

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

**Primatas e suas particularidades evolutivas reveladas através de duas distintas
abordagens genéticas**

Luane Jandira Bueno Landau

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Genética e Biologia Molecular**.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cátira Bortolini

Porto Alegre - RS

Abril - 2022

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Evolução Humana e Molecular (LEHM) do Departamento de Genética, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) foi o órgão responsável por financiar a bolsa de mestrado à aluna, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM – UFRGS). O projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, profa. Maria Cátira Bortolini, por compartilhar seu conhecimento e experiência na área de Genética, Biologia Molecular e Evolução, fundamental para a realização deste trabalho. Por toda a assistência, acompanhamento e apoio durante todos os anos em que fui sua orientada.

Agradeço às professoras da banca, constituída por mulheres pesquisadoras e referências na área de Genética e Biologia Molecular brasileira, profas. Juliana Araripe, Vanessa Paixão-Côrtes e Andréia Turchetto, por se disponibilizarem a revisar e pela sua contribuição fundamental a este trabalho. Aos professores Tiago Falótico, por ter providenciado as amostras e o fomento para que este trabalho pudesse ser realizado, Alcides Pissinatti, por providenciar grande parte das amostras de primatas sul-americanos, e à professor Lavínia, pela colaboração para a realização do artigo parte desta dissertação.

Também agradeço especialmente aos meus colegas do LEHM que me acompanharam, aconselharam e colaboraram nos trabalhos em que desenvolvi durante o meu tempo no laboratório. Aos órgãos fomentadores deste trabalho, CNPq e FAPESP, respectivamente por financiar a minha bolsa de mestrado e o meu projeto. Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul por prover um ambiente de ensino e pesquisa de alto padrão e por possibilitarem que eu realizasse meu trabalho com muita qualidade.

Pessoalmente, agradeço à minha família pelo incentivo e apoio psicológico e econômico durante a realização da minha dissertação e todo meu percurso acadêmico. Aos meus pais, David e Roséli, por sempre me apoiarem nos meus objetivos profissionais, acreditando que eu conseguiria ir longe no caminho que escolhi seguir. À minha tia Elena e ao meu falecido avô Bennami por servirem de exemplo desde minha infância de intelectuais em suas áreas, sempre trazendo a importância da ciência para minha formação. E, finalmente, mas de igual importância, a todos os meus amigos que me acompanharam, ouviram, apoiaram durante o período de desenvolvimento da presente dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL.....	7
1.1 BREVE INTRODUÇÃO À CARACTERIZAÇÃO E EVOLUÇÃO DE PRIMATAS	8
1.1.1 <i>Evolução da parvorder Platyrrhini</i>	10
1.2 COEVOLUÇÃO ENTRE PRIMATAS E FLAVIVÍRUS.....	13
1.3 COMPORTAMENTO REPRODUTIVO EM PRIMATAS.....	17
1.4 <i>SAPAJUS LIBIDINOSUS</i> : CARACTERIZAÇÃO E COMPORTAMENTO	22
1.4.1 <i>Sapajus libidinosus do Parque Nacional da Serra da Capivara: Grupo da Pedra Furada.</i>	25
1.4.2 <i>A população de Sapajus libidinosus do Parque Ecológico do Tietê</i>	27
1.4.3 <i>Microssatélites (STRs)</i>	28
CAPÍTULO II: JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	30
2.1 JUSTIFICATIVA	30
2.2 OBJETIVOS.....	31
CAPÍTULO III: MÉTODOS	32
3.1 LOCAIS DE ESTUDO, COLETA E ESTOCAGEM DE MATERIAL.....	32
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA	32
3.3 AMPLIFICAÇÃO DOS LOCI DE MICROSSATÉLITE E GENOTIPAGEM.....	32
3.4 ANÁLISE DE DADOS	34
CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 RESULTADOS DE DIVERSIDADE DE STRS CONSIDERANDO AMBAS AS POPULAÇÕES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.2 VALORES DE DESEQUILIBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE LOCI	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.3 RESULTADOS POR POPULAÇÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.4 PERSPECTIVAS:	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
CAPÍTULO V: EVOLUTIONARY ANALYSIS OF THE ANTI-VIRAL STAT2 GENE OF PRIMATES AND RODENTS: SIGNATURE OF DIFFERENT STAGES OF AN ARMS RACE.....	36
CAPÍTULO VI: CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

A ordem Primata (Primates) compreende dois clados maiores que divergiram há aproximadamente 87 Ma: Strepsirrhini e Haplorrhini. Dentre os Haplorrhini, Platyrrhini é o único clado cujas espécies habitam o continente Americano, enquanto os Catarrhini habitam os continentes Africano e Asiático. Platyrrhini compreende três grandes famílias (Atelidae, Cebidae e Pitheciidae) e teve origem há ~43 Ma. Trata-se de um clado altamente diverso no que tange tanto à biologia, o que em parte reflete os biomas que habitam. Este trabalho apresenta duas abordagens evolutivas tendo como alvo espécies de primatas, particularmente aportando novos dados de genotipagem e sequenciamento em espécies de Platyrrhini. A primeira abordagem desta dissertação refere-se a um estudo de caracterização de diversidade genética em duas populações da espécie *Sapajus libidinosus*, que produz e utiliza ferramentas de forma proficiente, principalmente populações que habitam o Parque Nacional da Serra da Capivara. Aqui, investigamos 10 STRs previamente descritos para *Cebus capucinus*, dentre os quais 9 se demonstraram polimórficos para *S. libidinosus*. Os resultados de diversidade genética apresentados nesta dissertação são preliminares; no entanto, ressalta-se que os valores de $P_{(ID)}$ e $P_{(ID)SIBS}$ indicam que estes loci provavelmente serão sensíveis o suficiente para as descrições genealógicas das populações desta espécie. A segunda abordagem investiga a evolução do gene *STAT2*, importante para a resposta imune antiviral, e como mudanças evolutivas na respectiva proteína podem estar associadas a diversos desfechos relacionados à infecção por flavivírus, já que há notável diferença entre primatas e roedores. Para isso, analisamos a sequência codificadora de *STAT2* e particularmente de seu domínio *SH2* em 28 espécies de roedores e 49 espécies de primatas, considerando dados disponíveis (NCBI e ENSEMBL) e dados originais (*SH2* de 19 espécies de Platyrrhini foram obtidos). O alinhamento foi feito no programa MEGA 7, seguido de análises de seleção positiva por ramos e no sequenciamento completo nos softwares PAML e Datamonkey (MEME e RELAX). O algoritmo *fastcov* foi utilizado para análises de coevolução entre os sítios de *STAT2* que interagem com a proteína de flavivírus NS5. Cinco sítios sob seleção positiva foram encontrados em primatas e roedores (127, 731, 739, 766, e 780), mas estes não se encontram na interface entre a proteína *STAT2* e a proteína viral NS5. *SH2* está provavelmente sob constrição evolutiva, já que o domínio é importante para a função da proteína no hospedeiro. Evidências indicam que roedores provavelmente têm maior vantagem evolutiva quando comparados a primatas para combater o vírus, o que é corroborado por uma maior diversidade de sítios sob seleção, maiores taxas evolutivas, entre outros fatores.

ABSTRACT

The order Primates comprises two larger clades that diverged approximately 87 Ma ago: Strepsirrhini and Haplorrhini. Among the Haplorrhini, Platyrrhini is the only clade whose species inhabit the American continent, while the Catarrhini inhabit the African and Asian continents. Platyrrhini comprises three large families (Atelidae, Cebidae, and Pitheciidae) and originated ~43 Ma. It is a highly diverse clade in terms of biology, which in part reflects the biomes they inhabit. This work presents two evolutionary approaches targeting primate species, mainly providing new genotyping and sequencing data in Platyrrhini species. The first approach of this dissertation refers to a study of genetic diversity characterization in two populations of the species *Sapajus libidinosus*, which produces and uses tools proficiently, mainly in populations that occur in the PNSC. Here, we investigated 10 STRs previously described for *Cebus capucinus*, among which nine proved to be polymorphic for *S. libidinosus*. The genetic diversity results presented in this dissertation are preliminary; however, it is noteworthy that the values of $P_{(ID)}$ and $P_{(ID)SIBS}$ indicate that these loci are likely to be sensitive enough for genealogical descriptions of populations of this species. The second approach investigated the evolution of the *STAT2* gene, essential for the antiviral immune response, and how evolutionary changes in the respective protein may be associated with different outcomes related to flavivirus infection since there is a notable difference between primates and rodents. For this, we analyzed the coding sequence of *STAT2* and its SH2 domain in 28 species of rodents and 49 species of primates, considering available data (NCBI and ENSEMBL) and original data (SH2 from 19 species of Platyrrhini were obtained). Sequence Alignment was performed with MEGA 7 program, followed by analyzing positive selection by branches and complete sequencing using PAML and Datamonkey (MEME and RELAX) software. The *fastcov* algorithm was used for coevolution analyses between *STAT2* sites that interact with the NS5 flavivirus protein. Five sites under positive selection were found in primates and rodents (127, 731, 739, 766, and 780), but these are not found at the interface between the *STAT2* protein and the NS5 viral protein. SH2 is likely under evolutionary constriction, as the domain is important for the protein's function in the host. Evidence indicates that rodents probably have a more significant evolutionary advantage when compared to primates to fight the virus, which is supported by a greater diversity of sites under selection higher evolutionary rates, among other factors.

1 CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL

A presente dissertação é referente a um trabalho realizado durante a pandemia de Covid-19, nos anos de 2020 e 2021. O projeto inicial descrito a ser desenvolvido durante o mestrado desta autora não pode ser finalizado por questões de atraso em conseguir insumos durante a pandemia e, portanto, outro trabalho (já em andamento desde a graduação da autora) também foi desenvolvido durante o período de dois anos do mestrado. Este trabalho (que está apresentado aqui no artigo do **Capítulo V**) já possuía dados disponíveis que foram analisados para a composição desse trabalho. O trabalho que diz respeito ao projeto da autora não está finalizado, mas são apresentados dados preliminares do mesmo a fim de avaliar o andamento das análises. Então, este trabalho compreende diferentes abordagens pra resgatar a história de Primatas, mais especificamente da parvorder Platyrrhini (também conhecidos como primatas do Novo Mundo, ou pNM): 1) abordagem macroevolutiva, envolvendo interação entre patógeno (flavivírus) e hospedeiros (primatas e roedores) e 2) dados populacionais com microssatélites envolvendo populações da espécie *Sapajus libidinosus* (Platyrrhini, família Cebidae; Perelman et al., 2011). Para englobar ambas as abordagens, esta dissertação está organizada conforme descrito a seguir.

Nesta introdução, será abordada a história evolutiva de primatas, com especial atenção à subordem Platyrrhini. Em seguida, serão discutidos de forma breve o que se sabe sobre a relação entre primatas e flavivírus; seguido de uma introdução expandida sobre a caracterização e comportamento de *S. libidinosus*.

No **Capítulos II** serão abordados os objetivos para cada uma das abordagens descritas anteriormente. No **Capítulo III** será abordada a Metodologia respectiva ao segundo tópico apresentado no primeiro parágrafo desta sessão, que diz respeito à evolução de *S. libidinosus*. No **Capítulo IV**, serão apresentados Resultados e Discussão preliminares com relação a este estudo, contendo dados populacionais da espécie.

É importante ressaltar que uma introdução mais específica com relação ao tópico de coevolução de primatas, roedores e flavivírus, assim como sua metodologia, objetivos, resultados e discussão específicos serão apresentados no **Capítulo V**, em que estará exposto o artigo publicado “Evolutionary analysis of the anti-viral *STAT2* gene of primates and rodents: Signature of different stages of an arms race” na íntegra. Neste artigo, abordamos a corrida armamentista evolutiva entre flavivírus e primatas, incluindo

roedores. Escolhemos estudar mais afundo estes dados principalmente devido a uma necessidade da comunidade científica durante a pandemia de Covid-19 de se voltar para o aprendizado da evolução de vírus. Nesse sentido, apresentaremos no **Capítulo V** nossa contribuição para o entendimento da co-evolução entre os principais flavivírus e seus hospedeiros mamíferos, e no **Capítulo VI** uma breve conclusão geral.

1.1 Breve Introdução à Caracterização e Evolução de Primatas

Os primatas tiveram origem entre ~80-90 milhões de anos (Ma) e o clado compreende dois grandes grupos que divergiram há aproximadamente 87 Ma: Strepsirrhini (Lorisiformes, Chiromyiformes e Lemuriformes) e Haplorrhini (Tarsiiformes, Platyrrhini e Catarrhini) (Perelman et al., 2011). Um segundo estudo estimou que provavelmente primatas compartilham um ancestral comum entre ~71-63 Ma (Springer et al., 2012). Tampouco há um consenso quanto ao número de espécies que o clado Primata compreende, mas os números se encontram entre ~261-377 (Perelman et al., 2011), sendo a sua taxonomia bastante complexa – mais dados podem ser encontrados em Perelman et al. (2011). Segundo Springer et al. (2012), a origem dos primatas no geral, Haplorrhini, Catarrhini, e Hominoidea se deu mais provavelmente no continente Asiático, sendo que o mais recente ancestral de primatas provavelmente habitou a Eurásia. No que diz respeito à origem de Strepsirrhini, os dados apontam para uma maior probabilidade entre o continente Asiático e Madagascar (Springer et al., 2012).

Enquanto Platyrrhini é o único clado de primatas que habitam as Américas (por isso também conhecidos como primatas do Novo Mundo), a parvorder Catarrhini compreende espécies que habitam os continentes Africano e Asiático. Em sua maioria, espécies do clado Platyrrhini habitam ambientes de floresta, enquanto as espécies pertencentes ao clado Catarrhini podem habitar uma variedade de ambientes, incluindo florestas, savanas e áreas abertas (Ross, 1991). Estima-se que a divergência entre os clados Platyrrhini e Catarrhini ocorreu entre ~43 e 46 Ma (Finstermeier et al., 2013; Perelman et al., 2011).

De forma geral, as taxas de substituição globais de nucleotídeos em primatas é $6,163 \times 10^{-4}$ substituições/ sítio/ Ma (Perelman et al., 2011). No entanto, as taxas evolutivas entre os clados de primatas não permanecem as mesmas ao longo da filogenia. A hipótese de diminuição de taxas evolutivas em determinadas linhagens teria surgido a partir da ideia de que, ao aumentar a complexidade das formas de vida ao longo do tempo,

novas e complexas funções que evoluíram deveriam ser mantidas para que a vida pudesse permanecer, diminuindo as taxas evolutivas em determinadas linhagens evolutivas (Goodman, 1985). Perelman et al. (2011) ressaltam que há uma diminuição de taxas evolutivas em todo o clado de Catarrhini quando comparados a Platyrrhini e Strepsirrhini. Esses resultados são também confirmados por Moorjani et al. (2016), que constatou taxas evolutivas mais aceleradas em Platyrrhini quando comparados aos demais primatas.

Uma característica importante de primatas é o grande tamanho cerebral comparado ao tamanho corporal, o que tem implicações na sua fisiologia, ecologia e atributos anatômicos (Melchionna et al., 2019). Os tecidos cerebrais requerem grande quantidade energética para funcionar e, por isso, mudanças na dieta também estão presentes em organismos com grandes cérebros. De acordo com Melchionna et al. (2019), durante a sua história evolutiva, primatas experienciaram tendências de “(1) aumento de tamanho corporal, (2) aumento na encefalização [...], (3) menores taxas de extinção, (4) maiores taxas de especiação, e (5) hominídeos se destacam pelo seu cérebro excepcionalmente grande e por padrões de encefalização mais intensos.” (Melchionna et al., 2019, p. 20, tradução livre). Essas características são exclusivas do grupo e estão ligadas à sua forma de vida, ecologia, etologia e desenvolvimento.

Devido à sua similaridade biológicas e proximidade filogenética aos humanos, primatas não-humanos (ou pNH) são de grande importância para pesquisas em um grande número de áreas (King et al., 1988). De acordo com um levantamento realizado em 2010, indivíduos do gênero *Macaca* são os mais comuns em centros de pesquisa dos Estados Unidos (EUA), sendo a espécie mais utilizada *Macaca fascicularis*, seguida de *Macaca mulatta* (Lankau et al., 2014). A Figura 1, retirada de Lankau et al. (2014) demonstra o panorama geral de pNH utilizados em pesquisas nos EUA entre 2010 e 2012.

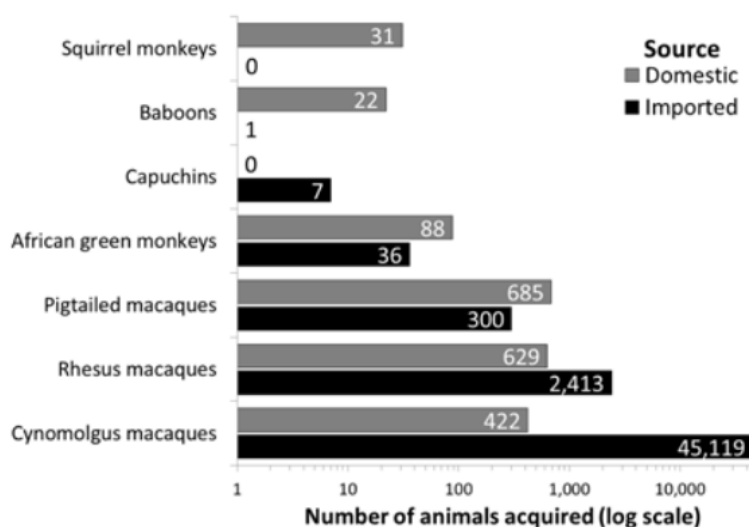


Figura 1. Retirada de Lankau et al., (2014), por isso as legendas estão em inglês. Número de primatas não humanos adquiridos entre 2010 e 2012 por instalações de pesquisa nos EUA. Em cinza, indivíduos adquiridos por criação em outras instalações dentro dos EUA; em preto, indivíduos importados de outros países.

A seguir, serão descritas características do clado Platyrrhini, que contém um conjunto de espécies explorado nos estudos que serão apresentados nesta dissertação. Em ambas as abordagens feitas para esta dissertação, são apresentados dados novos de espécies de Platyrrhini além daquelas já descritas na literatura.

1.1.1 Evolução da parvorder Platyrrhini

O clado Platyrrhini compreende três grandes famílias de primatas que ocorrem na América do Sul e Central: Atelidae, Cebidae e Pitheciidae. Abrange entre 100 e 125 espécies de pelo menos 16 gêneros que tiveram uma radiação impressionante entre América do Sul e Caribe, apresentando uma diversidade de nichos ecológicos, morfologia e tamanho corporal (Perez et al., 2013). Além disso, o clado compreende espécies com variadas formas de vida, como aquelas espécies que vivem em pares (como *Aotus* e *Callicebus*) ou que vivem em grupos de fêmeas (como *Brachyteles* e *Cacajao*); e que ocupam uma variedade de ambientes, desde a Caatinga até florestas úmidas (Duran et al., 2013). No geral, temperaturas altas durante o inverno e quantidades de chuva durante o ano são os dois fatores mais importantes que se correlacionam à distribuição geográfica do clado (Duran et al., 2013).

O clado teve origem há ~43,5 Ma, provavelmente a partir da migração de primatas da África pelo Atlântico, sendo que a sua maior diversificação (também chamada de

Crown Age) ocorreu há aproximadamente 32,8 Ma (Silvestro et al., 2019) – ainda que essa data não esteja totalmente estabelecida, tendo possivelmente sido mais recentemente (R. F. Kay, 2015; Schrago et al., 2014). Uma das evidências mais importantes para essa conclusão é um registro fóssil de molares encontrados em Santa Rosa, no Peru, datado de aproximadamente 36 Ma (Bond et al., 2015). Os fósseis encontrados apresentam semelhanças com os primatas do novo mundo atuais e com espécimes encontradas na África da mesma época, dando suporte a uma ou mais possíveis migrações pelo Atlântico (Bond et al., 2015). Fica ainda em aberto se o clado Platyrrhini surgiu, de fato, na África e teve sua primeira diversificação nesse continente antes de migrar ao continente sul-americano ou se o surgimento do clado teria ocorrido posteriormente já no Novo Mundo.

As evidências apontam para um surgimento tropical de Platyrrhini e uma maior diversificação na Amazônia, havendo mais de uma irradiação para a Mata Atlântica entre o Plioceno tardio e o Pleistoceno (Lynch Alfaro et al., 2015). Os autores também sugerem duas formas de colonização dos Andes pelos Platyrrhini; uma mais antiga, na qual houve dispersão para a região andina antes da total elevação, seguida de uma vicariância e uma mais recente, a partir do contorno das montanhas (Lynch Alfaro et al., 2015). Mais dados fósseis poderão futuramente ajudar a desvendar como ocorreu a expansão e evolução do clado ao longo do continente americano.

A filogenia do clado Platyrrhini tem sido extensivamente estudada a partir de dados moleculares há pelo menos 40 anos. Entre as características particulares de pNM, um importante estudo realizado por Moorjani et al. (2016) constatou, a partir de análises considerando o genoma completo de 10 espécies de primatas, que pNM apresentam taxas de mutação neutra em média 1,64x maiores do que aquelas encontradas para hominóides (grupo que engloba chimpanzés, orangotangos, gorilas e humanos), sendo as taxas médias de mutação para pNM de 6,92% (IC: 6,89–6,94%). Os autores sugerem que teria a ver com menores tempos geracionais em pNM quando comparados a pVM, entre outros componentes relacionados à sua biologia e ecologia.

Um estudo extensivo considerando tanto regiões autossômicas, como dos cromossomos sexuais em 186 primatas resolveu grande parte das dúvidas relativas à filogenia de primatas (Perelman et al., 2011). No entanto, a localização filogenética de diversos clados de pNM ainda é tema de debates constantes e divergências, como a posição do gênero *Aotus* na família Cebidae (R. F. Kay, 2015; Schneider & Sampaio, 2015). Os

achados indicam que o ancestral comum dos Pithecídeos provavelmente teve origem há 20,2 Ma, seguindo de Atelídeos e posteriormente Cebídeos (há aproximadamente 20 Ma); subsequentemente em um curto período de tempo, a subfamília Callitrichinae teria divergido de Aotinae (Perelman et al., 2011).

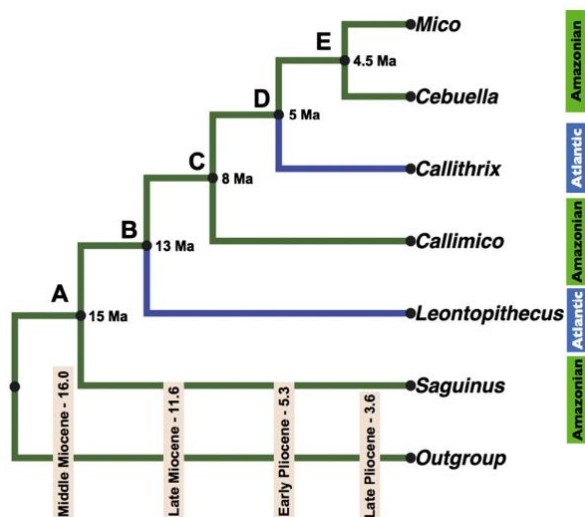


Figura 2. Filogenia de Callitrichinae proposta por Schneider et al. (2012).

Com relação à evolução e filogenia de Callitrichinae, Schneider et al. (2012) sugerem que um evento de divergência há ~5 Ma teria dado origem a três clados, *Cebuella*, *Mico* e *Callithrix* e que *Cebuella* poderia agrupar, com igual probabilidade, com *Mico* ou *Callithrix*, e, portanto, tecnicamente poderiam ser consideradas 3 linhagens diferentes (Schneider et al., 2012). A Figura 2 ilustra a filogenia mais suportada a partir das análises realizadas por Schneider et al. (2012). No entanto, Perelman et al. (2011) encontrou uma associação maior entre *Mico* e *Cebuella*, o que coincide com sua coexistência geográfica atual na bacia Amazônica. Mais dados ainda precisam ser analisados a fim de suportar uma conclusão mais robusta acerca da taxonomia desses três clados.

No que diz respeito a sua ecologia, as espécies pertencentes ao clado Platyrrhini apresentam uma grande variedade de nichos ecológicos. Em sua grande maioria, os pNM são arbóreos e, com exceção de espécies do gênero *Aotus*, são diurnos. Saguís e micos (subfamília Callitrichinae) são geralmente encontrados em florestas secundárias e habitats de borda. Esses mesmos grupos apresentam gemelaridade (com filhotes menores do que se esperaria de acordo com sua massa corporal), cuidado paterno e monogamia (Ross, 1991).

Pithecídeos apresentam uma variedade morfológica, ecológica e comportamental grande. Um exemplo é o comportamento de “predadores de sementes” (do inglês, *seed*

predators), já que extraem as sementes das frutas e as mastigam antes de engoli-las (R. Kay et al., 2013), sendo este comportamento característico do clado. Enquanto Atelídeos são os pNM com maior tamanho e massa corporal, Cebídeos são, em geral, menores. Callithrichineos (uma subfamília da família Cebidae) são os menores macacos do Novo Mundo, e com menor registro fóssil (Silvestro et al., 2019).

Caudas prensais provavelmente evoluíram pelo menos duas vezes dentro dos Platyrrhini, estando presente em Atelídeos e em Cebídeos, mais especificamente nos gêneros *Cebus*, *Alouatta*, *Lagothrix* e *Brachyteles*, ainda que para alguns autores a cauda de *Cebus* ainda é considerada semi-prensil (Rosenberger, 1983). Em Atelídeos, os gêneros *Ateles*, *Brachyteles* e *Lagothrix* compreendem os primatas que apresentam maior complexidade em suas caudas com respeito aos músculos, arcos neurais e morfologia das vértebras (Sehner et al., 2018). Por outro lado, espécies pertencentes ao gênero *Cacajao* possuem menores tamanhos caudais do que o esperado para seu tamanho corporal (Sehner et al., 2018).

Como pode ser visto a história dos Platyrrhini é rica e desafiadora. Com a presente dissertação buscou-se entender melhor aspectos que contribuiriam para seu sucesso evolutivo, para isso foram realizadas duas abordagens, sendo elas: 1) coevolução flavivírus-primatas (incluindo aqui espécies da ordem Rodentia) em que aportamos dados novos de Platyrrhini para a realização das análises; e 2) uma abordagem populacional a partir da investigação de uma espécie com diversas peculiaridades, qual seja, *S. libidinosus*. As próximas sessões abordam uma introdução expandida destes tópicos.

1.2 Coevolução entre Primatas e flavivírus

Grandes epidemias virais que acometem a espécie humana são comuns e acontecem frequentemente. Em 2016 tivemos a epidemia do vírus Zika (ZIKV; um flavivírus), particularmente no nordeste brasileiro, com desfecho devastador para crianças gestadas em mães infectadas. Desde 2020, vivemos a pandemia provocada pelo SARS-CoV-2 (um coronavírus) que tem se mostrado um vírus de alta transmissibilidade, evolução rápida e que tem afetado de maneira irreversível as populações humanas ao longo de 2 anos (Tao et al., 2021). Por isso, entendemos que há uma emergência para se investigar a evolução e a corrida armamentista patógeno-hospedeiro entre vírus e mamíferos ao longo da evolução do clado. Dessa forma, é possível ajudar a elucidar quais são os componentes evolutivos

envolvidos nessa coevolução e contribuir para um maior entendimento de epidemias que acometem a espécie humana. Na presente dissertação, abordaremos uma investigação de coevolução de proteínas virais de flavivírus com proteínas de seus hospedeiros mamíferos, buscando contribuir para o entendimento da comunidade científica com relação a este tópico.

Flavivírus (família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*) são um grupo de vírus de RNA de fita simples que inclui uma mais de 70 vírus, incluindo uma diversidade que acomete a espécie humana, incluindo ZIKV, o vírus da Dengue (DENV), da Febre Amarela (do inglês, *Yellow Fever Virus*, YFV), dentre outros (Williams et al., 2019). Geralmente são transmitidos por um intermediário artrópode, como carrapatos ou mosquitos, e foram responsáveis por severas epidemias que acometeram humanos. Flavivírus são divididos em três grupos ecológicos: o grupo transmitido por mosquito (*Mosquito-Borne Flavivirus*, MBFV), o grupo transmitido por carrapatos (do inglês, *Tick-Borne Flavivirus*, TBFV), o grupo flavivírus específico de vertebrado (conhecidos como aqueles que não se conhece o vetor) e aqueles conhecidos como específicos de insetos (do inglês, *Insect-Specific Flaviviruses*, ISFV) (Villordo et al., 2016).

Víriões do gênero *Flavivirus* geralmente são compostos de um RNA de fita simples positiva empacotado por um capsídeo proteico, cuja porção amino-terminal codifica três proteínas estruturais do vírus, capsídeo, membrana e envelope; sendo que o restante do genoma codifica sete proteínas não estruturais (NS1-NS6) (Mukhopadhyay et al., 2005). Os vírus geralmente de aderem à membrana plasmática das células hospedeiras e adentram a célula pelo mecanismo de endocitose. Uma vez que o genoma viral é liberado na intracelularmente, o RNA é traduzido em uma poliproteína que é processada por enzimas do hospedeiro e, posteriormente, do próprio vírus, e, uma vez maduro, o vírion é liberado extracelularmente através de exocitose (Mukhopadhyay et al., 2005).

Flavivírus em geral apresentam um mecanismo de ação de bloqueio, seja através de inativação ou degradação, da proteína STAT2 (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription 2*), importante para a transcrição de genes de resposta antiviral (Wang et al., 2020). A proteína STAT2 normalmente é fosforilada a partir de uma resposta antiviral mediada por Interferon do Tipo I (IFN-I) e forma um complexo proteico com outras duas proteínas (STAT1 e IRF9), que em última instância se transloca ao núcleo e serve como fator de transcrição de genes que identificam e combatem os vírus (Grant et al., 2016). Ao

inibir o funcionamento da proteína STAT2, os Flavivírus evitam o funcionamento de parte do mecanismo de defesa antiviral inato de mamíferos, impedindo a transcrição de uma diversidade importante de genes fundamentais para que esta ocorra.

Primatas não-humanos (pNH) são especialmente importantes para investigações de patógenos que acometem a espécie humana, principalmente devido à sua biologia similar e proximidade filogenética. Nesse sentido, ao longo dos anos, muitos pNH têm sido usados para o desenvolvimento de fármacos, vacinas, e a testagem das consequências fisiológicas da infecção por determinados patógenos. A seguir será apresentado um breve panorama sobre o que se sabe até o momento de infecções por flavivírus em primatas. É importante ressaltar que não se encontraram estudos comparando a coevolução entre as proteínas do sistema imune inato de pNH e as proteínas de flavivírus e o que apresentaremos a seguir é a respeito de como essas doenças acometem os diferentes grupos de primatas a partir de estudos na natureza ou em laboratório. Outra importância do estudo de flavivírus em primatas é especialmente por este clado ser carreador de muitas doenças que acometem humanos. Em especial, chama-se atenção para bugios (gênero *Alouatta*) que têm sido atacados em virtude de uma associação entre a espécie e a transmissão de YFV. É importante ressaltar que bugios são altamente sensíveis à doença, mas não a transmitem diretamente para outros humanos, já que a doença é carreada por mosquitos.

Dentro de hominídeos, sabe-se que primatas do gênero *Pan*, mais próximos da espécie humana, apresentam viremia quando infectados por DENV e YFV (Hanley et al., 2013; Osterrieth & Deleplanque-Liegeois, 1961), enquanto orangotangos (gênero *Pongo*) apresentam viremia quando infectados com ZIKV (Valentine et al., 2019). Todos estes estudos foram realizados a partir de inoculação do vírus em indivíduos em laboratório.

No que diz respeito a outros pVM, de longe as espécies mais testadas foram do gênero *Macaca*. Sabe-se que *Macaca mulatta*, *Macaca nemestrina* e *Macaca fascicularis* são suscetíveis à ZIKV e DENV, enquanto *Macaca mulatta* e *Macaca nemestrina* apresentaram morte fetal e lesão neural fetal respectivamente em fêmeas prenhas inoculadas com ZIKV (Adams Waldorf et al., 2016; Bernardo et al., 2008; Chua et al., 2019; Dudley et al., 2018; Han et al., 2019; Lopez-Ortiz et al., 2016; Magnani et al., 2018). Estes foram os primatas testados até hoje que apresentaram quadros patológicos mais parecidos à microcefalia em bebês humanos causada por ZIKV. Estes resultados são importantes, tendo em vista que são espécies de primatas que podem ser investigadas com

relação a este quadro, e podem ser usadas para a pesquisa e desenvolvimento de vacinas e medicamentos. Além disso, *Macaca mulatta* apresentou viremia e sintomas quando inoculada com YFV (Hanley et al., 2013), o que não foi encontrado em nenhum outro pVM.

Outros pVM testados para infecções por flavivírus compreendem espécies dos gêneros *Colobus*, *Chlorocebus*, *Papio* e *Cercocebus* que são suscetíveis a infecções por ZIKV (Boyer et al., 2018; Haddow et al., 2012; Wastika et al., 2019); *Trachypithecus*, *Papio* e *Mandrillus* que são suscetíveis a infecções por DENV (Han et al., 2019; Kading et al., 2013; Valentine et al., 2019); e *Hylobates*, *Colobus*, *Chlorocebus*, *Papio*, *Mandrillus* e *Cercocebus* que são suscetíveis a infecções por YFV (Han et al., 2019; Hanley et al., 2013; Silva et al., 2020, 2020). É importante ressaltar que nenhum dos indivíduos estudados das espécies citadas apresentou sintomas ao ser inoculado com nenhum dos três vírus, o que torna ainda mais importante a possibilidade de pesquisa com indivíduos do gênero *Macaca*, principalmente para o estudo de ZIKV. Pesquisas com infecções por outros flavivírus não são tão comuns e por isso ainda não há dados a serem reportados para estas espécies.

Entre os pNM mais testados para flavivírus, as espécies do gênero *Callithrix* costumam ser muito bem caracterizadas. Sabe-se que, assim como espécies do gênero *Macaca*, fêmeas prenhas de *Callithrix jacchus* inoculadas com ZIKV também apresentaram morte fetal e consequências neurais em fetos, similares com as vistas em humanos (Seferovic et al., 2018). Sabe-se também que primatas do novo mundo são particularmente suscetíveis a infecções por YFV, já que espécies dos gêneros *Alouatta*, *Ateles*, *Saimiri*, e *Aotus* apresentam sintomas quando infectados pelo vírus (Almeida et al., 2012; Davis, 1930; de Thoisy et al., 2004; Hanley et al., 2013). Em especial, chama-se atenção para as espécies de bugio (*Alouatta*), para as quais a infecção por YFV é fatal, tendo levado à morte de pelo menos 204 indivíduos reportados entre 2008-2009 no estado do Rio Grande do Sul/Brasil (Almeida et al., 2012), surtos em Minas Gerais entre 2016 e 2019 (Sacchetto et al., 2020). NM mantém contato constante com humanos em diversas áreas de ocorrência, e os estudos com essas espécies é de especial importância, já que esses primatas podem ser carreadores da doença.

Como pode ser visto a partir desta breve revisão, pNH apresentam uma diversidade de respostas a infecções por flavivírus. Por outro lado, roedores, no geral, não são

suscetíveis a infecções por flavivírus e por isso não são bons modelos para o estudo deste patógeno. Um estudo de 2010, no entanto, demonstrou que camundongos *knockout* para o gene *STAT2* se tornaram suscetíveis à DENV (Ashour et al., 2010). No **Capítulo V** desta dissertação nós apresentamos um estudo evolutivo do gene *STAT2* em primatas e roedores no intuito de elucidar se a evolução desse gene pode estar por trás das diferentes respostas a infecções por flavivírus apresentadas por primatas e roedores. Alguns resultados interessantes apontam para diferenças importantes na evolução do gene em roedores e primatas que podem estar relacionados a uma guerra armamentista evolutiva entre as proteínas do hospedeiro e as proteínas virais.

1.3 Comportamento reprodutivo e filopatria em primatas

O comportamento social tem um impacto importante na estrutura genética de uma população e no padrão de associação entre os indivíduos de um mesmo grupo. A ligação entre comportamento reprodutivo e *fitness* (valor adaptativo) é bastante estudada para primatas, sendo um componente importante para elucidar por que as populações estão organizadas de uma maneira ou de outra. A importância de estudar os padrões reprodutivos de determinada espécie está em compreender que traços e características estão sendo selecionados nessa espécie, considerando a pressão de seleção natural para sucesso reprodutivo. Os primatas não possuem uma única organização reprodutiva. Muitas espécies apresentam machos dominantes que monopolizam as fêmeas ou têm maior acesso a elas (tema que será discutido com maiores detalhes abaixo), mas isso não é uma regra. A relação entre dominância dos machos e sucesso reprodutivo, medido por número de filhotes, nem sempre é tão clara, podendo ser influenciada por vários fatores. A Figura 1 mostra a distribuição da dominância entre os sexos nas espécies de primatas: note que a dominância é altamente variável entre os clados da ordem Primata.

Um estudo com lêmures (*Eulemur fulvus rufus*) avaliou relações de parentesco a partir de análises de microssatélites e de haplótipos de DNA mitocondrial (Wimmer & Kappeler, 2002). Os autores chegaram à conclusão de que as fêmeas de uma mesma população geralmente eram filopátricas (geneticamente relacionadas: possivelmente irmãs, filhas ou sobrinhas da matriarca), enquanto os machos migravam para outros grupos ao atingir a maturidade sexual. Essa estratégia é clássica, potencialmente moldada pela seleção natural, pois minimiza o efeito deletério de cruzamentos entre indivíduos

aparentados (Greenwood, 1980). Além disso, o mesmo estudo encontrou que, apesar de os lêmures desta espécie serem promíscuos, a maior parte da prole era do mesmo macho dominante. Tal padrão se repetia em todas populações de lêmures analisadas para este estudo (Wimmer & Kappeler, 2002). Um exemplo similar foi encontrado para a espécie *Macaca nigra* a partir de análises de microsatélites ou STRs (do inglês, *Small Tandem Repeats*), onde fêmeas também são filopátricas e os machos são os que migram (Engelhardt et al., 2017). No entanto, os machos dessa espécie tendem a ser completamente dominantes e, portanto, houve uma grande tendência de monopolização da paternidade pelos mesmos. Macacos *vervet* (*Chlorocebus pygerythrus*), por outro lado, apresentam codominância entre machos e fêmeas. Um estudo com STRs para esta espécie demonstrou que não há relação forte entre dominância de machos e sucesso reprodutivo (Minkner et al., 2018). Os últimos autores sugerem que esse resultado está relacionado com diferentes estratégias utilizadas pelas fêmeas para a escolha de parceiros reprodutivos (Minkner et al., 2018).

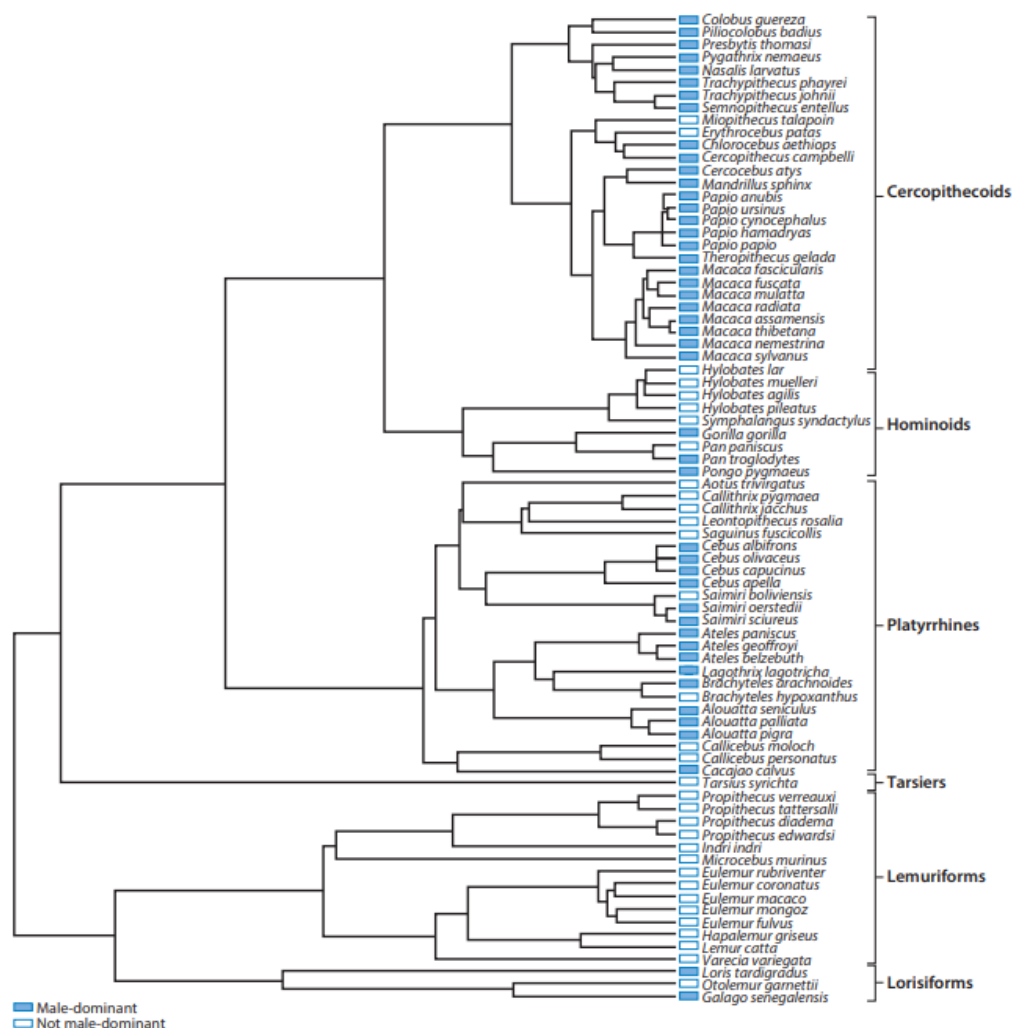


Figura 3. Distribuição da dominância do macho entre as espécies de primatas. Em azul, espécies em que o macho é dominante e em branco espécies em que não há dominância do macho reportada. Adaptado de Lewis (2018).

Estudos com espécies de Platyrrhini não são numerosos quando comparados ao montante de estudos com Catarrhini. Uma espécie de macacos-prego (*Cebus capucinos*) vive em grupos em que os machos migram ao atingir a maturidade sexual (Jack & Fedigan, 2006). Para esta espécie, a dominância em machos está diretamente relacionada com o sucesso reprodutivo e machos subordinados raramente têm filhotes com as fêmeas do bando (Jack & Fedigan, 2006). Esses achados foram corroborados posteriormente por Muniz et al. (2010) a partir de um estudo com populações da mesma espécie que habitavam a Reserva Biológica de Lomas Barbudal, localizado em Guanacaste, Costa Rica. Os autores sugerem que a probabilidade de um indivíduo jovem de determinado bando ser filho do macho alfa do bando aumenta se no grupo (1) há um menor número de machos subalternos ou jovens, (2) se há um menor número de fêmeas em idade reprodutiva e se (3)

a mãe desse indivíduo não for filha do macho alfa. Os autores também sugerem que a escolha das fêmeas tem um papel importante na dinâmica reprodutiva da espécie, e que elas provavelmente preferem acasalar com o macho dominante, já que este não apresenta nenhum comportamento de retaliação direcionado a outros machos ou vigília forte dos acasalamentos de fêmeas com machos subalternos (Muniz et al., 2010). Apesar de todos os cebídeos estudados até então apresentarem dominância de machos, isto não é regra para o que diz respeito à dispersão. Um estudo com *Sapajus nigritus*, espécie da mesma família Cebidae, encontrou um padrão diferente de organização, em que ambos machos e fêmeas migram em igual medida, sendo a respectiva razão evolutiva ainda debatida (Tokuda et al., 2018).

Outro estudo com uma espécie de bugio (*Alouatta pigra*; família Atelidae; Perelman et al., 2011) encontrou resultados ainda mais diferentes. Os grupos são formados por fêmeas e machos relacionados, que, quando migram, tendem a ir em grupos do mesmo sexo também relacionados geneticamente (fenômeno denominado de migração paralela; Van Belle et al., 2012). Collevatti et al. (2013), por sua vez, analisaram outra espécie deste gênero, *Aouatta caraya*, e também encontraram um padrão de migração paralela nos grupos analisados. Além disso, os autores encontraram que mais de um macho no grupo tinha sucesso reprodutivo e que há muita cópula extra grupo (Collevatti et al., 2013). Por outro lado, um estudo com muriquis (*Brachyteles hypoxanthus*; família Atelidae; Perelman et al., 2011) demonstrou que a paternidade nesses animais é muito mais distribuída ao acaso entre os machos, congruente com a raridade das agressões e com a horizontalidade das relações sociais nessa espécie (Strier et al., 2011). Indivíduos da espécie de Sagui-de-Geoffrey (*Saguinus geoffroyii*; família Cebidae; Perelman et al., 2011) apresentam comportamento parecido, pois machos geralmente tinham alto grau de parentesco e dividiam os cuidados com a prole em alguns grupos. Para os autores, esse comportamento pode ser devido aos benefícios da cooperação entre machos da espécie (Díaz-Muñoz, 2011).

A partir desses estudos, é possível observar que, apesar de existir dominância dos machos na maioria das espécies estudadas dentro do clado Platyrrhini, há uma variação de como esse comportamento se expressa, fazendo com que diferentes padrões de organização social decorram disso. Além disso, apesar de contra-intuitivo, nem sempre os machos dominantes parecem ter maior sucesso reprodutivo. Ellis (1995) sugere algumas razões que

podem estar ligadas à diminuição do sucesso reprodutivo de machos dominantes, tais como: a manutenção da posição de dominância requer tanto empenho e gasto de energia (como para manter o território e monopolizar o alimento) que alguns machos subalternos podem se aproveitar disso para ganhar espaço entre as fêmeas, já que machos dominantes nem sempre conseguem vigiar as fêmeas a todo momento; ainda, machos dominantes tendem a ser tão agressivos que esse comportamento pode acabar assustando algumas possíveis parceiras (Ellis, 1995). As preferências reprodutivas das fêmeas também devem ser levadas em consideração, já que em muitas espécies de primatas os machos apresentam nenhum ou pouco cuidado parental, principalmente no que diz respeito a pVM (Kappeler & van Schaik, 2004). (Minkner et al., 2018), por exemplo, argumentam que a distribuição da paternidade pode ser guiada pela escolha do parceiro pela fêmea.

Outro fator que pode interferir no sucesso reprodutivo de machos-alfa é que a presença de outros machos subalternos no bando pode ajudar a proteger os indivíduos do grupo. Isso traz vantagens e, muitas vezes, os machos dominantes abrem mão de monopolizar as fêmeas em troca dessa ajuda na proteção do bando (como em *C. capucinus*; (Muniz et al., 2010)). Ainda, em Platyrrhini, a frequência de machos, incluindo os dominantes, que gastam parte de seu tempo com cuidados diretos com a prole é bastante marcante, especialmente dentro da família Cebidae. Esse comportamento tem um componente adaptativo bem documentado como mostram estudos com genes moduladores do comportamento conduzidos por nosso grupo de pesquisa (Fam et al., 2019; Parreiras-e-Silva et al., 2017; Reales et al., 2018; Vargas-Pinilla et al., 2015, 2017). No entanto, como esses dados mostram, não há somente um gene ou variante deste associado à emergência de tais fenótipos adaptativos, mas sim um complexo repertório genético táxon-específico envolvendo vias correlatas tais como oxitocinérgica, serotoninérgica e do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA).

Portanto, a relação entre dominância e sucesso reprodutivo nem sempre é tão clara, ainda mais considerando que é difícil observar comportamentos reprodutivos na natureza e que nem sempre os comportamentos reprodutivos observados correspondem ao padrão de paternidade nas populações observadas. Sendo assim, estudos genéticos de determinação de parentesco podem contribuir para elucidar quais as variáveis evolutivas em jogo em determinada espécie.

Di Fiore (2003) aponta duas importantes razões para investigar a relação entre comportamento, estrutura social e estrutura genética em primatas: (1) o conhecimento da estrutura genética de diversas populações é crucial para compreender a evolução do comportamento social; e (2) entender comportamento individual é fundamental para o entendimento da organização social dos primatas. O autor sugere ainda que estas avaliações podem ser realizadas a partir da genotipagem de loci de STRs, principalmente no sentido de medir relações de parentesco e paternidade (Di Fiore, 2003).

Com o intuito de investigar o comportamento reprodutivo dos *Sapajus libidinosus* que vivem no Parque Nacional da Serra da Capivara (PNSC, Piauí) fizemos a caracterização de 10 loci de microssatélites para duas populações desta espécie. Vale destacar que os indivíduos de um grupo da Pedra Furada (PF), que vive no PNSC, foi postulado que os indivíduos da PF usam extensivamente ferramentas com alta proficiência, mesmo quando comparado à homínidos (Falótico et al., 2019). Desse modo, é considerado que os *S. libidinosus* PNSC/PF têm uma cultura autóctone e dinâmica com potencial valor adaptativo, uma vez que promove soluções para demandas sociais e ambientais, envolvendo comportamentos complexos associados ao uso de ferramentas por adultos e aprendizagem por indivíduos mais jovens. Entretanto, até o momento não se sabe quanto dessa cultura impacta a reprodução no grupo da PF. A partir dos dados gerados pelo presente estudo será possível mensurar, por exemplo, se os indivíduos mais hábeis no uso de ferramentas (e que são os mais observados) conseguem ter também maior sucesso reprodutivo (em número de filhos). A seguir, será introduzido com mais detalhes características da espécie investigada e um pouco do que já é sabido sobre seu comportamento reprodutivo.

1.4 *Sapajus libidinosus*: caracterização e comportamento

S. libidinosus é uma espécie de macacos-prego da família Cebidae. Esta espécie se distribui pelos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, São Paulo, Piauí, Rio Grande do Norte, Tocantins, Pernambuco e Paraíba (la Salles et al., 2018), ocorrendo em uma diversidade de ambientes, incluindo nos biomas da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Floresta Atlântica (Lynch Alfaro et al., 2012). A maior parte dos estudos sobre a distribuição filogeográfica de *S. libidinosus* buscam entender melhor a separação entre os gêneros *Cebus* e *Sapajus*, visto que, hoje, as espécies de ambos gêneros

ocupam em simpatria diversos habitats, desde a América Central até o norte da Argentina (Lima et al., 2017, 2018; Lynch Alfaro et al., 2012; Martins-Junior et al., 2018).

O que diferencia mais visivelmente *S. libidinosus* é a presença de um topete amarelo ou bege, podendo assumir cores mais escuras dependendo do indivíduo; possuem peso entre 1,4-4,8 kg e dimorfismo sexual, em que machos geralmente são maiores do que as fêmeas (la Salles et al., 2018). Essa espécie é considerada oportunista e generalista, consumindo principalmente frutas, sementes, insetos e pequenos vertebrados (la Salles et al., 2018).

Os macacos do gênero *Sapajus*, de modo geral, costumam viver em grupos de 10 a 35 indivíduos, nos quais as fêmeas são filopátricas e os machos migram entre grupos (la Salles et al., 2018). As fêmeas não têm necessariamente estro sincronizado, mas comumente o pico de nascimentos ocorre na época de maior abundância de alimentos (la Salles et al., 2018). Elas não costumam apresentar distinções morfológicas quando estão no cio, no entanto, engajam-se em atividades para chamar atenção do macho, como as descritas por (Falótico & Ottoni, 2013), sendo, portanto, um dos indicativos de que se encontram em período reprodutivo (la Salles et al., 2018). (Falótico & Ottoni, 2013) descreveram um comportamento inovador quando observaram fêmeas atirando pedras em direção a machos que elas, potencialmente, tinham interesse. Esse comportamento foi rapidamente copiado por outras fêmeas.

Até o presente momento, os estudos de comportamento reportando as estratégias reprodutivas com populações de *S. libidinosus* são do tipo observacional (Falótico & Ottoni, 2013; Izar et al., 2012; la Salles et al., 2018). Os últimos autores discutem que as estratégias de comportamento reprodutivo são conservadas dentro do gênero *Sapajus*, já que nas espécies *S. libidinosus* e *S. nigritus* as fêmeas preferem copular com o macho dominante, configurando um sistema reprodutivo poligínico (Izar et al., 2012; la Salles et al., 2018). No entanto, não há estudos genéticos que corroborem estes resultados, deixando ainda espaço para que mais estudos complementem o observado no estudo de campo pelos autores citados acima.

Embora *S. libidinosus* não seja uma espécie caracterizada pelo cuidado direto exercido pelo pai, como acontece com outras espécies da família Cebidae (Parreiras-e-Silva et al., 2017; Vargas-Pinilla et al., 2015), há muita tolerância dos adultos, incluindo dos machos dominantes, com a aproximação dos jovens aprendizes. Esse comportamento

facilita muito a aprendizagem social, já que indivíduos destas espécies são muito habilidosos no uso de ferramentas (bigorna e martelo de pedra, por exemplo) para ter acesso a partes moles de frutos encapsulados, tais como castanha de caju (*Anacardium* spp.) abundante na Caatinga, um dos biomas que habitam (Coelho et al., 2015). Tem sido estimado que pelo menos dois anos são necessários para dominar a arte de usar um martelo (Otoni & Izar, 2008), sendo que (Fragaszy et al., 2020) propõem que antes dos 5 anos de idade os indivíduos não conseguem dominar com excelência a quebra de frutos/sementes de casca dura, tempo considerado próximo ao de grandes primatas (considerando que este primata pode viver até 25 anos na natureza). Esses dados indicam grande tempo para aprendizagem. Apesar desta característica de “tolerância” em relação aos jovens aprendizes ser marcante nas populações de *S. libidinosus*, as relações entre machos adultos costumam ser agressivas na disputa pelas fêmeas (Mendonça-Furtado et al., 2014). Sob uma perspectiva evolutiva, esses efeitos opostos têm potencial para “dilemas” evolutivos, já que deve haver um balanço entre comportamentos agressivos / de dominação masculinos *versus* cuidados paternos diretos (Mokkonen et al., 2018). Os últimos autores chamam especial atenção para o caso Platyrrhini, onde machos cuidadores são comuns em alguns clados tal como Cebidae. Ou seja, comportamentos agressivos vinculados à dominação dos machos *versus* cuidados paternos diretos, ou a tolerância para aproximação dos jovens (seja para observar o manejo de ferramentas para obter alimento, seja para o *scrounging* – catação de restos de alimento depois do uso da bigorna e martelo para quebrar castanhas por um adulto, por exemplo), como acontece com os *S. libidinosus*, seria um bom exemplo do tal dilema evolutivo. No caso dessa espécie, não temos dados sobre o sucesso reprodutivo de machos dominantes, os quais também são os mais observados pelos jovens aprendizes, que fazem suas aproximações no momento que os adultos utilizam ferramentas (Coelho et al., 2015). Essas informações seriam críticas para avaliar esse potencial dilema evolutivo, visto que poderia elucidar o quanto o comportamento de produção e utilização de ferramentas está vinculado a um maior sucesso reprodutivo em machos da espécie *S. libidinosus*.

Além disso, não está claro, por exemplo, se machos dessa espécie diferenciam a sua prole em relação às demais do grupo, o que é importante no sentido de direcionar o cuidado parental para a própria prole. Em *C. capucinus*, os infantes tendem a interagir mais com os machos dominantes, mesmo que estes não sejam necessariamente seus pais

biológicos (Sargeant et al., 2016). O mesmo estudo sugere que a relação entre irmãos também não é maior quando eles têm parentesco por lado de pai, mas é maior quando compartilham a mesma mãe, demonstrando a importância do papel materno nos laços afetivos dos jovens dessa espécie (Sargeant et al., 2016). Esses comportamentos podem se dar pelo fato de que nem os machos nem os infantes sabem quem é pai de quem, já que as fêmeas também podem copular com outros machos além do dominante. Considerando que *S. libidinosus* tem uma configuração de reprodução parecida, uma possibilidade é que o comportamento da prole com relação aos machos da população seja parecido. Uma forma de investigar esse assunto seria saber se os infantes realmente interagem com todos os machos igualmente, mais com o macho dominante ou mais com seus pais biológicos. Para isso, testes de paternidade, por exemplo, a partir de loci de STRs, são importantes para poder comparar as interações entre os indivíduos e definir exatamente suas relações de parentesco.

É importante reconhecer as relações de parentesco entre indivíduos de grupos de *S. libidinosus* para compreender suas relações sociais. Por isso, para o presente estudo, duas populações de *S. libidinosus* serão analisadas e características das mesmas serão descritas nos tópicos a seguir, já que são particulares no que tange à sua organização social e ao uso de ferramentas.

1.4.1 *Sapajus libidinosus* do Parque Nacional da Serra da Capivara: Grupo da Pedra Furada.

O Parque Nacional da Serra da Capivara (PNSC) é uma Área de Preservação Permanente criado em 1979 e localizado no sudeste do estado do Piauí; compreende 130.000 hectares de fauna e flora características do bioma da Caatinga (de acordo com os dados divulgados pelo Instituto Chico Mendes - ICMBio através do endereço <https://www.icmbio.gov.br/portal/visitacao1/unidades-abertas-a-visitacao/199-parque-nacional-da-serra-da-capivara>). Esse bioma é um dos biomas mais secos do Neotrópico, caracterizado por um baixo e irregular nível de chuvas, sendo altamente atingido por ação antrópica (Olmos, 1992). Encontra-se na região nordeste do Brasil, sendo o terceiro maior bioma do país (Moura, 2005). Os indivíduos de *S. libidinosus* chegaram à região onde hoje identificamos como Caatinga em recentes aproximadamente <200 mil anos (Lynch Alfaro et al., 2012). O bioma é um ambiente inóspito para muitas espécies, devido ao clima semi-árido e à eventual escassez de alimentos sazonal.

Atualmente, uma população da espécie *S. libidinosus*, denominada de Grupo da Pedra Furada (PF), é acompanhada desde 2007 pelo Dr. Tiago Falótico e equipe (Falótico & Ottoni, 2013, 2014, 2016). O local situa-se dentro do PNSC, sendo que indivíduos desse foram investigados no presente trabalho.

Apesar da escassez de dados sobre a filogeografia de *S. libidinosus*, um estudo inicial do nosso laboratório (Laboratório de Evolução Humana e Molecular, LEHM–UFRGS) a partir de dados de sequências do *CYTB* demonstrou que os indivíduos que ocorrem no PNSC estão em expansão demográfica relativamente recente, a menos de ~10 mil ou ~6 mil anos atrás, dependendo da taxa de mutação utilizada (Cantele, 2020). Como dados com *CYTB* contam a história demográfica e evolutiva mediada pelas fêmeas, é oportuno investigar a população da PNSC com marcadores biparentais, tais como STRs.

As populações de *S. libidinosus* que vivem atualmente nos biomas do Cerrado e da Caatinga, particularmente as populações do PNSC, fazem o uso de ferramentas (por exemplo “bigorna” e “martelo” de pedras e/ou madeira) para abrir frutos encapsulados, tais como castanha de caju (*Anacardium ssp.*; (Falótico, Luncz, et al., 2016; Ottoni & Izar, 2008). Um estudo de arqueologia de primatas de Novo Mundo realizado dentro da área do parque mostrou que o uso de ferramentas pela espécie de *S. libidinosus* ocorre há, pelo menos, 3 mil anos (Falótico et al., 2019). Usam ferramentas também para amaciar o solo e cavar com o objetivo de encontrar tubérculos e insetos (Mannu & Ottoni, 2009). Como já comentado, outro comportamento inovador recentemente descrito para essas populações foi o de atirar pedras em direção aos machos, possivelmente um comportamento de corte feminino (Falótico & Ottoni, 2013).

Ainda no PNSC, foram descritos comportamentos interessante para esta espécie: o bipedalismo eventual em substratos verticais (Falótico, Inaba, et al., 2016), o uso de sondas (pequenos palitos) e varetas para limpar os dentes ou para cutucar pequenos vertebrados e roedores escondidos em fendas (Haslam & Falótico, 2015; Mannu & Ottoni, 2009). Esses indivíduos de *S. libidinosus* não apenas usam ferramentas, mas são capazes de escolher as ferramentas de acordo com seu objetivo e definir qual a melhor para determinada tarefa. Por exemplo, como os chimpanzés, indivíduos da espécie *S. libidinosus* que ocorrem na região do PNSC, são capazes de aperfeiçoar ferramentas, tirando as folhas da vareta e afinando sua ponta (Falótico et al., 2017; Westergaard & Fragaszy, 1987). Ainda, são capazes de espantar cobras usando pedaços de pau ou varetas (Falótico et al., 2018).

Os machos dominantes dos grupos de *S. libidinosus* que habitam o PNSC são tolerantes e os mais observados pelos jovens (Ottoni & Izar, 2008). No entanto, não temos dados sobre o sucesso reprodutivo desses indivíduos. Como já mencionado, essas informações seriam críticas para avaliar o dilema evolutivo envolvendo agressão *versus* tolerância, e seu delicado equilíbrio evolutivo em *S. libidinosus*, os mais habilidosos manipuladores de ferramentas dentre os primatas do Novo Mundo (Falótico et al., 2019).

1.4.2 A população de *Sapajus libidinosus* do Parque Ecológico do Tietê

O Parque Ecológico do Tietê (PET) é um parque urbano, localizado na zona leste da cidade de São Paulo (23°29'S, 46° 31'O; (Izar & Ferreira, 2006). Foi criado em 1976 com o objetivo de preservar o rio Tietê, tendo um papel muito importante na conservação das várzeas naturais do rio como forma de prevenção de alagamentos. É uma das maiores áreas de soltura de animais capturados ilegalmente (estas e outras informações foram retiradas do endereço eletrônico do parque, http://www.daee.sp.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=564:parque-ecologico-do-tiete-pq&catid=48:noticias&Itemid=53).

Os indivíduos mais velhos de *S. libidinosus* presentes no PET foram confiscados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e soltos no parque, sendo que atualmente há indivíduos nascidos no parque. Eles se distribuem em quatro grupos formados independentemente, sendo parte de sua dieta provisionada pelos trabalhadores do parque e parte por forrageio da região (Ottoni & Mannu, 2001). As amostras de *S. libidinosus* utilizadas para este estudo são provenientes de um dos grupos encontrados no parque, cujos indivíduos estão em condições de semi-liberdade em uma área reflorestada de 180.000 m². Os indivíduos desse grupo são unicamente identificados por sua morfologia como *S. libidinosus*. No entanto, há suspeita de que sejam híbridos com outras espécies do mesmo gênero, principalmente porque a origem dos animais não é conhecida.

Há registro de uso de ferramentas também pelas populações de *S. libidinosus* que ocorrem no PET, apesar de não ser de forma tão frequente e regular como no PNSC (Ottoni & Izar, 2008). Foi no PET que as observações de indivíduos de *Sapajus spp.* permitiram inferir que jovens macacos são incentivados a observar para aprender os comportamentos elaborados de confecção e uso de ferramentas. Também foi reportado que

alguns jovens *S. libidinosus* que vivem no PET, enquanto observam os adultos, movem as mãos como se os estivessem imitando (Coelho et al., 2015). Os mais jovens parecem apresentar um viés quando escolhem quem irão observar, (Coelho et al., 2015) argumentam que idade, hierarquia, proficiência e produtividade são as características mais importantes que determinam quem será observado.

Por ser uma população introduzida artificialmente na região, não é possível fazer grandes inferências evolutivas a respeito desta população. No entanto, os dados dos indivíduos de *S. libidinosus* do PET são importantes para complementar os estudos de padronização de microssatélites, apresentados nesta dissertação. Além disso, servem como fonte de comparação com o outro grupo da PF, já que não é uma população natural, mas introduzida. Assim, os dados destes indivíduos serão utilizados para este fim, e serão discutidos de acordo.

1.4.3 Microssatélites (STRs)

Microssatélites são regiões não codificadoras encontradas nos genomas de eucariotos e, muito menos frequentemente, em procariotos nas quais sequências de até 5pb se repetem inúmeras vezes *in tandem* em determinada região do DNA, frequentemente apresentando um grande número de alelos por loci (Queller et al., 1993). Essas regiões são altamente polimórficas, sendo, portanto, muito importantes para a identificação individual e para testes de parentesco. Em nível populacional, os microssatélites podem ser úteis para indicar parâmetros filogeográficos (por exemplo, o quanto uma população é endogâmica, se há ou não efeito de gargalo de garrafa, efeito fundador, grau de hibridização, heterozigose média, e padrões de comportamento reprodutivo e de dispersão; ver (Bruford & Wayne, 1993; de Ruiter, 2004; Turchetto et al., 2015).

As técnicas moleculares de avaliação de paternidade e parentesco permitem avaliar com mais precisão e clareza as relações entre os membros de um grupo e os respectivos comportamentos reprodutivos. Nem sempre está claro, principalmente no que tange à paternidade, quem é filho de quem, e se essas relações estão fortemente relacionadas ao comportamento sexual e de cuidado parental de machos e fêmeas. Estudos de paternidade através da utilização de STRs são fundamentais para o entendimento da ecologia e dos aspectos evolutivos relacionados às populações investigadas, bem como para traçar padrões reprodutivos e comportamentais de cada uma das espécies (Gibbs, 2001). Outros

estudos também investigaram padrões de comportamento reprodutivo através de análise de STRs em diversas espécies de vertebrados, inclusive com repercussão para a conservação dessas espécies (Bouchard et al., 2018; Escudero et al., 2017; Green et al., 2015; Ojeda et al., 2016; Van Oosten et al., 2016). Por exemplo, um estudo analisou 9 loci de microssatélites em três populações de tuco-tucos (*Ctenomys flamarioni*) da região litoral sul-brasileira, sendo que duas das regiões estudadas, nos municípios de Xangrilá e Remanso que eram caracterizadas por forte urbanização, apresentaram sinal de redução populacional recente dessa espécie (Fernández-Stolz et al., 2007), ilustrando o quanto estudos com essa metodologia podem ajudar a entender quais populações estão decrescendo em função das atividades humanas.

A utilização de STRs para inferências de paternidade é também muito comum e tem diversas vantagens, como o fato de ser fácil identificar heterozigotos por serem marcadores codominantes, de terem altas taxas de mutação e, portanto, serem altamente polimórficos (Selkoe & Toonen, 2006). Além disso, é relativamente fácil de genotipar, já que são necessárias pequenas quantidades de DNA e as análises podem ser feitas por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*; Webster & Reichart, 2005). Para inferir a paternidade, um método mendeliano simples já pode resolver o problema. Basicamente, analisando um locus, um dos alelos deve vir necessariamente de um dos pais e o outro alelo, do outro. Ao analisar diversos loci, é possível encontrar com maior probabilidade os pais por exclusão comparando com possíveis candidatos (Webster & Reichart, 2005). No entanto, é necessário ter em conta de que essa atribuição de paternidade, por se dar por exclusão, pode ser encontrada ao acaso, e que a probabilidade disto acontecer difere de população para população e de marcador para marcador. Portanto, ainda que a exclusão seja um método inicial importante, métodos estatísticos robustos são necessários para inferir paternidade com segurança (Marshall et al., 1998), o que de fato vem sendo feito, atualmente, com alta probabilidade de acerto (Gouy & Zieger, 2017).

Diversos estudos envolvendo comportamento e evolução de primatas citados neste texto foram realizados através da genotipagem de marcadores moleculares, em sua maioria, STRs (ver sessão 1.3 desta dissertação). Nesse sentido, dez loci de STRs foram selecionados para investigar as amostras de *S. libidinosus* que compõe o presente estudo. Nos tópicos a seguir, serão descritos os objetivos, métodos, resultados e discussão preliminares para realizar esta investigação.

2 CAPÍTULO II: JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

O conhecimento acerca da genética envolvendo espécies de Platyrrhini ainda está em pleno desenvolvimento, sendo que muito ainda deve ser descrito para que tenhamos de fato um panorama geral da evolução de tão interessante clado de primatas.

Na introdução desta Dissertação, abordamos o estado da arte considerando os estudos que descrevem, em especial a filogenia e as particularidades comportamentais associadas ao uso de ferramentas por indivíduos *S. libidinosus* do grupo da Pedra Furada (PF) e do Parque Ecológico do Tietê (TEP). A população da PF, em especial, tem características muito marcantes no uso de ferramentas, cuja diversidade de comportamentos associados não tem paralelo com qualquer outra espécie de primata não-humano. Por isso tem sido dito que o grupo PF (PNSC) desenvolveu um cultura autóctone, transgeracional, dinâmica, inovadora e adaptativa. Com isso, uma pergunta evolutiva que surge é se o sucesso no manejo de ferramentas dos indivíduos está relacionado (ou não) ao seu sucesso reprodutivo, ou seja, se os animais que melhor/mais assertivamente manejam ferramentas (e por isso são os mais observados) têm mais filhos. Esse dado é particularmente importante considerando os machos, já que os dados observacionais não podem com precisão definir quem é o macho genitor. Com os dados de STR aqui gerados, poderemos identificar relações precisas de parentesco, o que permitirá estabelecer pela primeira vez, se o acesso ao alimento processado também traz ganho adaptativo no quesito reprodução. Será um importante achado para compreender mais aspectos da cultura dessa população. Outro importante aspecto deste estudo é contribuir para ampliar o conhecimento sobre o surgimento e desenvolvimento de uma cultura adaptativa em espécie de primata não-humano e contribuir para o entendimento de como se deu a evolução de comportamentos complexos como o uso de ferramentas (seja considerando o *Homo sapiens* ou outros hominíneos).

Além disso, na introdução da presente Dissertação também foi feita uma ampla revisão bibliográfica na busca dos possíveis desfechos de infecções pelos flavivírus mais conhecidos que infectam primatas. Com propósito comparativo, compilações de dados de outra ordem de mamíferos (Rodentia) foi também obtida, já que animais deste clado são

naturalmente mais resistentes a infecções por tais flavivírus comuns, que trazem desfechos graves em primatas (exemplo, ZIKA). A hipótese de trabalho então focou na identificação do padrão de variação no gene *STAT2* e se este refletiria uma potencial guerra armamentista evolutiva entre o patógeno (flavivírus) e hospedeiros primatas. Os vírus evoluem de forma rápida no intuito de aumentar sua própria replicação e desviar da imunidade do hospedeiro, enquanto o sistema imune do hospedeiro também evolui no sentido de barrar a entrada do vírus no interior da célula, evitando sua replicação. Levando-se em conta o que foi exposto até aqui, definiu-se os seguintes objetivos:

2.2 Objetivos

A partir da justificativa acima colocada, a seguir apresentamos os dois objetivos desta dissertação que estão de acordo com as investigações que já foram desenvolvidas para este trabalho (explicadas no início da introdução). Sejam eles:

2.1 Descrever a diversidade genética das populações de *S. libidinosus* do PNSC e do PET a partir da padronização de 10 STRs ainda não descritos para esta espécie. Para isso, tem-se como objetivos específicos: (a) Padronizar e STRs específicos para duas populações da espécie de *S. libidinosus*; (b) Estimar a diversidade genética e o poder de resolução de um painel de microssatélites para estudos de parentesco de *S. libidinosus*;

2.2 Desvendar padrões de diversidade e características táxon-específicos do gene *STAT2* em espécies das ordens Primates e Rodentia e se tais perfis estariam relacionados à diferentes desfechos na infecção por flavivírus, bem como se poderiam refletir um histórico de corrida armamentista evolutiva entre patógeno e hospedeiro.

3 CAPÍTULO III: MÉTODOS

Tendo em vista que os métodos para alcançar o Objetivo 2.2 serão descritos em detalhes no **Capítulo V (artigo científico)**, iremos nos limitar a descrever os métodos referentes ao Objetivo 2.1 a seguir.

3.1 Locais de estudo, coleta e estocagem de material

Foram coletadas pelo Dr. Tiago Falótico e equipe (USP) 111 amostras de fezes correspondentes a 43 indivíduos de duas áreas de ocorrência da espécie de *S. libidinosus*, PNSC e PET. As coletas foram realizadas entre os anos de 2015 e 2017. Foram coletadas 92 amostras de 33 indivíduos do PNSC, mais especificamente da população da PF; e 11 amostras, 10 indivíduos da população do PET. As amostras da PF e do PET estão todas identificadas a nível de indivíduo, já que essas populações já tem um acompanhamento dos pesquisadores. Para ambas as populações, sabe-se as idades dos indivíduos e as relações de maternidade entre os mesmos. Estima-se que o grupo da PF tenha em torno de 38 a 43 indivíduos, portanto nossa amostra representa pelo menos 75% do grupo. O grupo do PET é menor que o grupo da PF, e constitui-se de indivíduos introduzidos artificialmente no parque.

No campo, imediatamente após a coleta, as amostras foram estocadas em gelo para o transporte ao laboratório na USP e depois para o transporte ao LEHM, onde foram armazenadas em um freezer a -20°C .

3.2 Extração de DNA

As amostras que foram utilizadas para este trabalho foram extraídas com a utilização do kit de reagentes para extração de DNA de amostras de fezes (QiagenStool Kit® e Power Fecal Kit®) de acordo com protocolo do fabricante.

3.3 Amplificação dos loci de microssatélite e genotipagem

Dez loci de microssatélites foram utilizados para caracterizar a espécie *S. libidinosus* das populações do PET e do PNSC: Ceb03, Ceb08, Ceb09, Ceb11, Ceb115,

Ceb119, Ceb120, Ceb121, Ceb128 e Ceb130 (Tabela 1), previamente descritos para *C. capucinus* (Muniz & Vigilant, 2008). Foram selecionados aqueles microssatélites com maior número de alelos e/ou com maior valor de heterozigidade para utilizar na investigação com a espécie *S. libidinosus*. As amostras foram enviadas para a empresa prestadora de serviço Biotecnologia Pesquisa e Inovação – BPI, com sede na Av. Deputado Dante Delmanto, 1.649, Botucatu - SP para padronização dos STRs e obtenção dos dados de genotipagem para os indivíduos de *S. libidinosus*.

Os dados de amplificação por reações de cadeia de polimerase (PCRs) seguiram os protocolos descritos pelos autores seguidos de modificações que serão descritas a seguir. Para a preparação do mix para um volume total de 20 μ L por poço, foram utilizados: 1 μ L do Primer Fwd marcado (FAM ou VIC) na concentração de 10 μ M, 1 μ L do Primer Reverse na concentração de 10 μ M, 0,25 μ L do Primer Fwd frio na concentração de 10 μ M, 10 μ L do Master Mix Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, 5,75 μ L de H₂O DNase free, 2 μ L de DNA (30ng). As condições do PCR foram: desnaturação inicial a 98°C por 30s; 45 ciclos de 98 °C por 15s, Temperatura de Anelamento (TA; ver informação na Tabela 1 sobre a TA de cada marcador) por 30s e 72 °C por 30s; seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Tabela 1. STRs descritos para *C. capucinus* (Muniz & Vigilant, 2008) que foram utilizados neste trabalho.

Lócus	Sequências de primers (5'-3')	Motivo de repetição	N _A	TF	TA °C
Ceb03	F: TGGAAGTGTGGGTATCAGTGT R: TGTCATTGCTTTTAGGGGTTTC	[GATA] ₁₁	6	177–201	58
Ceb08	F: GCCTGGGTAACAAGAGCA R: TATTTGAAACGGTGGGTCAG	[TAGA] ₁₂	6	161–189	58
Ceb09	F: GGGCTTCTCAGCCTCCAC R: CAGGGTTCTCCAAAGAAAGAGA	[ATCT] ₁₀	8	153–189	60
Ceb11	F: GCTTTCTGACTTGGGCTGAC R: TGGTTTGGATGCCTCTGAC	[TCTA] ₁₁	7	223–251	59
Ceb115	F: CCTGGGCAACAGAGTGAG R: TACACACAGTATTGGGAGACCA	[ATCT] ₁₁	5	122–134	58
Ceb119	F: TGGGCAACAGAGCAAGAC R: ACTTGAGAGGTTGAAGCATGAG	[GATA] ₁₂	6	229–257	62
Ceb120	F: TTTGGGACTTGGACTGGTTC R: CCGGGTGTATTAGGGTCCTC	[CTAT] ₁₃	6	210–230	60
Ceb121	F: CCATTTAGGGGAGGAGAAGG R: TTGGTTGGTAGGCAGGTAGG	[CTAT] ₁₀	5	140–184	59
Ceb128	F: CAGCGAGGTTTCATCTCAAG R: TATTGCCAGGTCCAAAAGTG	[CTAT] ₁₀	5	190–206	60
Ceb130	F: CAAAGTCCACTCACTTAACCAC R: AGAAGACCCTGCCTCAAG	[ATCT] ₉	8	182–218	59

TF: Tamanho do Fragmento para *C. capucinus*. TA: Temperatura de anelamento dos primers.

3.4 Análise de dados

Os dados brutos de STRs (com extensão .fsa) foram fornecidos pela empresa prestadora de serviço. Os alelos foram inferidos com o programa Peak Scanner™ Software v2.0 (disponível em <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/sequencing/fragment-analysis/fragment-analysis-fundamentals/fragment-analysis-software-data-analysis.html?SID=fr-cesoftware-main>) e comparados no programa Osiris (Bonis et al., 2006). Os alelos foram testados para a presença de alelos nulos a partir do programa MicroChecker (Van Oosterhout et al., 2004). Testes de Equilíbrio de Hardy-Weiberg, desequilíbrio de ligação entre loci e AMOVA foram realizados no programa Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Probabilidade de identidade (PI_d) e PI_d entre irmãos (PI_dSIBS) foram calculados no software GENEALEX (Hunter et al., 2010). As análises descritivas de diversidade genética foram estimados no programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008). Análises de estrutura de população foram realizadas no STRUCTURE v. 2.3.4 (Falush et al., 2003, 2007; Hubisz et al., 2009; Pritchard et al., 2000).

4 CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 CAPÍTULO V: EVOLUTIONARY ANALYSIS OF THE ANTI-VIRAL *STAT2* GENE OF PRIMATES AND RODENTS: SIGNATURE OF DIFFERENT STAGES OF AN ARMS RACE

Luane Jandira Bueno Landau, Bibiana Sampaio de Oliveira Fam, Yuri Yépez, Gabriela Barreto Caldas-Garcia, Alcides Pissinatti, Tiago Falótico, Guillermo Reales, Lavínia Schüler-Faccini, Vinicius Albuquerque Sortica, Maria Cátira Bortolini, Evolutionary analysis of the anti-viral *STAT2* gene of primates and rodents: Signature of different stages of an arms race, *Infection, Genetics and Evolution*, Volume 95, 2021, 105030, ISSN 1567-1348, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105030> (disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134821003282>). Artigo publicado.



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Evolutionary analysis of the anti-viral *STAT2* gene of primates and rodents: Signature of different stages of an arms race

Luane Jandira Bueno Landau^a, Bibiana Sampaio de Oliveira Fam^a, Yuri Yépez^a, Gabriela Barreto Caldas-Garcia^a, Alcides Pissinatti^b, Tiago Falótico^c, Guillermo Reales^{a,d}, Lavínia Schüler-Faccini^d, Vinicius Albuquerque Sortica^a, Maria Cátira Bortolini^{a,*}

^a Laboratório de Evolução Humana e Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Rio de Janeiro's Primatology Center (RJPC – INEA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^d Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

STAT2
SH2 domain
Molecular evolution
Primates
Flavivirus infection
Rodentia
Arms race

ABSTRACT

STAT2 plays a strategic role in defending viral infection through the signaling cascade involving the immune system initiated after type I interferon release. Many flaviviruses target the inactivation or degradation of STAT2 as a strategy to impair this host's line of defense. Primates are natural reservoirs for a range of disease-causing flaviviruses (e.g., Zika, Dengue, and Yellow Fever virus), while rodents appear less susceptible. We analyzed the STAT2 coding sequence of 28 Rodentia species and 49 Primates species. Original data from 19 Platyrrhini species were sequenced for the SH2 domain of STAT2 and included in the analysis. STAT2 has many sites whose variation can be explained by positive selection, measured by two methods (PALM indicated 12, MEME 61). Both evolutionary tests significantly marked sites 127, 731, 739, 766, and 780. SH2 is under evolutionary constraint but presents episodic positive selection events within Rodentia: in one of them, a moderately radical change (serine > arginine) at position 638 is found in *Peromyscus* species, and can be implicated in the difference in susceptibility to flaviviruses within Rodentia. Some other positively selected sites are functional such as 5, 95, 203, 251, 782, and 829. Sites 251 and 287 regulate the signaling mediated by the JAK-STAT2 pathway, while 782 and 829 create a stable tertiary structure of STAT2, facilitating its connection with transcriptional co-activators. Only three positively selected sites, 5, 95, and 203, are recognized members who act on the interface between STAT2 and flaviviruses NS5 protein. We suggested that due to the higher evolutionary rate, rodents are, at this moment, taking some advantage in the battle against infections for some well-known *Flaviviridae*, in particular when compared to primates. Our results point to dynamics that fit with a molecular evolutionary scenario shaped by a thought-provoking virus-host arms race.

1. Introduction

1.1. The first line of defense against viral infection and the mammalian *STAT2* role

During the animals' evolutionary trajectory, efficient strategies to combat a large diversity of pathogens have evolved. For instance, upon virus infection, type I interferons (IFNs) are expressed in the vertebrate hosts, triggering a complex signaling molecular cascade that inhibits viral replication, containing the disease associated with it (Xu et al.,

2013; Jennings and Sang, 2019; Wang, B et al., 2020; Boudinot et al., 2021).

In mammals, in addition to IFNs such as IFN α , ω , β , δ , ϵ , ζ , κ , τ , ω , many other gene products are involved in the sophisticated activation of the host antiviral defense program, among which members of the signal transducer and activator of transcription (STAT) protein family (Jennings and Sang, 2019; Boudinot et al., 2021). Based on in silico, in vitro, and in vivo studies with humans and animal models, once released on extracellular space, type I IFNs bind to their membrane receptors (IFNAR), leading to the receptors' oligomerization. Posteriorly, Janus

* Corresponding author at: Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: maria.bortolini@ufrgs.br (M.C. Bortolini).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105030>

Received 28 April 2021; Received in revised form 24 July 2021; Accepted 6 August 2021

Available online 9 August 2021

1567-1348/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

6 CAPÍTULO VI: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho se propôs a fazer uma análise evolutiva de primatas, aportando dados novos de sequenciamento e genotipagem de espécies Platyrrhini, a partir de duas abordagens diferentes.

A primeira abordagem tratada neste trabalho diz respeito à análise de diversidade genética em populações de *S. libidinosus*. Tivemos sucesso em transferir 9 dos 10 STRs descritos anteriormente para *C. capucinus* (Muniz & Vigilant, 2008) para a espécie *S. libidinosus*. Foi possível descrever de forma preliminar alguns parâmetros de diversidade genética, ainda que estes serão futuramente atualizados. A partir dos dados de genotipagem apresentados aqui, obtivemos valores de $P_{(ID)}$ e $P_{(ID)SIBS}$ compatíveis com a utilização para análises de parentesco nas populações, que serão futuramente comparadas com os dados observacionais e demográficos da população do PNSC. Este estudo é um importante passo para a construção do conhecimento genético e evolutivo particularmente da população da Serra da Capivara, cuja característica mais marcante é a sua cultura de uso de ferramentas com herança horizontal e transgeracional.

Investigações evolutivas com pNH são relevantes por duas razões fundamentais: para contribuir com o entendimento da ecologia e evolução das espécies sob investigação a fim de elaborar planos de conservação, e também para compreender um pouco mais sobre a evolução humana e de outros hominíneos, que têm trajetórias evolutivas também caracterizadas pela presença de culturas potencialmente adaptativas. Nesse sentido, este trabalho contribui para ambas as razões descritas acima. Indivíduos *S. libidinosus* do Grupo da PF do PNSC usam ferramentas de uma forma notável, e nada ou pouco se sabe sobre o sucesso reprodutivo dos indivíduos mais observados pelos jovens aprendizes, por exemplo. Desvendar este cenário poderá também contribuir para o entendimento sobre o início do desenvolvimento da cultura dos hominíneos, seja da nossa espécie seja de espécies extintas que também faziam uso de ferramentas. Além disso, desvendar detalhes padrões de diversidade do grupo populacional da PF também poderá contribuir para o manejo e sua conservação, já que sua existência está ameaçada.

Também abordamos, em estudo já publicado, a relevante questão da guerra armamentista evolutiva entre patógeno e hospedeiro, e o quanto estudos dessa natureza

podem ajudar no entendimento de epidemias como foi o caso de surto de Zika no nordeste brasileiro e da corrente pandemia de Covid-19. Este trabalho também teve o intuito de contribuir para o esforço científico que tem sido feito internacionalmente para compreender grandes epidemias/pandemias virais e como preveni-las. Sendo assim, acreditamos que o aporte teórico do trabalho aqui apresentado possui relevância para a comunidade científica tendo em conta as razões sobresscritas.

Neste mesmo estudo, já publicado, foi levado em conta a coevolução entre flavivírus e seus hospedeiros mamíferos, considerando aqui roedores e primatas. Para isto, aportamos dados de sequenciamento originais de diversas espécies de pNM que foram usados em análises evolutivas detalhadas do gene *STAT2* e seu domínio SH2. Somamos a isso, uma análise de coevolução entre a respectiva proteína e a proteína NS5 de flavivírus. Encontramos resultados que julgamos importantes para o entendimento da guerra armamentista evolutiva entre a proteína de ambos primatas e roedores e as infecções de flavivírus, que provavelmente tiveram origem há centenas de milhares de anos (Meyerson & Sawyer, 2011). Parte dos resultados evolutivos apresentados para o gene *STAT2* provavelmente estão relacionados a essa guerra armamentista evolutiva. Roedores apresentaram maiores taxas evolutivas de *STAT2*, um maior número de sítios de interação com NS5 viral que estão coevoluindo e um maior número de sítios sob seleção positiva quando comparados aos primatas. A partir desses resultados, inferimos que roedores provavelmente apresentam vantagens evolutivas na batalha contra infecções por flavivírus quando comparados aos primatas, pelo menos considerando o conjunto de espécies investigadas. Outros resultados pontuais vão na mesma direção, como por exemplo uma Arginina na posição 638 presente somente em espécies do gênero *Peromyscus* que está sob seleção positiva episódica, poderia estar relacionada a uma resistência a infecções por um tipo específico de flavivírus passado por carrapatos. Além destes resultados, foram encontrados cinco sítios sob seleção positiva em roedores e primatas considerando dois métodos de investigação evolutiva. Ainda não há relatos na literatura sobre a funcionalidade destes sítios e estudos funcionais serão fundamentais para elucidar quais as consequências das mudanças nessas posições da proteína *STAT2*. Finalmente, é importante destacar que ainda é um desafio para os geneticistas extrapolar o quanto características genéticas táxon-específicas são fontes causais na determinação de fenótipos adaptativos táxon-específicos. No entanto, acreditamos que foi possível, com este trabalho, sugerir

uma parte do repertório genético em primatas e roedores que contribui para a variedade de desfechos por infecção de flavivírus em ambos clados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams Waldorf, K. M., Stencel-Baerenwald, J. E., Kapur, R. P., Studholme, C., Boldenow, E., Vornhagen, J., Baldessari, A., Dighe, M. K., Thiel, J., Merillat, S., Armistead, B., Tisoncik-Go, J., Green, R. R., Davis, M. A., Dewey, E. C., Fairgrieve, M. R., Gatenby, J. C., Richards, T., Garden, G. A., ... Rajagopal, L. (2016). Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. *Nature Medicine*, 22(11), 1256–1259. <https://doi.org/10.1038/nm.4193>
- Almeida, M. A. B. de, Santos, E. dos, Cardoso, J. da C., Fonseca, D. F. da, Noll, C. A., Silveira, V. R., Maeda, A. Y., Souza, R. P. de, Kanamura, C., & Brasil, R. A. (2012). Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008-2009. *American Journal of Primatology*, 74(1), 68–76. <https://doi.org/10.1002/ajp.21010>
- Arandjelovic, M., & Vigilant, L. (2018). Non-invasive genetic censusing and monitoring of primate populations. *American Journal of Primatology*, 80(3), e22743. <https://doi.org/10.1002/ajp.22743>
- Ashour, J., Morrison, J., Laurent-Rolle, M., Belicha-Villanueva, A., Plumlee, C. R., Bernal-Rubio, D., Williams, K. L., Harris, E., Fernandez-Sesma, A., Schindler, C., & García-Sastre, A. (2010). Mouse STAT2 Restricts Early Dengue Virus Replication. *Cell Host & Microbe*, 8(5), 410–421. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.10.007>
- Bernardo, L., Izquierdo, A., Prado, I., Rosario, D., Alvarez, M., Santana, E., Castro, J., Martínez, R., Rodríguez, R., Morier, L., Guillén, G., & Guzmán, M. G. (2008). Primary and Secondary Infections of *Macaca fascicularis* Monkeys with Asian and American Genotypes of Dengue Virus 2. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(3), 439–446. <https://doi.org/10.1128/CVI.00208-07>
- Bond, M., Tejedor, M. F., Campbell, K. E., Chornogubsky, L., Novo, N., & Goin, F. (2015). Eocene primates of South America and the African origins of New World monkeys. *Nature*, 520(7548), 538–541. <https://doi.org/10.1038/nature14120>
- Bonis, J., Furlong, L. I., & Sanz, F. (2006). OSIRIS: A tool for retrieving literature about sequence variants. *Bioinformatics*, 22(20), 2567–2569. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl421>
- Bouchard, C., Tessier, N., & Lapointe, F.-J. (2018). Paternity Analysis of Wood Turtles (*Glyptemys insculpta*) Reveals Complex Mating Patterns. *Journal of Heredity*, 109(4), 405–415. <https://doi.org/10.1093/jhered/esx103>
- Boyer, S., Calvez, E., Chouin-Carneiro, T., Diallo, D., & Failloux, A.-B. (2018). An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes and Infection*, 20(11–12), 646–660. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.006>
- Bruford, M. W., & Wayne, R. K. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics & Development*, 3(6), 939–943. [https://doi.org/10.1016/0959-437X\(93\)90017-J](https://doi.org/10.1016/0959-437X(93)90017-J)
- Cai, Y., Yu, H., Liu, H., Jiang, C., Sun, L., Niu, L., Liu, X., Li, D., & Li, J. (2020). Genome-wide screening of microsatellites in golden snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellana*), for the development of a standardized genetic marker

- system. *Scientific Reports*, 10(1), 10614. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67451-2>
- Cantele, C. (2020). Variabilidade genética, demografia, história populacional e comportamento em populações de *Sapajus libidinosus*. (Master Thesis). In: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/212078>
- Chua, C. L., Chan, Y. F., Andu, E. S. G. S., Rovie-Ryan, J. J., Sitam, F. T., Verasahib, K., & Sam, C. (2019). Little Evidence of Zika Virus Infection in Wild Long-Tailed Macaques, Peninsular Malaysia. *Emerging Infectious Diseases*, 25(2), 374–376. <https://doi.org/10.3201/eid2502.180258>
- Coelho, C. G., Falótico, T., Izar, P., Mannu, M., Resende, B. D., Siqueira, J. O., & Ottoni, E. B. (2015). Social learning strategies for nut-cracking by tufted capuchin monkeys (*Sapajus spp.*). *Animal Cognition*, 18(4), 911–919. <https://doi.org/10.1007/s10071-015-0861-5>
- Collevatti, R. G., Souza-Neto, A. C., Silva-Jr., N. J., & Telles, M. P. C. (2013). Kin structure and parallel dispersal in the black-and-gold howler monkey *Alouatta caraya* (Platyrrhini, Atelidae). *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 6018–6031. <https://doi.org/10.4238/2013.November.27.1>
- Davis, N. C. (1930). The transmission of yellow fever. *Journal of Experimental Medicine*, 51(5), 703–720. <https://doi.org/10.1084/jem.51.5.703>
- de Ruiter, J. R. (2004). Genetic Markers in Primate Studies: Elucidating Behavior and Its Evolution. *International Journal of Primatology*, 25(5), 1173–1189. <https://doi.org/10.1023/B:IJOP.0000043357.90280.61>
- de Thoisy, B., Dussart, P., & Kazanji, M. (2004). Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(7), 409–412. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2003.12.003>
- Di Fiore, A. (2003). Molecular genetic approaches to the study of primate behavior, social organization, and reproduction. *American Journal of Physical Anthropology*, 122(S37), 62–99. <https://doi.org/10.1002/ajpa.10382>
- Díaz-Muñoz, S. L. (2011). Paternity and relatedness in a polyandrous nonhuman primate: Testing adaptive hypotheses of male reproductive cooperation. *Animal Behaviour*, 82(3), 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.06.013>
- Dudley, D. M., Van Rompay, K. K., Coffey, L. L., Ardeshir, A., Keesler, R. I., Bliss-Moreau, E., Grigsby, P. L., Steinbach, R. J., Hirsch, A. J., MacAllister, R. P., Pecoraro, H. L., Colgin, L. M., Hodge, T., Streblow, D. N., Tardif, S., Patterson, J. L., Tamhankar, M., Seferovic, M., Aagaard, K. M., ... O'Connor, D. H. (2018). Miscarriage and stillbirth following maternal Zika virus infection in nonhuman primates. *Nature Medicine*, 24(8), 1104–1107. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0088-5>
- Duran, A., Meyer, A. L. S., & Pie, M. R. (2013). Climatic Niche Evolution in New World Monkeys (Platyrrhini). *PLoS ONE*, 8(12), e83684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083684>
- Ellis, L. (1995). Dominance and reproductive success among nonhuman animals: A cross-species comparison. *Ethology and Sociobiology*, 16(4), 257–333. [https://doi.org/10.1016/0162-3095\(95\)00050-U](https://doi.org/10.1016/0162-3095(95)00050-U)
- Engelhardt, A., Muniz, L., Perwitasari-Farajallah, D., & Widdig, A. (2017). Highly Polymorphic Microsatellite Markers for the Assessment of Male Reproductive

- Skew and Genetic Variation in Critically Endangered Crested Macaques (*Macaca nigra*). *International Journal of Primatology*, 38(4), 672–691. <https://doi.org/10.1007/s10764-017-9973-x>
- Escudero, P. C., Tucker, D. B., Avila, L. J., Sites, J. W., & Morando, M. (2017). Distribution of Genetic Diversity within a Population of *Liolaemus xanthoviridis* and an Assessment of its Mating System, as Inferred with Microsatellite Markers. *South American Journal of Herpetology*, 12(3), 183–192. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-16-00037.1>
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Falótico, T., Inaba, A., McGrew, W. C., & Ottoni, E. B. (2016). Vertical bipedal locomotion in wild bearded capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*). *Primates*, 57(4), 533–540. <https://doi.org/10.1007/s10329-016-0542-2>
- Falótico, T., Luncz, L. V., Svensson, M. S., & Haslam, M. (2016). Cashew Nut Positioning during Stone Tool Use by Wild Bearded Capuchin Monkeys (*Sapajus libidinosus*). *Folia Primatologica*, 87(6), 392–397. <https://doi.org/10.1159/000459621>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079535>
- Falótico, T., & Ottoni, E. B. (2014). Sexual bias in probe tool manufacture and use by wild bearded capuchin monkeys. *Behavioural Processes*, 108, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.09.036>
- Falótico, T., & Ottoni, E. B. (2016). The manifold use of pounding stone tools by wild capuchin monkeys of Serra da Capivara National Park, Brazil. *Behaviour*, 153(4), 421–442. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003357>
- Falótico, T., Proffitt, T., Ottoni, E. B., Staff, R. A., & Haslam, M. (2019). Three thousand years of wild capuchin stone tool use. *Nature Ecology & Evolution*, 3(7), 1034–1038. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0904-4>
- Falótico, T., Siqueira, J. O., & Ottoni, E. B. (2017). Digging up food: Excavation stone tool use by wild capuchin monkeys. *Scientific Reports*, 7(1), 6278. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06541-0>
- Falótico, T., Verderane, M. P., Mendonça-Furtado, O., Spagnoletti, N., Ottoni, E. B., Visalberghi, E., & Izar, P. (2018). Food or threat? Wild capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*) as both predators and prey of snakes. *Primates*, 59(1), 99–106. <https://doi.org/10.1007/s10329-017-0631-x>
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2003). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567–1587. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567>
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles: TECHNICAL ARTICLE. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 574–578. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- Fam, B. S. O., Reales, G., Vargas-Pinilla, P., Paré, P., Viscardi, L. H., Sortica, V. A., Felkl, A. B., O. Franco, Á., Lucion, A. B., Costa-Neto, C. M., Pissinatti, A., Salzano, F. M., Paixão-Côrtes, V. R., & Bortolini, M. C. (2019). AVPR1b variation and the

- emergence of adaptive phenotypes in Platyrrhini primates. *American Journal of Primatology*. <https://doi.org/10.1002/ajp.23028>
- Fernández-Stolz, G. P., Stolz, J. F. B., & de Freitas, T. R. O. (2007). Bottlenecks and Dispersal in the Tuco-Tuco Das Dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae), in Southern Brazil. *Journal of Mammalogy*, 88(4), 935–945. <https://doi.org/10.1644/06-MAMM-A-210R1.1>
- Finstermeier, K., Zinner, D., Brameier, M., Meyer, M., Kreuz, E., Hofreiter, M., & Roos, C. (2013). A Mitogenomic Phylogeny of Living Primates. *PLoS ONE*, 8(7), e69504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069504>
- Fragaszy, D. M., Barton, S. A., Keo, S., Patel, R., Izar, P., Visalberghi, E., & Haslam, M. (2020). Adult and juvenile bearded capuchin monkeys handle stone hammers differently during nut-cracking. *American Journal of Primatology*, 82(7). <https://doi.org/10.1002/ajp.23156>
- Gibbs, H. L. (2001). Insights into Population Ecology and Sexual Selection in Snakes Through the Application of DNA-Based Genetic Markers. *Journal of Heredity*, 92(2), 173–179. <https://doi.org/10.1093/jhered/92.2.173>
- Goodman, M. (1985). Rates of molecular evolution: The hominoid slowdown. *BioEssays*, 3(1), 9–14. <https://doi.org/10.1002/bies.950030104>
- Gouy, A., & Zieger, M. (2017). STRAF—A convenient online tool for STR data evaluation in forensic genetics. *Forensic Science International: Genetics*, 30, 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.007>
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., Schwarz, M. C., Sánchez-Seco, M. P., Evans, M. J., Best, S. M., & García-Sastre, A. (2016). Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host & Microbe*, 19(6), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.009>
- Green, M. L., Herzing, D. L., & Baldwin, J. D. (2015). Molecular Assessment of Mating Strategies in a Population of Atlantic Spotted Dolphins. *PLOS ONE*, 10(2), e0118227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118227>
- Greenwood, P. J. (1980). Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour*, 28(4), 1140–1162. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(80\)80103-5](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(80)80103-5)
- Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., Guzman, H., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2012). Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), e1477. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001477>
- Han, B. A., Majumdar, S., Calmon, F. P., Glicksberg, B. S., Horesh, R., Kumar, A., Perer, A., von Marschall, E. B., Wei, D., Mojsilović, A., & Varshney, K. R. (2019). Confronting data sparsity to identify potential sources of Zika virus spillover infection among primates. *Epidemics*, 27, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2019.01.005>
- Hanley, K. A., Monath, T. P., Weaver, S. C., Rossi, S. L., Richman, R. L., & Vasilakis, N. (2013). Fever versus fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 292–311. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.008>

- Haslam, M., & Falótico, T. (2015). Nasal probe and toothpick tool use by a wild female bearded capuchin (*Sapajus libidinosus*). *Primates*, 56(3), 211–214. <https://doi.org/10.1007/s10329-015-0470-6>
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1322–1332. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>
- Hunter, M. K., Broderick, D., Ovenden, J. R., Tucker, K. P., Bonde, R. K., Mcguire, P. M., & Lanyon, J. M. (2010). Characterization of highly informative cross-species microsatellite panels for the Australian dugong (*Dugong dugon*) and Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) including five novel primers. *Molecular Ecology Resources*, 10(2), 368–377. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02761.x>
- Izar, P., & Ferreira, R. G. (2006). Socioecologia de macacos-prego (*Cebus spp.*) selvagens e provisionados: Uma análise comparativa (Vol. 10). J.C. Bicca-Marques. https://www.researchgate.net/publication/282507139_Socioecologia_de_macacos-prego_Cebus_spp_selvagens_e_provisionados_uma_analise_comparativa
- Izar, P., Verderane, M. P., Peternelli-dos-Santos, L., Mendonça-Furtado, O., Presotto, A., Tokuda, M., Visalberghi, E., & Fragaszy, D. (2012). Flexible and conservative features of social systems in tufted capuchin monkeys: Comparing the socioecology of *Sapajus libidinosus* and *Sapajus nigritus*: Socioecology of Tufted Capuchin Monkeys. *American Journal of Primatology*, 74(4), 315–331. <https://doi.org/10.1002/ajp.20968>
- Jack, K. M., & Fedigan, L. M. (2006). Why Be Alpha Male? Dominance and Reproductive Success in Wild White-Faced Capuchins (*Cebus capucinus*). In A. Estrada, P. A. Garber, M. S. M. Pavelka, & L. Luecke (Orgs.), *New Perspectives in the Study of Mesoamerican Primates* (p. 367–386). Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/0-387-25872-8_18
- Kading, R. C., Borland, E. M., Cranfield, M., & Powers, A. M. (2013). Prevalence of antibodies to alphaviruses and flaviviruses in free-ranging game animals and nonhuman primates in the greater Congo Basin. *Journal of Wildlife Diseases*, 49(3), 587–599. <https://doi.org/10.7589/2012-08-212>
- Kappeler, P. M., & van Schaik, C. P. (Orgs.). (2004). *Sexual Selection in Primates: New and Comparative Perspectives* (1^o ed). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542459>
- Kay, R. F. (2015). Biogeography in deep time – What do phylogenetics, geology, and paleoclimate tell us about early platyrrhine evolution? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 358–374. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.12.002>
- Kay, R., Meldrum, D., & Takai, M. (2013). Pitheciidae and other platyrrhine seed predators. *Evolutionary biology and conservation of titis, sakis and uacaris*, (p. 3–12).
- King, F. A., Yarbrough, C. J., Anderson, D. C., Gordon, T. P., & Gould, K. G. (1988). Primates. *Science*, 240(4858), 1475–1482. <https://doi.org/10.1126/science.3287624>
- la Salles, A. Y. F. de, Carreiro, A. da N., Medeiros, G. X., Muniz, J. A. P. C., & Menezes, D. J. A. de. (2018). Aspectos biológicos e comportamentais de *Sapajus libidinosus*: Revisão. *Pubvet*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n1a8.1-13>

- Lankau, E. W., Turner, P. V., Mullan, R. J., & Galland, G. G. (2014). Use of Nonhuman Primates in Research in North America. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 53(3), 278–282.
- Lewis, R. J. (2018). Female Power in Primates and the Phenomenon of Female Dominance. *Annual Review of Anthropology*, 47(1), 533–551. <https://doi.org/10.1146/annurev-anthro-102317-045958>
- Lima, M. G. M., Buckner, J. C., Silva-Júnior, J. de S. e, Aleixo, A., Martins, A. B., Boubli, J. P., Link, A., Farias, I. P., da Silva, M. N., Röhe, F., Queiroz, H., Chiou, K. L., Di Fiore, A., Alfaro, M. E., & Lynch Alfaro, J. W. (2017). Capuchin monkey biogeography: Understanding *Sapajus* Pleistocene range expansion and the current sympatry between *Cebus* and *Sapajus*. *Journal of Biogeography*, 44(4), 810–820. <https://doi.org/10.1111/jbi.12945>
- Lima, M. G. M., Silva-Júnior, J. de S. e, Černý, D., Buckner, J. C., Aleixo, A., Chang, J., Zheng, J., Alfaro, M. E., Martins, A., Di Fiore, A., Boubli, J. P., & Lynch Alfaro, J. W. (2018). A phylogenomic perspective on the robust capuchin monkey (*Sapajus*) radiation: First evidence for extensive population admixture across South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 124, 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.02.023>
- Lopez-Ortiz, R., Garcia, B. R., Galloway, R. L., Sharp, T. M., Hemme, R. R., Elrod, M. G., & Hunsperger, E. A. (2016). Serological Evidence of Infection with Endemic Human Pathogens Among Free-Ranging Old World Monkeys in Puerto Rico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), 1095–1099. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0262>
- Luna, F. de O., Beaver, C. E., Nourisson, C., Bonde, R. K., Attademo, F. L. N., Miranda, A. V., Torres-Florez, J. P., de Sousa, G. P., Passavante, J. Z., & Hunter, M. E. (2021). Genetic Connectivity of the West Indian Manatee in the Southern Range and Limited Evidence of Hybridization With Amazonian Manatees. *Frontiers in Marine Science*, 7, 574455. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.574455>
- Lynch Alfaro, J. W., Boubli, J. P., Olson, L. E., Di Fiore, A., Wilson, B., Gutiérrez-Espeleta, G. A., Chiou, K. L., Schulte, M., Neitzel, S., Ross, V., Schwochow, D., Nguyen, M. T. T., Farias, I., Janson, C. H., & Alfaro, M. E. (2012). Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys: Biogeography of Neotropical capuchin monkeys. *Journal of Biogeography*, 39(2), 272–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02609.x>
- Lynch Alfaro, J. W., Cortés-Ortiz, L., Di Fiore, A., & Boubli, J. P. (2015). Special issue: Comparative biogeography of Neotropical primates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 518–529. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.09.027>
- Magnani, D. M., Rogers, T. F., Maness, N. J., Grubaugh, N. D., Beutler, N., Bailey, V. K., Gonzalez-Nieto, L., Gutman, M. J., Pedreño-Lopez, N., Kwal, J. M., Ricciardi, M. J., Myers, T. A., Julander, J. G., Bohm, R. P., Gilbert, M. H., Schiro, F., Aye, P. P., Blair, R. V., Martins, M. A., ... Watkins, D. I. (2018). Fetal demise and failed antibody therapy during Zika virus infection of pregnant macaques. *Nature Communications*, 9(1), 1624. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04056-4>
- Mannu, M., & 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. *American Journal of Primatology*, 71(3), 242–251. <https://doi.org/10.1002/ajp.20642>

- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B., & Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7(5), 639–655. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x>
- Martins-Junior, A. M. G., Carneiro, J., Sampaio, I., Ferrari, S. F., & Schneider, H. (2018). Phylogenetic relationships among Capuchin (Cebidae, Platyrrhini) lineages: An old event of sympatry explains the current distribution of *Cebus* and *Sapajus*. *Genetics and Molecular Biology*, 41(3), 699–712. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0012>
- McGrew, W. C., Falótico, T., Gumert, M. D., & Ottoni, E. B. (2019). A Simian View of the Oldowan: Reconstructing the Evolutionary Origins of Human Technology. In W. C. McGrew, T. Falótico, M. D. Gumert, & E. B. Ottoni, *Squeezing Minds From Stones* (p. 13–41). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780190854614.003.0002>
- Melchionna, M., Mondanaro, A., Serio, C., Castiglione, S., Di Febbraro, M., Rook, L., Diniz-Filho, J. A. F., Manzi, G., Profico, A., Sansalone, G., & Raia, P. (2019). Macroevolutionary trends of brain mass in Primates. *Biological Journal of the Linnean Society*, blz161. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blz161>
- Mendonça-Furtado, O., Edaes, M., Palme, R., Rodrigues, A., Siqueira, J., & Izar, P. (2014). Does hierarchy stability influence testosterone and cortisol levels of bearded capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*) adult males? A comparison between two wild groups. *Behavioural Processes*, 109, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.09.010>
- Meyerson, N. R., & Sawyer, S. L. (2011). Two-stepping through time: Mammals and viruses. *Trends in Microbiology*, 19(6), 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.03.006>
- Minkner, M. M. I., Young, C., Amici, F., McFarland, R., Barrett, L., Grobler, J. P., Henzi, S. P., & Widdig, A. (2018). Assessment of Male Reproductive Skew via Highly Polymorphic STR Markers in Wild Vervet Monkeys, *Chlorocebus pygerythrus*. *Journal of Heredity*. <https://doi.org/10.1093/jhered/esy048>
- Mokkonen, M., Koskela, E., Procyshyn, T., & Crespi, B. (2018). Socio-reproductive Conflicts and the Father's Curse Dilemma*. *The American Naturalist*. <https://doi.org/10.1086/698216>
- 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*, 113(38), 10607–10612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600374113>
- Moura, A. C. D. Andrade. (2005). Capuchin monkey and the Caatinga dry forest: A hard life in a harsh habitat (Doctoral thesis). <https://doi.org/10.17863/CAM.13970>
- Muniz, L., Perry, S., Manson, J. H., Gilkenson, H., Gros-Louis, J., & Vigilant, L. (2010). Male dominance and reproductive success in wild white-faced capuchins (*Cebus capucinus*) at Lomas Barbudal, Costa Rica. *American Journal of Primatology*, 72(12), 1118–1130. <https://doi.org/10.1002/ajp.20876>
- Muniz, L., & Vigilant, L. (2008). Isolation and characterization of microsatellite markers in the white-faced capuchin monkey (*Cebus capucinus*) and cross-species amplification in other New World monkeys. *Molecular Ecology Resources*, 8(2), 402–405. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01971.x>

- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Nordborg, M., & Tavaré, S. (2002). Linkage disequilibrium: What history has to tell us. *Trends in Genetics*, 18(2), 83–90. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02557-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02557-X)
- Ojeda, G. N., Amavet, P. S., Rueda, E. C., Siroski, P. A., & Larriera, A. (2016). Mating System of *Caiman yacare* (Reptilia: Alligatoridae) Described from Microsatellite Genotypes. *Journal of Heredity*, esw080. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw080>
- Olmos, F. (1992). Serra Da Capivara National Park and the conservation of north-eastern Brazil's caatinga. *Oryx*, 26(3), 142–146. <https://doi.org/10.1017/S0030605300023565>
- Osterrieth, P. M., & Deleplanque-Liegeois, P. (1961). Présence d'anticorps vis-à-vis des virus transmis par arthropodes chez le chimpanzé (*Pan troglodites*). Comparaison de leur état immunitaire a celui de l'homme. *I*, 63–72.
- Otoni, E. B., & Izar, P. (2008). Capuchin monkey tool use: Overview and implications. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 17(4), 171–178. <https://doi.org/10.1002/evan.20185>
- Otoni, E. B., & Mannu, M. (2001). Semifree-ranging Tufted Capuchins (*Cebus apella*) Spontaneously Use Tools to Crack Open Nuts. *International Journal of Primatology*, 22(3), 347–358. <https://doi.org/10.1023/A:1010747426841>
- Parreiras-e-Silva, L. T., Vargas-Pinilla, P., Duarte, D. A., Longo, D., Espinoza Pardo, G. V., Dolor Finkler, A., Paixão-Côrtes, V. R., Paré, P., Rovaris, D. L., Oliveira, E. B., Caceres, R. A., Gonçalves, G. L., Bouvier, M., Salzano, F. M., Lucion, A. B., Costa-Neto, C. M., & Bortolini, M. C. (2017). Functional New World monkey oxytocin forms elicit an altered signaling profile and promotes parental care in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(34), 9044–9049. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711687114>
- Perelman, P., Johnson, W. E., Roos, C., Seuánez, H. N., Horvath, J. E., Moreira, M. A. M., Kessing, B., Pontius, J., Roelke, M., Rumpler, Y., Schneider, M. P. C., Silva, A., O'Brien, S. J., & Pecon-Slattery, J. (2011). A Molecular Phylogeny of Living Primates. *PLoS Genetics*, 7(3), e1001342. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001342>
- 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(6), e68029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068029>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2), 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Queller, D. C., Strassmann, J. E., & Hughes, C. R. (1993). Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(8), 285–288. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90256-O](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90256-O)
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86(3), 248–249. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573>
- Reales, G., Paixão-Côrtes, V. R., Cybis, G. B., Gonçalves, G. L., Pissinatti, A., Salzano, F. M., & Bortolini, M. C. (2018). Serotonin, behavior, and natural selection in New

- World monkeys. *Journal of Evolutionary Biology*, 31(8), 1180–1192. <https://doi.org/10.1111/jeb.13295>
- Rosenberger, A. L. (1983). Tale of tails: Parallelism and prehensility. *American Journal of Physical Anthropology*, 60(1), 103–107. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330600114>
- Ross, C. (1991). Life history patterns of new world monkeys. *International Journal of Primatology*, 12(5), 481–502. <https://doi.org/10.1007/BF02547635>
- Rousset, F. (2008). genepop'007: A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
- Sacchetto, L., Silva, N. I. O., Rezende, I. M. de, Arruda, M. S., Costa, T. A., de Mello, É. M., Oliveira, G. F. G., Alves, P. A., de Mendonça, V. E., Stumpp, R. G. A. V., Prado, A. I. A., Paglia, A. P., Perini, F. A., Lacerda Nogueira, M., Kroon, E. G., de Thoisy, B., Trindade, G. de S., & Drumond, B. P. (2020). Neighbor danger: Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017-2018 yellow fever outbreaks in Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(10), e0008658. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658>
- Sargeant, E. J., Wikberg, E. C., Kawamura, S., Jack, K. M., & Fedigan, L. M. (2016). Paternal kin recognition and infant care in white-faced capuchins (*Cebus capucinus*): Paternal Kin Recognition and Infant Care in *Cebus capucinus*. *American Journal of Primatology*, 78(6), 659–668. <https://doi.org/10.1002/ajp.22530>
- Schneider, H., Bernardi, J. A. R., Da Cunha, D. B., Tagliaro, C. H., Vallinoto, M., Ferrari, S. F., & Sampaio, I. (2012). A molecular analysis of the evolutionary relationships in the Callitrichinae, with emphasis on the position of the dwarf marmoset: Evolutionary relationships in Callitrichinae. *Zoologica Scripta*, 41(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2011.00502.x>
- Schneider, H., & Sampaio, I. (2015). The systematics and evolution of New World primates – A review. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.017>
- Schrago, C. G., Menezes, A. N., Furtado, C., Bonvicino, C. R., & Seuanez, H. N. (2014). Multispecies Coalescent Analysis of the Early Diversification of Neotropical Primates: Phylogenetic Inference under Strong Gene Trees/Species Tree Conflict. *Genome Biology and Evolution*, 6(11), 3105–3114. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu244>
- Seferovic, M., Sánchez-San Martín, C., Tardif, S. D., Rutherford, J., Castro, E. C. C., Li, T., Hodara, V. L., Parodi, L. M., Giavedoni, L., Layne-Colon, D., Tamhankar, M., Yagi, S., Martyn, C., Reyes, K., Suter, M. A., Aagaard, K. M., Chiu, C. Y., & Patterson, J. L. (2018). Experimental Zika Virus Infection in the Pregnant Common Marmoset Induces Spontaneous Fetal Loss and Neurodevelopmental Abnormalities. *Scientific Reports*, 8(1), 6851. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25205-1>
- Sehner, S., Fichtel, C., & Kappeler, P. M. (2018). Primate tails: Ancestral state reconstruction and determinants of interspecific variation in primate tail length. *American Journal of Physical Anthropology*, 167(4), 750–759. <https://doi.org/10.1002/ajpa.23703>
- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615–629. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>

- Silva, N. I. O., Sacchetto, L., de Rezende, I. M., Trindade, G. de S., LaBeaud, A. D., de Thoisy, B., & Drumond, B. P. (2020). Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. *Virology Journal*, *17*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7>
- Silvestro, D., Tejedor, M. F., Serrano-Serrano, M. L., Loiseau, O., Rossier, V., Rolland, J., Zizka, A., Höhna, S., Antonelli, A., & Salamin, N. (2019). Early Arrival and Climatically-Linked Geographic Expansion of New World Monkeys from Tiny African Ancestors. *Systematic Biology*, *68*(1), 78–92. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy046>
- Slavov, S. N., Otaguiri, K. K., Kashima, S., & Covas, D. T. (2016). Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *49*. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165420>
- Springer, M. S., Meredith, R. W., Gatesy, J., Emerling, C. A., Park, J., Rabosky, D. L., Stadler, T., Steiner, C., Ryder, O. A., Janečka, J. E., Fisher, C. A., & Murphy, W. J. (2012). Macroevolutionary Dynamics and Historical Biogeography of Primate Diversification Inferred from a Species Supermatrix. *PLoS ONE*, *7*(11), e49521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049521>
- Strier, K. B., Chaves, P. B., Mendes, S. L., Fagundes, V., & Di Fiore, A. (2011). Low paternity skew and the influence of maternal kin in an egalitarian, patrilocal primate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(47), 18915–18919. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116737108>
- Tao, K., Tzou, P. L., Nouhin, J., Gupta, R. K., de Oliveira, T., Kosakovsky Pond, S. L., Fera, D., & Shafer, R. W. (2021). The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00408-x>
- Tokuda, M., Martins, M. M., & Izar, P. (2014). Transferability of microsatellites for studies on the social behavior of the tufted capuchin monkey (genus *Sapajus*). *Genetics and Molecular Research*, *13*(4), 9910–9914. <https://doi.org/10.4238/2014.November.27.19>
- Tokuda, M., Martins, M. M., & Izar, P. (2018). Socio-genetic correlates of unbiased sex dispersal in a population of black capuchin monkeys (*Sapajus nigritus*). *Acta Ethologica*, *21*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10211-017-0277-0>
- Turchetto, C., Segatto, A. L. A., Beduschi, J., Bonatto, S. L., & Freitas, L. B. (2015). Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB Plants*, *7*, plv084. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv084>
- Valentine, M. J., Murdock, C. C., & Kelly, P. J. (2019). Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. *Parasites & Vectors*, *12*(1), 463. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3732-0>
- Van Belle, S., Estrada, A., Strier, K. B., & Di Fiore, A. (2012). Genetic Structure and Kinship Patterns in a Population of Black Howler Monkeys, *Alouatta pigra*, at Palenque National Park, Mexico: Genetic Population Structure of Black Howlers. *American Journal of Primatology*, *74*(10), 948–957. <https://doi.org/10.1002/ajp.22047>
- Van Oosten, A. R., Matthysen, E., & Heylen, D. J. A. (2016). Mating strategies and multiple paternity, assessed by microsatellites, of the dispersal-limited, ectoparasitic tree-hole tick, *Ixodes arboricola*. *International Journal for Parasitology*, *46*(9), 593–602. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.004>

- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- 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. (2017). Progesterone Response Element Variation in the OXTR Promoter Region and Paternal Care in New World Monkeys. *Behavior Genetics*, 47(1), 77–87. <https://doi.org/10.1007/s10519-016-9806-2>
- Vargas-Pinilla, P., Paixão-Côrtes, V. R., Paré, P., Tovo-Rodrigues, L., Vieira, C. M. de A. G., Xavier, A., Comas, D., Pissinatti, A., Sinigaglia, M., Rigo, M. M., Vieira, G. F., Lucion, A. B., Salzano, F. M., & 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*, 112(1), 88–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419399112>
- Villordo, S. M., Carballeda, J. M., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2016). RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation. *Trends in Microbiology*, 24(4), 270–283. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.002>
- Waits, L. P., Luikart, G., & Taberlet, P. (2001). Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: Cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10(1), 249–256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01185.x>
- Wang, B., Thurmond, S., Zhou, K., Sánchez-Aparicio, M. T., Fang, J., Lu, J., Gao, L., Ren, W., Cui, Y., Veit, E. C., Hong, H., Evans, M. J., O’Leary, S. E., García-Sastre, A., Zhou, Z. H., Hai, R., & Song, J. (2020). Structural basis for STAT2 suppression by flavivirus NS5. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(10), 875–885. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0472-y>
- Wastika, C. E., Sasaki, M., Yoshii, K., Anindita, P. D., Hang’ombe, B. M., Mweene, A. S., Kobayashi, S., Kariwa, H., Carr, M. J., Hall, W. W., Eshita, Y., Orba, Y., & Sawa, H. (2019). Serological evidence of Zika virus infection in non-human primates in Zambia. *Archives of Virology*, 164(8), 2165–2170. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04302-0>
- Webster, M. S., & Reichart, L. (2005). Use of Microsatellites for Parentage and Kinship Analyses in Animals. In *Methods in Enzymology* (Vol. 395, p. 222–238). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95014-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95014-3)
- Westergaard, G., & Fragaszy, D. (1987). Self-treatment of wounds by a capuchin monkey (*Cebus apella*). *Human Evolution*, 2(6), 557–562. <https://doi.org/10.1007/BF02437429>
- Williams, D. T., MacKenzie, J. S., & Bingham, J. (2019). Flaviviruses. In J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, & J. Zhang (Eds.), *Diseases of Swine* (1^o ed, p. 530–543). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch33>
- Wimmer, B., & Kappeler, P. M. (2002). The effects of sexual selection and life history on the genetic structure of redfronted lemur, *Eulemur fulvus rufus*, groups. *Animal Behaviour*, 64(4), 557–568. <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.4003>