.2011.11.009
- Stoop R (2012) Neuromodulation by Oxytocin and Vasopressin. *Cell* 76:142–159. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.025
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Tanoue A, Ito S, Honda K, Oshikawa S, Kitagawa Y, Koshimizu TA, Mori T, Tsujimoto, G. (2004). The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *Journal of Clinical Investigation*, 113, 302–309
- Tavaré S, Marshall CR, Will O, Soligo C and Martin RD (2002) Using the fossil record to estimate the age of the last common ancestor of extant primates. *Nature* 416:726–729. doi: 10.1038/416726a
- Terenina E, Babigumira BM, Mignon G Le, Bazovkina D and Rousseau S (2013) Association study of molecular polymorphisms in candidate genes related to stress responses with production and meat quality traits in pigs. *Domest Anim Endocrinol* 44:81–97.
- Terranova JI, Ferris CF and Albers HE (2017) Sex Differences in the Regulation of Offensive Aggression and Dominance by Arginine-Vasopressin. *Front*

- Endocrinol (Lausanne) 8:308. doi: 10.3389/fendo.2017.00308
- Theofanopoulou C, Gastaldon S, Rourke TO, Bridget D, Messner A, Martins PT, Delogu F and Alamri S (2017) Comparative genomic evidence for self-domestication in *Homo sapiens*. 1–14.
- Trut L, Oskina I and Kharlamova A (2009) Animal evolution during domestication: The domesticated fox as a model. *BioEssays* 31:349–360. doi: 10.1002/bies.200800070
- 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. doi: 10.1073/pnas.1419399112
- Vigneaud V du; EAPHCL (1952) PARTIAL PURIFICATION AND AMINO ACID CONTENT OF VASOPRESSIN FROM HOG POSTERIOR PITUITARY GLANDS. *J Am Chem Soc* 367:3713. doi: 10.1021/ja01134a528
- Vilà C, Savolainen P, Maldonado JE, Amorim IR, Rice JE, Honeycutt RL, Crandall KA, Lundeberg J and Wayne RK (1997) Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog Carles Vila. *Science* (80-) 2761687:1687–1689. doi: 10.1126/science.276.5319.1687
- Wacker D, Stevens RC and Roth BL (2017) How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* 170:414–427. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.009
- Wallis M (2012) Molecular evolution of the neurohypophysial hormone precursors in mammals: Comparative genomics reveals novel mammalian oxytocin and vasopressin analogues. *Gen Comp Endocrinol* 179:313–318. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.07.030
- Warmuth V, Eriksson A, Bower MA, Barker G, Barrett E, Hanks BK, Li S, Lomitashvili D, Ochir-Goryaeva M, Sizonov G V. et al. (2012) From the Cover: Reconstructing the origin and spread of horse domestication in the Eurasian steppe. *Proc Natl Acad Sci* 109:8202–8206. doi: 10.1073/pnas.1111122109
- Wersinger SR, Caldwell HK, Martinez L, Gold P, Hu SB and Young WS (2007)

- Vasopressin 1a receptor knockout mice have a subtle olfactory deficit but normal aggression. *Genes, Brain Behav* 6:540–551. doi: 10.1111/j.1601-183X.2006.00281.x
- Wersinger SR, Ginns EI, Carroll AO, Lolait SJ and Iii WSY (2002) Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol Psychiatry* 7:975–984. doi: 10.1038/sj.mp.4001195
- Wiener P and Wilkinson S (2011) Deciphering the genetic basis of animal domestication. *Proc R Soc B Biol Sci* 278:3161–3170. doi: 10.1098/rspb.2011.1376
- Witchev SK, Stevenson EL and Caldwell HK (2016) Genotypic differences in intruder-evoked immediate early gene activation in male, but not female, vasopressin 1b receptor knockout mice. *BMC Neurosci* 17:75. doi: 10.1186/s12868-016-0310-7
- Yamashita K and Kitano T (2013) Molecular Phylogenetics and Evolution Molecular evolution of the oxytocin – oxytocin receptor system in eutherians. *Mol Phylogenet Evol* 67:520–528. doi: 10.1016/j.ympev.2013.02.017
- Zeder MA (2012a) The domestication of animals. *J Anthropol Res* 68:161–190. doi: 10.1080/00988157.1982.9977605
- Zeder M a. (2012b) Pathways to Animal Domestication. *Biodivers Agric Domest Evol Sustain* 227–259. doi: 10.1017/CBO9781139019514.013
- Zeder MA, Emshwiller E, Smith BD and Bradley DG (2006) Documenting domestication: The intersection of genetics and archaeology. *Trends Genet* 22:139–155. doi: 10.1016/j.tig.2006.01.007
- Zingg HH and Laporte SA (2003) The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab* 14:222–227. doi: 10.1016/S1043-2760(03)00080-8