Guilherme Garcia

Análise comparativa dos padrões de
covariação genética e fenotípica no
crânio e mandíbula de *Calomys expulsus*
(Rodentia:Muroidea)

Comparative analysis of phenotypic and genetic
covariances in the skull and mandible of the vesper mouse,
Calomys expulsus (Rodentia:Muroidea)

Gabriel Marroig

Orientador

São Paulo

2010

Guilherme Garcia

Análise comparativa dos padrões de
covariação genética e fenotípica no
crânio e mandíbula de *Calomys expulsus*
(Rodentia:Muroidea)

Dissertação apresentada ao Instituto de Bio-
ciências da Universidade de São Paulo, para
a obtenção de Título de Mestre em Ciências,
na Área de Genética e Biologia Evolutiva.

Orientador: Gabriel Marroig

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Garcia, Guilherme

Análise comparativa dos padrões de covariação genética e fenotípica no crânio e mandíbula de *Calomys expulsus* (Rodentia:Muroidea).

95 páginas.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Genética Quantitativa;
2. Morfologia Craniana;
3. Roedores.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr. Gabriel Marroig

*Dedico esta obra aos meus pais,
Eduardo e Teresa.*

When the ebbing tide retreats
Along the rocky shoreline,
It leaves a trail of tidal pools
In a short-lived galaxy.
Each microcosmic planet
A complete society.

A simple kind mirror
To reflect upon our own.
All the busy little creatures
Chasing out their destinies.
Living in their pools,
They soon forget about the sea...

Wheels within wheels in a spiral array,
A pattern so grand and complex,
Time after time we lose sight of the way,
Our causes can't see their effects.

Rush, Natural Science

Agradecimentos

"If I have seen further, it is by standing in the shoulder of giants."

Isaac Newton

Tenho muita gente a agradecer. Não fossem estas pessoas, não haveria maneiras deste trabalho estar aqui.

Primeiro de tudo, tenho de agradecer ao gigante Gabriel Marroig, por me orientar de forma a equilibrar os tempos de liberdade e de disciplina e por ser um modelo de cientista e profissional a ser seguido. Há três anos atrás, tinha um orientador; hoje em dia, tenho também um amigo.

Também agradeço aos meus colegas do LEM, por propiciarem um dos melhores ambientes de trabalho dos quais eu pude participar e por sempre estarem dispostos a dizer o que eu tenho de ouvir e ouvir o que eu tenho a dizer. Me sinto seguro em dizer novamente que há três anos eu tinha colegas, mas agora tenho também amigos. Então, milhões de agradecimentos a Paulinha, Roberta, Dani, Tafinha, Harley, Arthur, Ogro, Fino e Leila. E também às últimas "aquisições", Alex e Aninha.

Claro, tenho de lembrar do outro melhor ambiente de trabalho do qual eu pude participar e agradecer pelos anos iniciais de formação. Agradeço à Erika, por ter tido toda a paciência necessária para me orientar durante a minha iniciação. E também agradeço ao Fábio (Lugar) e ao Thiago (Wally), que além de sempre terem sido bons amigos, foram colegas de laboratório fantásticos durante aqueles dois anos no MZ.

Devo também agradecer aos amigos de longa data, por suas contribuições pitorescas a todo o processo. Santiago, Xanolas, Carimbo, Sandra, Dayan, Quel, Aríete, Júnior, Kate, Naga, Caio... Por todos os cafés, cigarros, desgraças e delícias dos últimos três anos.

Por fim, devo agradecer à minha família, por basicamente tudo. Sem eles, Teresa, Eduardo e Gustavo, seria realmente impossível chegar até aqui. E claro, tenho de agradecer à Larissa, não só por ter lido este trabalho à exaustão, mas por ser, nos últimos 20 meses, o meu futuro.

E claro, agradeço à FAPESP, por ter concedido minha bolsa.

Resumo

Os padrões de covariância genética entre caracteres, expressos pela matriz de covariância aditiva G , desempenham um papel importante na evolução de morfologias complexas, visto que esta matriz influencia a direção e magnitude da resposta à seleção em uma população. Assumindo-se a estabilidade da matriz G ao longo do tempo, pode-se testar explicitamente hipóteses acerca da influência de processos evolutivos sobre a diversificação. Espera-se que esta matriz influencie os padrões expressos por sua equivalente fenotípica P , devido a contingências funcionais e ontogenéticas na relação entre genótipo e fenótipo, que levam à estruturação de modularidade nesta relação, de modo a otimizar a evolvabilidade. No presente trabalho, investiguei a estrutura da covariância genética no crânio e mandíbula de uma população do roedor sigmodontíneo *Calomys expulsus*, com o objetivo de estimar a similaridade entre covariâncias fenotípicas e genéticas; também avaliei a influência de padrões de modularidade sobre ambos os níveis de organização da variação morfológica. As matrizes P e G que obtive para o crânio e para a mandíbula se mostraram bastante similares no que diz respeito à sua estrutura de covariação e se relacionam parcialmente às hipótese de modularidade estabelecidas. Os resultados que obtive aqui são bastante similares àqueles obtidos para os mamíferos como um todo, portanto suportando a hipótese de estabilidade no padrão de covariâncias genéticas e fenotípicas na evolução do grupo.

Palavras-chave: genética quantitativa, morfologia craniana, Sigmodontinae

Abstract

Patterns of genetic covariance between characters (represented by the additive covariance matrix G) play an important role in the evolution of morphological complexes, since they influence the direction and norm of the response to selection in a population. Therefore, the assumption that G -matrices are stable through evolutionary timescales allows evolutionary biologists to infer the influence of evolutionary processes that operate over biological diversification. These matrices are also expected to influence the patterns expressed in their phenotypic counterparts (P -matrix), because of the imposition of multiple developmental and functional contingencies over the genotype/phenotype map, that leads to its modular organization in order to increase evolvability. Here, I have investigated patterns of genetic covariance structure in the skull and mandible of a population of the vesper mouse *Calomys expulsus* in order to estimate the level of similarity between additive and phenotypic covariances; I have also evaluated the influence of expected patterns of modularity over both levels of morphological variation. For either skull and mandible, I have obtained P - and G -matrices that are strongly similar in their structure; these matrices also support the modularity hypotheses for developmental and functional constraints, akin to the overall results obtained for mammals, thus supporting the hypothesis of stability in genetic and phenotypic covariance structure in mammalian evolution.

Keywords: quantitative genetics, cranial morphology, Sigmodontinae

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Análises comparativas de padrões de covariância	6
1.2	Modularidade	7
1.3	Objetivos	10
2	Metodologias para a análise de padrões de covariação genética e fenotípica	12
2.1	Estimativas de variâncias e covariâncias genéticas	12
2.2	Comparação de padrões de covariância	17
2.3	Análise de modularidade	22
3	Genética quantitativa de caracteres cranianos em <i>Calomys expulsus</i>	25
3.1	Introdução	25
3.2	Materiais e Métodos	27
3.3	Resultados	34
3.4	Discussão	44
4	Genética quantitativa de caracteres mandibulares em <i>Calomys expulsus</i>	51
4.1	Introdução	51
4.2	Materiais e Métodos	53
4.3	Resultados	58
4.4	Discussão	67
5	Considerações Finais	73
	Referências Bibliográficas	77
A	Rotinas	86
A.1	Genética quantitativa	87
A.2	Comparação de matrizes	90
A.3	Análise de modularidade	95

Lista de Figuras

1.1	Representação de uma matriz de covariância fenotípica.	4
1.2	Resposta à seleção em duas populações.	5
1.3	Relação modular entre genótipo, fenótipo e funcionalidade.	9
3.1	Marcos geométricos sobre o crânio.	29
3.2	Representação das matrizes P e G cranianas.	37
3.3	Distribuição de herdabilidades dos caracteres cranianos.	38
3.4	Distribuição dos autovalores das matrizes P e G cranianas.	42
3.5	Comparação entre P e G cranianas através do método RSD.	45
3.6	Relação entre escores RSD e h^2 para os caracteres do crânio.	46
3.7	Distribuição de valores simulados de r^2 para as matrizes cranianas. . . .	48
4.1	Marcos geométricos sobre a mandíbula.	54
4.2	Representação das matrizes P e G mandibulares.	61
4.3	Distribuição de herdabilidades dos caracteres mandibulares.	63
4.4	Distribuição dos autovalores das matrizes P e G mandibulares.	65
4.5	Comparação entre P e G mandibulares através do método RSD.	68
4.6	Relação entre escores RSD e h^2 para os caracteres da mandíbula.	69
4.7	Distribuição de valores simulados de r^2 para as matrizes mandibulares. .	70

Lista de Tabelas

3.1	Descrição dos marcos geométricos tomados sobre o crânio.	30
3.2	Distâncias euclidianas tomadas sobre o crânio.	31
3.3	Repetibilidade dos caracteres cranianos.	34
3.4	Comparação entre matrizes P cranianas para diferentes faixas etárias. . .	36
3.5	Comparação entre matrizes P cranianas para machos e fêmeas.	38
3.6	Estimativas de herdabilidade para os caracteres cranianos.	40
3.7	Autovetores da matriz G craniana.	41
3.8	Comparação entre as matrizes P e G cranianas.	43
3.9	Hipóteses de modularidade sobre as matrizes cranianas P e G	47
4.1	Descrição dos marcos geométricos tomados sobre a mandíbula.	55
4.2	Distâncias euclidianas tomadas sobre a mandíbula.	56
4.3	Repetibilidade dos caracteres mandibulares.	59
4.4	Comparação entre matrizes P mandibulares para diferentes faixas etárias. .	60
4.5	Comparação entre matrizes P mandibulares para machos e fêmeas. . . .	62
4.6	Estimativas de herdabilidade para os caracteres mandibulares.	64
4.7	Autovetores da matriz G mandibular.	66
4.8	Comparação entre as matrizes P e G mandibulares.	66
4.9	Hipóteses de modularidade sobre as matrizes mandibulares P e G	71
5.1	Sumário dos resultados obtidos nos Capítulos 3 e 4.	74

Capítulo 1

Introdução

A variação morfológica em uma população resulta de um processo que envolve a interação entre desenvolvimento, desempenho funcional, condições ambientais e história evolutiva, dentre outros fatores (Olson & Miller, 1958; Cheverud, 1984; Arnold, 1992; Polly, 2008). Tais fatores também estão associados à expressão e regulação de redes gênicas complexas (Bolker, 2000; Wagner *et al.*, 2007; Klingenberg, 2008). O efeito destas redes sobre o fenótipo é determinado pela composição e associação do efeito de inúmeros *loci* e as frequências dos diferentes alelos contidos em cada *locus* em questão (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998).

Ao se tratar de apenas um caráter fenotípico quantitativo, pode-se considerar que parte da sua variação fenotípica deve-se aos alelos cuja contribuição é diretamente adicionada ao fenótipo; portanto, define-se esta como sendo a variância aditiva do caráter (Falconer & Mackay, 1996). Ainda podemos definir variâncias genéticas não-aditivas, advindas da interação entre diferentes alelos dentro de um mesmo *locus* (variância de dominância), ou dentre alelos em *loci* diferentes (variância epistática). Além disso, qualquer caráter em uma população está sujeito à flutuações aleatórias de diferentes origens, representadas por um componente residual ou ambiental em sua variação. Assim, um modelo simples de partição da variância fenotípica (σ_P^2) pode ser explicitado da seguinte forma (Falconer & Mackay, 1996):

$$\sigma_P^2 = \sigma_A^2 + \sigma_E^2 \quad (1.1)$$

de maneira que o componente aditivo da variância (σ_A^2) destaca-se dos demais componentes (σ_E^2), por ser responsável pela semelhança entre progenitores e progênie, sendo portanto de especial interesse em processos microevolutivos. A porção da variância fenotípica herdável, definida como herdabilidade ($h^2 = \sigma_A^2 / \sigma_P^2$), desempenha um papel na resposta à seleção direcional entre duas gerações subsequentes (Falconer & Mackay, 1996), pois h^2 é a constante de proporcionalidade entre a diferença na média do caráter antes e depois de um evento de seleção e a diferença média na geração seguinte desta população devido a este evento.

Quando dois ou mais caracteres são considerados, a covariância genética aditiva entre eles também deve ser levada em conta. Esta covariância advém da pleiotropia, que ocorre quando genes interferem conjuntamente sobre a variação fenotípica de múltiplos caracteres, ou do desequilíbrio de ligação, relacionado aos desvios das proporções associadas à segregação independente entre diferentes *loci* (Lande, 1980; Cheverud, 1996a). De forma similar ao caso univariado, a variação em um fenótipo multivariado dentro de uma população é representada pela matriz de variância e covariância fenotípica P e pode ser decomposta da seguinte maneira (Lynch & Walsh, 1998):

$$P = G + E \quad (1.2)$$

onde a matriz G representa a porção aditiva da covariância genética e a matriz E representa toda a covariância além da aditiva, englobando efeitos de dominância, epistasia e flutuações aleatórias que geram covariância entre caracteres.

Matrizes de covariância são particularmente úteis neste contexto, pois elas representam as variâncias e covariâncias entre todos os caracteres que compõem o fenótipo considerado em uma única entidade matemática. É possível representar uma matriz de covariância na forma

$$\begin{bmatrix} \sigma_1^2 & cov_{1,2} & cov_{1,3} & \dots \\ cov_{2,1} & \sigma_2^2 & cov_{2,3} & \dots \\ cov_{3,1} & cov_{3,2} & \sigma_3^2 & \dots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \end{bmatrix}$$

onde as variâncias dos caracteres se encontram na diagonal e suas covariâncias estão nas caselas fora da diagonal. Portanto, matrizes de covariância são quadradas, simétricas e de dimensão igual ao número de caracteres considerados. Elas também podem ser entendidas graficamente (Figura 1.1) na forma de uma hiperelipse de confiança ao redor da dispersão entre os caracteres considerados, da mesma forma que variâncias podem ser entendidas como uma medida de dispersão no contexto univariado. Também pode-se representar a associação entre caracteres na forma de matrizes de correlação, sendo que correlações são simplesmente covariâncias independentes da escala dos caracteres.

Os padrões expressos por matrizes *G* refletem portanto a covariância entre efeitos aditivos de diferentes *loci* sobre os caracteres quantitativos em questão. Dessa forma, espera-se a correspondência entre estas matrizes e os resultados de análises baseadas em marcadores moleculares para a detecção de QTLs (*quantitative trait loci* ou *loci* de caracteres quantitativos), visto que há uma associação conceitual e também estatística entre as duas abordagens (Lynch & Walsh, 1998; Kelly, 2009). Por exemplo, Klingenberg & Leamy (2001), analisando padrões de covariância na forma mandibular em uma população de *Mus musculus*, encontraram correspondência entre os padrões expressos pelas direções de máxima variância em *G* e o efeito de QTLs identificados por Klingenberg *et al.* (2001) para a forma mandibular na mesma colônia. Desta maneira, os autores constataram empiricamente a associação entre padrões de covariância genética e o efeito aditivo de *loci* quantitativos.

Figura 1.1: Representação gráfica de uma matriz de covariância fenotípica A entre dois caracteres x e y em uma população, como uma elipse de confiança ao redor da média bivariada. As linhas indicadas por PC1 e PC2 representam os dois componentes principais da matriz, suas direções ortogonais de máxima variação.

A matriz de covariância G é particularmente importante no contexto da biologia evolutiva (Lande, 1979; Cheverud, 1988; Arnold *et al.*, 2008), pois dada uma população sofrendo seleção direcional sobre um fenótipo composto por múltiplos caracteres, a equação

$$\Delta z = G\beta \quad (1.3)$$

descreve o vetor de respostas do fenótipo à seleção em duas gerações subsequentes (Δz) como função dos efeitos aditivos afetando este fenótipo (G) e da direção de maior inclinação (gradiente) na paisagem adaptativa atuando sobre a população (β ; Lande, 1979). Em um contexto multivariado, a direção dos vetores envolvidos é tão importante quanto sua magnitude, de forma que G define tanto a proporção quanto a direção da resposta à seleção em relação ao gradiente aplicado (Lande, 1979; Klingenberg & Monteiro, 2005), de acordo com a Figura 1.2. Assim, as direções de máxima varia-

ção de G , bem como suas proporções relativas e a dimensionalidade do espaço gerado por estas direções, são características fundamentais para o entendimento da evolução de fenótipos multivariados (Schluter, 1996; Blows & Hoffmann, 2005; Mezey & Houle, 2005; Pavlicev *et al.*, 2009).

Figura 1.2: Representação gráfica da resposta à seleção em duas populações. À esquerda, a matriz de covariância genética G_1 afeta a magnitude e a direção da resposta Δz_1 em relação ao vetor β de seleção. À direita, uma outra matriz G_2 sofre seleção direcional com a mesma intensidade e direção de G_1 ; no entanto, a resposta à seleção, representada por Δz_2 , é diferente de Δz_1 em direção e magnitude, devido às diferenças nas duas matrizes (modificado a partir de Revell, 2007).

Assumindo a constância de G ao longo do tempo, pode-se generalizar o modelo expresso na Equação 1.3 para um número arbitrário de gerações, de forma que a resultante dos gradientes de seleção, geração após geração, produz a mudança total no fenótipo médio observada na população. Desta maneira, pode-se por exemplo reconstruir padrões históricos de diversificação e relacioná-los aos processos evolutivos, como seleção e deriva (Lande, 1976; Reeve, 2000; Marroig & Cheverud, 2004), além de prever o comportamento do fenótipo médio em uma população em relação às forças de seleção reais ou hipotéticas (Lande, 1979; Klingenberg & Leamy, 2001; Polly, 2004). Portanto,

a investigação acerca da manutenção e divergência dos padrões de covariância entre efeitos aditivos expressos por G torna-se uma questão central dentro da biologia evolutiva (Steppan *et al.*, 2002).

1.1 Análises comparativas de padrões de covariância

Os padrões expressos por G são reflexo de múltiplos fatores atuando sobre os genes aditivos subjacentes a estes padrões. De modo geral, a matriz G sofre influência do tamanho efetivo da população, de efeitos mutacionais pleiotrópicos e de aspectos locais da paisagem adaptativa (como sua curvatura e orientação) que implicam em seleção estabilizadora sobre G (Lande, 1980; Jones *et al.*, 2003, 2007; Revell, 2007; Arnold *et al.*, 2008). Diversos autores demonstraram que a constância absoluta da matriz G ao longo da evolução de fenótipos complexos é inviável, tanto em análises baseadas em abordagens analíticas (Turelli, 1988; Shaw *et al.*, 1995), quanto empíricas (Cheverud, 1995, 1996b; Phillips & Arnold, 1999; Ackermann & Cheverud, 2000; Marroig & Cheverud, 2001) ou em simulações numéricas (Jones *et al.*, 2003; Revell, 2007). No entanto, não existem razões teóricas que descartem um quadro de estabilidade relativa de G ao longo do tempo (Jones *et al.*, 2003); por exemplo, observa-se este quadro em certos conjuntos de caracteres morfológicos (Kohn & Atchley, 1988; Lofsvold, 1986; Cheverud, 1996b). Além disso, Revell (2007) argumenta que pequenas flutuações na estrutura de G ao longo do tempo não afetam a reconstrução de padrões de seleção, visto que estas flutuações simplesmente podem cancelar umas às outras. De qualquer forma, a pressuposição da estabilidade de G ao longo do tempo deve ser feita com cautela, de forma que há necessidade de se testar explicitamente a hipótese de estabilidade antes de utilizar esta premissa na interpretação de resultados acerca da evolução de fenótipos multivariados (Kohn & Atchley, 1988; Marroig & Cheverud, 2001; Steppan *et al.*, 2002).

A obtenção de padrões de covariância genética aditiva entre um conjunto de caracteres quantitativos é realizada através de modelos de partição de variâncias e covariâncias sobre uma população em que são conhecidas as relações de parentesco entre os in-

divíduos (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998). Entretanto, o conhecimento acerca da genealogia subjacente à uma população é difícil de se obter (Cheverud, 1988); além disso, estimativas de G estão associadas à um erro muito maior do que suas equivalentes fenotípicas (Hill & Thompson, 1978; Meyer & Kirkpatrick, 2008), dificultando seu uso prático em questões ligadas à evolução de caracteres multivariados.

Com o objetivo de circundar o problema na estimação de matrizes G , Cheverud (1988) formula a hipótese de que a matriz de covariância fenotípica P seria uma boa aproximação da matriz G . O autor testa sua expectativa a partir de uma compilação de matrizes fenotípicas e genéticas advindas da literatura, relatando que, à medida que G é estimada com mais precisão, a dissimilaridade entre as duas matrizes diminui. Desta forma, matrizes de covariância fenotípicas são boas estimativas para suas equivalentes genéticas e P pode ser então utilizada em substituição à G . Esta expectativa foi testada em populações de organismos bastante distintos (ex.: Kohn & Atchley, 1988; Roff, 1995; Waitt & Levin, 1998; Reusch & Blanckenhorn, 1998), sustentando a hipótese de correspondência entre as duas matrizes. Por exemplo, no crânio no mamíferos, atesta-se a manutenção dos padrões expressos por matrizes fenotípicas na diversificação do grupo (Ackermann & Cheverud, 2000; Marroig & Cheverud, 2001; Porto *et al.*, 2009; de Oliveira *et al.*, 2009) em relação às matrizes G disponíveis (Cheverud, 1995, 1996b; de Conto, 2007).

Este quadro de correspondência entre padrões de covariância genética e fenotípica em uma população, estabelecido empiricamente, está associado à conceituação teórica que relaciona contingências ontogenéticas e funcionais entre caracteres componentes de um dado fenótipo multivariado aos padrões de covariância observados para estes caracteres (Lande, 1980; Cheverud, 1982, 1984).

1.2 Modularidade

Modularidade é uma propriedade característica de sistemas complexos passíveis de serem experimentalmente ou conceitualmente decompostos em unidades relativamente independentes entre si, denominadas módulos (Bolker, 2000; Newman, 2006; Mittero-

ecker & Bookstein, 2007; Wagner *et al.*, 2007; Klingenberg, 2008). O conceito de modularidade tem sido aplicado dentro das ciências biológicas em diversos contextos, como por exemplo na análise de redes metabólicas (ex.: Ravasz *et al.*, 2002) e em estudos sobre interações em comunidades ecológicas (ex.: Fortuna *et al.*, 2008; Genini *et al.*, 2010).

Dentro do âmbito da biologia evolutiva, o conceito de modularidade encontra-se intimamente ligado ao de integração morfológica (Klingenberg, 2008). Este conceito (Olson & Miller, 1958) refere-se à correspondência entre os padrões de covariação de um conjunto de caracteres quantitativos e as hipóteses sobre suas relações biológicas. Estas hipóteses podem ser definidas sobre diferentes níveis de organização (Cheverud, 1982, 1996a) como, por exemplo, sobre a dinâmica entre vias de sinalização e expressão gênica durante o desenvolvimento (Klingenberg, 2008, 2010) ou sobre a interação entre elementos morfológicos em sua performance funcional conjunta (Cheverud, 1982, 1996a). Considerando-se que a performance funcional de um dado indivíduo é correlacionada à sua aptidão, caracteres associados por integração funcional tendem, então, a evoluir em conjunto (Cheverud, 1984). Além disso, a arquitetura genética destes caracteres tende a evoluir de forma a exibir uma forte coerência interna, através de efeitos pleiotrópicos (Cheverud, 1996a) e, ao mesmo tempo, ser relativamente independente de outras redes gênicas similares (Wagner, 1996). Estes quatro níveis de integração morfológica (ontogenético, funcional, evolutivo e genético) se relacionam de forma circular (Marroig & Cheverud, 2001; Klingenberg, 2008), de modo que cada um destes interfere nos demais.

Estas interdependências entre diferentes níveis de integração morfológica limitam e direcionam a evolução correlacionada de caracteres integrados (Arnold, 1992; Cheverud, 1984), de forma que a existência de modularidade que permeia cada um dos níveis de integração é crucial para a manutenção da evolvibilidade, isto é, a capacidade de uma população de responder diretamente à seleção (Wagner & Altenberg, 1996; Hansen & Houle, 2008). Assim sendo, Wagner (1996) formula a existência de um mapa modular na relação genótipo/fenótipo (Figura 1.3).

Figura 1.3: Relação modular entre genótipo, fenótipo e funcionalidade. Os genes G1, G2 e G3 afetam os quatro caracteres do complexo C1, relacionados à função F1, enquanto os genes G4, G5 e G6 afetam os três caracteres do complexo C2, relacionados à função F2, havendo algum grau de relacionamentos entre os dois módulos em todos os níveis (retirado de Wagner, 1996).

Diversos autores (ex.: Mezey *et al.*, 2000; Leamy *et al.*, 1999; Klingenberg *et al.*, 2004) encontraram evidências do efeito modular de QTLs em morfologias complexas, confirmando as expectativas de que os efeitos aditivos de genes quantitativos atuam de forma modular sobre a variação fenotípica, relacionando empiricamente a genética de caracteres complexos ao conceito de integração morfológica; desta forma, estabelece-se um quadro conceitual teórico e empírico a qual sustentar a conjectura enunciada por Cheverud (1988) de similaridade entre padrões de covariância fenotípica e genética.

1.3 Objetivos

Meus principais objetivos ao longo do mestrado foram estimar matrizes de covariância genética para o crânio e mandíbula de uma população de *Calomys expulsus* e compará-las com suas equivalentes fenotípicas, de maneira a fortalecer a conjectura estabelecida por Cheverud (1988) de que a covariância fenotípica entre caracteres componentes de um fenótipo complexo se espelha na covariância entre efeitos aditivos de genes que afetam este fenótipo. Além disso, segundo o quadro conceitual estabelecido pelo autor em outros trabalhos (ex.: Cheverud, 1982, 1995, 1996b), comparei estes padrões de covariância obtidos com hipóteses de modularidade relacionadas ao desenvolvimento e função do crânio e da mandíbula, com o objetivo de testar o efeito de contingências ontogenéticas e funcionais sobre genótipo e fenótipo. Ademais, busquei comparar os padrões de covariância que obtive aqueles obtidos por outros autores, de forma a incrementar a compreensão acerca da estabilidade da matriz G ao longo da evolução de fenótipos multivariados, como é o caso do crânio e da mandíbula nos mamíferos.

Estrutura da Dissertação

Inicialmente, caracterizo a população que utilizei como modelo; no capítulo seguinte, ofereço uma explanação acerca dos métodos utilizados para a estimativa de matrizes de covariância genética e para a comparação destas matrizes com outras, sejam estas fenotípicas ou associadas a hipóteses de modularidade. Nos capítulos que seguem, discorro sobre a genética quantitativa e padrões de modularidade de caracteres cranianos (Capítulo 3) e mandibulares (Capítulo 4); por fim, apresento minhas considerações finais acerca de todo o trabalho (Capítulo 5).

1.3.1 Objeto de estudo

O gênero *Calomys* (Muroidea, Cricetidae) compreende uma série de pequenos roedores sigmodontíneos que ocorrem ao longo de áreas abertas na porção central da América do Sul (Hershkovitz, 1962). Alguns autores (Reig, 1986; Braun, 1993) consideram

Calomys o gênero mais primitivo dentre a tribo Phyllotini, sendo possivelmente o representante atual mais similar ao ancestral comum do grupo, condição sustentada por análises moleculares (Steppan *et al.*, 2004).

A espécie *Calomys expulsus* ($2n = 66$) se distribui ao longo de áreas de Cerrado e Caatinga na porção central do Brasil, ocorrendo em simpatria com *C. tener* no limite sul de sua distribuição. O status taxonômico de *C. expulsus* foi bastante discutido; a espécie já foi considerada sinônima de *C. callosus* (Musser & Carleton, 1993), ou mesmo uma subespécie da mesma (Hershkovitz, 1962). No entanto, análises baseadas em dados cariotípicos, morfológicos e moleculares confirmam a validade da espécie (Bonvicino & Almeida, 2000; Almeida *et al.*, 2007).

A colônia de *Calomys expulsus* que utilizo aqui se originou a partir da coleta de 37 exemplares de *C. expulsus* na Fazenda Canoas, no Estado de Minas Gerais (16°50'S, 43°35'W, 800m). Estes exemplares, 16 fêmeas e 21 machos sexualmente imaturos, foram levados ao Laboratório de Vertebrados da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde foram colocados em condições controladas. Os animais, pareados aleatoriamente em casais e colocados na mesma gaiola, produziram mais de 400 filhotes no período entre Agosto de 1995 e Novembro de 1996. Cada ninhada foi deixada na gaiola com sua progenitora até o desmame. Os animais foram utilizados para a construção de uma série ontogenética craniana (Hingst-Zaher *et al.*, 2000) através da preparação de seus esqueletos; assim sendo, conhece-se as idades nas quais os animais foram sacrificados, bem como suas relações de parentesco, essenciais para a estimativa de matrizes de covariância de efeitos aditivos.

Capítulo 2

Metodologias para a análise de padrões de covariação genética e fenotípica

Este capítulo dedica-se ao detalhamento das metodologias utilizadas para a obtenção de variâncias e covariâncias genéticas aditivas; além disso, ele detalha a análise comparativa de padrões de covariância e correlação em diferentes contextos, como por exemplo na comparação entre padrões fenotípicos e genéticos ou na correspondência destes padrões com hipóteses de integração morfológica, de maneira a oferecer um embasamento teórico para os capítulos subsequentes.

Devo ressaltar que não é o intuito aqui esgotar a discussão sobre todas as técnicas multivariadas para a análise de padrões de covariação; o presente capítulo situa-se portanto como instrumento para o desenvolvimento dos próximos.

No Apêndice A, demonstro a implementação de algumas destas metodologias no ambiente de programação R (R Development Core Team, 2010), de forma a complementar a informação presente neste capítulo.

2.1 Estimativas de variâncias e covariâncias genéticas

Conforme exposto no Capítulo 1, a obtenção de estimativas de padrões de covariância genética aditiva entre um conjunto de caracteres quantitativos em uma dada população envolve modelos de partição de variâncias associados à estrutura genealógica subjacente a população-modelo (Falconer & Mackay, 1996). Desta forma, nesta seção,

descrevo o modelo animal simples (Lynch & Walsh, 1998), que utilizei na obtenção das matrizes G expostas nos capítulos seguintes. Este modelo associa toda a covariância genética não-aditiva à matriz de covariância residual, conforme a Equação 1.2.

2.1.1 Estimativas de herdabilidade e variância aditiva

A herdabilidade (h^2 ; Falconer & Mackay, 1996) de um dado caráter quantitativo é definida como a proporção entre a variância aditiva genética (σ_A^2) e a variância fenotípica (σ_P^2) do caráter em questão dentro de uma população considerada. Dessa forma, é possível estabelecer a relação:

$$\sigma_A^2 = h^2 \sigma_P^2 \quad (2.1)$$

onde a variância aditiva genética é escrita como função da herdabilidade. A estimação da herdabilidade sobre caracteres fenotípicos envolve a construção de modelos lineares mistos, dependentes da variância aditiva, e portanto, dependentes também de h^2 . Dessa forma, considerando-se um vetor y que contém n observações do caráter em questão sobre uma amostra de uma população cuja genealogia é conhecida, assume-se que essas observações são descritas por um modelo da seguinte forma (Lynch & Walsh, 1998, Capítulo 27):

$$y = X\beta + Zu + \epsilon \quad (2.2)$$

onde β é um vetor que possui p elementos relacionados aos efeitos fixos (como sexo ou idade, por exemplo), u representa um vetor de q efeitos aleatórios (como, por exemplo, o efeito aditivo de um dado alelo sobre o caráter), ϵ é um vetor de erros independentemente distribuídos e as matrizes $X_{n \times p}$ e $Z_{n \times q}$ representam matrizes de incidência dos efeitos fixos e aleatórios sobre cada uma das n observações. Considerando-se $E(u) = \mathbf{0}_q$ (vetor nulo de tamanho q), já que os efeitos aditivos de genes são definidos em relação ao fenótipo médio da população (Falconer & Mackay, 1996), e assumindo-se que os erros são distribuídos de forma independente e portanto não afetam o fenótipo médio, temos $E(\epsilon) = \mathbf{0}_n$ e portanto observa-se a partir da Equação 2.2 que $E(y) = X\beta$.

Agora, considere-se a matriz de variância e covariância de y . Assumindo que a

distribuição dos erros é independente em cada observação contida em y , pode-se decompor a matriz de covariância de y da seguinte forma:

$$V = \sigma_A^2 A + \sigma_E^2 I_n \quad (2.3)$$

onde σ_A^2 é a variância aditiva do caráter em questão, $\sigma_E^2 = (1 - h^2)\sigma_P^2$ é a variância dissociada de efeitos aditivos, I_n representa a matriz identidade de tamanho n e a matriz $A_{n \times n}$ representa a matriz genética aditiva de relacionamento, onde cada elemento A_{ij} é definido como sendo duas vezes o coeficiente ϕ_{ij} de coancestralidade de Wright (Lynch & Walsh, 1998, Capítulo 7) para os indivíduos i e j da genealogia considerada. Assim, a matriz A será quadrada e simétrica (visto que $A_{ij} = A_{ji}$) de tamanho n ; esta matriz, portanto, representa as relações de parentesco entre os n indivíduos.

O vetor y , portanto, possui distribuição multivariada normal de média $X\beta$ e matriz de covariância V ($y \sim MVN(X\beta, V)$; Lynch & Walsh, 1998, Capítulo 27). Assim, através dessa propriedade, é possível produzir estimativas de máxima verossimilhança para parâmetros presentes no modelo, maximizando a função de densidade de probabilidade da distribuição multivariada normal em função dos parâmetros de interesse. A partir desta forma de otimização, deriva-se a otimização por máxima verossimilhança restrita (REML; Shaw, 1987, 1991) através da transformação $y' = y - X\beta$, de forma que as estimativas para os parâmetros fixos são preestabelecidas através de um modelo linear anterior à otimização por máxima verossimilhança. Dessa forma, o modelo REML se reduz à estimativa de σ_A^2 (e, portanto, de h^2) que maximiza a probabilidade de y' pertencer à distribuição multivariada normal com média igual ao vetor nulo e matriz de covariância V ($y' \sim MVN(\mathbf{0}_n, V)$).

A determinação da significância do modelo é possível através da comparação com um modelo alternativo no qual $V = \sigma_P^2 I_n$, ou seja, um modelo em que a herdabilidade é nula; as verossimilhanças dos dois modelos são então comparados através do teste de *likelihood-ratio* (Cheverud, 1995, 1996b). A variância de uma estimativa de herdabilidade também pode da mesma forma ser utilizada para avaliar a significância do modelo através da construção de intervalos de confiança em torno da expectativa mé-

dia através da aproximação da curva de verossimilhança de h^2 para uma distribuição normal (Cheverud, 1982). Além disso, é possível avaliar o tamanho efetivo de amostra da estimativa (N_{eff} ; Robertson, 1959; Cheverud, 1995), que representa o número de valores genéticos aditivos utilizados na estimativa de h^2 , de forma que esta terá as propriedades estatísticas de um parâmetro estimado com um tamanho de amostra idêntico ao N_{eff} . Este valor é calculado da seguinte forma:

$$N_{eff} = \frac{2h^4}{var(h^2)} + 1 \quad (2.4)$$

onde h^4 representa o quadrado da estimativa de herdabilidade e $V(h^2)$ expressa a variância desta estimativa. Observa-se que cada caráter terá seu tamanho efetivo de amostra diferente, dependente da estimativa de herdabilidade para ele e da variância desta, mesmo que tais estimativas sejam produzidas a partir da mesma amostra (Cheverud, 1995).

Devo ressaltar que quando múltiplos caracteres são considerados, suas estimativas individuais de herdabilidades não são suficientes para expressar a variância aditiva subjacente a estes. Dessa maneira, as covariâncias e correlações genéticas entre estes caracteres, advindas da pleiotropia e do desequilíbrio de ligação (Cheverud, 1996a), devem ser levadas em consideração.

2.1.2 Estimativas de correlações genéticas

Consideremos agora a situação onde dois caracteres quantitativos a e b distintos são tomados de uma amostra advinda de uma população de interesse cuja genealogia é conhecida. A covariância fenotípica ($cov_{P(a,b)}$) entre estes caracteres pode ser expressa da forma (Cheverud, 1995; Falconer & Mackay, 1996):

$$cov_{P(a,b)} = cov_{A(a,b)} + cov_{E(a,b)} \quad (2.5)$$

onde $cov_{A(a,b)} = r_A \sqrt{\sigma_{A_a}^2 \sigma_{A_b}^2}$ e $cov_{E(a,b)} = r_E \sqrt{\sigma_{E_a}^2 \sigma_{E_b}^2}$ representam as covariâncias genética aditiva e residual; r_A e r_E expressam as respectivas correlações. Dessa forma,

a correlação fenotípica é decomposta como a média das correlações aditiva e residual ponderadas pelas herdabilidades dos dois caracteres (Cheverud, 1988).

De forma similar ao que foi visto para estimativas de herdabilidade, as estimativas de covariâncias e correlações genéticas se apoiam na construção de modelos lineares. Assim sendo, seja y um vetor de tamanho $2n$ contendo as observações para os dois caracteres, de forma que as observações para o indivíduo i estejam nas posições i e $i + n$ do vetor em questão. O modelo linear misto que expressa a partição de y em efeitos fixos e aleatórios é idêntico aquele expresso pela Equação 2.2. No entanto, os elementos vetoriais contém fatores relativos aos efeitos fixos e aleatórios sobre os dois caracteres em questão; as matrizes de incidência sofrem uma expansão similar. Ademais, a decomposição da matriz de covariância de y se modifica da seguinte forma (Lynch & Walsh, 1998, Capítulo 27):

$$V = C \otimes A + E \otimes I_n \quad (2.6)$$

no qual $A_{n \times n}$ expressa a matriz genética aditiva de relacionamento e I_n representa a matriz identidade de tamanho n ; o símbolo $\otimes$ denota o produto de Kronecker. As matrizes $C_{2 \times 2}$ e $E_{2 \times 2}$, contém, respectivamente, as variâncias genéticas aditivas (σ_A^2) e residuais (σ_E^2) para os dois caracteres em suas diagonais principais; as covariâncias aditiva ($cov_{A(a,b)}$) e residual ($cov_{E(a,b)}$) figuram como os elementos fora da diagonal nas duas matrizes. A Equação 2.6 é uma generalização multivariada da Equação 2.3, neste caso ajustada para dois caracteres. Dessa forma, é possível estabelecer a relação $y' \sim MVN(\mathbf{0}_{2n}, V)$, de forma similar ao que foi visto na Subseção 2.1.1.

Assim, fixando-se as variâncias obtidas através das estimativas de herdabilidade, torna-se possível produzir estimativas para as correlações genéticas e residuais, através de uma solução REML para a função de densidade de probabilidade da distribuição multivariada normal parametrizada a partir de r_G e r_E . A significância da estimativa de r_G é avaliada de forma similar àquela vista na subseção anterior para as estimativas de h^2 .

As estimativas de correlações genéticas possuem as propriedades estatísticas de uma amostra de tamanho associado ao número real de valores genéticos aditivos uti-

lizados na estimativa, de forma similar a h^2 . Assim, o N_{eff} associado à uma certa correlação genética é calculado como a média geométrica das estimativas de N_{eff} para cada caráter individualmente, da seguinte forma (Robertson, 1959; Cheverud, 1995):

$$N_{eff} = \sqrt{\frac{2h_a^2 h_b^2}{var(h_a^2) var(h_b^2)}} + 1 \quad (2.7)$$

A partir das estimativas de variâncias e covariâncias genéticas produzidas, matrizes de covariância e correlação genéticas podem ser construídas de forma a resumir a informação associada aos padrões de covariação nos efeitos de genes aditivos dentro do conjunto de caracteres em questão.

2.2 Comparação de padrões de covariância

A partir da obtenção de padrões de covariação distintos, como por exemplo os padrões expressos pelas matrizes P e G de uma mesma população, ou mesmo padrões fenotípicos ou genéticos de populações diferentes, a hipótese de manutenção destes padrões ao longo destes níveis de organização pode ser testada formalmente. Esta seção se dedica a detalhar os métodos utilizados para a comparação de padrões expressos por matrizes de covariância.

2.2.1 Repetibilidade

A repetibilidade de matrizes de covariância ou correlação define-se como a capacidade da matriz em questão representar de maneira fidedigna os padrões de covariação reais da população amostrada. Ou seja, este valor reflete a representatividade da amostra em relação à população real e, portanto, está associado ao tamanho n desta amostra. Este valor também depende da precisão da mensuração; no entanto, esta precisão é estimada a partir de uma medida de repetibilidade sobre cada caráter mensurado; visto que esta outra estimativa é subjacente à mensuração, ela será discutida em separado para o crânio e para a mandíbula, nos Capítulos 3 e 4, respectivamente.

A estimativa deste parâmetro de uma dada matriz se faz importante na comparação

entre padrões de covariância ou correlação pois as repetibilidades das matrizes limitam a correlação máxima teórica entre estas. Para os dois tipos de correlação entre matrizes utilizados (os métodos de Adagas Casualizadas e o Teste de Mantel), o valor máximo teórico corresponde à média geométrica entre as repetibilidades das duas matrizes, de forma que a correlação entre duas matrizes A e B , corrigida para este valor máximo, é obtida da seguinte forma (Cheverud, 1995, 1996b; Marroig & Cheverud, 2001):

$$r_{real} = \frac{r_{obs}}{\sqrt{t_A t_B}} \quad (2.8)$$

onde r_{obs} representa a correlação resultante do método de comparação entre matrizes e t_A e t_B representam respectivamente as repetibilidades das matrizes A e B .

A repetibilidade de matrizes de correlação é definida como sendo a proporção da variância nos elementos observados (V_{obs}) devido à variação nos valores reais, excluindo a variação devida ao erro de amostragem (V_{erro}) (Cheverud, 1996b; de Oliveira *et al.*, 2009). Assim, a repetibilidade t é calculada da forma:

$$t = \frac{V_{obs} - V_{erro}}{V_{obs}} \quad (2.9)$$

onde V_{erro} é definida como sendo o quadrado do erro-padrão da correlação média dentro da matriz, na forma:

$$V_{erro} = \frac{1}{n-2} \left(1 - \frac{1}{n} \sum_{i < j} r_{ij} \right). \quad (2.10)$$

A repetibilidade de matrizes de covariância é obtida de forma diferente, através de um procedimento do tipo *bootstrap* (de Oliveira *et al.*, 2009; Porto *et al.*, 2009) onde re-amostragens sobre a amostra original, corrigida para os efeitos fixos que afetam seus padrões de covariância, são obtidas através de sorteios com reposição, mantendo o tamanho da amostra n constante e idêntico àquela da amostra real. Após cada sorteio, uma nova matriz de covariância é calculada. Esta matriz é comparada à original através do método de Adagas Casualizadas (Subseção 2.2.3). O procedimento é repetido várias vezes, de forma que a repetibilidade da matriz é a média das correlações entre a

matriz original e cada uma das réplicas obtidas por *bootstrap*.

Matrizes G e Repetibilidade

A repetibilidade das matrizes G pode ser calculada através de um procedimento de aleatorização diferente daquele utilizado para as matrizes fenotípicas, pois não é possível estimar novas matrizes genéticas a partir de reamostragens dos dados brutos, dada a estrutura genealógica subjacente às estimativas de G (Cheverud, 1996b).

Desta forma, a repetibilidade de matrizes de covariância genética é realizada através de *bootstrap*, utilizando-se o tamanho efetivo médio da amostra (N_{eff}) como substituto para o tamanho amostral. No entanto, a amostra utilizada refere-se à estimativa da matriz fenotípica correspondente, de forma que o valor de repetibilidade da matriz de covariância genética é o valor de repetibilidade de P caso esta tivesse sido estimada com o tamanho efetivo médio de G .

Para o caso de matrizes de correlação, o índice de repetibilidade é calculado conforme descrevi anteriormente para matrizes fenotípicas, utilizando o tamanho efetivo médio de amostra como o parâmetro n .

2.2.2 Teste de Mantel

A correlação entre duas matrizes de correlação (Sneath & Sokal, 1972; Cheverud *et al.*, 1989) é avaliada da seguinte forma:

$$\Gamma_{AB} = \frac{\sum_{i < j} (a_{ij} b_{ij})}{\sqrt{\sum_{i < j} (a_{ij}^2) \sum_{i < j} (b_{ij}^2)}} \quad (2.11)$$

onde a_{ij} e b_{ij} representam respectivamente os elementos de duas matrizes A e B ; ambas quadradas e simétricas de dimensão n . O valor de Γ_{AB} obtido é então contrastado com uma distribuição nula de valores de Γ_{AB} , construída a partir de dez mil permutações nas linhas e colunas de uma das matrizes (A , por exemplo), enquanto a outra (B , nesse caso) é mantida fixa, de forma a produzir um teste de significância à correlação

real observada (Mantel, 1967; Cheverud, 1995, 1996b). O Teste de Mantel, portanto, contrasta a hipótese nula de dissimilaridade entre A e B com a hipótese alternativa de similaridade entre estas matrizes.

2.2.3 Adagas Casualizadas

Os padrões expressos por matrizes de covariância são comparados através do método de Adagas Casualizadas (*Random Skewers* ou RS; Cheverud, 1996b; Marroig & Cheverud, 2001; Cheverud & Marroig, 2007): dez mil gradientes seletivos (β) aleatórios são gerados e aplica-se sobre cada um deles a equação de seleção direcional multivariada (Equação 1.3; Lande, 1979) utilizando-se as duas matrizes de interesse no lugar de G . Para cada vetor β gerado, calcula-se a correlação entre os dois vetores de resposta à seleção (Δz) provenientes das duas matrizes; ressaltar que quaisquer diferenças entre os vetores de resposta são associadas à diferenças entre as matrizes, e não a diferenças nos vetores de seleção, visto que estes são os mesmos a cada iteração, conforme observado na Figura 1.2. A média das correlações entre os dez mil pares de vetores Δz é então comparada à uma distribuição nula, gerada a partir de correlações entre vetores aleatórios. Contrasta-se a hipótese nula de que as matrizes não são similares (nesse caso, a média de correlações das respostas à seleção não é superior à 95% das correlações entre vetores aleatórios) com a hipótese alternativa de que os padrões expressos pelas duas matrizes são similares (e, portanto, a correlação média entre as respostas provenientes das duas matrizes será maior que 95% das correlações entre vetores aleatórios), de forma que as hipóteses deste teste são formuladas de forma análoga ao teste de Mantel (Marroig & Cheverud, 2001).

2.2.4 SRD: Decomposição de Respostas à Seleção

O método de Decomposição de Respostas à Seleção (SRD; Marroig et al., no prelo), uma extensão ao método RS, permite a distinção da contribuição individual de cada caráter para a correspondência entre os padrões de covariância expressos por duas matrizes de covariância A e B de tamanho n .

Considere a aplicação de um vetor de gradiente de seleção β sobre uma matriz de covariância A , de acordo com a equação de resposta multivariada à seleção (Equação 1.3; Lande, 1979):

$$\Delta z = A\beta$$

$$\begin{bmatrix} z_1 \\ z_2 \\ \vdots \\ z_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sigma_{A_1}^2 & cov_{A_{1,2}} & \dots & cov_{A_{1,n}} \\ cov_{A_{2,1}} & \sigma_{A_2}^2 & \dots & cov_{A_{2,n}} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ cov_{A_{n,1}} & cov_{A_{n,2}} & \dots & \sigma_{A_n}^2 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \vdots \\ \beta_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sigma_{A_1}^2 \beta_1 + cov_{A_{1,2}} \beta_2 + \dots + cov_{A_{1,n}} \beta_n \\ cov_{A_{2,1}} \beta_1 + \sigma_{A_2}^2 \beta_2 + \dots + cov_{A_{2,n}} \beta_n \\ \vdots \\ cov_{A_{n,1}} \beta_1 + cov_{A_{n,2}} \beta_2 + \dots + \sigma_{A_n}^2 \beta_n \end{bmatrix}$$

Cada elemento z_i do vetor Δz resultante da aplicação sobre A é composto pela resposta à seleção na direção do caráter i , condicionada pela variância deste, e pela resposta associada à seleção sobre outros caracteres, que influenciam o caráter i através de suas covariâncias com o mesmo.

O método *SRD* busca observar a correspondência entre estes componentes da resposta à seleção para cada caráter em duas matrizes. Primeiramente, a soma que resulta no elemento z_i do vetor Δz é transformada em um vetor a_i da seguinte forma:

$$\begin{bmatrix} \sigma_{A_1}^2 \beta_1 & cov_{A_{1,2}} \beta_2 & \dots & cov_{A_{1,n}} \beta_n \\ cov_{A_{2,1}} \beta_1 & \sigma_{A_2}^2 \beta_2 & \dots & cov_{A_{2,n}} \beta_n \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ cov_{A_{n,1}} \beta_1 & cov_{A_{n,2}} \beta_2 & \dots & \sigma_{A_n}^2 \beta_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \\ \vdots \\ a_n \end{bmatrix}$$

O vetor a_i associado ao caráter i na matriz A é correlacionado ao vetor b_i resultante da aplicação do mesmo vetor de seleção β sobre uma matriz B :

$$SRD_{\beta,i} = \frac{a_i^T b_i}{\|a_i\| \cdot \|b_i\|} \quad (2.12)$$

o que corresponde ao valor de *SRD* para o caráter i na comparação entre as matrizes A e B ao se aplicar um determinado vetor β sobre estas matrizes.

De maneira similar ao método de *Random Skewers*, um conjunto de vetores aleatórios é aplicado sobre as matrizes *A* e *B*, de forma a obter uma distribuição de valores de SRD associadas a cada caráter presente nas duas matrizes. A expectativa é que caracteres que apresentam um alto grau de similaridade de padrões de covariação entre as duas matrizes irão possuir valores médios de SRD próximos de 1 com um pequeno desvio em relação à esta média, enquanto espera-se o comportamento inverso de caracteres que representam as principais dissimilaridades em relação aos padrões de covariação nas duas matrizes.

Assim sendo, é possível identificar quais caracteres representam estas dissimilaridades através da distribuição bivariada de valores médios e desvios-padrão para os valores de SRD. Aqueles caracteres que apresentam valores médios baixos de SRD e valores altos de desvio-padrão além da elipse de 95% de confiança para esta distribuição são caracteres que contribuem significativamente para a dissimilaridade entre as duas matrizes.

2.3 Análise de modularidade

Inicialmente, devemos estabelecer a distinção entre a magnitude de integração morfológica, associada ao comportamento conjunto dos caracteres considerados e o reconhecimento de padrões de modularidade dentre estes caracteres. No entanto, resalto aqui que esta distinção não é completa, visto que a magnitude de integração total afeta o reconhecimento de padrões de modularidade em uma dada matriz (Porto *et al.*, 2009; Shirai & Marroig, 2010). Posto isso, duas abordagens para a análise de modularidade são apresentadas a seguir.

2.3.1 Magnitude de Integração Morfológica

O coeficiente de determinação r^2 , calculado simplesmente como sendo a média das correlações ao quadrado em uma dada matriz (Cheverud *et al.*, 1989), representa o nível geral de integração dos caracteres na matriz considerada. Este índice, por ser

calculado sobre matrizes de correlação, é independente de escala, de forma que pode ser utilizado para comparar a magnitude da integração morfológica entre populações diferentes em termos de escala, como os diferentes grupos de mamíferos (Porto *et al.*, 2009; de Oliveira *et al.*, 2009). Além disso, é possível obter intervalos de confiança para este índice, através de métodos de reamostragem (Cheverud *et al.*, 1989). Por exemplo, pode-se utilizar o método de *Monte-Carlo*, onde a matriz de correlação sobre a qual o índice foi calculado é utilizada para gerar novos indivíduos, representados por vetores aleatórios, fixando-se o tamanho amostral. A partir destes indivíduos, uma nova matriz de correlação é estimada e calcula-se seu índice r^2 . Repetindo este procedimento, obtém-se uma distribuição de valores de r^2 que pode ser utilizada, por exemplo, em comparações entre índices provenientes de matrizes diferentes.

Matrizes G e Métodos Monte-Carlo

A utilização de métodos de *Monte-Carlo* exige que a matriz considerada possua todos os seus autovalores não-negativos, devido aos algoritmos utilizados para a aleatorização de indivíduos representativos da amostra. Visto que estimativas de matrizes de covariância genética usualmente possuem autovalores negativos (Hill & Thompson, 1978), estas estimativas não podem ser, a princípio, utilizadas em simulações *Monte-Carlo*. No entanto, diversos autores (ex.: Stein, 1956; Hayes & Hill, 1981; Schafer & Strimmer, 2005) propuseram métodos de correção para este erro nas estimativas de autovalores de G . Dentro do contexto desta dissertação, utilizei um critério simples de correção. A partir do primeiro autovalor inferior a 10^{-4} , modifiquei os autovalores seguintes em uma taxa de decrescimento constante, de forma que o último autovalor tivesse o valor de 10^{-8} , que representa o limite ϵ de resolução computacional para números reais; desta maneira, todos os autovalores da matriz são positivos e a autoestrutura da matriz é preservada, visto que os autovalores modificados são aqueles menos significativos dentre o conjunto total de autovalores da matriz. Portanto, esta técnica me permitiu utilizar simulações do tipo *Monte-Carlo* para a estimativa de intervalos de confiança de r^2 em matrizes de correlação genética.

2.3.2 Padrões de Modularidade

A análise de padrões de modularidade busca estabelecer paralelos entre o conhecimento acerca dos padrões de desenvolvimento e função compartilhada entre um conjunto de caracteres quantitativos e os padrões expressos pela matriz de correlação associada a estes caracteres.

Para o teste formal de correspondência entre o padrão de modularidade hipotético e o padrão de correlação expresso em uma matriz $A_{n \times n}$, matrizes de conectividade de tamanho n são construídas de acordo com as hipóteses consideradas (Cheverud, 1995). Nestas matrizes, quando dois caracteres i e j encontram-se no módulo correspondente à matriz, a casela i,j da matriz contém o valor 1 ($a_{i,j} = 1$); no caso contrário, o valor 0 é encontrado na casela correspondente ($a_{i,j} = 0$). Estas matrizes são então utilizadas para o teste de distinção entre as correlações internas e externas em relação ao módulo correspondente, através do Teste de Mantel (Subseção 2.2.2).

Capítulo 3

Genética quantitativa de caracteres cranianos em *Calomys expulsus*

3.1 Introdução

O crânio de mamíferos se origina a partir de dois primórdios embrionários: a crista neural e o mesoderma paraxial (Moore, 1981), através de diferentes processos de condrição e ossificação (Pan & Oxnard, 2002). É possível observar a distinção cronológica entre o crescimento do neurocrânio (mais precoce) e o crescimento da face (mais tardio; Moore, 1981; Cheverud, 1982), de forma que as duas regiões provavelmente possuem controles hormonais distintos (Sara *et al.*, 1981). O padrão de crescimento do neurocrânio corresponde ao desenvolvimento do cérebro, meninges, fluido cérebroespinal e órbita. O crescimento do basicrânio, além de sofrer influência do crescimento do cérebro, é em parte influenciado por fatores de crescimento somático tardios (Moore, 1981). Na face, três principais componentes podem ser distinguidos: a porção oral, muscular e nasal. O esqueleto oral inclui a cavidade oral e o suporte aos dentes, o muscular é composto do arco zigomático e da fossa temporal e o nasal associa-se à porção óssea associada ao septo nasal cartilaginoso.

O desenvolvimento dos elementos componentes do crânio não pode ser de maneira nenhuma dissociado da função relacionada à estes, porque a função muscular durante estágios iniciais do crescimento, por exemplo, é necessária ao desenvolvimento correto do esqueleto associado (Zelditch *et al.*, 1992; Cheverud, 1995). Dessa forma, a partir do

conhecimento prévio acerca da origem embrionária e função dos diferentes elementos do crânio, hipóteses associadas à modularidade ontogenética e funcional podem ser construídas e testadas sobre matrizes representativas dos padrões de associação fenotípica ou genética aditiva de caracteres cranianos (Cheverud, 1982; Klingenberg, 2008).

Cheverud (1995), ao analisar padrões de modularidade no crânio de *Saguinus fuscicollis*, encontrou correspondência entre os padrões de covariância expressos por P e G em uma população da espécie. Ademais, o autor encontra associação entre estas matrizes e suas hipóteses de modularidade em relação à região oral e a abóbada craniana. Estendendo estas análises para outros grupos, como espécies dentro do gênero *Saguinus* (Cheverud, 1996b; Ackermann & Cheverud, 2000), primatas (Marroig & Cheverud, 2001; de Oliveira *et al.*, 2009) e finalmente os mamíferos como um todo (Porto *et al.*, 2009; Shirai & Marroig, 2010), é possível observar a manutenção dos padrões expressos por matrizes de covariância fenotípica de caracteres cranianos na diversificação dos mamíferos e a relação destes padrões fenotípicos com padrões de covariância genética obtidos para *Saguinus* por Cheverud 1995; 1996b e, mais recentemente, para *Akodon*, um roedor sigmodontíneo da tribo Oryzomine (de Conto, 2007). Apenas dentre os macacos do Velho Mundo (Catarrhini), na diversificação das subfamílias Papioninae e Homininae, ocorreram mudanças significativas nos padrões de covariância de caracteres cranianos (de Oliveira *et al.*, 2009).

Em relação aos padrões de modularidade no crânio, o quadro estabelecido pelos autores supracitados atesta a manutenção da modularização da região da face em relação às outras regiões do crânio, à exceção dos primatas hominíneos (Porto *et al.*, 2009). O padrão de modularização da região da face também é observado para o crânio de *Mus musculus*, o camundongo comum de laboratório (Willmore *et al.*, 2006).

Ademais, Porto *et al.* (2009) indica que mudanças na magnitude de integração morfológica ocorreram durante o curso da diversificação da forma craniana nos mamíferos, enquanto os padrões de modularidade se mantiveram estáveis. Esta magnitude de integração morfológica se associa ao efeito da alometria (Marroig *et al.*, 2004) sobre a variação morfológica, de forma que a proporção de variação associada ao tamanho

em uma população (seu “fator de tamanho”, Bookstein *et al.*, 1985) pode ter um papel importante na evolução da forma craniana no grupo (Marroig & Cheverud, 2005; Porto *et al.*, 2009).

3.1.1 Objetivos

No presente capítulo, mostro como obtive matrizes que representam os padrões de covariância e correlação fenotípicos e genéticos para caracteres representativos do crânio na população de *Calomys expulsus*; com o objetivo central de testar a correspondência entre os padrões expressos nestes dois níveis de organização, bem como testar a correspondência entre estes padrões e hipóteses de modularidade associadas ao desenvolvimento do crânio em mamíferos. Ademais, visto que matrizes de covariância fenotípica e genética craniana para *Akodon cursor* estão disponíveis (de Conto, 2007; Porto *et al.*, 2009), testo aqui a hipótese de manutenção dos padrões expressos por estas matrizes associada à divergência entre os gêneros *Calomys* e *Akodon*, datada em cerca de 7.5 milhões de anos (Steppan *et al.*, 2004).

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Aquisição de dados

A coleção referente à colônia de *Calomys expulsus* possui um total de 365 crânios cuja informação genealógica está disponível e que apresentam estado de conservação suficiente para que todos os 21 marcos geométricos (Figura 3.1, Tabela 3.1) sejam digitalizados ao menos uma vez em cada exemplar, considerando-se que treze destes marcos ocorrem em ambos os lados do crânio de um mamífero. A escolha deste conjunto de marcos geométricos segue Cheverud (1995), tendo sido utilizada em outros trabalhos acerca de padrões de covariância no crânio de mamíferos (ex.: Cheverud, 1996b; Ackermann & Cheverud, 2000; Marroig & Cheverud, 2001; de Conto, 2007; de Oliveira *et al.*, 2009), de forma que é possível comparar diretamente os resultados que obtive aqui àqueles associados a estes trabalhos.

Fixei cada crânio em argila e registrei as coordenadas tridimensionais de cada marco através de um digitalizador Microscribe 3DX. O uso de argila como base de apoio para a fixação dos crânios impede a tomada de todos os marcos geométricos em todo o crânio simultaneamente; assim sendo, registrei as coordenadas dos lados direito e esquerdo separadamente, repetindo os pontos sobre a linha sagital em ambas as vistas. Ademais, registrei as coordenadas de cada lado do crânio duas vezes, de maneira a me permitir estimar repetibilidades para os caracteres e reduzir o erro associado à mensuração (Falconer & Mackay, 1996).

O software que acompanha o digitalizador Microscribe transfere as três coordenadas de cada marco geométrico à uma planilha de Excel que preparei especialmente para este fim; a partir destas, transferei os dados referentes a cada um dos exemplares ao ambiente de programação estatística R (R Development Core Team, 2010). Calculei as 35 distâncias euclidianas (Tabela 3.2) de cada hemicrânio e tomei as médias das réplicas e, no caso de distâncias bilateralmente simétricas, dos lados esquerdo e direito. No caso de um exemplar danificado, com marcos geométricos ausentes em um dos lados, considerei a distância do lado oposto como sendo esta média.

Repetibilidade

A partir das réplicas de cada distância em cada crânio, calculei os valores de repetibilidade associados ao erro de mensuração (Falconer & Mackay, 1996), através de uma ANOVA simples, tendo a identificação do indivíduo como fator de ajuste. O valor de repetibilidade é estimado como a porcentagem da variância total explicada pelo modelo. Além disso, investiguei cada variável em relação à desvios da normalidade através da observação da relação entre quantis teóricos e quantis da amostra.

3.2.2 Estimativas de matrizes de covariância e correlação

A partir das estimativas de repetibilidade, utilizei a média tomada entre os dois conjuntos de mensurações para cada indivíduo em todas as análises subsequentes.

Figura 3.1: Posição dos 21 marcos geométricos sobre o crânio de um indivíduo adulto de *Calomys expulsus* em vistas dorsal, lateral e ventral

Tabela 3.1: Descrição dos 21 marcos geométricos que tomei sobre o crânio. Os marcos em *itálico* se posicionam sobre a linha sagital e são, portanto, únicos em cada exemplar; os demais são marcos bilaterais.

Marco	Descrição
<i>IS</i>	<i>interincisivo superior</i>
PM	sutura maxilar-premaxilar
<i>NSL</i>	<i>extremidade rostral do nasal</i>
<i>NA</i>	<i>extremidade caudal do nasal na junção com o osso frontal</i>
<i>BR</i>	<i>sutura entre o parietal e o frontal em posição medial</i>
PT	sutura entre o parietal e o frontal em posição lateral
ZS	sutura superior entre o zigomático e o maxilar
ZI	sutura inferior entre o zigomático e o maxilar
MT	tuberosidade maxilar caudal ao terceiro molar
<i>PNS</i>	<i>espinha caudal do nasal</i>
APET	petrous temporal
<i>BA</i>	<i>ponto ventral do forame magno</i>
<i>OPI</i>	<i>ponto dorsal do forame magno</i>
EAM	meato auditivo externo rostral
PEAM	meato auditivo externo caudal
ZYGO	sutura entre o zigomático e o temporal
TSP	sutura entre os ossos temporal, esfenóide e frontal
TS	sutura entre o temporal e o esfenóide em posição caudal
JP	processo jugular
<i>LD</i>	<i>sutura entre o occipital e o interparietal em posição medial</i>
AS	sutura entre os ossos parietal e occipital

Controle para variação ontogenética e dimorfismo sexual

Corrigi os caracteres considerados para efeitos relacionados ao dimorfismo sexual e desenvolvimento, visto que estas fontes de variação não são de interesse no presente contexto. Dessa forma, ajustei uma análise multivariada de covariância (MANCOVA) com interação utilizando sexo e o logaritmo natural da idade como efeitos fixos. Após ajustar o modelo, avaliei a significância desses efeitos sobre os 35 caracteres cranianos através do teste de Wilks. A partir dos resíduos deste modelo, obtive a estimativa da matriz de covariância fenotípica P .

Além disso, calculei matrizes de variância e covariância para indivíduos pertencentes a certas categorias de idade, corrigindo os valores destes indivíduos para o efeito do dimorfismo sexual, e comparei estas matrizes pelo método de Adagas Casualizadas (Subseção 2.2.3), com o objetivo de avaliar a constância dos padrões fenotípicos de

Tabela 3.2: As 35 distâncias euclidianas que calculei sobre os marcos geométricos e as hipóteses de modularidade às quais cada distância pertence.

Distância	Região	Hipótese(s)
ISPM	Face	Oral
ISNSL	Face	Nasal
ISPNS	Face	Oral,Nasal
PMZS	Face	Oral
PMZI	Face	Oral
PMMT	Face	Oral
NSLNA	Face	Nasal
NSLZS	Face	Nasal
NSLZI	Face	Oral,Nasal
NABR	Neurocrânio	Abóbada
NAPNS	Face	Nasal
BRPT	Neurocrânio	Abóbada
BRAPET	Neurocrânio	Abóbada
PTAPET	Neurocrânio	Abóbada
PTBA	Neurocrânio	Abóbada
PTEAM	Neurocrânio	Abóbada
PTZYGO	Face	Zigomático
PTTSP	Face,Neurocrânio	Zigomático,Abóbada
ZSI	Face	Zigomático
ZIMT	Face	Zigomático
ZIZYGO	Face	Zigomático
ZITSP	Face	Zigomático
MTPNS	Face	Oral
PNSAPET	Neurocrânio	Base
APETBA	Neurocrânio	Base
APETTS	Neurocrânio	Base
BAEAM	Neurocrânio	Base
EAMZYGO	Face	Zigomático
ZYGOTSP	Face	Zigomático
LDAS	Neurocrânio	Abóbada
BRLD	Neurocrânio	Abóbada
OPILD	Neurocrânio	Abóbada
PTAS	Neurocrânio	Abóbada
JPAS	Neurocrânio	Abóbada
BAOPI	Neurocrânio	Base

variância e covariância ao longo do desenvolvimento do crânio. Realizei o mesmo procedimento em relação às matrizes representativas de cada sexo, desta vez corrigindo os valores fenotípicos dos indivíduos para o efeito relacionado a suas idades.

Estimativas de herdabilidades e correlações genéticas

De acordo com o exposto na Seção 2.1, estimei as herdabilidades para os 35 caracteres cranianos, utilizando para tal os resíduos do modelo linear descrito anteriormente, adequando assim os dados à abordagem de máxima verossimilhança restrita (REML). Fixando as estimativas de herdabilidade, obtive as estimativas de correlações genéticas aditivas associadas às 595 possíveis combinações par a par entre estes caracteres, de forma a compor a matriz de covariância genética aditiva ao final de todo o processo. Ademais, conforme exposto na Seção 2.1 obtive estimativas para as variâncias, intervalos de confiança e tamanho efetivo de amostra (N_{eff}) para todas as herdabilidades e correlações genéticas que estimei. Também obtive os valores de probabilidade para a comparação dos modelos frente ao modelo nulo e para a aproximação normal de cada parâmetro estimado, de forma a avaliar a hipótese nula de ausência de variação ou covariação herdável para o conjunto de caracteres cranianos.

Comparação entre P e G em Calomys e Akodon

Após obter estimativas para ambas as matrizes fenotípica e genética para *Calomys*, pude avaliar a constância dos padrões de covariância e correlações nos diferentes níveis de organização que estas matrizes representam, além de testar a constância destes padrões ao longo da diversificação dos sigmodontíneos. Para tal, comparei as matrizes *P* e *G* de *Calomys* e *Akodon* através do método de Adagas Casualizadas (Subseção 2.2.3) para as matrizes de covariância e através do teste de Mantel (Subseção 2.2.2) para as de correlação.

Com o objetivo de avaliar quais caracteres representam as principais similaridades e diferenças entre as matrizes *P* e *G* em *Calomys*, avaliei a comparação entre estas matrizes através do método de SRD, exposto na Subseção 2.2.4.

Conforme a explanação contida na Subseção 2.2.1, calculei as repetibilidades associadas às matrizes de covariância e correlação P e G em ambas as espécies, ajustando os valores de correlação entre matrizes em relação à correlação máxima teórica entre estas.

3.2.3 Modularidade

Com o objetivo de testar a correspondência entre os padrões expressos por P e G e hipóteses de modularidade, construí matrizes teóricas de conectividade entre os caracteres cranianos de acordo com suas afinidades com as cinco hipóteses descritas na Tabela 3.2 (Oral, Nasal, Zigomático, Abóbada e Base), de acordo com a compartimentalização no desenvolvimento do crânio de mamíferos que descrevi na Seção 3.1, de forma idêntica às hipóteses formuladas por Porto *et al.* (2009) para Roedores. Outras duas matrizes foram construídas, referentes aos caracteres do Neurocrânio e da Face, de forma a testar a distinção entre fatores de crescimento somático inicial e tardio, respectivamente (Marroig *et al.*, 2004; Porto *et al.*, 2009). Além disso, computei uma matriz relacionada à distinção entre pares de caracteres integrados e não-integrados por estes fatores de crescimento (Neuroface) e uma outra matriz relacionada a esta distinção nas cinco hipóteses de modularidade (Total). Comparei estas matrizes teóricas com as matrizes de correlação P e G de *Calomys* através do teste de Mantel, de acordo com a Subseção 2.3.2.

Também calculei os índices de magnitude de integração morfológica para ambas as matrizes de correlação (Subseção 2.3.1); este índice representa a intensidade de integração total entre os caracteres mandibulares em cada uma das matrizes. Conforme expus na Subseção 2.3.1, obtive distribuições para os valores de r^2 calculados em P e G e testei as diferenças entre estes dois valores através do teste t de Student.

3.3 Resultados

3.3.1 Repetibilidade

Apresento as repetibilidades relacionadas à precisão de mensuração para os caracteres cranianos de *Calomys* na Tabela 3.3. Estas variam entre 0.83 e 0.99, com média 0.98, mediana 0.99 e desvio-padrão 0.03. O valor mais baixo, correspondente ao caráter MTPNS, que possui o menor valor de variância fenotípica dentre todos os caracteres. Assim, atribuo este valor reduzido de repetibilidade a uma aproximação entre a proporção da variância atribuída ao erro e a variância total; de qualquer forma, este valor não é excepcionalmente baixo comparado aos valores de repetibilidade reportados por outros autores (ex.: Cheverud, 1995, 1996b)

Dessa forma, os valores de repetibilidade encontrados indicam que, de forma geral, o impacto do erro de mensuração sobre os caracteres considerados pode ser desconsiderado na interpretação dos resultados que obtive neste capítulo.

Tabela 3.3: Repetibilidades associadas às 35 distâncias euclidianas no crânio.

	Valor		Valor		Valor
ISPM	0.9918	ISNSL	0.9865	ISPNS	0.9979
PMZS	0.9955	PMZI	0.9967	PMMT	0.9929
NSLNA	0.9983	NSLZS	0.9989	NSLZI	0.9989
NABR	0.9931	NAPNS	0.9961	BRPT	0.9542
BRAPET	0.9870	PTAPET	0.9961	PTBA	0.9979
PTEAM	0.9964	PTZYGO	0.9954	PTTSP	0.9787
ZSZI	0.9870	ZIMT	0.9912	ZIZYGO	0.9830
ZITSP	0.9924	MTPNS	0.8316	PNSAPET	0.9910
APETBA	0.9845	APETTS	0.8976	BAEAM	0.9783
EAMZYGO	0.9767	ZYGOTSP	0.9829	LDAS	0.9504
BRLD	0.9800	OPILD	0.9889	PTAS	0.9904
JPAS	0.9879	BAOPI	0.9535		

3.3.2 Padrões de covariâncias fenotípicas e genéticas

Segundo o teste de Wilks, idade, sexo e a interação entre estes fatores afeta significativamente o conjunto total de distâncias tomadas sobre o crânio; ademais, observei que

o efeito do dimorfismo sexual sobre todos os caracteres está relacionado à uma diferença pequena entre sexos, de forma que o impacto do fator sexo é ínfimo em relação a variabilidade de cada caráter. De qualquer forma, visto que o efeito de todos os fatores considerados é significativo, utilizei a matriz de covariância residual do modelo como estimativa de P para *Calomys* (Figura 3.2a).

A comparação entre matrizes de covariância ao longo da ontogênese da espécie (Tabela 3.4) evidencia a constância de padrões de covariância no desenvolvimento, indicando que a remoção do efeito relacionado à estratificação etária sobre os caracteres cranianos tem um impacto negligenciável nas análises que apresento. Da mesma forma, não há diferenças entre sexos em relação aos padrões de covariância fenotípica (Tabela 3.5), de forma que a estimativa de P que obtive é consistente em relação à amostra como um todo.

Herdabilidades

As estimativas de herdabilidade que obtive estão resumidas na Tabela 3.6 e na Figura 3.3. Seus valores estão contidos no intervalo entre 0.05 e 0.55, com média 0.31 e desvio padrão de 0.1. Dentre os 35 caracteres cranianos, apenas três valores de herdabilidade se mostraram significativamente indistintos ao valor zero, segundo o critério de intervalos de confiança, com valor crítico de 0.05. Porém, segundo o critério de *likelihood-ratio*, todas as herdabilidades que estimei são significativas. Dessa forma, adotei uma abordagem mais conservadora e passei a considerar o primeiro destes critérios para estimar a significância dos modelos, especialmente após inspecionar o comportamento das curvas da função de verossimilhança e perceber que estas são, de modo geral, bem aproximadas por distribuições normais. Assim sendo, a Tabela 3.6 reporta os valores de probabilidade associados ao critério de intervalos de confiança.

Tabela 3.4: Comparação entre matrizes fenotípicas cranianas em sete faixas etárias. Os valores nas diagonais representam as repetibilidades associadas às matrizes comparadas. Abaixo das diagonais figuram os valores de correlação original entre as matrizes; acima das diagonais encontram-se os valores corrigidos de acordo com as repetibilidades. Todos os valores são significativamente diferentes de zero ($P(\alpha) = 10^{-2}$). Os tamanhos de amostra de cada categoria de idade também estão indicados.

a: Comparação entre matrizes de covariância									
	20 $n = 21$	30 $n = 26$	50 $n = 52$	100 $n = 60$	200 $n = 47$	300 $n = 30$	400 $n = 30$		
20	0.8695	0.7707	0.8252	0.8595	0.8318	0.7785	0.7998		
30	0.6827	0.9026	0.8571	0.8118	0.8684	0.8599	0.8855		
50	0.7525	0.7964	0.9564	0.8884	0.8753	0.8254	0.8911		
100	0.7831	0.7536	0.8489	0.9547	0.8418	0.8250	0.8763		
200	0.7542	0.8022	0.8324	0.7998	0.9456	0.9067	0.8944		
300	0.7048	0.7931	0.7837	0.7826	0.8560	0.9426	0.8288		
400	0.7214	0.8137	0.8429	0.8282	0.8413	0.7784	0.9356		

b: Comparação entre matrizes de correlação									
	20 $n = 21$	30 $n = 26$	50 $n = 52$	100 $n = 60$	200 $n = 47$	300 $n = 30$	400 $n = 30$		
20	0.3186	1.7688	1.7454	1.7506	1.8011	1.9414	1.6970		
30	0.7372	0.5452	1.3606	1.3338	1.4447	1.5751	1.3584		
50	0.7959	0.8117	0.6527	1.3303	1.4651	1.5191	1.4021		
100	0.8169	0.8143	0.8886	0.6836	1.3699	1.4725	1.3340		
200	0.7781	0.8164	0.9059	0.8669	0.5858	1.6103	1.4458		
300	0.7853	0.8334	0.8795	0.8724	0.8832	0.5135	1.5549		
400	0.7468	0.7820	0.8831	0.8599	0.8627	0.8687	0.6078

Figura 3.2: Estimativas das matrizes de correlação fenotípica (a) e genética (b) craniana para a população de *Calomys expulsus*. Correlações positivas são indicadas por tons mais claros de cinza, enquanto tons mais escuros indicam correlações negativas, de acordo com a legenda. Os pontos indicam correlações estatisticamente idênticas a zero ($P(\alpha) = 0.05$).

Tabela 3.5: Correlação entre as matrizes fenotípicas cranianas de machos (M) e fêmeas (F). Os valores nas diagonais representam as repetibilidades associadas às matrizes comparadas. Abaixo das diagonais figuram os valores de correlação original entre as matrizes; acima das diagonais encontram-se os valores corrigidos de acordo com as repetibilidades. Todos os valores são significativamente diferentes de zero, para $P(\alpha) \leq 10^{-4}$. Os tamanhos de amostra para os dois sexos também estão indicados.

a: Comparação entre matrizes de covariância.			b: Comparação entre matrizes de correlação.		
	M	F		M	F
	$n = 173$	$n = 192$		$n = 173$	$n = 192$
M	0.9929	0.9752	M	0.9412	1.0475
F	0.9681	0.9928	F	0.9875	0.9442

Figura 3.3: Distribuição de densidades das estimativas de herdabilidade para os 35 caracteres cranianos; além disso, são indicados os intervalos de confiança de 95% para cada uma das estimativas. Os pontos maiores representam aquelas correlações significativamente diferentes de zero ($P(\alpha) = 0.05$).

Correlações Genéticas

A Figura 3.2b resume as estimativas de correlações genéticas que obtive. Estas estão contidas no intervalo entre -0.86 e 0.99 , com média 0.51 e desvio-padrão 0.26 . Cerca de 25% das estimativas são idênticas ao valor nulo segundo o critério de intervalos de confiança; algumas destas correlações são associadas àqueles caracteres para os quais não foi possível rejeitar a hipótese de herdabilidade nula, com exceção ao caráter ISNSL, que possui estimativa de herdabilidade marginalmente significativa. O caráter BAOPI apresenta o comportamento inverso: uma herdabilidade alta associada a um grande número de correlações genéticas indistintas de zero. Da mesma forma que nas estimativas de herdabilidade, todas as correlações são significativamente diferentes de zero segundo o critério de comparação ao modelo nulo por *likelihood-ratio*; adotando novamente a postura conservadora, reporto na Figura 3.2b as correlações indistintas de zero em relação ao critério intervalar.

A partir das estimativas de herdabilidades e correlações genéticas, pude compor a matriz G de *Calomys*, que resume as informações sobre variâncias e covariâncias genéticas aditivas em uma única entidade matemática.

Comparações entre matrizes

As matrizes P e G que obtive (Figura 3.2) apresentam, no que concerne sua autoestrutura, a predominância do primeiro autovalor sobre os demais (Figura 3.4), de maneira que cerca de 47% da variância multivariada total que a matriz fenotípica apresenta se alinha ao primeiro autovetor. Em relação à matriz genética essa predominância é ainda mais marcante, visto que cerca de 66% da variância associada a ela se concentra na direção associada ao primeiro autovalor. Esta direção, em ambas as matrizes (representada na Tabela 3.7 pela direção de máxima variação de G), apresenta praticamente todos os seus componentes com o mesmo sinal (à exceção do caráter BAOPI), representando a variação alométrica. Pode-se também observar (Figura 3.4) que a distribuição de autovalores da matriz G possui uma cauda de valores negativos após seu vigésimo autovalor; o mesmo comportamento não é observado na matriz P .

Tabela 3.6: Estimativas de herdabilidades associadas às 35 distâncias euclidianas crani-
anas, com suas respectivas variâncias e intervalos de confiança. Em *itálico*, destacam-
se aquelas herdabilidades que não se mostraram significativamente diferentes de zero
($P(\alpha) = 0.05$), segundo a probabilidade associada à região crítica do intervalo de con-
fiança, na quinta coluna. São também indicados os tamanho efetivos de amostra para
cada estimativa.

	Média	Variância	IC-	IC+	P	N_{eff}
ISPM	0.3115	0.0098	0.1418	0.5129	0.0017	20.7315
ISNSL	<i>0.1457</i>	0.0064	0.0283	0.3345	0.0691	7.6078
ISPNS	0.3992	0.0105	0.2115	0.5984	0.0001	31.2796
PMZS	0.3117	0.0108	0.1284	0.5179	0.0028	18.9310
PMZI	0.2535	0.0099	0.0889	0.4586	0.0108	14.0073
PMMT	0.3119	0.0097	0.1439	0.5124	0.0015	21.0701
NSLNA	0.3436	0.0104	0.1639	0.5460	0.0008	23.6907
NSLZS	0.3201	0.0102	0.1446	0.5231	0.0016	21.0287
NSLZI	0.2862	0.0097	0.1204	0.4885	0.0037	17.8501
NABR	0.2674	0.0094	0.1060	0.4686	0.0058	16.2234
NAPNS	0.2787	0.0095	0.1169	0.4801	0.0042	17.4201
BRPT	0.4270	0.0103	0.2383	0.6229	0.0000	36.3455
BRAPET	0.4082	0.0095	0.2316	0.6001	0.0000	36.1158
PTAPET	0.3513	0.0095	0.1789	0.5467	0.0003	26.8944
PTBA	0.3293	0.0096	0.1586	0.5274	0.0008	23.4941
PTEAM	0.2919	0.0092	0.1291	0.4898	0.0024	19.4437
PTZYGO	0.2452	0.0087	0.0917	0.4429	0.0087	14.7499
PTTSP	0.3215	0.0093	0.1526	0.5164	0.0009	23.1891
ZSZI	<i>0.0541</i>	0.0040	0.0000	0.2186	0.3956	2.4434
ZIMT	0.3064	0.0117	0.1132	0.5173	0.0046	17.0637
ZIZYGO	0.3438	0.0105	0.1606	0.5453	0.0008	23.5841
ZITSP	0.2357	0.0086	0.0873	0.4350	0.0111	13.9055
MTPNS	0.3634	0.0092	0.1944	0.5562	0.0002	29.7420
PNSAPET	0.3057	0.0095	0.1397	0.5049	0.0017	20.6741
APETBA	0.2556	0.0085	0.1035	0.4497	0.0054	16.4576
APETTS	0.3953	0.0107	0.2044	0.5954	0.0001	30.1533
BAEAM	0.2705	0.0088	0.1118	0.4654	0.0040	17.6073
EAMZYGO	0.4239	0.0102	0.2385	0.6204	0.0000	36.1888
ZYGOTSP	<i>0.1389</i>	0.0076	0.0067	0.3364	0.1106	6.0911
LDAS	0.5501	0.0098	0.3546	0.7350	0.0000	62.7865
BRLD	0.4832	0.0100	0.2908	0.6728	0.0000	47.7202
OPILD	0.2599	0.0092	0.0994	0.4587	0.0066	15.7402
PTAS	0.3881	0.0100	0.2069	0.5840	0.0001	31.2381
JPAS	0.1899	0.0073	0.0570	0.3802	0.0261	10.8988
BAOPI	0.5184	0.0095	0.3301	0.7039	0.0000	57.2964
Média	0.3168					20.2906

Tabela 3.7: Autovetores associados aos cinco primeiros autovalores da matriz de covariância G .

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
ISPM	-0.1334	-0.0446	0.0734	0.0267	0.1091
ISNSL	-0.0549	0.0621	-0.0256	0.0058	-0.0373
ISPNS	-0.2892	-0.1471	-0.1809	0.2012	0.2990
PMZS	-0.1823	-0.1435	-0.1307	-0.1740	-0.0305
PMZI	-0.1917	-0.2050	-0.0969	-0.1975	-0.1847
PMMT	-0.1435	-0.0225	-0.1772	0.1822	0.1148
NSLNA	-0.3449	-0.2042	-0.2853	0.1362	-0.0518
NSLZS	-0.3255	-0.2254	-0.0757	-0.0384	-0.1157
NSLZI	-0.3454	-0.2205	0.0284	-0.0362	-0.2096
NABR	-0.1681	-0.0879	0.5090	0.3716	0.0679
NAPNS	-0.1606	0.0066	-0.0133	0.3134	0.0683
BRPT	-0.0762	0.1435	0.0044	-0.0791	-0.2595
BRAPET	-0.1573	0.2014	-0.1087	0.0447	-0.0235
PTAPET	-0.1838	0.2871	-0.0215	0.0763	-0.1053
PTBA	-0.2416	0.2333	0.0913	-0.0920	-0.1892
PTEAM	-0.2021	0.3193	0.0384	-0.0346	-0.0435
PTZYGO	-0.1465	0.2924	-0.0633	-0.0255	0.0138
PTTSP	-0.0792	0.2145	-0.1630	0.1167	0.0403
ZSZI	-0.0632	0.0159	0.2400	0.0132	0.0043
ZIMT	-0.1060	-0.1282	-0.0590	-0.1153	-0.0972
ZIZYGO	-0.1255	-0.0082	0.1143	0.1298	0.5507
ZITSP	-0.1305	-0.1730	-0.0140	-0.0331	0.0986
MTPNS	-0.0312	-0.0014	0.0535	-0.0015	0.1717
PNSAPET	-0.1405	-0.0344	0.2865	-0.0898	-0.1354
APETBA	-0.1115	-0.0371	0.0280	-0.1193	-0.0150
APETTS	-0.0443	0.1090	-0.0071	0.0949	0.0952
BAEAM	-0.0797	0.0506	0.0316	0.0548	0.0017
EAMZYGO	-0.1366	0.0327	-0.1081	0.0456	-0.0190
ZYGOTSP	-0.0623	-0.1955	0.2146	-0.2418	0.0201
LDAS	-0.0659	0.1921	-0.0712	-0.3056	0.1310
BRLD	-0.1949	0.0380	0.1730	-0.5643	0.3934
OPILD	-0.1168	0.1069	0.2159	0.1403	-0.2914
PTAS	-0.1957	0.3615	0.1422	-0.0231	0.1028
JPAS	-0.0955	0.1303	0.0461	-0.0102	-0.0805
BAOPI	0.0023	0.1690	-0.4250	-0.0470	0.0841

No que se refere às outras dimensões de máxima variação em G (Tabela 3.7), estas apresentam contrastes entre caracteres em diferentes regiões, como por exemplo o segundo componente principal, que apresenta direções de variação negativa para caracteres na face e basicrânio, enquanto aponta para a direção oposta para caracteres da abóbada craniana.

Figura 3.4: Distribuição de autovalores para as matrizes de correlação fenotípica (P) e genética (G) craniana.

As repetibilidades e comparações pareadas entre matrizes cranianas estão resumidas na Tabela 3.8. De modo geral, as matrizes P e G de *Calomys* e *Akodon* apresentam constância nos padrões expressos, de forma que as correlações entre estas matrizes são significativas em relação a níveis críticos até menores do que 5% em alguns casos. Ressalto que algumas comparações entre matrizes de correlação exibem valores maiores do que as correlações máximas teóricas possíveis, de forma que estas correlações (à exceção da comparação entre matrizes P das duas espécies), corrigidas para repetibilidades, excedem o valor unitário.

Tabela 3.8: Correlação entre as matrizes genética e fenotípica cranianas de *Akodon* e *Calomys*. Os valores nas diagonais representam as repetibilidades associadas às matrizes comparadas. Abaixo das diagonais figuram os valores de correlação original entre as matrizes; acima das diagonais encontram-se os valores corrigidos de acordo com as repetibilidades. Todos os valores são significativamente diferentes de zero ($P(\alpha) = 0.05$).

a: Comparação entre matrizes de covariância.					
		Calomys		Akodon	
		<i>P</i>	<i>G</i>	<i>P</i>	<i>G</i>
Calomys	<i>P</i>	0.9962	1.0124	0.8876	0.8657
	<i>G</i>	0.8599	0.7242	0.8847	0.9474
Akodon	<i>P</i>	0.8784	0.7464	0.9830	0.9832
	<i>G</i>	0.7162	0.6683	0.8080	0.6870
b: Comparação entre matrizes de correlação.					
		Calomys		Akodon	
		<i>P</i>	<i>G</i>	<i>P</i>	<i>G</i>
Calomys	<i>P</i>	0.9404	1.5580	0.9791	1.2197
	<i>G</i>	0.9397	0.3868	1.3876	1.7897
Akodon	<i>P</i>	0.8996	0.8177	0.8977	1.3774
	<i>G</i>	0.7764	0.7307	0.8566	0.4309

Em relação à identificação dos caracteres que representam as principais diferenças em relação às matrizes *P* e *G* de *Calomys*, a aplicação do método SRD para a comparação destas (Figura 3.5) permitiu-me observar que caracteres que apresentam um número maior de correlações genéticas indistintas de zero são aqueles que compõem as principais diferenças entre *P* e *G*; há também uma correlação positiva entre escores SRD e herdabilidade (Figura 3.6). O caráter BAOPI, apesar de possuir um valor alto de herdabilidade, figura entre os caracteres que representam as diferenças entre as matrizes *P* e *G* de *Calomys*.

3.3.3 Modularidade em *Calomys*

Em relação aos coeficientes de magnitude de integração morfológica r^2 , obtive um valor de 0.1497 para a matriz *P* e 0.3360 para a matriz *G* de *Calomys*; segundo o teste realizado sobre as distribuições geradas a partir do método *Monte-Carlo* (Figura 3.7),

estes dois valores são significativamente diferentes.

Quanto aos testes de modularidade para esta espécie, apresento estes resultados na Tabela 3.9; de forma geral, as matrizes P e G comportam-se de forma bastante similar no que diz respeito aos seus padrões de modularidade. Em ambas as matrizes, é possível observar a evidência das regiões oral e nasal como módulos distintos. A matriz G (Tabela 3.9b) apresenta a região da face significativamente modularizada, além de evidenciar a distinção entre pares de caracteres integrados ao longo do crescimento inicial e tardio, associando-se significativamente à matriz Neuroface; a matriz fenotípica (Tabela 3.9a) apresenta apenas uma associação marginalmente significativa com estas duas matrizes. Além disso, as duas matrizes apresentam uma correlação significativa com a matriz de integração total, havendo portanto uma distinção entre pares de caracteres integrados e não-integrados, com correlações 15% maiores em P e 11% maiores em G entre pares de caracteres integrados.

3.4 Discussão

A herdabilidade média dos caracteres cranianos (0.31) é compatível com a compilação feita por Mousseau & Roff (1987) de valores de herdabilidade para caracteres morfológicos em animais endotérmicos; este valor de herdabilidade média também é compatível com outras estimativas de herdabilidade para caracteres cranianos, sendo apenas um pouco menor do que aquelas observadas por Cheverud (1988), Cheverud (1995) e de Conto (2007) para as espécies *Macaca mulata*, *Saguinus fuscicollis* e *Akodon cursor*, respectivamente. Em relação às herdabilidades individuais de cada caráter, observo que aquelas estimativas indistintas do valor nulo estão associadas à valores baixos de tamanho efetivo de amostra, de forma que estas estimativas podem ser afetadas por um tamanho amostral inadequado, e não por uma ausência de variação herdável nestes caracteres (Cheverud, 1988, 1995).

A matriz G que estimei para *Calomys* possui autovalores negativos, o que significa que existem combinações lineares de caracteres que possuem herdabilidades negativas. Embora matrizes de covariância dessa forma sejam impossíveis na realidade, a

Figura 3.5: Comparação entre as matrizes de covariância fenotípica e genética craniana de *Calomys* através do método RSD. À esquerda, estimativas de valores médios de RSD para as 39 distâncias euclidianas com seus respectivos intervalos de confiança de 95%. À direita, a relação entre média e desvio padrão centralizados destes escores; pontos vazados indicam caracteres cujos valores nestes dois parâmetros são significativamente menores que o valor médio para $P(\alpha) = 0.025$.

Figura 3.6: Gráfico de dispersão entre as 35 estimativas de herdabilidade para os caracteres cranianos e seus valores médios de SRD para a comparação entre P e G em *Calomys*. A curva de regressão expressa a relação $SRD = 1.027 + 0.076 * \log(h^2)$; ambos os coeficientes da equação são significativamente diferentes de zero ($P(\alpha) = 0.01$).

probabilidade de obter-se uma estimativa de matriz com essas características é bastante alta (Hill & Thompson, 1978). No caso da matriz G estimada aqui, o problema se agrava pela constatação de que o tamanho efetivo médio da amostra (20 indivíduos) é menor do que o número de caracteres contidos na matriz.

As estimativas de correlações genéticas se mostram, em média, mais altas do que as correlações fenotípicas; isto pode ser observado pela diferença significativa entre os valores de r^2 calculados para as duas matrizes ($r_P^2 = 0.1497$ e $r_G^2 = 0.3360$). Novamente, ressalto que existe uma relação negativa entre diferenças na correlação média entre matrizes P e G e tamanho efetivo de amostra (Cheverud, 1988), de maneira que a diferença entre magnitudes de integração morfológica em P e G pode ser devida à amostragem inadequada.

De qualquer forma, os padrões expressos pelas matrizes P e G em *Calomys* e *Akodon*

Tabela 3.9: Hipóteses de integração morfológica sobre as matrizes cranianas P e G . O coeficiente Γ representa a correlação entre cada matriz de correlação e as matrizes associadas às nove hipóteses de modularidade; valores de Γ em negrito representam correlações significativamente diferentes de zero para $P(\alpha) = 0.05$; valores em itálico representam correlações significativas para $P(\alpha) = 0.1$. São também listadas as correlações médias internas (AVG+) e externas (AVG-) a cada módulo, bem como a razão entre estes valores.

a: Matriz Fenotípica									
	Oral	Nasal	Zigomático	Base	Abóbada	Face	Neuro	Neuroface	Total
Γ	0.2298	0.2464	0.1460	0.0619	0.3085	0.5261	0.3640	0.6349	0.4578
P	0.0500	0.0020	0.7990	0.9130	0.3300	0.1000	0.7740	0.0530	0.0230
AVG+	0.4733	0.6005	0.2604	0.1847	0.3584	0.3798	0.2946	0.3420	0.3665
AVG-	0.3242	0.3224	0.3328	0.3319	0.3258	0.3091	0.3397	0.3160	0.3181
Razão	1.4602	1.8626	0.7824	0.5566	1.1001	1.2285	0.8671	1.0824	1.1520
b: Matriz Genética									
	Oral	Nasal	Zigomático	Base	Abóbada	Face	Neuro	Neuroface	Total
Γ	0.2300	0.2250	0.1582	0.0620	0.3250	0.5536	0.3992	0.6789	0.4697
P	0.0170	0.0000	0.8370	0.9500	0.2570	0.0370	0.7270	0.0050	0.0320
AVG+	0.7097	0.8214	0.4228	0.2771	0.5656	0.5986	0.4840	0.5478	0.5633
AVG-	0.5125	0.5117	0.5242	0.5236	0.5137	0.4876	0.5300	0.4892	0.5061
Razão	1.3848	1.6054	0.8065	0.5292	1.1010	1.2277	0.9133	1.1198	1.1131

Figura 3.7: Histograma de frequência da distribuição dos valores obtidos para o coeficiente de magnitude de integração r^2 para P e G através do método *Monte-Carlo*. Os pontos sobre o eixo das abscissas representam os valores originais de r^2 para as duas matrizes. As duas matrizes apresentam coeficientes de magnitude de integração significativamente diferentes, para $P(\alpha) \leq 10^{-4}$.

se mostram extremamente similares, tanto em relação a padrões de covariância quanto de correlação, o que reforça a hipótese de similaridade entre P e G formulada por Cheverud (1988), além de reforçar o quadro de manutenção dos padrões de covariância entre caracteres cranianos na evolução dos diversos clados de mamíferos (Marroig & Cheverud, 2001; Porto *et al.*, 2009; de Oliveira *et al.*, 2009; Shirai & Marroig, 2010).

O método de SRD (Figura 3.5) indica que as dissimilaridades entre P e G se relacionam àqueles caracteres que apresentam uma concentração de correlações genéticas estatisticamente indistintas do valor nulo; apesar de haver uma associação entre herdabilidade e índices SRD (Figura 3.6), o método SRD aponta para um quadro de diver-

gências localizadas entre P e G , de forma a não afetar o quadro geral de similaridade entre as duas matrizes.

Dentre os caracteres que representam as dissimilaridades entre P e G está o caráter BAOPI, que representa a altura da abertura do forame magno (Tabela 3.2); este caráter possui uma das mais altas estimativas de herdabilidade e o maior número de correlações genéticas nulas (Figura 3.2b). O caráter também se destaca dos demais por se mostrar invariante em relação ao componente alométrico em P e G (Tabela 3.7). Uma possível explicação reside na ausência de covariação genética entre este caráter e outros caracteres cranianos; ressalto que certos autores (ex.: Kessel *et al.*, 1990; Skuntz *et al.*, 2009) encontraram evidências que relacionam o controle do desenvolvimento na região do basioccipital à genes associados ao desenvolvimento do esqueleto axial, em particular da articulação entre o crânio e o primeiro elemento deste esqueleto. Portanto, sugiro aqui que o caráter possa estar mais geneticamente integrado ao esqueleto axial do que ao crânio propriamente dito, o que explicaria seu índice de herdabilidade alto associado à uma concentração de correlações genéticas nulas na matriz genética craniana.

Em relação aos padrões de modularidade expressos pelas duas matrizes de *Calomys*, ressalto que estas matrizes se comportam de forma bastante similar ao comportamento de matrizes similares em outras taxa dentre os mamíferos (Marroig & Cheverud, 2001; Porto *et al.*, 2009; de Oliveira *et al.*, 2009; Shirai & Marroig, 2010), que apresentam, de modo geral, integração significativa nos elementos da face; os resultados que apresento são também similares ao observado por Willmore *et al.* (2006) para caracteres cranianos em *Mus musculus*. Este comportamento também é observado na matrizes de *Akodon*, embora o comportamento da matriz G nesta espécie ser um pouco diferente por não apresentar a região oral modularizada em relação aos outros componentes (de Conto, 2007; Porto *et al.*, 2009). Ressalto aqui que observar as direções de maior variância em G (Tabela 3.7) leva a conclusão que o componente alométrico é o principal responsável pela covariância entre os caracteres cranianos, enquanto que os efeitos regionalizados dentro de cada módulo atuam em segundo plano na determina-

ção destes padrões de covariância. Assim, sugiro aqui um quadro de independência relativa dos componentes morfogenéticos do crânio, associados a um fator de integração entre regiões (Marroig *et al.*, 2004), representado pelo componente alométrico.

Ainda que o efeito do componente alométrico seja mais pronunciado na matriz *G* do que em *P* (Figura 3.4), o que pode ser observado pela diferença na magnitude de integração morfológica entre as duas matrizes (Figura 3.7), atribuo esta diferença ao viés na estimativa da variância dos autovalores em *G* (Meyer & Kirkpatrick, 2008) e não a diferenças reais no efeito do componente alométrico. Visto que o viés na estimativa da variância de autovalores em uma matriz de covariância é proporcional à razão entre o número de caracteres e o tamanho da amostra (Cheverud *et al.*, 1989; Meyer & Kirkpatrick, 2008), a estimativa deste parâmetro em *G* e sua relação com o parâmetro populacional deve ser interpretada com extrema cautela. Este viés na variância dos autovalores em *G* também é responsável pela cauda de autovalores negativos; dessa forma, não acredito que hajam razões para creditar a existência de autovalores negativos em *G* a redução da dimensionalidade desta matriz em relação à *P*.

Concluo aqui que os resultados que obtive para a relação entre fenótipo, genótipo e modularidade na covariância de caracteres cranianos para a população de *Calomys expulsus* não diferem daqueles obtidos para os outros mamíferos como um todo, de maneira a reforçar a hipótese de manutenção da arquitetura genética associada à variação morfológica craniana na evolução do grupo.

Capítulo 4

Genética quantitativa de caracteres mandibulares em *Calomys expulsus*

4.1 Introdução

A mandíbula de mamíferos se origina a partir de células da crista neural e do mesoderma paraxial que migram para a região do primeiro arco mandibular, formando o mesênquima embrionário (Chai *et al.*, 2000), que irá se diferenciar em tecido esquelético, dentário e conjuntivo. As células mesenquimais que se agregarem ao redor da cartilagem de Meckel (Ramaesh & Bard, 2003) se diferenciam formando os componentes morfogenéticos da mandíbula (Atchley & Hall, 1991). Cada hemimandíbula é composta por um único osso dentário, que consiste de duas regiões distintas: o processo alveolar na região anterior, composto principalmente pelas regiões alveolares suportando os dentes incisivo e molares; e o ramo ascendente posterior, composto pelos processos coronoide, condilar e angular associados à região massetérica central.

Diversos autores (ex: Cheverud *et al.*, 1997; Mezey *et al.*, 2000, Klingenberg *et al.*, 2001, 2003, 2004) buscaram testar a correspondência entre a ontogênese dos componentes da mandíbula e os padrões de covariância genética ou fenotípica de caracteres desta estrutura.

Alguns destes trabalhos (Cheverud *et al.*, 1997; Mezey *et al.*, 2000) atestam a compartimentalização de efeitos pleiotrópicos na mandíbula, sustentando a hipótese de distinção entre o processo alveolar e o ramo ascendente. Hall (2003), em uma com-

pilação sobre os efeitos de silenciamento de genes homeóticos sobre os componentes morfogênicos da mandíbula, argumenta que os efeitos destes experimentos afeta a forma mandibular de forma modular; por exemplo, o gene *gooseoid* (Rivera-Pérez *et al.*, 1995), responsável pelo desenvolvimento de uma série de elementos esqueléticos e que, quando silenciado, afeta o desenvolvimento dos processos coronoide e angular, de forma a suprimir estes elementos na composição da mandíbula.

Outros trabalhos (Klingenberg & Leamy, 2001; Klingenberg *et al.*, 2001) sugerem que a mandíbula se comporta de forma integrada, não havendo, portanto, uma distinção clara entre seus dois componentes morfogênicos. Ademais, Klingenberg & Leamy (2001) atestam a similaridade entre padrões de covariância fenotípicos e genéticos na mandíbula de *Mus musculus*. Finalmente, Klingenberg *et al.* (2004) argumenta que a questão não reside na distinção entre um quadro de partições modulares conspícuas ou estruturas totalmente integradas, mas sim na determinação da dependência relativa entre os componentes morfogênicos na mandíbula.

Quero ressaltar que estes trabalhos versam sobre a variação de forma mandibular em *Mus musculus*, o camundongo comum de laboratório, pertencente à família Muridae; este grupo se separou da família Cricetidae, a qual pertence o gênero *Calomys*, há cerca de 23 milhões de anos (Steppan *et al.*, 2004).

4.1.1 Objetivos

No presente capítulo, mostro como obtive matrizes que representam os padrões de covariância e correlação fenotípicos e genéticos para caracteres representativos da mandíbula na população de *Calomys expulsus*, com o objetivo central de testar a correspondência entre os padrões expressos nestes dois níveis de organização, bem como testar a correspondência entre estes padrões e hipóteses de modularidade associadas ao desenvolvimento da mandíbula em mamíferos.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Aquisição de dados

As principais diferenças metodológicas no uso da mandíbula como modelo em relação ao crânio se referem à aquisição de dados. A mandíbula dos mamíferos é uma estrutura simétrica, dividida em duas hemimandíbulas conectadas através da sínfise mandibular; cada hemimandíbula é essencialmente uma estrutura bidimensional, e pode ser representada desta forma. Assim sendo, a tomada de medidas lineares em mandíbulas pode ser realizada através de *software* competente sobre fotografias tiradas previamente. Consequentemente, o processo de aquisição de dados é mais longo, por consistir em duas etapas distintas. Além disso, uma fonte de erro é introduzida na mensuração, referente à possível diferença entre a mandíbula real e sua representação na forma de um registro fotográfico; esta fonte de erro se soma àquela intrínseca ao processo de mensuração.

Aquisição de imagens

Fotografei os indivíduos quando ao menos uma de suas hemimandíbulas se encontrava intacta; se as duas estavam intactas, ambas as estruturas foram fotografadas. No caso das hemimandíbulas ainda estarem conectadas pela sínfise mandibular, destruí esta conexão com o auxílio de um estilete. Tomei as imagens utilizando uma câmera Nikon Coolpix 4500 acoplada à lupa Nikon SMZ 1000. Fotografei cada hemimandíbula separadamente, acompanhada de uma tira de papel milimetrado para o escalonamento das medidas tomadas. Amostrei um total de 228 indivíduos desta forma.

Seleção de marcos geométricos e digitalização

Os onze marcos geométricos que selecionei para representar a forma mandibular em *Calomys expulsus* (Figura 4.1) foram escolhidos com base em trabalhos anteriores relacionados à morfologia mandibular de Roedores (ex.: Cheverud *et al.*, 1997; Klingenberg & Leamy, 2001; Klingenberg *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2005). A descrição detalhada

da posição destes marcos geométricos encontra-se na Tabela 4.1.

Registrei os marcos geométricos considerados sobre as fotografias através do programa tpsDig2 (Rohlf, 2006). Posteriormente, converti os onze marcos geométricos em 25 distâncias lineares (Figura 4.1; Tabela 4.2). Para os indivíduos com ambas as hemimandíbulas disponíveis, considerei as médias de cada distância em ambos os lados; no caso contrário, contabilizei apenas as medidas correspondentes ao lado disponível, tomando-a como representativa da média entre os dois lados.

Figura 4.1: Posição dos onze marcos geométricos sobre a hemimandíbula esquerda de um indivíduo adulto de *Calomys expulsus* em vista lateral. As linhas ligando os pontos indicam as 25 distâncias euclidianas consideradas. A linha pontilhada central indica a divisão entre o processo alveolar à esquerda e o ramo ascendente à direita.

Repetibilidade

Dentre os 228 indivíduos que amostramos, fotografamos novamente a mandíbula de trinta indivíduos, que também tiveram suas medidas lineares tomadas duas vezes para cada conjunto distinto de fotos. A partir destas quatro réplicas, pude construir uma estimativa de repetibilidade (Falconer & Mackay, 1996) associada à imprecisão na mensuração e na tomada de imagens.

Para cada caráter, ajustei um modelo linear com identificação e a interação entre

identificação e fotografia como fatores, determinando assim uma ANOVA hierárquica. Considerei então o valor de repetibilidade de cada caráter como sendo a porcentagem da variância total explicada apenas pelo fator identificação isolado, excluindo, portanto, aquela variação associada aos erros no registro fotográfico das mandíbulas e durante a mensuração. Além disso, investiguei cada variável em relação à desvios da normalidade através da observação de gráficos contendo a relação entre quantis teóricos e quantis da amostra.

Tabela 4.1: Descrição dos onze marcos geométricos registrados sobre a mandíbula de *C. expulsus*.

Marco	Descrição
DA	Limite dorsal do alvéolo do i1
MA	Limite anterior do alvéolo do m1
MP	Limite posterior do alvéolo do m1
COR	Limite dorsal do processo coronoide
MCA	Limite anterior do côndilo mandibular
MCP	Limite posterior do côndilo mandibular
ANG	Limite posterior do processo angular
IDM	Ponto de inflexão dorsal máxima entre o processo angular e a região alveolar
RT	Ponto de inflexão ventral máxima da raiz do i1
VC	Ponto de inflexão ventral máxima do queixo
VA	Limite ventral do alvéolo do i1

4.2.2 Estimativas de matrizes de covariância e correlação

A partir das estimativas de repetibilidade, utilizei a média tomada entre os dois conjuntos de mensurações para cada indivíduo em todas as análises subsequentes.

Controle para variação ontogenética e dimorfismo sexual

Corrigi os caracteres considerados para efeitos relacionados ao dimorfismo sexual e desenvolvimento, visto que estas fontes de variação não são de interesse no presente contexto. Dessa forma, ajustei uma análise multivariada de covariância (MANCOVA) com interação utilizando sexo e o logaritmo natural da idade como efeitos fixos. Após ajustar o modelo, avaliei a significância desses efeitos sobre os 25 caracteres mandibu-

lares através do teste de Wilks. A partir dos resíduos deste modelo, obtive a estimativa da matriz de covariância fenotípica P .

Além disso, calculei matrizes de variância e covariância para indivíduos pertencentes a certas categorias de idade, corrigindo os valores destes indivíduos para o efeito do dimorfismo sexual, e comparei estas matrizes pelo método de Adagas Casualizadas (Subseção 2.2.3), com o objetivo de avaliar a constância dos padrões fenotípicos de variância e covariância ao longo do desenvolvimento da mandíbula. Realizei o mesmo procedimento em relação às matrizes representativas de cada sexo, desta vez corrigindo os valores fenotípicos dos indivíduos para o efeito relacionado a suas idades.

Tabela 4.2: As vinte e cinco distâncias euclidianas que calculei mandíbula de *C. expulsus* e suas afinidades com os dois módulos hipotéticos.

Distância	Grupo	Distância	Grupo
DAMA	Processo Alveolar	DAMP	Processo Alveolar
MAMP	Processo Alveolar	CORMCA	Ramo Ascendente
CORMCP	Ramo Ascendente	MCAMCP	Ramo Ascendente
CORANG	Ramo Ascendente	MCAANG	Ramo Ascendente
MCPANG	Ramo Ascendente	CORIDM	Ramo Ascendente
MCAIDM	Ramo Ascendente	MCPIDM	Ramo Ascendente
ANGIDM	Ramo Ascendente	DART	Processo Alveolar
MART	Processo Alveolar	MPRT	Processo Alveolar
DAVC	Processo Alveolar	MAVC	Processo Alveolar
MPVC	Processo Alveolar	RTVC	Processo Alveolar
DAVA	Processo Alveolar	MAVA	Processo Alveolar
MPVA	Processo Alveolar	RTVA	Processo Alveolar
VCVA	Processo Alveolar		

Estimativas de herdabilidades e correlações genéticas

De acordo com o exposto na Seção 2.1, estimei as herdabilidades para os 25 caracteres mandibulares, utilizando para tal os resíduos do modelo linear descrito anteriormente, adequando portanto os dados à abordagem de máxima verossimilhança restrita (REML). Fixando as estimativas de herdabilidade, obtive as estimativas de correlações genéticas aditivas associadas às 300 possíveis combinações pareadas entre estes caracteres, de forma a compor a matriz de covariância genética aditiva ao final de todo o processo. Ademais, conforme exposto na Seção 2.1 obtive estimativas para as vari-

âncias, intervalos de confiança (considerando uma aproximação normal) e tamanho efetivo de amostra (N_{eff}) para todas as herdabilidades e correlações genéticas que estimei. Também obtive os valores de probabilidade para a comparação dos modelos frente ao modelo nulo e para a aproximação normal de cada parâmetro estimado, de forma a avaliar a hipótese nula de ausência de variação ou covariação herdável para o conjunto de caracteres mandibulares.

Comparação entre P e G

Após obter estimativas para as matrizes fenotípica e genética, pude avaliar a constância dos padrões de covariância e correlação nos diferentes níveis de organização que estas matrizes representam. Para tal, comparei P e G através do método de Vetores Aleatórios (Subseção 2.2.3) para as matrizes de covariância e através do teste de Mantel (Subseção 2.2.2) para as de correlação.

Com o objetivo de avaliar quais caracteres representam as principais similaridades e diferenças entre P e G , avaliei a comparação entre estas matrizes através do método de SRD, exposto na Subseção 2.2.4.

Conforme a explanação contida na Subseção 2.2.1, calculei as repetibilidades associadas às matrizes de covariância e correlação P e G , ajustando os valores de correlação entre matrizes em relação à correlação máxima teórica entre estas.

4.2.3 Modularidade

A hipótese de modularidade que adotei para a mandíbula refere-se à distinção entre o processo alveolar e o ramo ascendente, conforme descrevi na Seção 4.1; dessa maneira, dividi os caracteres mandibulares em dois grupos, de acordo com suas afinidades com os dois módulos adotados (Figura 4.1, Tabela 4.2). Adotei a abordagem delineada na Subseção 2.3.2 para a construção de matrizes teóricas que expressam estes padrões de modularidade. Além disso, construí uma terceira matriz, de integração total, que representa a distinção entre pares de caracteres integrados e não-integrados; obtive tal matriz simplesmente através da soma das outras duas. Comparei estas matrizes

teóricas com as matrizes de correlação P e G através do teste de Mantel, de acordo com a Subseção 2.3.2.

Também calculei os índices de magnitude de integração morfológica para ambas as matrizes de correlação (Subseção 2.3.1); este índice representa a intensidade de integração total entre os caracteres mandibulares em cada uma das matrizes. Conforme expus na Subseção 2.3.1, obtive distribuições para os valores de r^2 calculados em P e G e testei as diferenças entre estes dois valores através do teste t de Student.

4.3 Resultados

4.3.1 Repetibilidade

Apresento as repetibilidades relacionadas à precisão de mensuração para os caracteres mandibulares na Tabela 4.3. Estas variam entre 0.78 e 0.99, com média 0.96, mediana 0.98 e desvio padrão 0.04. O caráter RTVC, que possui o menor valor de repetibilidade dentre todos os caracteres mandibulares, é delimitado por dois marcos geométricos que representam pontos máximos de curvatura, que estão associados a um maior erro em seu registro (Bookstein, 1991). De qualquer forma, este valor de 0.78 não é excepcionalmente baixo comparado aos valores de repetibilidade reportados por outros autores (ex.: Cheverud, 1995, 1996b).

Dessa forma, os valores de repetibilidade encontrados indicam que, de forma geral, o impacto do erro de mensuração sobre os caracteres considerados pode ser desconsiderado na interpretação dos resultados que obtive neste capítulo.

Tabela 4.3: Repetibilidades associadas às 25 distâncias euclidianas mandibulares.

	Valor		Valor		Valor
DAMA	0.9782	DAMP	0.9831	MAMP	0.9211
CORMCA	0.9812	CORMCP	0.9819	MCAMCP	0.9533
CORANG	0.9941	MCAANG	0.9944	MCPANG	0.9896
CORIDM	0.9942	MCAIDM	0.9943	MCPIDM	0.9934
ANGIDM	0.9939	DART	0.9668	MART	0.9755
MPRT	0.9900	DAVC	0.9751	MAVC	0.9788
MPVC	0.9764	RTVC	0.7816	DAVA	0.9713
MAVA	0.9831	MPVA	0.9897	RTVA	0.9206
VCVA	0.9339				

4.3.2 Padrões de covariâncias fenotípicas e genéticas

Segundo o teste de Wilks, idade, sexo e a interação entre estes fatores afeta significativamente o conjunto total de distâncias tomadas sobre a mandíbula; ademais, observei que o efeito do dimorfismo sexual sobre todos os caracteres está relacionado à uma diferença pequena entre sexos, de forma que o impacto do fator sexo é ínfimo em relação a variabilidade de cada caráter. De qualquer forma, visto que o efeito de todos os fatores considerados é significativo, utilizei a matriz de covariância residual do modelo como estimativa de P (Figura 4.2a).

A comparação entre matrizes ao longo da ontogênese da espécie (Tabela 4.4) evidencia a constância de padrões de covariância no desenvolvimento, indicando que a remoção do efeito relacionado à estratificação etária sobre os caracteres mandibulares tem um impacto negligenciável nas análises que apresento. Da mesma forma, não há diferenças entre sexos em relação aos padrões de covariância fenotípica (Tabela 4.5), de forma que a estimativa de P que obtive é consistente em relação à amostra como um todo.

Herdabilidades

As estimativas de herdabilidade que obtive estão resumidas na Tabela 4.6 e na Figura 4.3. Seus valores estão contidos no intervalo entre 0.11 e 0.90, com média próxima a 0.5 e desvio padrão de 0.21. Dentre os 25 caracteres mandibulares, apenas três valores

Tabela 4.4: Comparação entre matrizes fenotípicas mandibulares em seis faixas etárias. Os valores nas diagonais representam as repetibilidades associadas às matrizes comparadas. Abaixo das diagonais figuram os valores de correlação original entre as matrizes; acima das diagonais encontram-se os valores corrigidos de acordo com as repetibilidades. Todos os valores são significativamente diferentes de zero ($P(\alpha) = 0.05$). Os tamanhos de amostra de cada categoria de idade também estão indicados.

a: Comparação entre matrizes de covariância									
	20 $n = 18$	30 $n = 20$	50 $n = 32$	100 $n = 42$	200 $n = 33$	300 $n = 19$			
20	0.8989	0.7353	0.8773	0.8576	0.8484	0.7879			
30	0.6568	0.8875	0.7526	0.7531	0.7509	0.6603			
50	0.8097	0.6901	0.9475	0.9572	0.9688	0.7938			
100	0.7916	0.6908	0.9072	0.9480	0.9676	0.8070			
200	0.7771	0.6834	0.9110	0.9101	0.9333	0.8182			
300	0.7198	0.5993	0.7445	0.7571	0.7617	0.9285			

b: Comparação entre matrizes de correlação									
	20 $n = 18$	30 $n = 20$	50 $n = 32$	100 $n = 42$	200 $n = 33$	300 $n = 19$			
20	0.3952	1.5693	1.7930	1.7843	1.6804	1.5734			
30	0.7444	0.5694	1.2871	1.3031	1.2452	1.0881			
50	0.9051	0.7799	0.6448	1.5168	1.4372	1.2578			
100	0.8685	0.7614	0.9431	0.5996	1.4902	1.3085			
200	0.8651	0.7695	0.9451	0.9450	0.6707	1.2538			
300	0.7664	0.6362	0.7826	0.7852	0.7957	0.6005

Figura 4.2: Estimativas das matrizes de correlação fenotípica (a) e genética (b) mandibular para a população de *Calomys expulsus*. Correlações positivas são indicadas por tons mais claros de cinza, enquanto tons mais escuros indicam correlações negativas, de acordo com a legenda. Os pontos indicam correlações estatisticamente idênticas a zero ($P(\alpha) = 0.05$).

Tabela 4.5: Correlação entre as matrizes fenotípicas mandibulares de machos (M) e fêmeas (F). Os valores nas diagonais representam as repetibilidades associadas às matrizes comparadas. Abaixo das diagonais figuram os valores de correlação bruto entre as matrizes; acima das diagonais encontram-se os valores corrigidos de acordo com as repetibilidades. Todos os valores são significativamente diferentes de zero ($P(\alpha) \leq 10^{-4}$). Os tamanhos de amostra para os dois sexos também estão indicados.

a: Comparação entre matrizes de covariância.			b: Comparação entre matrizes de correlação.		
	M $n = 108$	F $n = 120$		M $n = 108$	F $n = 120$
M	0.9903	0.9609	M	0.8861	1.1286
F	0.9510	0.9892	F	0.9794	0.8499

de herdabilidade se mostraram significativamente indistintos ao valor zero, segundo o critério de intervalos de confiança, com valor crítico de 0.05. Porém, segundo o critério de *likelihood-ratio*, todas as herdabilidades que estimei são significativas. Dessa forma, adotei uma abordagem mais conservadora e passei a considerar o primeiro destes critérios para estimar a significância dos modelos, especialmente após inspecionar o comportamento das curvas da função de verossimilhança e perceber que estas são, de modo geral, bem aproximadas por distribuições normais. Assim sendo, a Tabela 4.6 reporta os valores de probabilidade associados ao critério de intervalos de confiança.

Correlações Genéticas

A Figura 4.2b resume as estimativas de correlações genéticas que obtive. Estas estão contidas no intervalo entre -0.48 e 0.99 , com média 0.60 e desvio-padrão 0.22 . Cerca de 17% das estimativas são idênticas ao valor nulo segundo o critério de intervalos de confiança; estas correlações são principalmente associadas àqueles caracteres para os quais não foi possível rejeitar a hipótese de herdabilidade nula. Da mesma forma que nas estimativas de herdabilidade, todas as correlações são significativamente diferentes de zero segundo o critério de comparação ao modelo nulo por *likelihood-ratio*; adotando novamente a postura conservadora, reporto na Figura 4.2b as correlações indistintas de zero em relação ao critério de intervalos de confiança.

A partir das estimativas de herdabilidades e correlações genéticas, pude compor a

matriz G , que resume as informações sobre variâncias e covariâncias genéticas aditivas em uma única entidade matemática.

Comparações entre P e G

As matrizes P e G que obtive (Figura 4.2) apresentam, no que concerne sua autoestrutura, a predominância do primeiro autovalor sobre os demais (Figura 4.4), de maneira que cerca de 57% da variância multivariada total que a matriz fenotípica apresenta se alinha ao primeiro autovetor. Em relação à matriz genética essa predominância é ainda

Figura 4.3: Distribuição de densidades das estimativas de herdabilidade para as 25 distâncias euclidianas mandibulares; além disso, são indicados os intervalos de confiança de 95% para cada uma das estimativas. Os pontos maiores representam aquelas correlações significativamente diferentes de zero ($P(\alpha) = 0.05$).

Tabela 4.6: Estimativas de herdabilidades associadas às 25 distâncias euclidianas mandibulares, com suas respectivas variâncias e intervalos de confiança. Em *itálico*, destacam-se aquelas herdabilidades que não se mostraram significativamente diferentes de zero ($P(\alpha) = 0.05$), segundo a probabilidade associada à região crítica do intervalo de confiança, na quinta coluna. São também indicados os tamanho efetivos de amostra para cada estimativa.

	Média	Variância	IC-	IC+	P	N_{eff}
DAMA	0.6007	0.0160	0.3484	0.8319	0.0000	46.0166
DAMP	0.7371	0.0142	0.4888	0.9505	0.0000	77.3228
MAMP	0.8280	0.0124	0.5912	1.0000	0.0000	111.2591
CORMCA	0.8971	0.0118	0.6615	1.0000	0.0000	137.3761
CORMCP	0.8058	0.0133	0.5614	1.0000	0.0000	98.4473
MCAMCP	<i>0.1165</i>	0.0072	0.0000	0.3257	0.1703	4.7604
CORANG	0.6235	0.0156	0.3741	0.8516	0.0000	50.7683
MCAANG	0.3559	0.0159	0.1383	0.6071	0.0047	16.9527
MCPANG	0.3528	0.0154	0.1394	0.6013	0.0045	17.1653
CORIDM	0.3519	0.0145	0.1458	0.5951	0.0034	18.1222
MCAIDM	0.4899	0.0164	0.2509	0.7321	0.0001	30.2408
MCPIDM	0.4772	0.0161	0.2430	0.7187	0.0002	29.3048
ANGIDM	0.3441	0.0144	0.1412	0.5880	0.0041	17.4681
DART	0.6487	0.0155	0.3984	0.8748	0.0000	55.2304
MART	0.6755	0.0147	0.4288	0.8953	0.0000	62.8802
MPRT	0.6210	0.0149	0.3761	0.8438	0.0000	52.7943
DAVC	0.4934	0.0162	0.2558	0.7337	0.0001	31.1409
MAVC	0.4891	0.0157	0.2555	0.7273	0.0001	31.4147
MPVC	0.5787	0.0158	0.3335	0.8108	0.0000	43.4467
RTVC	<i>0.1145</i>	0.0099	0.0000	0.3595	0.2492	3.6551
DAVA	0.4681	0.0158	0.2348	0.7076	0.0002	28.7245
MAVA	0.4571	0.0166	0.2203	0.7028	0.0004	26.2380
MPVA	0.5927	0.0163	0.3402	0.8262	0.0000	44.1206
RTVA	0.3036	0.0155	0.0966	0.5573	0.0147	12.9104
VCVA	<i>0.2513</i>	0.0166	0.0463	0.5185	0.0509	8.6261
Média	0.5070					30.3304

mais marcante, visto que cerca de 73% da variância associada à esta matriz se concentra na direção associada ao primeiro autovalor. Esta direção, em ambas as matrizes (representada na Tabela 4.7 pela direção de máxima variação de G), apresenta componentes de mesmo sinal, representando a variação alométrica, ou seja, a relação entre forma e tamanho. Pode-se também observar (Figura 4.4) que a distribuição de autovalores da matriz G possui uma cauda de valores negativos após seu vigésimo autovalor; o mesmo comportamento não é observado na matriz P .

No que se refere às outras dimensões de máxima variação em G (Tabela 4.7), ressaltar

Figura 4.4: Distribuição de autovalores para as matrizes de correlação fenotípica (P) e genética (G) mandibular.

que a segunda dimensão de máxima variação representa o encurvamento do processo coronoide em direção ao côndilo mandibular e o encurtamento do processo angular em contraste ao crescimento das outras regiões; o terceiro componente principal relaciona-se à compressão dorsoventral da região alveolar em contraposição ao crescimento do ramo ascendente associado ao deslocamento do processo angular em direção dorsal.

As repetibilidades e comparações pareadas entre matrizes mandibulares estão resumidas na Tabela 4.8. De modo geral, as matrizes P e G apresentam constância nos padrões expressos, de forma que as correlações entre estas matrizes são significativas em relação a níveis críticos até menores do que 5%. Ressalto que a comparação entre matrizes de correlação exibe um valor maior do que a correlação máxima teórica possível, de forma que esta correlação, corrigida para repetibilidades, excede o valor unitário.

Em relação à identificação dos caracteres que representam as principais diferenças em relação às matrizes P e G , a aplicação do método SRD para a comparação destas (Figura 4.5) permitiu-me observar que caracteres que apresentam valores baixos de herdabilidade são aqueles que compõem as principais diferenças entre P e G , de forma

Tabela 4.7: Autovetores associados aos três primeiros autovalores da matriz de covariância genética G .

	PC1	PC2	PC3
DAMA	-0.1279	0.0931	0.4136
DAMP	-0.1928	0.2300	0.2293
MAMP	-0.0661	0.1275	-0.1783
CORMCA	-0.2691	-0.4545	0.0458
CORMCP	-0.3036	-0.4455	0.1211
MCAMCP	-0.0301	0.0097	0.0706
CORANG	-0.3699	-0.2966	-0.3408
MCAANG	-0.1621	0.0357	-0.3114
MCPANG	-0.1369	0.0546	-0.3871
CORIDM	-0.2703	0.1696	0.0270
MCAIDM	-0.2985	0.0552	0.1923
MCPIDM	-0.3183	0.0332	0.1842
ANGIDM	-0.3051	-0.1180	0.1864
DART	-0.1907	0.3373	-0.0097
MART	-0.1316	0.2720	-0.1372
MPRT	-0.1503	0.0851	-0.1844
DAVC	-0.1604	0.2560	-0.0568
MAVC	-0.1593	0.1277	0.0486
MPVC	-0.1931	0.0250	-0.0531
RTVC	-0.0675	0.0333	0.0291
DAVA	-0.0887	0.2406	0.1372
MAVA	-0.1195	0.1111	0.1549
MPVA	-0.1731	0.1215	-0.0786
RTVA	-0.1109	0.1159	-0.2517
VCVA	-0.0682	0.0324	-0.2809

Tabela 4.8: Correlação entre as matrizes genética e fenotípica. Os valores na diagonal representam as repetibilidades associadas às matrizes comparadas. Abaixo das diagonais figuram os valores de correlação bruto entre as matrizes; acima das diagonais encontram-se os valores corrigidos de acordo com as repetibilidades. Todos os valores são significativamente diferentes de zero ($P(\alpha) = 0.05$).

a: Comparação entre matrizes de covariância.			b: Comparação entre matrizes de correlação.		
	G	P		G	P
G	0.8937	0.9295	G	0.5490	1.3192
P	0.8744	0.9900	P	0.9444	0.9335

que há uma correlação positiva entre escores SRD e herdabilidade (Figura 4.6).

4.3.3 Modularidade

Em relação aos coeficientes de magnitude de integração morfológica, obtive um valor de 0.2288 para a matriz fenotípica e 0.4099 para a matriz genética; segundo o teste realizado sobre as distribuições geradas a partir do método *Monte-Carlo* (Figura 4.7), estes dois valores são significativamente diferentes.

Quanto aos testes de modularidade, apresento estes resultados na Tabela 4.9; de forma geral, as matrizes *P* e *G* comportam-se de forma bastante similar no que diz respeito aos seus padrões de modularidade. Em ambas as matrizes, é possível observar a evidência do ramo ascendente como um módulo distinto; a correlação entre caracteres pertencentes à esta região se mostra 38% maior na matriz *P* (Tabela 4.9a) e 21% maior na matriz *G* (Tabela 4.9b). Já em relação ao processo alveolar, não pude observar o mesmo comportamento. Além disso, as duas matrizes apresentam uma distinção entre caracteres integrados e não-integrados, representada pela afinidade das duas matrizes com a matriz de integração total; com correlações 24% maiores em *P* e 15% maiores em *G* entre caracteres pertencentes ao mesmo módulo.

4.4 Discussão

A herdabilidade média dos caracteres mandibulares (cerca de 0.5) é compatível com a compilação feita por Mousseau & Roff (1987) de valores de herdabilidade para caracteres morfológicos em animais endotérmicos; no entanto, este valor se mostra mais alto que as herdabilidades normalmente encontradas para o crânio de mamíferos, como observado no Capítulo 3. Da mesma forma que no Capítulo 3, observo que valores de herdabilidade baixos tendem a estar associados a caracteres com tamanhos efetivos de amostra baixos, de forma que estas estimativas podem ser afetadas pelo tamanho amostral inadequado, e não por uma ausência de variação herdável nestes caracteres (Cheverud, 1988, 1995).

Figura 4.5: Comparação entre as matrizes de covariância fenotípica e genética mandibular através do método SRD. À esquerda, estimativas de valores médios de SRD para as 25 distâncias euclidianas com seus respectivos intervalos de confiança de 95%. À direita, a relação entre média e desvio padrão centralizados destes escores; pontos vazados indicam caracteres cujos valores nestes dois parâmetros são significativamente menores que o valor médio para $P(\alpha) = 0.025$.

Figura 4.6: Gráfico de dispersão entre as 25 estimativas de herdabilidade para os caracteres mandibulares e seus valores médios de SRD para a comparação entre P e G . A curva de regressão expressa a relação $SRD = 1.036 + 0.113 * \log(h^2)$; ambos os coeficientes da equação são significativamente diferentes de zero ($P(\alpha) = 0.01$).

A matriz G que estimei possui autovalores negativos, o que significa que existem combinações lineares de caracteres que possuem herdabilidades negativas. Embora matrizes dessa forma sejam impossíveis na realidade, a probabilidade de obter-se uma estimativa de matriz com essas características é bastante alta (Hill & Thompson, 1978). Neste caso em particular, a existência de autovalores negativos é mitigada devido ao tamanho efetivo de amostra, de cerca de 30 indivíduos, ser maior do que o número de caracteres analisados.

As estimativas de correlações genéticas se mostram, em média, mais altas do que as correlações fenotípicas; isto pode ser observado pela diferença entre os valores de

Figura 4.7: Histograma de frequência da distribuição dos valores obtidos para o coeficiente de magnitude de integração r^2 para P e G através do método *Monte-Carlo*. Os pontos sobre o eixo das abscissas representam os valores originais de r^2 para as duas matrizes. As duas matrizes apresentam coeficientes de magnitude de integração significativamente diferentes, para $P(\alpha) \leq 10^{-4}$.

r^2 calculados para as duas matrizes. Novamente, ressalto que existe uma relação negativa entre diferenças na correlação média entre matrizes P e G e tamanho efetivo de amostra (Cheverud, 1988), de maneira que a diferença significativa entre magnitudes de integração morfológica em P e G pode ser devida à amostragem inadequada.

De qualquer forma, os padrões expressos por estas duas matrizes se mostram extremamente similares, tanto em relação a padrões de covariância quanto de correlação, o que corrobora a hipótese de similaridade formulada por Cheverud (1988) para padrões fenotípicos e genéticos de covariância entre caracteres. Ademais, o método de SRD (Figura 4.5) indica que as dissimilaridades entre P e G se concentram exatamente

Tabela 4.9: Hipóteses de integração morfológica sobre as matrizes mandibulares P e G . O coeficiente Γ representa a correlação entre cada matriz de correlação e as matrizes associadas às três hipóteses de modularidade; valores de Γ em negrito representam correlações significativamente diferentes de zero para $P(\alpha) = 0.05$. São também listadas as correlações médias internas (AVG+) e externas (AVG-) a cada módulo, bem como a razão entre estes valores.

a: Matriz Fenotípica			
	Alveolar	Ascendente	Total
Γ	0.5269	0.4408	0.6823
P	0.4440	0.0360	0.0040
AVG+	0.4260	0.5443	0.4615
AVG-	0.4119	0.3944	0.3722
Razão	1.0342	1.3802	1.2399

b: Matriz Genética			
	Alveolar	Ascendente	Total
Γ	0.5697	0.4263	0.7101
P	0.3340	0.0360	0.0010
AVG+	0.6165	0.7046	0.6429
AVG-	0.5908	0.5813	0.5567
Razão	1.0435	1.2121	1.1550

naqueles caracteres que apresentam índices de herdabilidade estatisticamente indistintos do valor nulo, resultado que atribuo à amostragem inadequada; portanto, reforço aqui a hipótese de que dissimilaridades entre estimativas de P e G resultam de amostragem inadequada (Cheverud, 1988).

Em relação aos padrões de modularidade expressos por P e G , os resultados obtidos para a distinção entre as regiões anterior e posterior da mandíbula Tabela 4.9 atestam a independência relativa entre as duas regiões, de forma similar aos resultados obtidos por Mezey *et al.* (2000) para os efeitos diferenciais de *loci* quantitativos para as duas regiões da mandíbula de *Mus musculus*. A detecção do ramo ascendente como módulo e a impossibilidade de se evidenciar o processo alveolar da mesma forma reforça esta relação de independência relativa. Ressalto que o componente alométrico, representado pela direção de máxima variação fenotípica e genética (Tabela 4.7) e que toma uma grande porção da variância multivariada total (Figura 4.4), atua como um fator de integração entre módulos (Bookstein *et al.*, 1985; Marroig *et al.*, 2004), elevando todas as correlações dentro de ambas as matrizes. Assim sendo, o componente alométrico

atua de forma antagônica ao efeito da independência dos componentes morfogenéticos sobre os padrões de covariância na mandíbula, de forma a compor o quadro de independência relativa entre as diferentes regiões da mandíbula.

Ainda que o efeito do componente alométrico seja mais pronunciado na matriz *G* do que em *P* (Figura 4.4), o que pode ser observado pela diferença na magnitude de integração morfológica entre as duas matrizes (Figura 4.7), atribuo esta diferença ao viés na estimativa da variância dos autovalores em *G* (Meyer & Kirkpatrick, 2008) e não a diferenças reais no efeito do componente alométrico. Visto que o viés na estimativa da variância de autovalores em uma matriz de covariância é proporcional à razão entre o número de caracteres e o tamanho da amostra (Cheverud *et al.*, 1989; Meyer & Kirkpatrick, 2008), a estimativa deste parâmetro em *G* e sua relação com o parâmetro populacional deve ser interpretada com extrema cautela. Este viés na variância dos autovalores em *G* também é responsável pela cauda de autovalores negativos; dessa forma, não acredito que hajam razões para creditar a existência de autovalores negativos em *G* a redução da dimensionalidade desta matriz em relação à *P*.

No que concerne aos efeitos de outras direções de máxima variação em *G*, é possível observar paralelos entre o efeito destas dimensões sobre a variação de forma mandibular em *Calomys* e *Mus*, como por exemplo a compressão dorsoventral associada ao quarto componente principal da matriz genética mandibular de (Klingenberg & Leamy, 2001), presente aqui no terceiro componente da matriz *G* de *Calomys*. Além disso, a variação associada ao segundo componente principal desta matriz está relacionado ao efeito do gene *gooseoid* (Rivera-Pérez *et al.*, 1995; Hall, 2003) sobre os processos coronóide e angular.

Ainda que as abordagens destes diversos trabalhos sejam bastante diferentes daquela que adotei aqui, concluo que os padrões que obtive para a covariância dos caracteres mandibulares em *Calomys expulsus* não se dissociam de forma nenhuma daqueles resultados obtidos para a mandíbula de *Mus musculus*, de maneira a indicar a manutenção da arquitetura genética subjacente à variação morfológica mandibular na evolução da superfamília Muroidea.

Capítulo 5

Considerações Finais

Nos capítulos anteriores, comparei os padrões de covariância fenotípicos e genéticos no crânio e na mandíbula de uma população de *Calomys expulsus*, de maneira a corroborar a hipótese de correspondência entre os padrões de covariância nestes dois níveis de organização da variação morfológica subjacente à estas estruturas, conforme a conjectura proposta por Cheverud (1988). Além disso, mostrei o impacto das contingências ontogenéticas e funcionais sobre os padrões de covariância morfológica. Estas restrições resultam na modularização de regiões específicas das duas estruturas, em concordância a resultados obtidos por outros autores para o crânio e mandíbula de mamíferos.

Comparação de estimativas no crânio e mandíbula

Os resultados que obtive nos capítulos anteriores estão resumidos na Tabela 5.1. Pode-se observar que a mandíbula apresenta um tamanho efetivo médio de amostra (N_{eff}) maior do que aquele associado ao crânio em suas respectivas estimativas de G , apesar do tamanho de amostra para P ser maior para o crânio ($n = 365$) do que para a mandíbula ($n = 228$). As estimativas de correlações na mandíbula, sejam elas fenotípicas ou genéticas, são em média mais altas do que no crânio, conforme pode ser observado pela diferença entre os coeficientes r^2 de magnitude de integração morfológica, pela porcentagem de variância associada ao primeiro autovetor de P e G e pela quantidade de autovalores negativos nas matrizes G nas duas estruturas. Assim, conforme Young

Tabela 5.1: Sumário dos resultados que obtive nos capítulos anteriores para os padrões de covariância genética e fenotípica no crânio e mandíbula da população de *Calomys expulsus*.

		Crânio	Mandíbula
Tamanho da amostra (n)		365	228
Tamanho efetivo médio da amostra (N_{eff})		20	30
Autovalores negativos em G		40%	36%
Variância associada ao primeiro autovalor			
	P	47.2%	57.3%
	G	66.1%	72.3%
Magnitude de integração morfológica (r^2)			
	P	0.1497	0.2288
	G	0.3360	0.4099

et al. (2010), a estimativa de G na mandíbula é mais precisa do que no crânio, devido à diferença entre as correlações médias nas duas estruturas, o que é refletido pelo tamanho efetivo de amostra maior na mandíbula.

Este quadro de diferenças na magnitude das correlações nas duas estruturas aponta para uma distinção entre a mandíbula e o crânio no que se refere à intensidade da integração morfológica. Atribuo esta distinção ao fato de que o crânio recebe contribuições de diferentes tecidos durante o desenvolvimento, apresentando distinções em relação ao crescimento e controle hormonal destas diferentes regiões (Moore, 1981; Sara *et al.*, 1981; Pan & Oxnard, 2002). A mandíbula, por sua vez é formada principalmente a partir de células da crista neural, que se comportam de forma mais homogênea em relação à composição dos diferentes componentes morfogenéticos da mandíbula (Chai *et al.*, 2000; Ramaesh & Bard, 2003). Este padrão se reflete no comportamento da mandíbula como uma estrutura mais integrada em relação ao crânio.

Estabilidade dos padrões de covariância na evolução dos mamíferos

Os resultados que obtive em conjunto com aqueles obtidos por outros autores (ex.: Mezey *et al.*, 2000; Klingenberg & Leamy, 2001; Willmore *et al.*, 2006; de Conto, 2007) apontam para a estabilidade dos padrões de covariância genética no crânio e na mandí-

bula durante a evolução dos Roedores. Em relação ao crânio, o quadro de estabilidade relativa de G se estende à diversificação dos mamíferos como um todo (Marroig & Cheverud, 2001; Porto *et al.*, 2009; Shirai & Marroig, 2010).

Este fato indica que durante a evolução do grupo, a estrutura de covariância dos caracteres cranianos e mandibulares foi relativamente preservada enquanto o fenótipo médio nestas estruturas sofreu alterações na divergência entre os diferentes clados. Apesar de não ser possível a princípio inferir os processos evolutivos responsáveis por estas divergências, o quadro de estabilidade de G ao longo da diversificação dos mamíferos permite uma investigação acerca destes processos no grupo (Lande, 1976; Reeve, 2000; Marroig & Cheverud, 2001), estendendo as análises realizadas dentre os Platyrrhini (Marroig & Cheverud, 2004, 2005, 2009).

Manutenção da arquitetura genética de morfologias complexas

Este panorama que apresento aqui, composto pela correspondência entre padrões de covariância expressos no fenótipo e genótipo, pela associação entre estes padrões à contingências ontogenéticas e funcionais e pela manutenção destes padrões na evolução de morfologias complexas, indica a importância dos fatores que promovem a estabilidade de G ao longo do tempo.

Conforme relatei no Capítulo 1, os padrões de covariância aditiva são afetados majoritariamente pelo efeito de mutações, seleção estabilizadora e deriva genética (Cheverud, 1996a; Arnold *et al.*, 2008). Visto que os padrões expressos por G se relacionam intimamente à evolvabilidade de uma população (Wagner & Altenberg, 1996), a arquitetura genética subjacente à matriz G irá evoluir na direção de maximizar sua capacidade de responder à seleção, através, por exemplo, de contingências sobre os efeitos mutacionais. Dessa forma, a produção de variabilidade advinda destes efeitos será direcionada pelas demandas impostas pelo regime de seleção sobre a população (Jones *et al.*, 2007). Da mesma maneira, a emergência de modularidade na relação entre genótipo e fenótipo permite que redes gênicas apresentem ao mesmo tempo flexibilidade e robustez (Wagner, 1996; Cheverud, 1996a).

Assim, espera-se que uma arquitetura genética que apresente estas características se mantenha relativamente estável em relação à escala macro-evolutiva. Os resultados que apresento aqui, juntamente com aqueles obtidos por outros autores, sustentam que este é o caso da arquitetura genética subjacente à variação morfológica craniana e mandibular nos mamíferos.

Referências Bibliográficas

- Ackermann, R. R. & Cheverud, J. M., 2000. Phenotypic Covariance Structure in Tamarins (Genus *Saguinus*): A Comparison of Variation Patterns Using Matrix Correlation and Common Principal Component Analysis. *American Journal of Physical Anthropology*, 111:489–501.
- Almeida, F. C., Bonvicino, C. R., & Cordeiro-Estrela, P., 2007. Phylogeny and temporal diversification of *Calomys* (Rodentia, Sigmodontinae): implications for the biogeography of an endemic genus of the open/dry biomes of South America. *Molecular phylogenetics and evolution*, 42(2):449–466.
- Arnold, S. J., 1992. Constraints on Phenotypic Evolution. *The American Naturalist*, 140:S85–S107.
- Arnold, S. J., Bürger, R., Hohenlohe, P. A., Ajie, B. C., & Jones, A. G., 2008. Understanding the evolution and stability of the G-matrix. *Evolution*, 62(10):2451–61.
- Atchley, W. R. & Hall, B. K., 1991. A model for development and evolution of complex morphological structures. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 66:101–157.
- Blows, M. W. & Hoffmann, A. A., 2005. A reassessment of genetic limits to evolutionary change. *Ecology*, 86(6):1371–1384.
- Bolker, J. A., 2000. Modularity in development and why it matters to evo-devo. *Integrative and Comparative Biology*, 40(5):770.
- Bonvicino, C. R. & Almeida, F. C., 2000. Karyotype, morphology and taxonomic status of *Calomys expulsus* (Rodentia: Sigmodontinae). *Mammalia*, 64:339–351.
- Bookstein, F. L., 1991. *Morphometric tools for landmark data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Bookstein, F. L., Chernoff, B., Elder, R., Humphries, Smith, G., & Strauss, R., 1985. *Morphometrics in Evolutionary Biology*. The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Philadelphia.
- Braun, J. K., 1993. Systematic relationships of the tribe Phyllotini (Muridae: Sigmodontinae) of South America. *Special Publication, Oklahoma Museum of Natural History*.
- Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P., Han, J., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P., & Sucov, H. M., 2000. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 127(8):1671–9.
- Cheverud, J. M., 1982. Phenotypic, Genetic, and Environmental Morphological Integration in the Cranium. *Evolution*, 36(3):499–516.
- , 1984. Quantitative genetics and developmental constraints on evolution by selection. *Journal of theoretical biology*, 110(2):155–71.
- , 1988. A Comparison of Genetic and Phenotypic Correlations. *Evolution*, 42(5):958–968.
- , 1995. Morphological Integration in the Saddle-Back Tamarin (*Saguinus fuscicollis*) Cranium. *The American Naturalist*, 145(1):63–89.
- , 1996a. Developmental integration and the evolution of pleiotropy. *Integrative and Comparative Biology*, 36(1):44–50.
- , 1996b. Quantitative genetic analysis of cranial morphology in the cotton-top (*Saguinus oedipus*) and saddle-back (*S. fuscicollis*) tamarins. *Journal of Evolutionary Biology*, 9:5–42.
- Cheverud, J. M. & Marroig, G., 2007. Comparing covariance matrices: Random skewers method compared to the common principal components model. *Genetics and Molecular Biology*, 30(2):461–469.
- Cheverud, J. M., Routman, E. J., & Irschick, D. J., 1997. Pleiotropic Effects of Individual Gene Loci on Mandibular Morphology. *Evolution*, 51(6):2006–2016.
- Cheverud, J. M., Wagner, G. P., & Dow, M. M., 1989. Methods for the Comparative Analysis of Variation Patterns. *Systematic Zoology*, 38(3):201–213.
- de Conto, V., 2007. *Estratégias bionômicas e padrões de variação e covariação do crânio de Akodon cursor (Rodentia: Sigmodontinae)*. Tese de doutoramento, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Falconer, D. S. & Mackay, T., 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 4th edição.
- Fortuna, M. A., García, C., Guimarães Jr., P. R., & Bascompte, J., 2008. Spatial mating networks in insect-pollinated plants. *Ecology letters*, 11(5):490–8.
- Genini, J., Morellato, L. P. C., Guimarães Jr., P. R., & Olesen, J. M., 2010. Cheaters in mutualism networks. *Biology Letters*, 6(January):494–497.
- Hall, B. K., 2003. Unlocking the Black Box between Genotype and Phenotype: Cell Condensations as Morphogenetic (modular) Units. *Biology and Philosophy*, 18:219–247.
- Hansen, T. F. & Houle, D., 2008. Measuring and comparing evolvability and constraint in multivariate characters. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(5):1201–19.
- Hayes, J. F. & Hill, W. G., 1981. Modification of Estimates of Parameters in the Construction of Genetic Selection Indices ('Bending'). *Biometrics*, 37(3):483–493.
- Hershkovitz, P., 1962. Evolution of neotropical cricetine rodents (Muridae) with special reference to the phyllotine group. *Fieldiana: Zoology*, 46:1–524.
- Hill, W. G. & Thompson, R., 1978. Probabilities of non-positive definite between-group or genetic covariance matrices. *Biometrics*, 34(3):429–439.
- Hingst-Zaher, E., Marcus, L. F., & Cerqueira, R., 2000. Application of geometric morphometrics to the study of post-natal size and shape changes in the skull of *C. expulsus*. *Hystrix*, 11:99–113.
- Jones, A. G., Arnold, S. J., & Bürger, R., 2003. Stability of the G-matrix in a population experiencing pleiotropic mutation, stabilizing selection, and genetic drift. *Evolution*, 57(8):1747–1760.
- , 2007. The mutation matrix and the evolution of evolvability. *Evolution*, 61(4):727–45.
- Kelly, J. K., 2009. Connecting QTLs to the G-matrix of evolutionary quantitative genetics. *Evolution*, 63(4):813–25.
- Kessel, M., Balling, R., & Gruss, P., 1990. Variations of cervical vertebrae after expression of a Hox-1.1 transgene in mice. *Cell*, 61(2):301–8.

- Klingenberg, C. P., 2008. Morphological Integration and Developmental Modularity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39(1):115–132.
- , 2010. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature reviews. Genetics*, 11(9):623–635.
- Klingenberg, C. P. & Leamy, L. J., 2001. Quantitative genetics of geometric shape in the mouse mandible. *Evolution*, 55(11):2342–2352.
- Klingenberg, C. P., Leamy, L. J., & Cheverud, J. M., 2004. Integration and modularity of quantitative trait locus effects on geometric shape in the mouse mandible. *Genetics*, 166:1909–1921.
- Klingenberg, C. P., Leamy, L. J., Routman, E. J., & Cheverud, J. M., 2001. Genetic architecture of mandible shape in mice: effects of quantitative trait loci analyzed by geometric morphometrics. *Genetics*, 157:785–802.
- Klingenberg, C. P., Mebus, K., & Auffray, J. C., 2003. Developmental integration in a complex morphological structure: how distinct are the modules in the mouse mandible? *Evolution & Development*, 5(5):522–531.
- Klingenberg, C. P. & Monteiro, L. R., 2005. Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Systematic Biology*, 54(4):678–688.
- Kohn, L. A. P. & Atchley, W. R., 1988. How Similar are Genetic Correlation Structures Data from Mice and Rats. *Evolution*, 42(3):467–481.
- Lande, R., 1976. Natural Selection and Random Genetic Drift in Phenotypic Evolution. *Evolution*, 30(2):314–334.
- , 1979. Quantitative Genetic Analysis of Multivariate Evolution, Applied to Brain: Body Size Allometry. *Evolution*, 33(1):402–416.
- , 1980. The genetic covariance between characters maintained by pleiotropic mutations. *Genetics*, 94:203–215.
- Leamy, L. J., Routman, E. J., & Cheverud, J. M., 1999. Quantitative Trait Loci for Early- and Late-Developing Skull Characters in Mice: A Test of the Genetic Independence Model of Morphological Integration. *The American Naturalist*, 153(2):201–214.

- Lofsvold, D., 1986. Quantitative Genetics of Morphological Differentiation in *Peromyscus*. I. Tests of the Homogeneity of Genetic Covariance Structure Among Species and Subspecies. *Evolution*, 40(3):559–573.
- Lynch, M. & Walsh, B., 1998. *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27(1):209–220.
- Marroig, G. & Cheverud, J. M., 2001. A comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology, and ontogeny during cranial evolution of new world monkeys. *Evolution*, 55(12):2576–2600.
- , 2004. Did Natural Selection or Genetic Drift Produce the Cranial Diversification of Neotropical Monkeys? *The American Naturalist*, 163(3):417–428.
- , 2005. Size as a line of least evolutionary resistance: diet and adaptive morphological radiation in new world monkeys. *Evolution*, 59(5):1128–1142.
- , 2009. Size As a Line of Least Resistance II: Direct Selection on Size or Correlated Response Due To Constraints? *Evolution*, páginas 1–19.
- Marroig, G., de Vivo, M., & Cheverud, J. M., 2004. Cranial evolution in sakis (*Pithecia*, Platyrrhini) II: evolutionary processes and morphological integration. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(1):144–155.
- Meyer, K. & Kirkpatrick, M., 2008. Perils of parsimony: properties of reduced-rank estimates of genetic covariance matrices. *Genetics*, 180(2):1153–66.
- Mezey, J. G., Cheverud, J. M., & Wagner, G. P., 2000. Is the genotype-phenotype map modular? A statistical approach using mouse quantitative trait loci data. *Genetics*, 156(1):305–311.
- Mezey, J. G. & Houle, D., 2005. The dimensionality of genetic variation for wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 59(5):1027–1038.
- Mitteroecker, P. & Bookstein, F. L., 2007. The conceptual and statistical relationship between modularity and morphological integration. *Systematic Biology*, 56(5):818–36.

- Monteiro, L. R., Bonato, V., & dos Reis, S. F., 2005. Evolutionary integration and morphological diversification in complex morphological structures: mandible shape divergence in spiny rats (Rodentia, Echimyidae). *Evolution & Development*, 7(5):429–439.
- Moore, M., 1981. *The mammalian skull*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Mousseau, T. A. & Roff, D., 1987. Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity*, 59(2):181–197.
- Musser, G. G. & Carleton, M. D., 1993. Family Muridae. In Wilson, D. E. & Reeder, D. M. (Editores), *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference*. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Newman, M. E. J., 2006. Modularity and community structure in networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23):8577–82.
- de Oliveira, F. B., Porto, A., & Marroig, G., 2009. Covariance structure in the skull of Catarrhini: a case of pattern stasis and magnitude evolution. *Journal of Human Evolution*, 56(4):417–30.
- Olson, E. & Miller, R., 1958. *Morphological Integration*. University of Chicago Press, Chicago.
- Pan, R. & Oxnard, C. E., 2002. Craniodental variation among Macaques (Macaca), nonhuman primates. *BMC Evolutionary Biology*, 2(1):10.
- Pavlicev, M., Cheverud, J. M., & Wagner, G. P., 2009. Measuring Morphological Integration Using Eigenvalue Variance. *Evolutionary Biology*, 36(1):157–170.
- Phillips, P. C. & Arnold, S. J., 1999. Hierarchical Comparison of Genetic Variance-Covariance Matrices. I. Using the Flury Hierarchy. *Evolution*, 53(5):1506–1515.
- Polly, P. D., 2004. On the simulation of the evolution of morphological shape: multivariate shape under selection and drift. *Palaeontologia Electronica*, 7(2):1–28.
- , 2008. Developmental Dynamics and G-Matrices: Can Morphometric Spaces be Used to Model Phenotypic Evolution? *Evolutionary Biology*, 35(2):83–96.
- Porto, A., de Oliveira, F. B., Shirai, L. T., de Conto, V., & Marroig, G., 2009. The Evolution of Modularity in the Mammalian Skull I: Morphological Integration Patterns and Magnitudes. *Evolutionary Biology*, 36(1):118–135.

- R Development Core Team, 2010. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramaesh, T. & Bard, J. B. L., 2003. The growth and morphogenesis of the early mouse mandible: a quantitative analysis. *Journal of Anatomy*, 203(2):213–22.
- Ravasz, E., Somera, A. L., Mongru, D. A., Oltvai, Z. N., & Barabási, A. L., 2002. Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5586):1551–5.
- Reeve, J. P., 2000. Predicting long-term response to selection. *Genetical Research*, 75(1):83–94.
- Reig, O., 1986. Diversity patterns and diversification of high Andean rodents. Em Vuilleumier, F. & Monasterio, M. (Editores), *High altitude tropical biogeography*, páginas 404–439. Oxford University Press, New York.
- Reusch, T. & Blanckenhorn, W. U., 1998. Quantitative genetics of the dung fly *Sepsis cynipsea*: Cheverud's conjecture revisited. *Heredity*, 81(1):111–119.
- Revell, L. J., 2007. The G matrix under fluctuating correlational mutation and selection. *Evolution*, 61(8):1857–72.
- Rivera-Pérez, J. A., Mallo, M., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., & Behringer, R. R., 1995. Goosecoid is not an essential component of the mouse gastrula organizer but is required for craniofacial and rib development. *Development*, 121(9):3005–3012.
- Robertson, A., 1959. The Sampling Variance of the Genetic Correlation Coefficient. *Biometrics*, 15(3):469–485.
- Roff, D. A., 1995. The estimation of genetic correlations from phenotypic correlations: a test of Cheverud's conjecture. *Heredity*, 74(May 1994):481–490.
- Rohlf, F. J., 2006. *tpsDig2, version 2.6*. Department of Ecology and Evolution, SUNY, Stony Brook, New York.
- Sara, V., Hall, B. K., & Wetterberg, L., 1981. Fetal brain growth: a proposed model for regulation by embryonic somatomedin. Em Ritzen, M., Aperia, A., Hall, B. K., Larsson, A., Zetterberg, A., & Zetterstrom, A. (Editores), *Biology of normal human growth*, páginas 241–252. Raven, New York.

- Schafer, J. & Strimmer, K., 2005. A shrinkage approach to large-scale covariance matrix estimation and implications for functional genomics. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 4:1–32.
- Schluter, D., 1996. Adaptive radiation along genetic lines of least resistance. *Evolution*, 50(5):1766–1774.
- Shaw, F. H., Shaw, R. G., Wilkinson, G. S., & Turelli, M., 1995. Changes in Genetic Variances and Covariances: G Whiz! *Evolution*, 49(6):1260–1267.
- Shaw, R. G., 1987. Maximum-Likelihood Approaches Applied to Quantitative Genetics of Natural Populations. *Evolution*, 41(4):812–826.
- , 1991. The Comparison of Quantitative Genetic Parameters between Populations. *Evolution*, 45(1):143–151.
- Shirai, L. T. & Marroig, G., 2010. Skull modularity in neotropical marsupials and monkeys: size variation and evolutionary constraint and flexibility. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 314B(June):663–683.
- Skuntz, S., Mankoo, B., Nguyen, M.-T. T., Hustert, E., Nakayama, A., Tournier-Lasserre, E., Wright, C. V. E., Pachnis, V., Bharti, K., & Arnheiter, H., 2009. Lack of the mesodermal homeodomain protein MEOX1 disrupts sclerotome polarity and leads to a remodeling of the cranio-cervical joints of the axial skeleton. *Developmental biology*, 332(2):383–95.
- Sneath, P. H. & Sokal, R. R., 1972. *Numerical Taxonomy*. WH Freeman & Company, San Francisco.
- Stein, C., 1956. Inadmissibility of the usual estimator for the mean of a multivariate distribution. *Proc. Berk. Symp. Math. Stat. Prob.*, 1:197–206.
- Steppan, S., Adkins, R., & Anderson, J., 2004. Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Systematic biology*, 53(4):533–53.
- Steppan, S. J., Phillips, P. C., & Houle, D., 2002. Comparative quantitative genetics: evolution of the G matrix. *Trends in Ecology & Evolution*, 17:320–327.

- Turelli, M., 1988. Phenotypic Evolution, Constant Covariances, and the Maintenance of Additive Variance. *Evolution*, 42(6):1342–1347.
- Wagner, G. P., 1996. Homologues, natural kinds and the evolution of modularity. *Integrative and Comparative Biology*, 36(1):36–43.
- Wagner, G. P. & Altenberg, L., 1996. Perspective: Complex Adaptations and the Evolution of Evolvability. *Evolution*, 50(3):967–976.
- Wagner, G. P., Pavlicev, M., & Cheverud, J. M., 2007. The road to modularity. *Nature reviews. Genetics*, 8(12):921–31.
- Waitt, D. E. & Levin, D. A., 1998. Genetic and phenotypic correlations in plants: a botanical test of Cheverud's conjecture. *Heredity*, 80(3):310–319.
- Willmore, K. E., Leamy, L., & Hallgrímsson, B., 2006. The effects of developmental and functional interactions on mouse cranial variability through late ontogeny. *Evolution & Development*, 8(6):550–567.
- Young, N. M., Wagner, G. P., & Hallgrímsson, B., 2010. Development and the evolvability of human limbs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8):3400–3405.
- Zelditch, M. L., Bookstein, F. L., & Lundrigan, B. L., 1992. Ontogeny of Integrated Skull Growth in the Cotton Rat *Sigmodon fulviventer*. *Evolution*, 46(4):1164–1180.

Apêndice A

Rotinas

Neste apêndice estão listadas as principais rotinas de R (R Development Core Team, 2010) que utilizei na confecção da presente dissertação, associada a uma pequena explicação sobre seu funcionamento básico. A álgebra e a estatística subjacentes a cada uma destas rotinas encontra-se desenvolvida no Capítulo 2; este apêndice portanto tem como objetivo complementar a informação naquele capítulo com a forma como implementei cada uma das etapas do meu trabalho ao longo do mestrado.

Cada uma das seções deste apêndice espelha as três seções presentes no Capítulo 2, de forma a facilitar a referência entre os dois conteúdos. Também tomei o cuidado de ordenar as rotinas dentro de cada seção de acordo com seu desenvolvimento no Capítulo 2. A explicação das rotinas também contém o número de seção o qual cada uma é associada.

Não é o intuito deste apêndice esgotar todas as rotinas que utilizei, mas sim de mostrar exemplos de como o leitor pode implementar algumas das análises que executei neste trabalho.

Pacotes

Estas funções utilizam alguns pacotes que não estão instalados na instalação padrão; tais pacotes estão disponíveis para instalação através da função *install.packages*. Destaco os pacotes *mvtnorm*, que contém uma implementação do cálculo de densidades de probabilidade da distribuição multivariada, fundamentais à estimação do modelo animal por máxima verossimilhança conforme a Seção 2.1, e o pacote *bbmle*, que contém rotinas para a otimização de modelos por máxima verossimilhança. Além disso, apesar destes pacotes não serem referenciados por estas funções, menciono dois pacotes devido à sua importância na geração e representação

dos resultados que obtive nesta dissertação. São eles o pacote *multicore*, notável por implementar funções de computação paralela dentro da linguagem R, e o pacote *plotrix*, responsável por produzir saídas gráficas de matrizes, como visto nas Figuras 3.2 e 4.2.

A.1 Genética quantitativa

```
build.kinship.matrix <- function (ID = NULL, sir, dam)
{
  size <- length (dam)
  A <- array (0,c(size,size))
  for (L in 1:size)
  {
    for (C in 1:size)
    {
      A[L,C] <- ifelse (L == C, 0.5,
        ifelse (dam[L] == dam[C] &&
          sir[L] == sir[C], 0.25,
            ifelse (dam[L] == dam[C] &&
              sir[L] != sir[C], 0.125,
                ifelse (dam[L] != dam[C] &&
                  sir[L] == sir[C], 0.125, 0))))
    }
  }
  if (!is.null (ID))
    rownames (A) <- colnames (A) <- ID
  return (A)
}
```

Rotina A.1: Construção de matrizes aditivas genéticas de relacionamento. A função recebe duas listas de tamanho igual, contendo os progenitores de cada indivíduo da amostra; além disso a função pode receber uma lista opcional de identidades para os indivíduos. A função retorna a matriz de relacionamento, contendo as identificações de cada indivíduo, caso este argumento seja passado. Ressalto que a função calcula coeficientes de Wright apenas para indivíduos pertencentes à mesma geração, com coeficientes de endocruzamento nulo (Subseção 2.1.1).

```

h2.est <- function (trait, kinship)
{
  Vp <- var (trait); A <- kinship; ind <- length (trait); I <- diag (ind)
  h2 <- function (h2 = 0.01)
  {
    Va <- h2 * Vp
    Ve <- Vp - Va
    V <- 2 * Va * A + Ve * I
    return (- mvtnorm::dmvnorm (trait, sigma = V, log = TRUE))
  }
  h2.model <- bbmle::mle2 (h2, method = "SANN",
    control = list("trace" = TRUE, maxit = 1000))
  h2.profile <- profile (h2.model)
  while (class (h2.profile)[1] != "profile.mle2")
  {
    h2.model <- h2.profile
    h2.profile <- profile (h2.model)
  }
  resumo <- c()
  resumo[1] <- coef (h2.model)
  resumo[c(3,4)] <- confint (h2.profile)
  resumo[2] <- h2.model@vcov
  resumo[5] <- summary (h2.model)@coef[4]
  names (resumo) <- c("mean","var","ic-","ic+","p")
  return (list ("model" = h2.model,
    "profile" = h2.profile,
    "summary" = resumo
  ))
}

```

Rotina A.2: Estimação de herdabilidade através de máxima verossimilhança restrita. Esta função recebe um vetor de valores fenotípicos ajustados para efeitos fixos e uma matriz de relacionamento entre os indivíduos componentes desta amostra; esta matriz deve ser construída através da Rotina A.1. A função retorna uma saída composta pelo modelo misto ajustado, o perfil da superfície de verossimilhança e um resumo contendo a herdabilidade estimada, a variância desta estimativa, o intervalo de confiança e a probabilidade de herdabilidade nula segundo a aproximação normal da curva de verossimilhança (Subseção 2.1.1).

```

Neff.var <- function (h2,var)
{return (((2 * h2^2) / var) + 1)}

```

Rotina A.3: Cálculo de tamanho efetivo de amostra. Esta função bastante simples recebe uma estimativa de herdabilidade e a variância desta, retornando o tamanho efetivo de amostra para a estimativa em questão (Subseção 2.1.1).

```

rg.est <- function (x, y, hx, hy, kinship)
{
  A <- kinship
  xuv <- scale (x); yuv <- scale (y)
  ex <- 1 - hx
  ey <- 1 - hy
  xy <- c (xuv, yuv)
  I <- diag (length (x))
  rp <- cor (cbind (x,y))[1,2]
  est <- function (rg)
  {
    RG <- rg * sqrt (hx * hy)
    RE <- rp - RG
    C <- array (c(hx, RG, RG, hy), c(2,2))
    E <- array (c(ex, RE, RE, ey), c(2,2))
    G <- 2 * (C %x% A); R <- E %x% I; V <- G + R
    return (- sum (dmvnorm (xy, sigma = V, log = TRUE)))
  }
  est.model <- mle2 (est, start = list ("rg" = rp), method = "SANN",
    control = list("trace" = TRUE, maxit = 1000))
  est.profile <- profile (est.model)
  while (class (est.profile)[1] != "profile.mle2")
  {
    est.model <- est.profile
    est.profile <- profile (est.model)
  }
  resumo <- c()
  resumo[1] <- coef (est.model)
  resumo[2] <- est.model@vcov
  resumo[3:4] <- confint (est.profile)
  resumo[5] <- summary (est.model)@coef[4]
  names (resumo) <- c("mean", "var", "ic-", "ic+", "p")
  return ( list ("model" = est.model,
    "profile" = est.profile,
    "summary" = resumo))
}

```

Rotina A.4: Estimaco de correlaco genética através de máxima verossimilhança restrita. Esta funo recebe dois vetores de valores fenotípicos ajustados para efeitos fixos e uma matriz de relacionamento entre os indivíduos componentes desta amostra; esta matriz deve ser construída através da Rotina A.1. A funo retorna uma saída composta pelo modelo misto ajustado, o perfil da superfície de verossimilhança e um resumo contendo a correlaco estimada, a variância desta estimativa, o intervalo de confiança e a probabilidade de correlaco nula segundo a aproximao normal da curva de verossimilhança (Subseo 2.1.2).

A.2 Comparação de matrizes

```
alpha.rep <- function (cor, tam)
{
  vec <- cor[lower.tri(cor)]
  mvec <- mean(vec)
  varerro <- (1 - (mvec^2))/(tam-2)
  vec2 <- vec^2
  Ex2 <- mean (vec2)
  varvec <- Ex2 - (mean(vec)^2)
  return((varvec - varerro)/varvec)
}
```

Rotina A.5: Estimação de repetibilidade para matrizes de correlação segundo a Subseção 2.2.1; a função recebe a matriz de correlação em questão e um argumento referente ao número de tamanho da amostra que gerou a matriz, retornando o valor de repetibilidade da matriz em questão (Subseção 2.2.1).

```
bootstrap.rep <- function (data, nb = 100)
{
  ind <- dim (data) [1]
  or.vcv <- var (data)
  v.rep <- c()
  for (N in 1:nb)
  {
    strap <- sample (1:ind, ind, TRUE)
    strap.vcv <- var (data[strap,])
    v.rep [N] <- random.skewers (or.vcv, strap.vcv, 1000) [1]
  }
  out <- mean (v.rep)
  return (out)
}
```

Rotina A.6: Estimação de repetibilidade para matrizes de covariância através de *bootstraping*; a função recebe a matriz de dados geradora da matriz de covariância em questão e um argumento referente ao número de reamostragens a ser feito, retornando o valor de repetibilidade da matriz em questão (Subseção 2.2.1).

```
monte.carlo.rep <- function (matrix, ind, nit = 100)
{
  if (sum(diag(matrix)) == dim (matrix) [1])
  {
    Func <- mantel
    Type <- cor
  }
  else
  {
    Func <- random.skewers
    Type <- var
  }
  R <- c()
  for (N in 1:nit)
  {
    rand.samp <- rmvnorm2 (ind, rep(0, times = dim (matrix)[1]),
                          sigma = matrix, method = "chol")
    rand.matrix <- Type (rand.samp)
    R[N] <- Func (matrix, rand.matrix, 1000)[1]
  }
  return (mean(R))
}
```

Rotina A.7: Estimaco de repetibilidade para matrizes de covariância ou correlaco através do método *Monte-Carlo*; a função recebe a matriz em questão e dois argumentos referentes ao número de indivíduos que deve amostrar a partir da matriz e o número de reamostragens a ser feito, retornando o valor de repetibilidade da matriz em questão. A rotina ajusta o tipo de função usada na comparação entre a matriz original e suas réplicas de acordo com o tipo de matriz passada como argumento (Subseo 2.2.1).

```

mantel <- function (corr1, corr2, nit = 1000, mod = FALSE)
{
  fix <- normalize (corr1 [lower.tri (corr1)])
  mob <- normalize (corr2 [lower.tri (corr2)])
  real <- fix %*% mob
  dist <- c()
  for (N in 1:nit)
  {
    shuffle <- sample (1:dim(corr1)[1])
    mobb <- normalize (corr2 [shuffle, shuffle] [lower.tri (corr1)])
    dist[N] <- fix %*% mobb
  }
  prob <- sum (dist > as.vector(real)) / nit
  if (mod == TRUE)
  {
    avgM <- mean (corr1 [lower.tri(corr1)] [mob != 0])
    avgm <- mean (corr1 [lower.tri(corr1)] [mob == 0])
    avg.ratio <- avgM / avgm
    output <- c(real,prob,avgM,avgm,avg.ratio)
    names(output) <- c("R²","Probability","AVG+","AVG-","AVG Ratio")
  }
  else
  {
    output <- c(real,prob)
    names(output) <- c("R²","Probability")
  }
  return (output)
}

```

Rotina A.8: Estimação de correlação entre matrizes de correlação através do método de Mantel. A função recebe as duas matrizes em questão e um argumento referente ao número de aleatorizações que deve utilizar, retornando o valor real de correlação entre as duas matrizes e o valor de probabilidade de dissimilaridade associado a este valor (Subseção 2.2.2).

```

random.skewers <- function (vcv1, vcv2, nsk = 10000)
{
  size <- dim (vcv1) [1]
  isovec <- normalize (rep (1, times = size))
  rvec <- array (rnorm (nsk * size, mean = 0, sd = 1), c(size, nsk))
  rvec <- apply (rvec, 2, normalize)
  dist <- abs (isovec %*% rvec)
  dz1 <- apply (vcv1 %*% rvec, 2, normalize)
  dz2 <- apply (vcv2 %*% rvec, 2, normalize)
  real <- abs (apply (dz1 * dz2, 2, sum))
  ac <- mean (real)
  stdev <- sd (real)
  prob <- sum (real < dist) / nsk
  output <- c(ac, prob, stdev)
  names(output) <- c("AC", "P", "SD")
  return(output)
}

```

Rotina A.9: Estimação de correlação entre matrizes de covariância através do método de Vetores Aleatórios. A função recebe as duas matrizes em questão e um argumento referente ao número de vetores aleatórios que deve utilizar, retornando o valor médio de correlações entre respostas nas duas matrizes, o desvio padrão deste valor e o valor de probabilidade de dissimilaridade associado à comparação (Subseção 2.2.3).

```

srd <- function (vcv1, vcv2, ns = 1000)
{
  normalize <- function (x)
  {
    xn <- x/sqrt(sum(x^2))
    return (xn)
  }
  size <- dim (vcv1)[1]
  r2s <- array (0, c(size,ns))
  beta <- apply (array (rnorm (size*ns,
    mean = 0, sd = 1),c(size,ns)),2, normalize)
  for (I in 1:ns)
  {
    beta.matrix <- diag (beta[,I])
    dz1 <- apply (vcv1 %*% beta.matrix, 1, normalize)
    dz2 <- apply (vcv2 %*% beta.matrix, 1, normalize)
    r2s[,I] <- colSums (dz1 * dz2)
  }
  mean.r2 <- apply (r2s, 1, mean)
  sample.conf <- function (x, lower = TRUE)
  {
    ox <- x[order(x)]
    lox <- length (ox)
    if (lower)
      crit <- round (0.025 * lox)
    else
      crit <- round (0.975 * lox)
    return (ox[crit])
  }
  low.r2 <- apply (r2s, 1, sample.conf, lower = TRUE)
  up.r2 <- apply (r2s, 1, sample.conf, lower = FALSE)
  sd.r2 <- apply (r2s,1,sd)
  cmean.r2 <- scale (mean.r2, scale = FALSE)
  csd.r2 <- scale (sd.r2, scale = FALSE)
  cent <- cbind (cmean.r2,csd.r2)
  pca.cent <- princomp (cent, cor = TRUE, scores = TRUE)
  pc1 <- pca.cent$scores[,1]
  if (pca.cent$loadings[1,1] < 0)
    pc1 <- - pc1
  pc1 <- pc1 / sd (pc1)
  pc1.quant <- quantile (pc1,
    probs = c (1,5,10,20,25,30,40,50,
      60,70,75,80,90,95,99)/100, names = FALSE)
  pc1.int <- - 1.96 / sqrt (length (pc1))
  pc1.sig <- ifelse (pc1 < pc1.int, 1, 0)
  model <- list ("quantiles" = pc1.quant,
    "interval" = pc1.int,
    "code" = pc1.sig)
  output <- cbind (mean.r2, low.r2, up.r2, sd.r2, cmean.r2, csd.r2)
  colnames (output) <- c("ARC","IC-","IC+","SD","CMEAN","CSD")
  rownames (output) <- rownames (vcv1)
  return (list ("out" = output,
    "pc1" = pc1,
    "model" = model,
    "cormat" = cor (t(r2s))))
}

```

Rotina A.10: Comparação de matrizes de covariância através do método SRD. A função recebe as duas matrizes em questão e um argumento referente ao número de vetores aleatórios que deve utilizar, retornando o valor médio de correlações entre respostas nas duas matrizes para cada caráter, bem como o modelo que distingue os caracteres que representam as principais dissimilaridades entre as duas matrizes, conforme a Subseção 2.2.4.

A.3 Análise de modularidade

```
mod.main <- function (cor, modhip, nit = 1000)
{
  no.hip <- dim (modhip) [2]
  traits <- dim (modhip) [1]
  m.hip.array <- array (0, c(traits, traits, no.hip + 1))
  for (N in 1:no.hip)
  {
    for (L in 1:traits)
    {
      for (M in 1:traits)
      {
        m.hip.array[L,M,N] <-
          ifelse (modhip[L,N] & modhip[M,N], 1, 0)
      }
    }
  }
  m.hip.array[, ,no.hip+1] <-
  as.integer (as.logical (apply (m.hip.array, c(1,2), sum)))
  no.hip <- no.hip + 1
  output <- array (0, c(5, no.hip))
  for (N in 1:no.hip)
  {
    tmp <- mantel (cor, m.hip.array[, ,N], mod = TRUE)
    output[,N] <- tmp
  }
  dimnames(output) <-
    list (names (tmp), c (colnames (modhip), "Full Integration"))
  return (output)
}
```

Rotina A.11: Comparação entre matrizes de correlação e hipóteses de modularidade. A função recebe uma matriz de correlação e um conjunto de hipóteses de modularidade na forma de uma matriz de caracteres *versus* hipóteses, além do número de aleatorizações a ser feito sobre cada matriz teórica. A função retorna a associação da matriz com cada hipótese do conjunto de hipóteses, de forma bastante similar à Tabela 4.9a, por exemplo. Esta rotina também é capaz de calcular uma matriz de integração total, somando as matrizes geradas para cada módulo (Subseção 2.3.2).