

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**A evolução molecular da rede gênica da oxitocina em primatas e outros
vertebrados**

Carlos Meton de Alencar Gadelha Vieira

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

Orientação: profa. Maria Cátira Bortolini

Porto Alegre

Março - 2012

Agradecimentos

À professora Maria Cátira Bortolini, pela generosidade de me acolher como orientando e conduzir o projeto de maneira sóbria, sempre se guiando pela qualidade dos objetivos;

A Vanessa Rodrigues Paixão Côrtes, pela excepcional dedicação a todas as questões relativas ao projeto, desde o seu primeiro esboço;

Ao professor Francisco Mauro Salzano, pelo prazer da convivência e pelo exemplo exato de um intelectual;

A Pedro Vargas Pinilla, pela amizade e colaboração na realização de experimentos *in vitro*, assim como na coleta dos dados de primatologia;

A Liédja Maria Pontes Mascarenhas, pela amizade e auxílio com as dificuldades “esotéricas” dos *softwares*;

Ao prof. Claiton Bau pela leitura e considerações úteis ao meu projeto de dissertação;

Ao Prof. Dr. Fabrício Santos e ao Dr. Rodrigo Redondo do banco de DNA da Universidade Federal de Minas Gerais, pela colaboração e pelo empréstimo das amostras;

Ao Dr. Alcides Pissinatti, veterinário responsável pelas coletas de amostras de Macacos do Novo Mundo;

Ao Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ-FEEMA) e à Estação Ecológica Estadual Paraíso (ESEC/ FEEMA), por disponibilizarem material científico e pela orientação na execução da pesquisa;

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

A Elmo Cardoso, pela pronta resposta a questões e demandas relativas às normas e ao bom andamento do programa de mestrado;

Aos colegas do LEHM - Laboratório de Evolução Humana e Molecular: Álvaro Silveira, Caio César Silva de Cerqueira, Eduardo Guerra Amorim, Eli Vieira Araújo Júnior, Rafael Bisso Machado, Luana Maciel e Tábita Hünemeier, por todos os momentos divididos na sala 129, e pelas conversas inspiradoras, que sempre equilibraram uma franca inspiração científica com o bom humor de um bate-papo entre amigos;

A Clênio Machado, pelo suporte técnico na realização dos experimentos *in vitro*;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelos novos conceitos que adquiri neste período;

A Sílvia Beatriz Fonseca de Melo, pela companhia, amizade, apoio e compreensão nos momentos fundamentais desta trajetória;

Aos meus pais, Vanius Meton Gadelha Vieira e Maria Auxiliadora Mota Gadelha Vieira, que me ensinaram a enfrentar todo desafio intelectual com muito prazer.

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
1. Introdução	9
1.1 - Histórico	
1.2 - Estudos comportamentais	
1.3 - O sistema oxitocinérgico	
1.3.1. Evolução do sistema	
1.3.2. A oxitocina (OXT)	
1.3.3. O receptor de oxitocina (OXTR)	
1.4 - Primatas	
2. Objetivos	26
3. Material e Métodos	27
3.1 – Amostras	
3.2 - Extração de DNA	
3.3 - PCR	
3.4 - Sequenciamento	
3.5 - Análises de dados	
3.5.1. Comparação das mutações não-sinônimas do gene OXTR em primatas	
3.5.2. Comparação das taxas evolutivas do gene OXTR em primatas e outros vertebrados	
3.5.3. Determinação da rede funcional da oxitocina em primatas e outros vertebrados	
3.5.4. Comparação da conservação da rede funcional da oxitocina em primatas e outros vertebrados	

4. Resultados e Discussão

33

4.1 - Sequenciamento do gene OXTR

4.2 - Variações não-sinônimas do gene OXTR

4.3 - Comparação das taxas evolutivas do gene OXTR em vertebrados

4.4 - Desenho da rede funcional de oxitocina

4.5 - Comparação da rede funcional de oxitocina

5. Referências Bibliográficas

53

Lista de Figuras

Figura 1 – Evolução da família dos nonapeptídeos em vertebrados.

Figura 2 – Diagrama simplificado dos genes de oxitocina e vasopressina.

Figura 3 - Esquema gráfico do gene *OXTR* e sua correspondência com a estrutura do receptor da oxitocina.

Figura 4- Filogenia dos primatas estudados neste projeto.

Figura 5 – Sequência primária da proteína *OXTR* humana.

Figura 6 – Estrutura secundária da proteína *OXTR* humana.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Variação comportamental e fisiológica entre as espécies de primatas estudadas.

Tabela 2: Amostras do banco de DNA de primatas do Laboratório de Evolução Humana e Molecular (LEHM).

Tabela 3. Espécies de vertebrados incluídos nas análises da rede gênica de oxitocina.

Tabela 4. Lista de *primers* confeccionados e utilizados para amplificação do gene *OXTR*.

Tabela 5 - Resultados obtidos no sequenciamento do gene *OXTR*.

Tabela 6 – Diferenças não-sinônimas no gene *OXTR* entre humanos e outros primatas.

Tabela 7 - Parâmetros estimados sobre diversos modelos de substituição de códons para o gene *OXTR*.

Tabela 8 - Descrição dos 12 genes que participam da rede funcional da oxitocina.

Tabela 9 - Comparação da conservação da rede funcional da oxitocina.

Resumo

Nos últimos anos, numerosas evidências da literatura científica têm atribuído ao hormônio nonapeptídico oxitocina (OXT) diversas ações sobre o comportamento animal. Para uma melhor compreensão desta associação, objetivou-se neste trabalho um estudo da evolução molecular da porção codificadora do gene do receptor da oxitocina (*OXTR*) em espécies da ordem *Primates*, assim como o desenho de uma rede gênica funcional da oxitocina, e sua análise ao longo de diversas linhagens de vertebrados. Obtivemos a sequência parcial de cDNA do gene *OXTR* para nove espécies de macacos do Novo Mundo, dado ausente na literatura até o momento. Associando estas informações à sequência de outras espécies de primatas que possuem o seu genoma descrito em banco de dados eletrônico, realizamos a comparação das porções codificantes do *OXTR*: entre 12 espécies de primatas para o éxon 3, e 17 espécies para o éxon 4. Descrevemos a ocorrência de 30 variações de códons não-sinônimas, distribuídas em 22 sítios diferentes. Evidenciamos o domínio intracelular 4 (IC4) como a região de menor conservação da proteína *OXTR*, respondendo por 46,6% (14/30) das variações observadas. De forma semelhante, este domínio apresentou o maior número de substituições moderadamente radicais, segundo critérios químicos (escore de Grantham). Identificamos três variações de sítios características, adjacentes a resíduos bastante conservados ao longo da filogenia por sua grande importância funcional. Uma análise de máxima verossimilhança códon-por-códon de sequências do gene *OXTR* em 38 espécies de vertebrados mostrou que a seleção negativa é a maior força agindo sobre o gene *OXTR*, embora 10% dos sítios apresentem um possível relaxamento. Metodologias da biologia de sistemas foram combinadas para o desenho de uma rede funcional da oxitocina, composta pelos genes *AVP*, *AVPR1A*, *AVPR1B*, *ESR1*, *FOS*, *HCRT*, *OXT*, *OXTR*, *PRL*, *PRLH*, *PRLR* e *TRH*. O nível de conservação destes 12 genes foi estudado em 36 espécies de vertebrados por meio da comparação das proteínas traduzidas com o seu homólogo humano. Identificaram-se dois grupos gênicos de padrão de conservação significativamente diferentes: um grupo mais conservado, associado à oxitocina (*OXT*), e um grupo mais diverso, relacionado à prolactina (*PRL*).

Abstract

During the past years, many evidences from scientific literature have ascribed several actions over animal behaviour to the nonapeptidic hormone oxytocin (OXT). For a better understanding of this association, it was aimed on this research an assay on molecular evolution of the coding sequence of the oxytocin receptor gene (*OXTR*) on species from the order *Primates*, and also the design of an oxytocin gene network and its analysis through several vertebrate lineages. We obtained the partial sequence of cDNA from gene *OXTR* for nine species of New World monkeys, an unpublished data until present. Blending these informations to the sequence of other primates, available at genomic databases, we compared the coding regions of *OXTR*: among 12 primate species for exon 3, and 17 species for exon 4. We described 30 non-synonyms changes, distributed along 22 different sites. We found that intracellular domain 4 (IC4) has the lowest conservation rate of the *OXTR* protein, being responsible for 46,6% (14/30) of the observed variations. Likewise, this domain presented the highest number of moderately radical substitutions, according to chemical criteria (Grantham score). We identified three characteristic sites changes, located besides aminoacids high-conserved for its great functional importance. A maximum-likelihood analysis by codon of the *OXTR* gene sequence on 38 vertebrate species showed that negative selection is the strongest power acting over the *OXTR* gene, although 10% of the sites are presented as possibly relaxed. Methodologies from systems biology were combined for design of an oxytocin functional network, composed by genes *AVP*, *AVPR1A*, *AVPR1B*, *ESR1*, *FOS*, *HCRT*, *OXT*, *OXTR*, *PRL*, *PRLH*, *PRLR* and *TRH*. Conservation levels from those 12 genes were studied on 36 vertebrate species by comparing the translated protein with its human homologous. Two assembling of genes showed conservation pattern significantly different: a more conserved group, associated to oxytocin (*OXT*), and a more diverse one, related to prolactin (*PRL*).

1. Introdução

1.1 - Histórico

A hipófise, ou glândula pituitária, é uma estrutura diminuta, localizada na base do crânio, que parece ter sido negligenciada por muitos séculos pelos cientistas, sendo considerada rudimentar e sem importância funcional. Este panorama muda com os estudos farmacológicos pioneiros na área de endocrinologia, realizados por Oliver & Schafer, em 1895. Seguindo um desenho experimental comum, estes pesquisadores investigaram os efeitos fisiológicos de extratos obtidos de diversas glândulas do organismo, incluindo a hipófise, e obtendo um sucesso particular na identificação da adrenalina, extraída das glândulas supra-renais (Bell, 1909). Posteriormente, Dale (1906) descreveu o efeito da hipófise sobre a contração uterina, ao mostrar a persistência de uma resposta do miométrio à sua administração endovenosa mesmo após o bloqueio da aferência de via simpática por meio do uso de ergot. Com a ampliação e refinamento das observações realizadas em diversas condições fisiológicas, este efeito farmacológico sobre o miométrio foi localizado no lobo posterior pituitário e na região do infundíbulo, estrutura anatômica que conecta a glândula com restante do encéfalo (Dale, 1909). Outros pesquisadores, utilizando-se de extrato do infundíbulo de pituitária preparado por Dale, encontraram efeitos semelhantes sobre úteros submetidos a diversos estados fisiológicos, mostrando ter o extrato um efeito pronunciado sobre o útero gravídico de fêmeas de coelho em relação ao útero de fêmeas virgens, com a ocorrência de contrações mais fortes, freqüentes e prolongadas, sugerindo uma sensibilidade uterina variável ao estímulo do

hormônio (Bell & Hich, 1909). Neste mesmo artigo, os últimos autores anunciaram um produto terapêutico baseado no extrato infundibular, a ser lançado no mercado sob a forma hipodérmica, para uso específico na prática obstétrica. De fato, os efeitos observados pelo extrato pituitário sobre a contração do miométrio superaram qualquer outro produto conhecido até então, sendo utilizado para a prevenção de complicações pós-cirúrgicas de cesáreas e no tratamento de hemorragias pós-parto, na hipotonia uterina (Bell, 1909), assim como na indução do trabalho de parto (Bell, 1915). O extrato de infundíbulo pituitário, apelidado de “infundibulina”, também foi capaz de acelerar a secreção mamária de leite em cabras (Ott & Scott, 1910).

Com o avanço das técnicas bioquímicas, surgiram opiniões opostas no que se refere às múltiplas ações fisiológicas observadas pela administração do extrato pituitário (contração uterina, vasopressora, diurética). Abel e colaboradores defendiam a idéia de que seria uma única substância a responsável por todos estes efeitos, sendo a mesma nomeada histamina (Abel & Macht, 1919). Porém, Dudley (1919) teve maior sucesso, com a separação bioquímica de dois princípios com ações diferentes: o “estimulante uterino” e a histamina (Acher, 1968). O primeiro princípio foi nomeado oxitocina, neologismo grego que significa “parto rápido”, uma referência à sua aplicação clínica mais freqüente. A dificuldade técnica na separação bioquímica dos princípios ativos do extrato se devia à grande homologia entre os hormônios oxitocina e vasopressina, como veremos posteriormente. Anos mais tarde, Du Vigneaud *et al.* (1953) propuseram a estrutura da oxitocina, um nonapeptídeo, e no mesmo ano realizaram a sua síntese - a primeira realizada de um hormônio polipeptídico - e confirmaram a

atividade oxitócica e sobre a ejeção de leite do hormônio sintético em humanos. Brownstein *et al.* (1980), por sua vez, descreveram a produção e a liberação de uma molécula precursora da oxitocina, a pré-pró-oxitocina-neurofisina I, por neurônios do sistema hipotálamo-neurohipofisário, e a clivagem do precursor ao longo do seu transporte axonal para a glândula. A sequência do peptídeo precursor do hormônio bovino foi definida por análise de cDNA (Land *et al.*, 1983; Ivell & Richter, 1984), chamando atenção o alto grau de homologia entre a neurofisina I e II, esta última associada a outro hormônio hipofisário, a vasopressina, o que sugere que tenha ocorrido um evento de duplicação gênica recente (Ruppert *et al.*, 1984). Já a estrutura e expressão do gene do único receptor conhecido da oxitocina foram obtidas posteriormente, assim como um receptor funcional, responsivo ao hormônio (Kimura *et al.*, 1992).

1.2 - Estudos comportamentais

De Wied (1965) efetuou a remoção da porção posterior da hipófise em ratos, observando a perda das respostas previamente condicionadas de aversão, sendo este déficit reversível pela administração de peptídeos hipofisários. Este fato tornou evidente um possível papel na formação de memória dos produtos secretados pela hipófise. Foi então proposto que a oxitocina também exerceria ações negativas sobre a consolidação de memória (Bohus *et al.*, 1978). Por outro lado, a vasopressina teria efeito oposto promovendo a consolidação da memória (Bohus *et al.*, 1978).

O aprofundamento dos estudos a respeito destes dois nonapeptídeos (oxitocina e vasopressina) gerou um enorme avanço na compreensão da fisiologia

e distribuição dos neuropeptídeos cerebrais (De Wied, 1997; Neumann, 2008). O receptor da oxitocina foi localizado em diversas áreas cerebrais, incluindo o hipocampo, sendo demonstrado que esta proteína possui as mesmas propriedades farmacológicas que a sua forma uterina (Elands *et al.*, 1991).

Levando em consideração que a oxitocina, em suas ações periféricas mais conhecidas, está associada prioritariamente às funções reprodutivas em mamíferos, e que os níveis séricos do hormônio se elevam drasticamente por ocasião da fase expulsiva do parto, teve início uma investigação do seu papel sobre o comportamento maternal, acreditando-se na harmonia e sobreposição de suas ações endócrinas e comportamentais (Klopper, 1971). Um método de transfusão sanguínea cruzada entre ratas virgens e parturientes indicou a existência de fatores humorais envolvidos na indução do comportamento maternal (Terkel & Rosenblatt, 1972). Pedersen & Prange (1979), por sua vez, administraram oxitocina em ventrículos laterais de cérebros de ratas virgens, que exibiram comportamento maternal em relação a filhotes adotivos. Nestas três últimas décadas, um corpo crescente de linhas de pesquisa tem evidenciado um papel preponderante da oxitocina e demais nonapeptídeos como importantes geradores de diversidade comportamental, talvez mais do que qualquer outro sistema neuroquímico (Goodson, 2008).

1.3 - O sistema oxitocinérgico

1.3.1. Evolução do sistema

Nonapeptídeos já foram identificados e isolados em uma grande quantidade de espécies, tanto vertebrados como invertebrados (Hoyle, 1998).

Constituiu-se num sistema molecular que teve um constante aumento de complexidade ao longo da trajetória evolutiva. Diversos nonapeptídios de invertebrados apresentam semelhanças estruturais com a arginina-vasotocina (AVT), nonapeptídeo encontrado em todos os vertebrados não-mamíferos estudados até o momento, o que indica que provavelmente o gene codificador desta molécula teria surgido na era pré-cambriana, há mais de 600 milhões de anos, e seria o ancestral dos demais membros da família dos nonapeptídios (Goodson, 2008). Foi proposto ainda que a função primitiva destas moléculas estivesse na indução de contrações rápidas em células musculares lisas, promovendo a expulsão de produtos presentes no interior da cavidade celômica. Em anelídeos, por exemplo, foi observado que a anetocina - um peptídeo homólogo à oxitocina - age sobre a contratilidade de nefrídios, órgãos excretores responsáveis pela osmorregulação e oviposição (Ivell et al., 2001). Em minhocas (*Eisenia foetida*), a administração de oxitocina desencadeou comportamentos estereotipados de oviposição (Oumi et al., 1996), o que demonstra a intensa conservação deste sistema hormonal ao longo da evolução. Uma duplicação do gene AVT (Figura 1), ocorrida em peixes há cerca de 450 milhões de anos atrás, originou o ramo isotocina-mesotocina-oxitocina da família (Goodson, 2008), o que permitiu uma diversificação de mensagens moleculares, seja por processamento diferencial dos precursores, diversidade de receptores hormonais, ou ainda pela diferenciação de efetores ativados no interior de células-alvo (Acher & Chauvet, 1995). Esta divergência na família gênica tem por consequência uma especialização do sistema como um todo (Gimpl & Fahrenholz, 2001). A oxitocina está envolvida, em mamíferos, na contratilidade de músculos responsáveis pela

menstruação, espermição, ejaculação, parto e lactação (Ivell et al., 2001), assim como responde por uma grande variedade de comportamentos associados à reprodução (Lee et al., 2009). Já a vasopressina, como visto anteriormente, outro membro importante da família, está envolvida na osmorregulação em mamíferos (Acher et al., 1995).

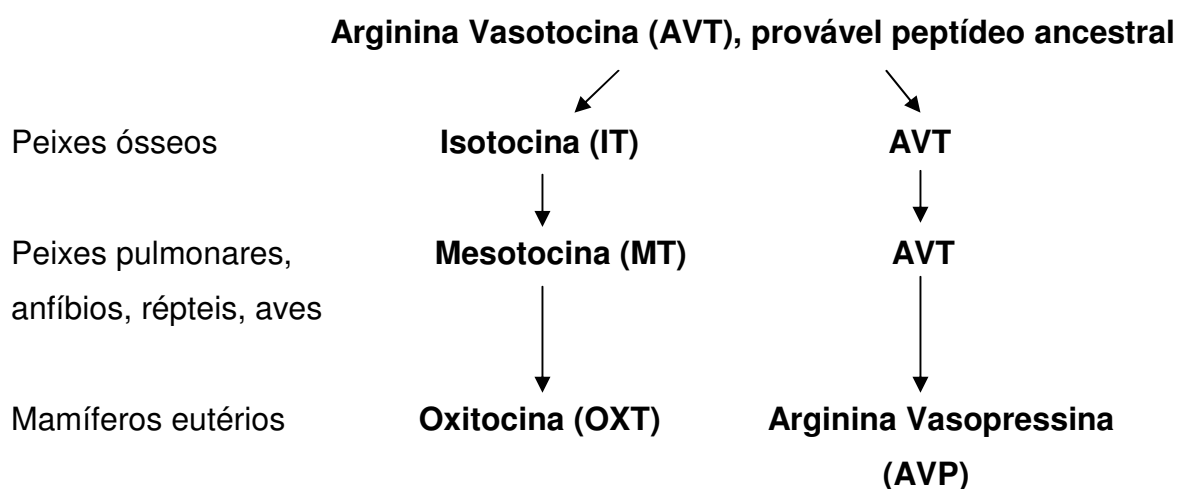


Figura 1 – Evolução da família dos nonapeptídeos em vertebrados (modificado de Acher & Chauvet, 1995)

Minakata (2010) descreveu recentemente a co-existência de dois genes que expressam nonapeptídeos em cefalópodes, com especialização de funções de forma análoga à superfamília dos vertebrados. Entre os peixes cartilagosos (*Chondrichthyes*) ocorreram duplicações gênicas secundárias, com a expressão de até quatro nonapeptídeos em algumas espécies. Ao menos seis peptídeos semelhantes à oxitocina estão expressos dentro do grupo, incluindo a própria oxitocina (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Esta grande diversidade do sistema oxitocinérgico em *Chondrichthyes* parece ter sido resultado da modificação do sistema de osmorregulação destes animais, livrando os peptídeos semelhantes à oxitocina de uma forte pressão seletiva, o que permitiu o surgimento de muitas variações neutras (Hoyle, 1998). Nos peixes ósseos (*Osteichthyes*) estudados, a isotocina é o único nonapeptídeo semelhante à oxitocina. Durante a transição para o ambiente terrestre, a isotocina foi substituída pela mesotocina, que por sua

vez está presente em todos os tetrápodes, exceto nos eutérios e protérios, que expressam oxitocina. Entre os metatérios ocorre certa diversidade, também com a ocorrência de duplicações secundárias, e a co-existência da mesotocina e oxitocina em algumas espécies. Apesar das várias modificações sofridas, a molécula de oxitocina difere de AVT por apenas um aminoácido, o que sugere uma forte pressão seletiva sobre o sistema. A evolução do ramo original da família, por sua vez, parece ter sido mais conservadora, com o surgimento da vasopressina em mamíferos, também pela substituição de apenas um aminoácido de AVT (Goodson, 2008).

1.3.2. A oxitocina (OXT)

Há quase sessenta anos que se conhece a estrutura molecular da oxitocina (Du Vigneaud *et al.*, 1953), um nonapeptídeo (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-GlyNH₂) constituído por uma porção cíclica, formada por uma ponte dissulfeto entre os resíduos de cisteína na posição 1 e 6, e uma cauda carboxi-terminal com três resíduos de aminoácidos. A formação cíclica é essencial para a interação com seu receptor, tendo um papel especial a isoleucina (Ile) localizada na posição 3 (Hoyle, 1998). A presença de um aminoácido neutro na posição 8 (no caso da oxitocina, a leucina) é a característica que distingue o grupo da oxitocina em relação ao grupo da vasopressina, cujos peptídeos possuem um aminoácido básico nesta mesma posição (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Porém, recentemente foi encontrada uma variação neste sítio (8Leu→Pro) distribuída no grupo dos macacos do novo mundo (Lee *et al.*, 2011). Embora o resíduo de prolina confira uma maior rigidez estrutural a este pequeno hormônio, tal substituição é considerada moderadamente conservadora por critérios químicos (Li, 1984). Mas a observação de uma variabilidade antes desconhecida da oxitocina dentro do grupo dos mamíferos indica que assim como o ligante, o sistema como um todo pode apresentar diferenças interespecíficas que podem, em seu conjunto, servir de base explicativa para diferenças fisiológicas ou comportamentais. Apesar do alto grau de homologia (80%) entre os dois nonapeptídeos, oxitocina e vasopressina, eles são considerados separadamente

devido a uma clara divergência de suas atividades fisiológicas, da estrutura gênica e de suas linhagens evolutivas, como visto acima (Hoyle, 1998).

O gene da oxitocina (*OXT*) codifica o precursor do hormônio - pré-pró-oxitocina-neurofisina I - e possui três éxons. O primeiro éxon codifica um sinal de translocação, o nonapeptídeo, um sinal de processamento tripeptídico, e os primeiros nove resíduos de neurofisina I. O segundo éxon codifica a porção central da neurofisina I. O terceiro éxon codifica a região carboxi-terminal da neurofisina I (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Como resultado da duplicação do gene comum ancestral, os genes da oxitocina e da vasopressina (*AVP*) estão presentes na mesma região cromossômica em todas as espécies, e apresentam uma distância intergênica variável (Figura 2, Gimpl & Fahrenholz, 2001). O gene *OXT* humano se localiza no cromossomo 20p13, e a distância intergênica com o gene *AVP* é de 12 kb (Rao *et al.*, 1992). É provável que tenha ocorrido a inversão de um dos genes, pois *OXT* e *AVP* são transcritos em direções opostas (Lee *et al.*, 2009). De modo geral, a regulação do gene da oxitocina *in vivo* parece ser um resultado da interação complexa de múltiplos *enhancers* e repressores. Curiosamente, o gene da oxitocina não possui *enhancer* a montante da sua extremidade 5', e sim sobre a região intergênica, na distância de 0,5-3 kb a jusante do gene *AVP* (Gimpl & Fahrenholz, 2001). O mRNA de oxitocina em ratos mostra um aumento do comprimento da cauda de poli(A) em resposta à ativação do sistema hipotálamo-neurohipofisial durante a gestação e lactação, por exemplo. Esse fato aumenta a estabilidade do mRNA e possivelmente determina uma maior intensidade de tradução do hormônio sob estas condições (Carter & Murphy, 1991). Uma análise recente dos dados do banco HapMap revelou 14 SNPs no gene *OXT* de humanos, todos estes em regiões não-codificantes (Xu *et al.*, 2008).

Em vertebrados, o precursor da oxitocina está sujeito à clivagem e outras modificações, à medida que é transportado ao longo dos axônios do sistema até os seus terminais localizados na hipófise (Brownstein *et al.*, 1980), onde são estocadas a oxitocina e neurofisina I maduras, até que sua liberação ocorra por sinalização neural. As neurofisinas são proteínas com 93-95 resíduos, ricas em resíduos de cisteína que exercem um papel crucial na construção da estrutura

terciária protéica, por meio da formação de ligações dissulfeto. A estrutura básica das neurofisinas parece estar conservada em moluscos (van Kesteren *et al.*, 1992), cefalópodes (Minakata, 2010) e anelídeos (Oumi *et al.*, 1996). A neurofisina I tem por função a localização, empacotamento e armazenamento da oxitocina dentro dos grânulos neurosecretores da hipófise, antes da liberação do hormônio na corrente sanguínea. O resíduo de cisteína na posição 1 da oxitocina, que possui um grupo amino protonado, estabelece ligações eletrostáticas e múltiplas pontes de hidrogênio com a neurofisina I (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Como a força destas ligações está na dependência do pH ambiente, a dissociação do complexo oxitocina-neurofisina I se efetua quando ocorre a mudança de um ambiente ácido (dentro dos grânulos neurosecretores) para um ambiente neutro (como o plasma). Portanto, uma vez ocorrida a exocitose da oxitocina pelos neurônios hipofisários, a neurofisina I perde a capacidade de influenciar as ações periféricas e centrais do nonapeptídeo. Portanto, não é surpresa que mutações na porção do gene que codifica a neurofisina I são mais frequentemente encontradas do que na porção do gene que codifica a oxitocina, o que se deve em parte ao maior comprimento da primeira, bem como ao fato desta também estar sujeita a uma menor pressão seletiva (Hoyle, 1998). Recentemente, variantes do *locus* que abriga o agrupamento OXT-AVP foram associadas com casos de esquizofrenia em um grupo familiar (Teltsch *et al.*, 2011). No gene da vasopressina (AVP) foram descritas mutações que afetam o padrão de dobramento da neurofisina II associadas ao *diabetes insipidus* de herança autossômica dominante (Rutishauser *et al.*, 1999).

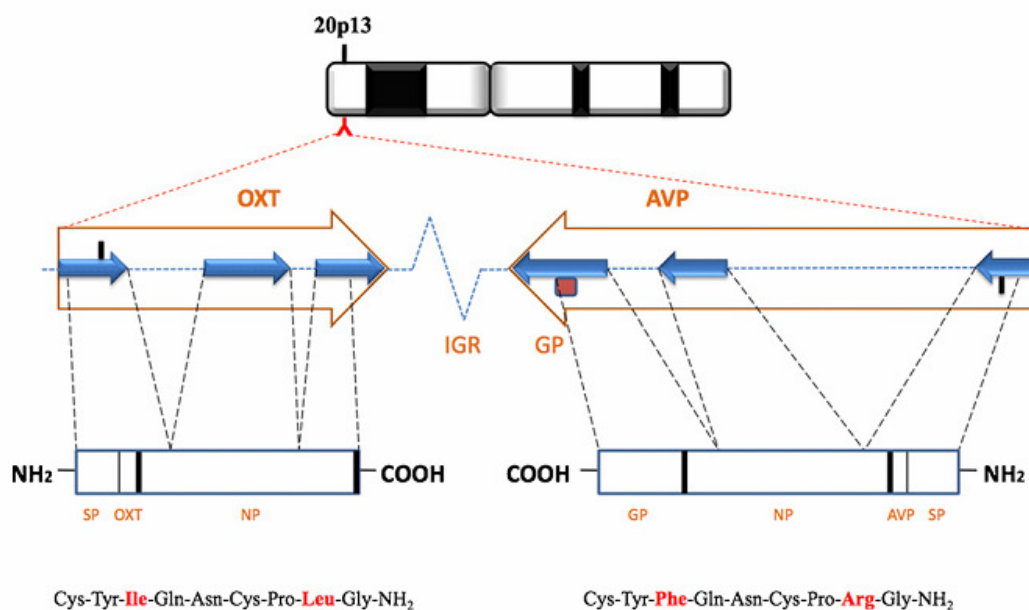


Figura 2 – Diagrama simplificado dos genes de oxitocina e vasopressina (respectivamente *OXT* e *AVP*) representado pelas setas grandes, os pré-pró-hormônios (caixas), e neuropeptídeos (seqüência de aminoácidos abaixo). A sua localização cromossômica em humanos é exibida acima. Os éxons são mostrados como setas azuis pequenas, e os íntrons como linhas pontilhadas. IGR, região intergênica; SP, peptídeo sinalizador; NP, neurofisina; GP, glicopeptídeo. Os resíduos de aminoácidos que diferem entre as moléculas estão representados em vermelho (Extraído de Lee *et al.*, 2009).

1.3.3. O receptor de oxitocina (OXTR)

O OXTR é uma proteína com 389 aminoácidos, apresentando sete domínios transmembrana, e pertence à classe I da família de receptores associados à proteína G (Kimura *et al.*, 1992). Resíduos conservados neste grupo de receptores parecem estar envolvidos nos mecanismos comuns para ativação e transmissão do sinal para o segundo mensageiro, neste caso uma proteína G. Com base em estudos de receptores modelos do grupo, se aceita que para adquirir a conformação ativa, o OXTR sofre uma mudança conformacional em seus domínios transmembrana 3 e 6, o que expõe os locais de ligação da proteína G. Mais especificamente, na classe I deste grupo de receptores, uma asparagina no segundo domínio transmembrana e um tripeptídeo (E/D RY) na interface entre o domínio transmembrana 2 e a primeira alça intracelular parecem importantes para a ativação do receptor. Modificações direcionadas destes

resíduos modificaram a capacidade de ativação do segundo mensageiro (Gimpl & Fahrenholz, 2001). A homologia mais alta entre OXTR de diversas espécies é encontrada nas alças extracelulares e as hélices transmembranas. Os terminais amino e carboxílico possuem semelhanças menores, e as alças intracelulares são as menos conservadas (Gimpl & Fahrenholz, 2001).

O gene *OXTR* está presente em cópia única no genoma humano, e está localizado no locus 3p25–3p26.2. Possui tamanho de 17 kb e contém 3 íntrons e 4 éxons (Figura 3). Os dois primeiros éxons correspondem à região 5' não codificante, e os dois últimos codificam o receptor. O íntron 3, que é o maior com 12 kb, separa a região codificante imediatamente após o sexto domínio transmembrana. O éxon 4 contém a sequência codificante do sétimo domínio transmembrana, o carboxi-terminal, e a inteira região não codificante 3', incluindo os sinais de poliadenilação. A proteína OXTR apresenta sete domínios transmembrana (TM), quatro regiões extracelulares (EC) e quatro intracelulares (IC), sendo que o somente o domínio intracelular 4 e o domínio transmembrana 7 são codificados pelo éxon 4.

Como visto anteriormente, a oxitocina está tradicionalmente associada a ações periféricas sobre o útero e glândulas mamárias, e mais recentemente seu papel como neurotransmissor com importância no comportamento reprodutivo e social tem sido bem documentado. No entanto, a distribuição de seu receptor é mais ampla, abrangendo diversos órgãos e linhagens celulares: rins, ovários, testículos, timo, músculo cardíaco, endotélio vascular, osteoclastos, mioblastos, células de ilhotas pancreáticas, adipócitos, e vários tipos de câncer (Zingg & Laporte, 2003). Muitas das propriedades deste sistema são ainda obscuras, e o fato de que ocorre uma semelhança dos níveis do hormônio no plasma de ambos os sexos em espécies de vertebrados sugere que a oxitocina possui funções fisiológicas desconhecidas (Gimpl & Fahrenholz, 2001).

Um fato adicional aumenta ainda mais a complexidade deste sistema: a distribuição dos receptores OXTR é altamente variável e espécie-específico, com diferenças amplas e qualitativas sendo observadas até mesmo entre espécies que são proximamente relacionadas (Goodson *et al.*, 2008). Curiosamente,

embora os estudos mostrem a importância do gene *OXTR* e seus ortólogos para o comportamento animal, são relativamente escassos e pouco conclusivos os estudos que buscam desvendar a trajetória evolutiva deste gene. Embora seja cada vez mais freqüente o número de espécies de vertebrados cujo genoma é conhecido, até o momento somente as seqüências codificadoras das espécies *Homo sapiens*, *Macaca mulata*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Rattus rattus* e *Sus domesticus* foram comparadas.

É importante salientar ainda que, como descrito em outros trabalhos que se utilizaram de técnicas para investigar a evolução molecular de genes em uma determinada filogenia, em vários ramos da árvore pode haver sinal evidente (ausência de variação) de forte ação de seleção purificadora agindo sobre o gene *OXTR*, enquanto em outros ramos da mesma filogenia pode haver clara evidencia de relaxamento da pressão de seleção, na medida em que uma surpreendente variedade é encontrada, num contexto conhecido como o de “janela evolutiva” (Pereira *et al*, 2006).

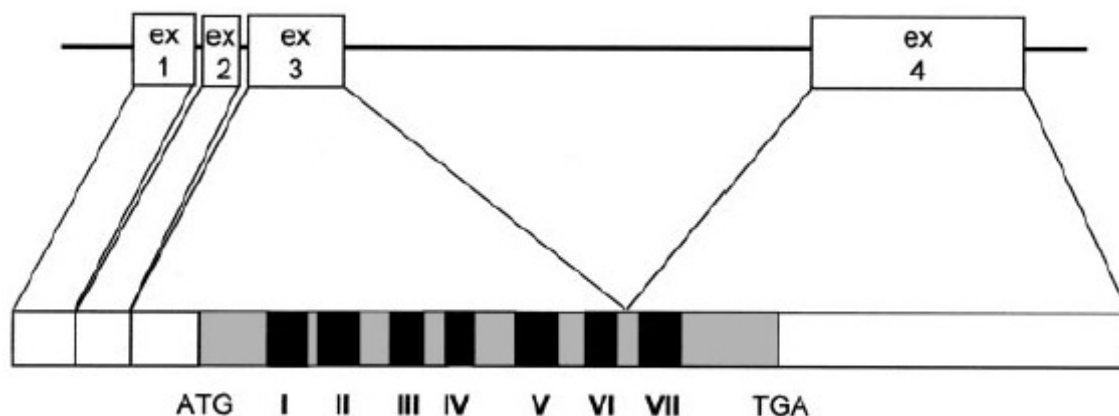


Figura 3 - Esquema gráfico do gene *OXTR* e sua correspondência com a estrutura do receptor da oxitocina. As bandas escuras numeradas por algarismos romanos correspondem aos domínios transmembrana do receptor *OXTR* (extraído de *Gimpl & Fahrenholz, 2001*)

1.4 - Primatas

A ordem *Primates* apresenta uma considerável diversidade – são mais de 230 espécies não extintas, distribuídas em 13 famílias (Myers, 2000). Morfologicamente, este grupo se identifica por um conjunto de apresentações típicas do crânio, membros e dentição, em particular: as órbitas frontais associadas a uma visão estereoscópica, uma redução relativa dos órgãos olfatórios, uma alta capacidade craniana, associada a uma expansão do córtex cerebral, e o movimento de oposição dos polegares e hálux. Muitas das características atuais dos primatas surgiram como adaptação para a vida arbórea ou foram traços primitivos que persistiram pela mesma razão, mesmo após a passagem de algumas espécies para o ambiente terrestre (Myers, 2000). Embora vários estudos moleculares indiquem que a linhagem dos primatas divergiu de outros mamíferos placentários há cerca de 90 milhões de anos, os traços característicos de sua morfologia provavelmente emergiram mais tarde, explicando a razão para o tempo de divergência menor encontrado nos registros fósseis, por volta de 54 a 81 milhões de anos atrás (Tavaré *et al.*, 2002).

Os primatas são divididos em duas subordens: *Strepsirrhini* e *Haplorrhini* (Figura 4). Estimativas que se utilizaram de métodos filogenéticos bayesianos sobre sete genes mitocondriais e três genes nucleares indicam um tempo de divergência entre estes dois clados de 64 milhões de anos atrás (Chatterjee *et al.*, 2009). Os estrepsirrininos mantiveram características mais ancestrais, como o nariz longo e desprotegido pela ausência de uma estrutura cartilaginosa, os dentes incisivos inferiores em forma de pente, e a ausência de uma placa óssea que separe a órbita da fossa temporal. Compreendem, em sua maioria, espécies de hábito arbóreo e noturno (Myers, 2000). Entre os haplorrininos, se inclui as espécies de tásio (infra-ordem *Tarsiiformes*), cuja posição filogenética foi um debate só concluído recentemente, graças à disponibilidade do genoma de *Tarsius syrichta* na íntegra (Jameson *et al.*, 2011). Durante décadas, a literatura científica se referiu ao táxon *Prosimii*, que unia os estrepsirrininos aos társios. Mas tornou-se evidente que este grupo é parafilético, ou seja, não divide um ancestral comum mais próximo do que o restante das espécies de haplorrininos (infra-ordem

Anthropoidea). Este último clado abrange as parvordens *Platyrrhini* e *Catarrhini*, que divergiram cerca de 43 milhões de anos atrás (Chatterjee *et al.*, 2009). Os platirrininos, ou macacos no Novo Mundo, possuem nariz achatado com narinas dirigidas para fora, enquanto que os catarrinos possuem narinas direcionadas para baixo (Kumar & Hedges, 1998). Há cerca de 29 milhões de anos atrás, ocorreu a divergência da parvordem *Catarrhini* nas superfamílias *Cercopithecoidea* (macacos do Velho Mundo) e *Hominoidea*, esta última, por sua vez, composta pelas famílias *Hylobatidae* e *Hominidae*.

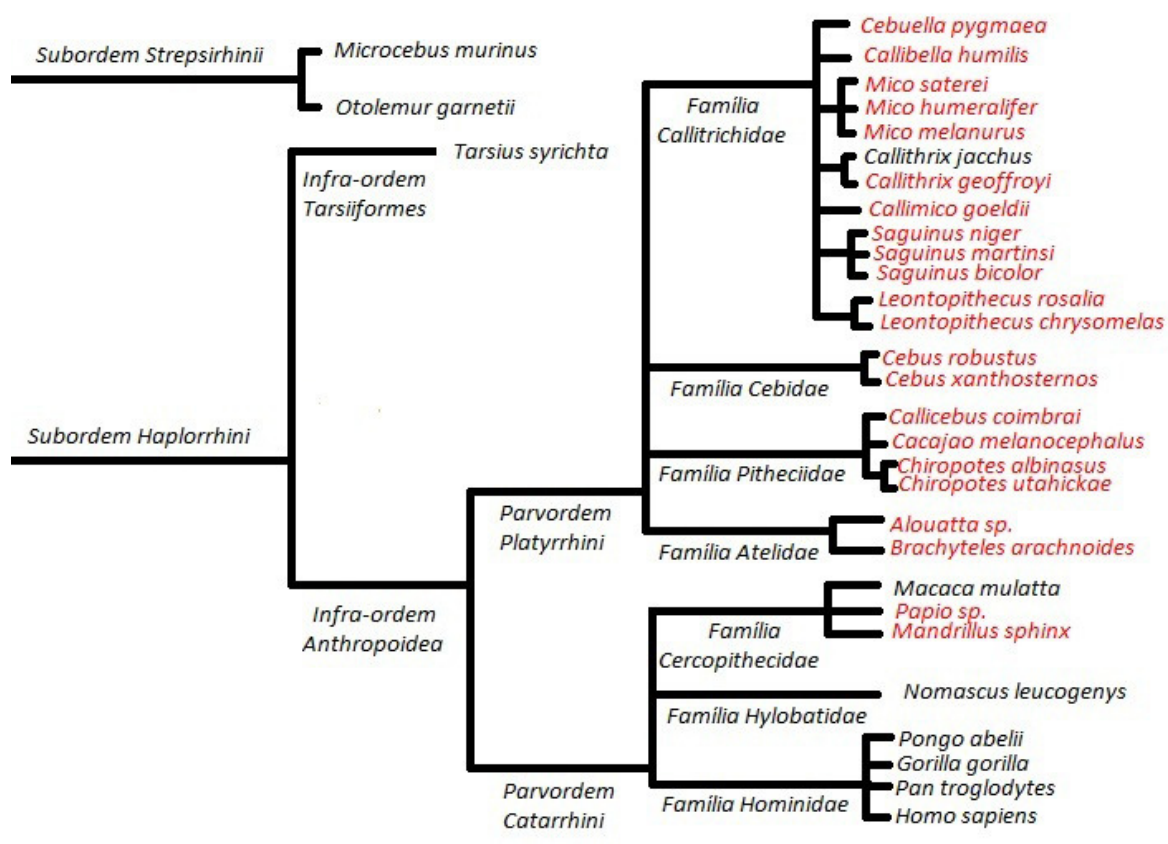


Figura 4- Filogenia dos primatas estudados neste projeto. As espécies que procedemos a análises *in vitro* estão em vermelho. O genoma das espécies em preto está disponível em banco de dados eletrônico. Figura construída com base nas informações de Chatterjee *et al.*, 2009 e Schneider, 2000.

A maioria das espécies de primatas tem por habitat as florestas tropicais ou subtropicais, embora alguns poucos tolerem o clima das regiões temperadas (Myers, 2000). Eles são em sua maioria generalistas, de hábitos alimentares

onívoros. Mas também existem animais especialistas, com interessantes modificações morfológicas, como o lêmur aye-aye, que possui um dedo médio alongado que utiliza na captura de larvas, ou ainda o macaco Colubus que possui um grande estômago ruminante composto de várias câmaras. Uma das grandes diferenças entre os macacos do velho mundo e os demais mamíferos, e uma importante inovação, é a visão tricromática, que possibilita a distinção através do espectro visível do azul, do verde e do vermelho. Esta característica possibilita, por exemplo, aos chimpanzés diferenciarem os brotos tenros, mais fáceis de digerir, das folhas mais velhas, que algumas vezes possuem toxinas (Carroll, 2006). A busca por nutrientes esculpiu a forma e a fisiologia, e deixou seu rastro no genoma dos primatas. Outro aspecto que diferencia de forma marcante os primatas dos demais vertebrados diz respeito à sofisticação de seus comportamentos, que se revela seja no cuidado com a prole, em seu sistema de acasalamento ou em sua hierarquia social (Animal Diversity Web, Tabela 1). Mais ainda, a variação comportamental intra-ordem é notável, mesmo em espécies evolutivamente tão próximas como *Pan paniscus* e *Pan troglodytes*. Deste modo, não se pode pretender que apenas os genes *OXTR* e *OXT* sejam os únicos responsáveis por traços complexo de comportamento, e uma abordagem que abrange a sua análise para outros genes da rede da oxitocina pode ser útil para elucidar aspectos relevantes sobre o tema.

A tabela 1 (abaixo) apresenta uma extensa compilação de dados sobre os primatas no que diz respeito à locomoção, dieta, estrutura social e sistema de acasalamento de algumas espécies investigadas aqui, cujos dados puderam ser compilados da literatura em particular através do site Animal Diversity Web e nas referências lá contidas.

Tabela 1. Variação comportamental e fisiológica entre as espécies de primatas estudadas.

Espécies	Peso corporal (kg)	Locomoção ^a	Dieta ^b	Estrutura social ^c	Sistema de acasalamento ^d	Estimativa de vida em cativeiro (anos)
<i>Otlemur garnettii</i>	0,751	AB	FR/IN	MMMF	PGA	15
<i>Tarsius synticha</i>	0,12	AB	IN/VT	MFPB	MGY	14
<i>Cebuella pygmaea</i>	0,13	AQ	OM	?	PGA/MGY	16
<i>Calibella humilis</i>	0,167	AB	IN/FR	MMMF	PGA	12
<i>Mico saterei</i>	0,4	AB	FR/IN	MFPB/OFMM	MGY/PGY/PGA	?
<i>Mico humeralifer</i>	0,4	AB	OM	MFPB/OFMM	MGY/PGY/PGA	?
<i>Mico melanurus</i>	0,4	AB	FR/IN	MFPB/OFMM	MGY/PGY/PGA	?
<i>Callithrix jacchus</i>	0,848	AB	OM	MFPB	MGY	16
<i>Callithrix geoffroyi</i>	0,375	AB	OM	MFPB	MGY/PGA	10
<i>Callimico goeldii</i>	0,626	AB	IN/FR/EX	MFPB	MGY	18
<i>Saguinus niger</i>	0,45	AB	OM/FR/IN/LV/EX/VT	MFPB	PGA	11,1
<i>Saguinus martinsi</i>	0,475	AB	OM/FR/IN/LV/EX/VT	MFPB	PGA	?
<i>Saguinus bicolor</i>	0,43	AB	LV/FR	OFMM	PGA	19
<i>Leontopithecus rosalia</i>	0,654	AB	OM	MFPB/OFMM	MGY	22
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	0,535	AB	OM	MFPB/OFMM	MGY	?
<i>Cebus robustus</i>	3	AB	OM	OMMF/SD	PGA	?
<i>Cebus xanthosternos</i>	3	AB	OM	MMMF	PGA	30
<i>Callicebus coimbrai</i>	0,9	AB	FR/IN/LV/IN	MFPB	MGY	25
<i>Cacajao melanocephalus</i>	3,2	AQ	FR/IN/SD	MMMF	MGY	12
<i>Chiropotes abinasus</i>	3	AQ	FR/LV/IN	MFPB/FF	MGY	?
<i>Chiropotes utahickae</i>	2,9	AQ	FR/LV/IN	MMMF	PGA/MGY	?
<i>Alouatta sp</i>	6,7	AQ	LV/FR	OMMF	MGY/PA/PGY	20
<i>Brachyteles arachnoides</i>	13,5	AB	LV/FR	FF	PGA	?
<i>Macaca mulatta</i>	8	AQ	OM	MMMF	PGA	36
<i>Papio anubis</i>	20	TQ	OM	MMMF	PGA	25,2
<i>Nomascus leucogenys</i>	5,7	AB/BR	FR/LV	MFPB	MGY	28
<i>Pongo abelii</i>	60	AB/BR	FR/LV/IN	SD	PGA	55
<i>Gorilla gorilla</i>	180	KN/AB	FR/LV	OMMF	PGY	50
<i>Pan troglodytes</i>	50	OM/BR	OM	FF	PGA	60

^aLocomoção: KN = knuckle-walker, AB = arboreal; OM = quadrumanous; BR = brachiator/suspensory; TQ = terrestrial quadruped; AQ = arboreal quadruped; ^bDieta: OM = omnivorous; FR = fruit; LV = leaves; SD = seeds; IN = insects; EX = exudates; VT = small vertebrates; ^c Estrutura social: FF = fission-fusion; M/MF = multimale/multifemale; SD = solitary/dispersed; OMMF = one male/multifemale; MFPB = male/female pairbond; ^d Sistema de acasalamento: PGA = polygynandrous; PGY = polygyny; MGY = monogamy.

Tabela 1. (continuação) Variação comportamental e fisiológica entre as espécies de primatas estudadas.

Espécies	Período gestacional (dias)	Tamanho da prole	Grupos (número de indivíduos)	Maturidade sexual da fêmea (meses)	Maturidade sexual do macho (meses)
<i>Otolemur garnettii</i>	130	1	?	12	20
<i>Tarsius syrichta</i>	180	1	2-4	?	?
<i>Cebuella pygmaea</i>	130-150	2	5-7	15	15
<i>Callibella humilis</i>	148	1	6-8	?	?
<i>Mico saterei</i>	140-150	2	4-15	?	?
<i>Mico humeralifer</i>	140	2	4-15	?	?
<i>Mico melanurus</i>	145	2	3-15	?	?
<i>Callithrix jacchus</i>	148	2	2-13	16	13
<i>Callithrix geoffroyi</i>	150-170	2	8-10	16,5	16,5
<i>Callimico goeldii</i>	155	1	5-6	14	14
<i>Saguinus niger</i>	140	2	2-13	21	21
<i>Saguinus martinsi</i>	140	2	2-13	?	?
<i>Saguinus bicolor</i>	140-150	2	2-15	18	24
<i>Leontopithecus rosalia</i>	130-135	2	3-14	18	24
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	125-132	2	2-14	18	24
<i>Cebus robustus</i>	150-180	1	10-30	?	?
<i>Cebus xanthosternos</i>	150-180	1	8-30	48	72
<i>Callicebus coimbrai</i>	128	1	3-5	?	?
<i>Cacajao melanocephalus</i>	180	1	20-30	43	43
<i>Chiropotes albinasus</i>	135-150	1	Até 44	48	48
<i>Chiropotes utahickae</i>	135	1	18-30	?	?
<i>Alouatta sp</i>	186	1	15-20	43	61
<i>Brachyteles arachnoides</i>	220	1	5-10	8,5	8,5
<i>Macaca mulatta</i>	165	1	80-100	3,2	5,7
<i>Papio anubis</i>	180	1	39-97	7,5	8,5
<i>Nomascus leucogenys</i>	210	1	4-6	6,5	7
<i>Pongo abelii</i>	254	1	1-2	12,2	19
<i>Gorilla gorilla</i>	170	1	5-15	120	180
<i>Pan troglodytes</i>	230	1-2	20-150	11,5	13,5

2. Objetivos

Contribuir para o delineamento do cenário evolutivo em nível molecular do gene receptor da oxitocina (*OXTR*), bem como investigar padrões evolutivos deste e demais genes da rede funcional da oxitocina (OXT). Para atingir este objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

a) Avaliar a variabilidade na região codificadora do gene do receptor da oxitocina (*OXTR*) nos primatas;

b) Estimar índices que inferem padrões evolutivos para o gene *OXTR* nos primatas e outros vertebrados;

c) Determinar a rede funcional de genes associados com *OXT*, bem como *OXTR* em primatas e outros vertebrados;

d) Comparar os padrões evolutivos nos genes da rede nos primatas e outros vertebrados.

3. Material e Métodos

3.1 – Amostras

O projeto foi delineado considerando 22 espécies de primatas (Tabela 2), que compõe o banco de DNA do Laboratório de Evolução Humana e Molecular (LEHM) do Departamento de Genética da UFRGS. A maioria das amostras de primatas do Novo Mundo foram cedidas pelo Centro de Primatologia do Rio de Janeiro –CPRJ/FEEMA, cujo curador e veterinário responsável é o Dr. Alcides Pissinatti, que conta com um plantel de 158 indivíduos de diversos gêneros, através de um sistema de colaboração firmado em agosto de 2007. Algumas das amostras eram pertencentes ao banco de DNA da Universidade Federal de Minas Gerais, que conta com uma coleção de amostras de mais de 400 espécies de vertebrados, principalmente aves e mamíferos, e foram cedidas pelo prof. Fabrício Santos, um dos curadores do banco.

O banco de dados foi ampliado através da busca de seqüências do gene *OXTR*, e dos outros genes que compõem a rede da oxitocina (*AVP*, *AVPR1A*, *AVPR1B*, *ESR1*, *FOS*, *OXT*, *PRL*, *PRLR*, *PRLH*, *HCRT* e *TRH*) de outros 10 primatas (*Callithrix jacchus*, *Gorilla gorilla*, *Homo sapiens*, *Macaca mulatta*, *Microcebus murinus*, *Nomascus leucogenys*, *Otolemur garnettii*, *Pan troglodytes*, *Pongo abelii* e *Tarsius syrichta*), bem como de outros 30 vertebrados (Tabela 3) depositadas no Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html/>) e no site UCSC Genome Browser Home (<http://genome.ucsc.edu/>). As buscas foram realizadas pela sigla do gene (busca textual) e também a partir da sequência de referência humana, utilizando-se o algoritmo BLAT. Posteriormente foram escolhidos os resultados identificados ou previstos como sendo ortólogos aos genes de interesse.

3.2 - Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído do sangue total de 22 das espécies de primatas, coletado previamente por colaboradores (ver item 3.1) e estocado congelado em nosso laboratório (Tabela 2). Foi utilizado o protocolo comercial

QIAamp DNA MiniKit (Qiagen) para extração e purificação do DNA destas amostras. Para algumas amostras, o DNA já havia sido extraído pelos colaboradores que nos enviaram uma alíquota para que o presente estudo fosse realizado (ver item 3.1).

3.3 - PCR

Foram amplificados os éxons 3 e 4, localizados na região codificadora do gene *OXTR*. Os *primers* universais para amplificação foram desenhados para flanquear os éxons em sua totalidade, por meio do software *FastPCR* (Tabela 4). Como o grupo de espécies do estudo compõe em sua maioria macacos do novo mundo (NWM), os *primers* foram elaborados a partir de sequências degeneradas de *Callithrix jacchus*, único representante do grupo NWM cujo genoma já é conhecido, estando disponível nos bancos públicos de genomas. Os fragmentos de PCR contendo os éxons de interesse foram obtidos de um volume de reação total de 10 µl contendo, além do tampão composto por Tris-HCl e KCl, aproximadamente 25 ng de DNA genômico, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol de cada primer e 25 U de Taq DNA Polimerase (Qiagen). Após um passo inicial de separação de 3 min a 94°C e extensão de 3 min a 72°C, o protocolo de PCR seguiu com 39 ciclos de 20 seg a 94°C, 20 seg de temperatura variável entre 58 e 62°C, de acordo com a espécie analisada, e 30 seg de 72°C, concluindo com um passo de extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos da amplificação foram montados e separados por eletroforese em gel de agarose a 2% com 0,003% de brometo de etídio.

3.4 - Sequenciamento

As purificações dos produtos amplificados foram feitas com as enzimas exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase*, comercializadas pela GE Healthcare, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O sequenciamento de ambas as fitas do DNA foi realizado através do equipamento ABI3730XL, de acordo com condições descritas pelos fabricantes. Foi utilizado o programa *Codon Code Aligner (trial version)* para verificar a qualidade das seqüências obtidas.

Tabela 2: Amostras do banco de DNA de primatas do Laboratório de Evolução Humana e Molecular (LEHM)

Espécies	Nº	Experimentos realizados			
		Amplificação Éxon 3	Amplificação Éxon 4	Sequenciamento Éxon 3	Sequenciamento Éxon 4
<i>Alouatta sp.</i>	2	2	2	0	0
<i>Brachyteles arachnoides</i>	2	1	2	0	0
<i>Cacajao melanocephalus</i>	2	2	2	0	2
<i>Calibella humilis</i>	1	1	1	0	0
<i>Callimico goeldii</i>	1	1	1	1	0
<i>Callicebus coimbrai</i>	1	1	1	0	0
<i>Callithrix geoffroyi</i>	7	7	7	6	6
<i>Cebuella pygmaea</i>	1	1	1	0	0
<i>Cebus robustus</i>	4	2	4	0	0
<i>Cebus xanthosternos</i>	6	2	6	0	0
<i>Chiropotes albinasus</i>	1	1	1	0	0
<i>Chiropotes utahickae</i>	1	1	1	0	0
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	3	3	3	0	2
<i>Leontopithecus rosalia</i>	5	2	5	0	0
<i>Mandrillus sphinx</i>	1	0	1	0	0
<i>Mico melanurus</i>	2	1	2	1	1
<i>Mico saterei</i>	1	1	1	0	0
<i>Mico humeralifer</i>	5	2	4	0	4
<i>Papio sp.</i>	1	1	1	0	0
<i>Saguinus niger</i>	7	3	5	0	3
<i>Saguinus martinsi</i>	3	2	3	1	2
<i>Saguinus bicolor</i>	6	2	4	1	3

Tabela 3. Espécies de vertebrados incluídos nas análises da rede gênica de oxitocina.

Nome comum	Nome científico	Ordem/Infraclasse/Classe
Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	Primata/Mamífero
Gorila	<i>Gorilla gorilla</i>	Primata/Mamífero
Orangotango	<i>Pongo abelii</i>	Primata/Mamífero
Gibão	<i>Nomascus leucogenys</i>	Primata/Mamífero
Macaco-Rhesus	<i>Macaca mulatta</i>	Primata/Mamífero
Sagui	<i>Callithrix jacchus</i>	Primata/Mamífero
Camundongo	<i>Mus musculus</i>	Roedor/Mamífero
Rato	<i>Rattus norvegicus</i>	Roedor/Mamífero
Porquinho-da-índia	<i>Cavia porcellus</i>	Roedor/Mamífero
Coelho	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Lagomorfo/Mamífero
Pika-americana	<i>Ochotona princeps</i>	Lagomorfo/Mamífero
Golfinho	<i>Tursiops truncatus</i>	Cetáceo/Mamífero
Vaca	<i>Bos taurus</i>	Artiodáctilo/Mamífero
Porco	<i>Sus scrofa</i>	Artiodáctilo/Mamífero
Gato	<i>Felis catus</i>	Carnívoro/Mamífero
Panda-gigante	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	Carnívoro/Mamífero
Cachorro	<i>Canis familiaris</i>	Carnívoro/Mamífero
Morcegos-de-orelhas-de-rato	<i>Myotis lucifugus</i>	Quiróptero/Mamífero
Raposa-voadora	<i>Pteropus vampyrus</i>	Quiróptero/Mamífero
Ouriço-terrestre	<i>Erinaceus europaeus</i>	Erinaceomorfo/Mamífero
Elefante	<i>Loxodonta africana</i>	Afrotério/Mamífero
Hírax	<i>Procavia capensis</i>	Afrotério/Mamífero
Tenrec	<i>Echinops telfairi</i>	Afrotério/Mamífero
Preguiça-de-Hoffmann	<i>Choloepus hoffmanni</i>	Xenartro/Mamífero
Gambá	<i>Monodelphis domestica</i>	Didelfimorfo/Marsupial/Mamífero
Demônio-da-Tasmânia	<i>Sarcophilus harrisii</i>	Dasiromorfo/Marsupial/Mamífero
Ornitorrinco	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Monotremado/Mamífero
Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	Galiforme/Ave
Galinha	<i>Gallus gallus</i>	Galiforme/Ave
Mandarim	<i>Taeniopygia guttata</i>	Passariforme/Ave
Rã	<i>Xenopus tropicalis</i>	Anura/Anfíbio
Baiacu verde pintado	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tetraodontiforme/Actinoptergii/Peixe
Baiacu asiático	<i>Takifugu rubripes</i>	Tetraodontiforme/Actinoptergii/Peixe
Esgana-gata	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Gasteroteiformes/Actinoptergii/Peixe
Peixe-arroz	<i>Oryzias latipes</i>	Beloniformes/Actinoptergii/Peixe
Peixe-zebra	<i>Danio rerio</i>	Cipriniforme/Actinoptergii/Peixe

Tabela 4. Lista de *primers* confeccionados e utilizados para amplificação do gene *OXTR*.

3.5 - Análises de dados

3.5.1. Comparação das mutações não-sinônimas do gene *OXTR* em primatas

As sequências dos primatas estudados foram comparadas à sequência nucleotídica humana do gene *OXTR* por meio do *software* MEGA 5.5. O efeito potencial das substituições entre aminoácidos foi predito de acordo com a matriz de Grantham (1974), que considera as diferenças encontradas nos aminoácidos relativas a suas composições, polaridades e volumes moleculares. Li (1984) classificou estes valores (*Grantham Score*, GS) como: conservador (de 0 a 50), moderadamente conservador (de 51 a 100), moderadamente radical (de 101 a 150) ou radical (≥ 151). Adicionalmente a esta análise química, em casos de substituições em sítios de localização particularmente significativa, foi utilizado o programa SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) para classificar as substituições como toleradas ou deletérias, tendo por referência a proteína *OXTR* humana.

3.5.2. Comparação das taxas evolutivas do gene *OXTR* em primatas e outros vertebrados

A análise das sequências nucleotídicas dos genes ortólogos *OXTR* foi realizada pelo programa PAML 4.4 (Yang, 2007), que se utiliza da estimativa por máxima verossimilhança, definindo que modelos estatísticos se ajustam melhor para analisar a evolução destes genes no conjunto de espécies estudado. A função CODEML deste pacote de algoritmos utiliza um modelo baseado em códons para detectar qualquer sinal de seleção positiva nas sequências

nucleotídicas, promovendo uma análise de ω (razão dN/dS, entre substituições sinônimas e não-sinônimas) nas sequências codificantes do receptor *OXTR*.

Os valores de verossimilhança foram gerados para modelos em que se permite uma variação de ω dentro do intervalo 0-1 (modelos neutros [M0 e M1a] e modelo discreto [M3]) e para modelos que permitem $\omega > 1$ para alguns sítios (modelos de seleção [M2a e M8]), de acordo com Yang et al. (2000). Foram feitas comparações por análises de máxima verossimilhança (LRT – “*likelihood ratio test*”), utilizando-se o programa *HyPhy* (Pond et al., 2005), entre os modelos M0 e M3, M1a e M2a, e M7 e M8 para determinar qual melhor modelo de substituição de códons adequava-se aos dados fornecidos.

3.5.3. Determinação da rede funcional da oxitocina em primatas e outros vertebrados

Utilizando-se uma abordagem de biologia de sistemas empregaram-se os programas STRING 9.0 (<http://string.embl.de/>) e Cytoscape 7.0 para identificar genes que estariam associados funcionalmente à oxitocina. Para a busca pelo STRING 9.0 foi utilizado a busca textual pelo *OXT* humano, com o nível de confiança de 90%, e a inclusão de 400 interações gênicas e até 100 genes (nós - *whitenodes*) independentes. No programa Cytoscape 7.0 foi utilizado o *plugin* AllegroMCODE para encontrar o cluster funcional do *OXT*, e o *plugin* Pingo para selecionar somente genes relacionados especificamente com o comportamento maternal e de amamentação, entre outros (Especificamente: GO:0007617: *mating behavior*; GO:0007619: *courtship behavior*; GO:0001967: *suckling behavior*; GO:0042711: *maternal behavior*; GO:0060746: *parental behavior*; GO:0019098: *reproductive behavior*).

3.5.4. Comparação da conservação da rede funcional da oxitocina em primatas e outros vertebrados

Investigamos o nível de conservação deste conjunto de genes ao longo das linhagens evolutivas, realizando uma análise comparativa entre a sequência de

aminoácidos presentes no homem e de outras 36 espécies de vertebrados. Para o cálculo do nível de identidade entre as sequências protéicas, foi utilizado o programa LALIGN [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html], utilizando o algoritmo de alinhamento local e a matriz de comparação *default*, BLOSSUM50. A variação da conservação dos genes, da rede funcional, dentro das espécies foi avaliada de um teste não-paramétrico de Mann-Whitney, através do programa SPSS16.

4. Resultados e Discussão

4.1 - Sequenciamento do gene *OXTR*

Houve um sucesso relativo no sequenciamento do gene *OXTR*. Somente nove espécies de macacos do novo mundo (*Cacajao melanocephalus*, *Callimico goeldii*, *Callitrix geoffroyi*, *Leontopithecus chrysomelas*, *Mico humeralifer*, *Mico melanurus*, *Saguinus bicolor*, *Saguinus martinsi* e *Saguinus niger*), de um total de 22 primatas cujas amostras estavam disponíveis para o estudo, tiveram resultados que puderam ser aproveitados total ou parcialmente nas análises (Tabela 2). Dificuldades técnicas relativas ao sequenciamento, como o desenho de um *primer* universal a todas as espécies estudadas, podem explicar tais limitações. A cobertura do sequenciamento foi de 58,4% para o éxon 3 e 51,8% para o éxon 4, compreendendo 57% (222/389) da sequência total de aminoácidos codificados pelo gene (Tabela 5). Durante o processo de amplificação dos fragmentos, a porção do éxon 3 ofereceu maior resistência, sendo realizado PCR com dois conjuntos de *primers*: *OXTRE3* e *OXTRE3_2*. Este último conjunto de *primers* não obteve sucesso em nenhuma amplificação.

Tabela 5 - Resultados obtidos no sequenciamento do gene *OXTR*

Éxon	3	4
Resíduos AA	1-308	309-389
Tamanho total	308	81
Posições analisadas	25-204	325-366
Fração do total	0,584	0,518

Usando como referência a estrutura espacial da proteína, que possui sete domínios transmembrana (TM), quatro regiões extracelulares (EC) e quatro regiões intracelulares (IC), o sequenciamento do gene *OXTR* efetivamente cobriu: 44,1% (19/43) de EC1, a totalidade de EC2 e 96,7% (30/31) de EC3; a totalidade de TM1, TM2, TM3, TM4 e 30% (6/20) de TM7; e a totalidade de IC1, IC2 e 61% (36/59) de IC4 (Figura 5). Os demais domínios (EC4, TM5, TM6 e IC3) não foram sequenciados.

MEGALAANWSAEAAANASAAPPGAEGNRTAGPPRRNEALARVEVAVLCLILLALLSNGACVLLALRTRTRKHSRLFFFMKHLADIADLVVAVFQVLPQLLWD 100
ITFRFYGPDLLCRLVKYLQVVGMFASTYLLLLMSLDRCLAICQPLRSLRRRTDRLAVLATWLGCLVASAPQVHIFSLREVADGVFDCWAVFIQPWGPKAY 200
ITWITLAVYIVPVIVLAACYGLISFKIWQNLRLKTAATAAAAEPEGAAAGDGGRRVALARVSSVKLISKAKIRTVKMTFIIIVLAFIVCWTPFFVQMWVW 300
DANAPKEASAFIIVMLLASLNSCCNPWIYMLFTGHLFHELVQRFLCCSASYLKGRRLGETSASKKSNSSSFVLSHRSSSQRSCSQPSTA 389

Figura 5 – Sequência primária da proteína *OXTR* humana. Os sítios que apresentaram variações no presente estudo estão destacados em amarelo. As sequências sublinhadas não foram cobertas por sequenciamento. As cores indicam os domínios da proteína. Extracelular (EC) em azul, transmembrana (TM) em vermelho e intracelular (IC) em verde.

4.2 - Variações não-sinônimas do gene *OXTR*

Com o intuito de se ampliar a análise dos achados de seqüenciamento obtidos em nove espécies de macacos do Novo Mundo (veja item 4.1), suas sequências foram comparadas com as de nove outros representantes da ordem *Primates*, de genoma já conhecido (*Callithrix jacchus*, *Gorilla gorilla*, *Homo sapiens*, *Macaca mulatta*, *Nomascus leucogenys*, *Otolemur garnettii*, *Pan*

troglydytes, *Pongo abelii*, e *Tarsius syrichta*). Não obtivemos sucesso na busca da sequência homóloga de *Microcebus murinus*. Vale lembrar que, usando a sequência humana como referência, a notação G→A, por exemplo, não indica a direção da mutação, ou seja, que o nucleotídeo “G” corresponde ao alelo ancestral e que o “A” é o derivado. Significa somente que na sequência do *Homo sapiens* existe um “G” na posição em questão, enquanto na outra espécie de primata, aparece um “A”.

Deste modo, tendo por referência a sequência nucleotídica humana, foram observadas variações que resultaram em 30 trocas de aminoácidos, como resultado de 34 mutações nas diversas espécies estudadas (Tabela 6) Neste estudo, foi observada a variabilidade não-sinônima de 22 códons do cDNA do gene *OXTR*. Interessante notar que os sítios mais variáveis entre as espécies de primatas pertencem à porção intracelular próxima a terminação carbóxi-terminal da proteína (IC4), com quatro substituições diferentes nos sítios 355 (Arg →Lys, Arg → Asn, Arg → Ser e Arg→ Thr), e três substituições nos sítios 357 (Leu → Gln e Leu → Pro, que surge por consequência de dois eventos mutacionais diferentes no códon) e 362 (Ala → Thr, Ala →Phe e Ala → Val). Esses sítios podem representar *hot spots* mutacionais devido a um relaxamento de pressão da seleção purificadora, pois erros metodológicos, particularmente na geração das sequências, não seriam parcimoniosos, visto tratar-se de dados recorrentes em estudos genômicos independentes, cuja cobertura é vasta. Esta mesma porção da proteína (IC4) acumula outros sítios variáveis, compreendendo 31,8% do total encontrado. Em contraste, as porções transmembrana 2 e 3 (TM2 e TM3), assim como da porção extracelular 2 (EC2), embora cobertas integralmente pelo seqüenciamento, não exibiram nenhuma variação não-sinônima para as espécies analisadas. No que se refere à localização protéica das variações observadas (Figuras 5 e 6), a porção intracelular apresentou o maior número de mudanças (16), seguidas pela presentes nas regiões extracelulares (8) e transmembrana (6)

Embora dentre as espécies de primatas que disponibilizamos as sequências do gene *OXTR*, *Otolemur garnettii* (subordem *Strepsirrhinii*) e *Tarsius syrichta* (infra-ordem *Tarsiiformes*) apresentem as maiores distâncias filogenéticas

do *Homo sapiens*, o maior número de variações foi observado em macacos do Novo Mundo, que apresenta um tempo de divergência inferior, de 43 milhões de anos atrás (Chatterjee *et al.*, 2009). Isto pode ser compreendido pela grande variabilidade do gene *OXTR* nas duas espécies não pertencentes à infra-ordem *Anthropoidea* (Figura 4), o que impediu a comparação da porção do éxon 3, codificante de aproximadamente 75% do cDNA. Dos macacos do Novo Mundo estudados, destaca-se *Mico melanura* com um total de 16 variações de códons não-sinônimas, quando comparadas ao *Homo sapiens*. Claramente há sinais filogenéticos, como as mutações dos domínios EC1 (33Arg→Gln e 35Asn→Asp), TM4 (169A→Val e 172Val→Met) e EC3 (193Gln→Glu e 197Pro→ Ser), observadas em todos os macacos da parvordem *Platyrrhini* investigados para os éxons correspondentes.

A presença de uma fenilalanina (Phe) na posição 51 da cadeia de aminoácidos, localizada dentro do domínio TM1, é observada em todos os primatas cujas sequências foram analisadas para o éxon 3, com a única exceção do *Homo sapiens*, que apresenta um resíduo de leucina (Leu) neste sítio. Uma busca nos genomas de hominídeos extintos permitiu identificar a presença da leucina também entre o espécime da caverna de Denisova (com relação aos neandertais não foi possível fazer a comparação devido a uma lacuna na seqüência nesta região do genoma disponível deste hominídeo). O chamado povo de Denisova, que teria uma relação filogenética próxima aos neandertais, teria uma linhagem ancestral que se separou daquela dos humanos modernos há cerca de 400 a 800 mil anos antes do presente (Green *et al.*, 2010, Reich *et al.*, 2010). Deste modo, a mutação não-sinônima que codificou a leucina ocorreu há pelo menos a 400-800 mil anos atrás (na linhagem ancestral dos humanos e dos neandertais/denisovanianos), e seria característico do gênero *Homo*, não somente da espécie *Homo sapiens*. Curiosamente, na posição 69 da cadeia de aminoácidos, localizada no domínio IC1, uma glutamina (Gln) está presente somente nos humanos, chimpanzés e gorilas. Como o aminoácido histidina (His) está presente nos orangotangos (*Pongo abelii*) e demais primatas estudados, é possível que a mutação His → Gln tenha ocorrido após a separação da linhagem dos orangotangos das linhagem dos demais grandes macacos (*Homo*, *Pan* e

Gorilla), por volta dos 15 a 10 milhões de anos atrás. Foi possível observar ainda que existem 14 mutações espécie-específicas, como aquela vista somente na espécie *Macaca mulatta* (27Arg →Cys).

No que se refere à radicalidade das substituições de aminoácidos, baseada em parâmetros químicos (Grantham, 1974), a substituição 27Arg→Cys, localizada no domínio IC1 exclusivamente na proteína OXTR de *Macaca mulatta*, foi a única considerada radical, com valor GS de 180. Em seguida, foram observadas substituições moderadamente radicais, de GS 113 (sítios 357 e 362), 112 (sítio 47) e 110 (sítios 149 e 355). Interessante observar que três destas últimas substituições se encontram no domínio IC4, porção da proteína que parece sofrer menor pressão seletiva. Os outros domínios afetados são o TM1 e o IC2, sendo importante ressaltar que estas substituições podem implicar em modificações estruturais e funcionais da proteína OXTR.

Interessante perceber que todos os macacos do Novo Mundo estudados para o éxon 3 apresentaram substituição dos sítios 33 (Arg→Gln) e 35 (Asn→Asp). Embora consideradas conservadoras por critérios químicos (GS de 43 e 23, respectivamente), estas substituições flanqueiam o sítio 34Arg, conservado em todas as espécies até o momento observadas, e de grande importância funcional. De fato, Wesley *et al.* (2002) observou que uma alteração deste sítio por truncamento ou substituição representa a perda de afinidade de 2000 vezes ao receptor OXTR pela oxitocina. Desta forma, é possível que estas duas substituições, exclusiva aos platirríneos estudados, podem exercer um efeito cumulativo, alterando a afinidade da porção amino-terminal do receptor ao seu ligante nestas espécies.

Dentre as espécies de macacos do Novo Mundo, *Cacajao melanocephalus* apresenta uma variação exclusiva no resíduo 345 (Leu →Met), substituição considerada conservadora por critérios químicos (GS 15). Embora este sítio esteja compreendido no domínio IC4, já descrito anteriormente como bastante variável, a sua posição é notável por se localizar ao lado de dois resíduos de cisteína (Cys), bastante conservados ao longo da evolução da classe dos receptores associados à proteína G (Schülein *et al.*, 1996), e que se acreditam

sofrer prenilação, ou seja, a adição de moléculas hidrofóbicas ao seu radical, permitindo dessa forma a adesão do receptor à face interna da membrana plasmática, fenômeno de “ancoramento” já observado no receptor de vasopressina, proteína homóloga ao OXTR. Sadeghi *et al.* (1997), utilizando-se de marcadores isótopos, indicaram que o impedimento da prenilação nestes sítios, pela substituição dos aminoácidos cisteína por serina (Ser), reduziu a expressão dos receptores na superfície celular, mas não afetou a afinidade do receptor com o ligante, nem a resposta do receptor aos segundos mensageiros. De maneira semelhante, Schülein *et al.* (1996) observaram uma redução de 30% dos locais de ligação de vasopressina à superfície celular mediante procedimento análogo, o que sugere uma deficiência do transporte e internalização destes receptores mutantes à membrana plasmática, uma vez impedidos de realizar a prenilação. Se a hipótese de que a mutação observada no sítio 345 de *Cacajao melanocephalus* possa ter algum efeito funcional sobre a expressão do OXTR na superfície celular seja confirmada por estudos adicionais, podemos conjecturar se os achados comportamentais exclusivos desta espécie (Tabela 1), como a estrutura social multimacho-multifêmea, a formação dos maiores grupos sociais (entre 20 e 30 indivíduos) das espécies consideradas nesta análise, ou o tempo mais longo para a maturidade sexual (43 meses), teriam alguma relação causal com este achado bioquímico. Em relação ao investimento parental desta espécie, pouco se sabe, uma vez que não tem havido sucesso na reprodução destes animais em cativeiro. No entanto outra espécie do gênero, *Calcajao clavus*, exibe extremo cuidado parental, incluindo longos períodos de lactação (Barnett, 2005).

Tabela 6 . Diferenças não-sinônimas no gene *OXTR* entre humanos e outros primatas.

Mutações no gene <i>OXTR</i>			Lêmur	Subordem <i>Haplorrhini</i>																
				Társio	Parvordem <i>Platyrrhini</i> (Macacos do Novo Mundo)											Parvordem <i>Catarrhini</i>				
					Família <i>Callitrichidae</i>						<i>F. Pitheciidae</i>					<i>F. Cercopithecidae</i>		<i>F. Hylobatidae</i>	<i>F. Hominidae</i>	
Domínio da proteína (codificado pelo)	Nucleotídeo	Aminoácido	Grantham Score	<i>Otolemur garnetti</i>	<i>Tarsius syrichta</i>	<i>Callithrix jacchus</i>	<i>Callithrix geoffroyi</i>	<i>Mico melanurus</i>	<i>Mico humeralifer</i>	<i>Saguinus bicolor</i>	<i>Saguinus martinsi</i>	<i>Saguinus niger</i>	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	<i>Callimico goeldii</i>	<i>Cacajao melanocephalus</i>	<i>Macaca mulatta</i>	<i>Normascus leucogenys</i>	<i>Pongo abelli</i>	<i>Gorilla gorilla</i>	<i>Pan troglodytes</i>
Extracelular 1 (éxon 3)	C->T (TGC) ^a	27Arg->Cys	180	?	?	0		?		?	?	?	?	0	?	1	0	0	0	0
	G->A (CAC) ^a	27Arg->His	29	?	?	0	1	1	?	1	1	?	?	0	?		0	0	0	0
	G->T	29Ala->Ser	99	?	?	1	0	0	?	0	0	?	?	0	?	0	0	0	0	0
	G->A	33Arg->Gln	43	?	?	1	1	1	?	1	1	?	?	1	?	0	0	0	0	0
	A->G	35Asn->Asp	23	?	?	1	1	1	?	1	1	?	?	1	?	0	0	0	0	0
	G->A	41Val->Ile	29	?	?	0	0	1	?	0	0	?	?	0	?	0	0	0	0	0
Transmembrana 1 (éxon 3)	G->C	47Cys->Ser	112	?	?	1	1	1	?	1	1	?	?	1	?	0	0	0	0	0
	C->G	48Ley->Val	32	?	?	0	0	0	?	1	0	?	?	0	?	0	0	0	0	0
	C->T	51Leu->Phe	22	?	?	1	1	1	?	1	1	?	?	1	?	1	1	1	1	1
	C->T	58Ala->Val	64	?	?	0	1	1	?	1	1	?	?	1	?	0	0	0	0	0
Intracelular 1 (éxon 3)	G->C	69Gln->His	24	?	?	1	1	1	?	0	1	?	?	1	?	1	1	1	0	0
Intracelular 2 (éxon 3)	C->A	149Arg->Ser	110	?	?	1	1	1	?	0	1	?	?	0	?	0	0	0	0	0
Transmembrana 4 (éxon 3)	C->T	169Ala->Val	64	0	0	1	1	1	?	1	1	?	?	1	?	0	0	0	0	0
	G->A	172Val->Met	21	0	0	1	1	1	?	1	1	?	?	1	?	0	0	0	0	0
Extracelular 3 (éxon 3)	C->G	193Gln->Glu	29	0	0	1	1	1	?	1	1	?	?	1	?	0	0	0	0	0
	C->T	197Pro->Ser	74	0	0	1	1	1	?	1	1	?	?	1	?	0	0	0	0	0

Cont.

4.3 - Comparação das taxas evolutivas do gene *OXTR* em vertebrados

Na primeira análise evolutiva do gene *OXTR*, quarenta e quatro espécies e 750 sítios puderam ser comparados, entre elas as nove espécies de primatas sequenciados. Os resultados dos cálculos das taxas de substituições, bem como os modelos, encontram-se na tabela 7. Quando os modelos de substituição são comparados (M0 – M3, M1a – M2a e M7 e M8), o que melhor se adapta aos dados é o M3 ($p < 0,001$), que admite variação nas classes de ω . A taxa média de substituições sinônimas e não-sinônimas ($dN/dS - \omega = 0,0332$) é um valor significativamente menor que um, sinalizando que a principal força agindo é, como esperado, seleção purificadora, porém também observamos a presença de alguns sítios (6%) com um leve relaxamento da pressão seletiva purificadora ($dN/dS - \omega = 0,25483$).

Em uma segunda análise diminuímos o número de espécies, para trinta e oito, o que possibilitou aumentar o número de sítios analisados para 1014 (de um total de 1227 nucleotídeos). O exame de um maior número maior de sítios confirmou a primeira análise (tabela 7), indicando a adequação do modelo discreto (M3- $p < 0,001$). Neste caso, houve a ratificação de que a seleção negativa é a maior força agindo sobre o gene *OXTR*, porém há uma identificação de um número maior de sítios (10%) com um possível relaxamento da constrição funcional ($dN/dS - \omega = 0,34398$).

Vale destacar que a análise não levou em conta os ramos da filogenia separadamente, e sim a variação códon-por-códon (NSsites), o que pode camuflar pressões seletivas diferentes da purificadora em ramos específicos da árvore filogenética dos vertebrados analisados.

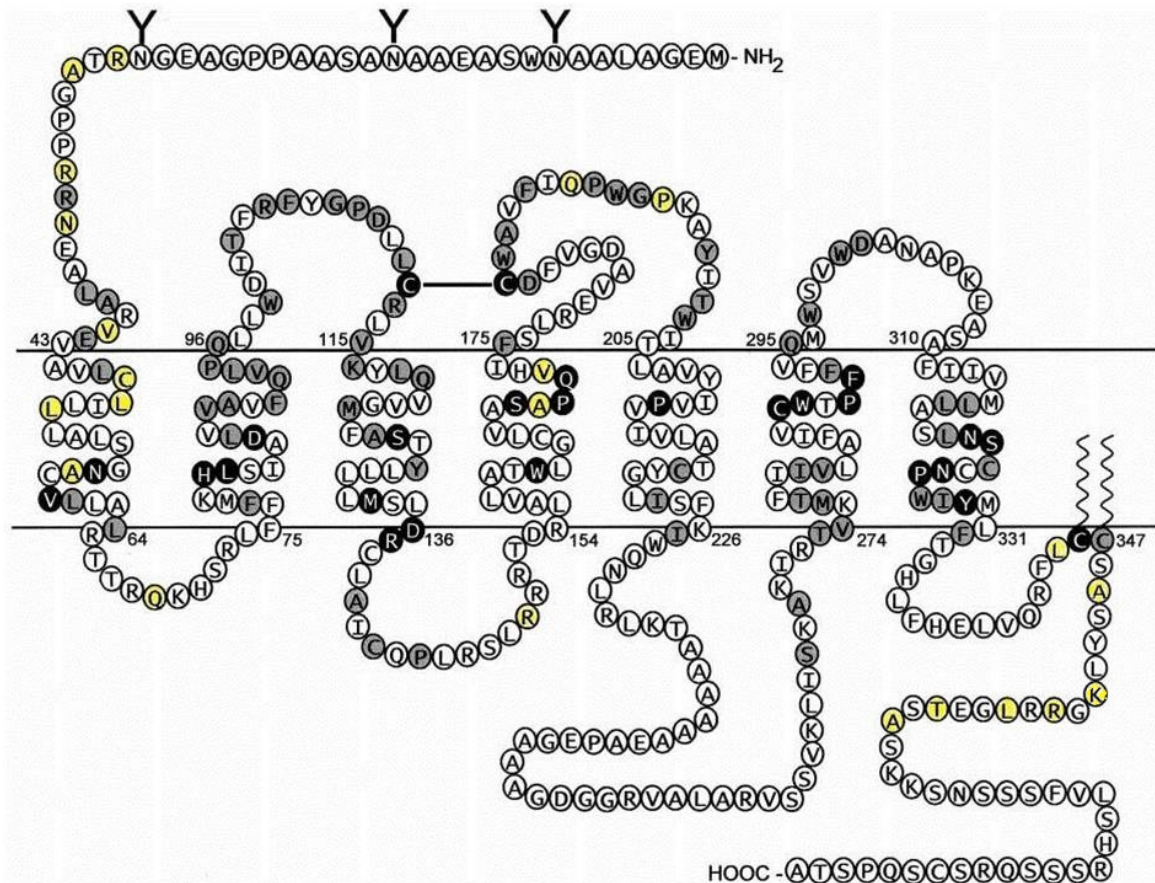


Figura 6 – Estrutura secundária da proteína OXTR humana, indicando quatro porções extracelulares (EC), sete porções transmembrana (TM) e quatro porções intracelulares (IC). Resíduos de aminoácidos em amarelo indicam sítios em que foi encontrada variação. Adaptado de Gimpl G, Fahrenholz F (2001).

De qualquer modo, não se pode pretender que fenótipos complexos sejam produto da ação de poucos genes de grande efeito, embora isso possa ser encontrado em espécies sujeitas a seleção artificial (Wayne & vonHoldt, 2012). Tratando-se de populações naturais, os fenótipos complexos normalmente são produzidos pela ação de um grande número de genes de pequeno efeito, sujeitos a penetrância incompleta, expressividade variável e pleiotropia, seja para criar caminhos neurais, seja para interpretar estímulos e gerar respostas comportamentais. Deste modo, é possível especular que os diversos tipos de comportamentos relacionados aos cuidados parentais e outras condutas relacionadas em vertebrados podem também ser em consequência de mudanças

em outros genes da rede funcional da oxitocina e não só no próprio gene da oxitocina ou no gene de seu receptor.

Tabela 7 - Parâmetros estimados sobre diversos modelos de substituição de códons para o gene *OXTR*.

	Modelo ^a	dN/dS ^b	Parâmetros estimados ^c	ℓ	p-value
Round 1 – 44 espécies / 750 sítios	M0: <i>one-ratio</i> (1)	0,0281	ω = 0,02813	- 8390,543442	<0,001
	M3: <i>discrete</i> (5)	0,0332	p0 =0,55821 , p1 =0,37330 , (p2 =0,06849); ω 0 =0,00204 , ω1 =0,03919 ω2 = 0,25483	-8089,64127	
	M1a: <i>neutral</i> (1)	0,093	p0 =0,95000 , (p1 = 0,05000); (ω0 =0,02035) , (ω1 =1)	- 8264,873940	0,999
	M2a: <i>selection</i> (3)	0,0691	p0=0,95024, p1 =0,02875 , (p2=0,02100) (ω0 =0,02033), (ω1 =1), ω2 = 1	- 8264,017057	
	M7: <i>beta</i> (2)	0,0409	p= 0,26188 q 5,65195	- 8100,296834	0,99
	M8: <i>beta&ω</i> (4)	0,2405	p0= 0,99999 (p1= 0,00001) p= 0,48692 q= 1,51943 ω = 2,95257	- 9544,336424	
Round 2 – 38 espécies / 1014 sítios	M0: <i>one-ratio</i> (1)	0,0482	ω = 0,04816	-1196735543	<0,001
	M3: <i>discrete</i> ()	0,0620	p0 =0,59854 , p1 =0,29385 , (p2 =0,10761); ω 0 =0,00637 , ω1 =0,07193 ω2 = 0,34398	- 11429,07569 1	
	M1a: <i>neutral</i> (1)	0,1378	p0 =0,89318, (p1 = 0,10682); (ω0 =0,03471), (ω1 =1)	- 11679,91971 6	0,999
	M2a: <i>selection</i> (3)	0,1378	p0=0,95024, p1 =0,08170 , (p2=0,02512) (ω0 =0,03471), (ω1 =1), ω2 = 1	- 11679,91971 6	
	M7: <i>beta</i> (2)	0,0718	p= 0,28257 q= 3,44165	- 11426,79518 3	0,999
	M8: <i>beta&ω</i> (4)	0,3912	p0= 0,99999 (p1= 0,00001) p= 0,93552 q= 1,44973 ω = 2,63689	- 13289,29833 3	

^a O número após o código modelo, entre parênteses, é o número de parâmetros livres na distribuição de ω.

^b O valor dN/dS ratio é um valor médio de todos os códons presentes no alinhamento do gene *OTXR*.

^c Os parâmetros em parênteses não são parâmetros livres; ω dN/dS ratio; p, proporção de códons na

4.4 - Desenho da rede funcional de oxitocina

A busca por genes funcionalmente relacionados ao gene *OXT* humano no browser STRING 9.0 (<http://string.embl.de/>), com o nível de confiança de 90%, retornou um total de 147 genes. No programa Cytoscape 7.0 foi utilizado o *plugin* AllegroMCODE para encontrar o *cluster* funcional do *OXT*. O programa determinou um *cluster* inicial com 58 genes e 255 conexões (escore = 4,397). O *plugin* Pingo foi utilizado para refinar o *cluster*, selecionando somente genes que possuíam anotações quanto a função no GeneOntology (<http://www.geneontology.org/>), associados especificamente com o comportamento de corte, acasalamento e reprodutivo, cuidado parental e maternal e amamentação (GO:0007619: *courtship behavior* GO:0007617: *mating behavior*; GO:0019098: *reproductive behavior*.; GO:0060746: *parental behavior*; GO:0042711: *maternal behavior*; GO:0001967: *suckling behavior*). Este refinamento resultou em uma rede com 12 genes funcionalmente relacionados apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Descrição dos 12 genes que participam da rede funcional da oxitocina.

Símbolo	Descrição	Cro	Fita	Início	Término	PB	Sumário do EntrezGene	Função UniProt
AVP	Vasopressina	20	-	3063202	3065370	2168	Este gene codifica uma proteína precursora composta por vasopressina e duas proteínas associadas, neurofisina 2 e um glicopeptídeo, copeptina. A vasopressina é um hormônio da hipófise posterior que é sintetizado no núcleo supra-óptico e no núcleo paraventricular do hipotálamo. Em conjunto com sua proteína carreadora, neurofisina 2, ela é empacotada no interior de vesículas neurosecretórias e transportada através dos axônios para as terminações nervosas na neurohipófise, onde são armazenadas ou secretadas na corrente sanguínea. Supõe-se que o precursor seja ativado ao longo de seu transporte axonal até a hipófise posterior. A vasopressina age como um fator de crescimento pela otimização da regulação do pH por meio de sistemas de transporte ácido-básico. Ela tem uma ação antidiurética direta sobre o rim, e também causa vasoconstrição dos vasos periféricos. Este hormônio pode contrair músculos lisos durante o parto e lactação. Também está associado à cognição, tolerância, adaptação e comportamentos sexuais e maternos complexos, assim como a regulação de excreção hídrica e funções cardiovasculares.	SwissProt: P01185 # A vasopressina tem uma ação antidiurética direta sobre o rim, ela também causa vasoconstrição de vasos periféricos.
AVPR1A	Receptor de vasopressina 1A	12	-	63539014	63546590	7576	A proteína codificada por este gene age como receptor para a vasopressina. Este receptor pertence à subfamília dos receptores associados à proteína G, que inclui os receptores AVPR1B, V2R e OXT. Sua atividade é mediada por proteínas G que estimulam o sistema de segundo mensageiro fosfatidil-inositol-cálcio. O receptor medeia a contração e proliferação celular, a agregação plaquetária, a liberação de fatores de coagulação e a glicogenólise. (Fornecido por RefSeq)	SwissProt: P37288 # Receptor para a vasopressina. A atividade deste receptor é mediada por proteínas G que ativam o sistema de segundo mensageiro fosfatidil-inositol-cálcio. Foi associada a comportamentos sociais, incluindo afiliação e envolvimento.
AVPR1B	Receptor de vasopressina 1B	1	+	206223976	206231639	7663	A proteína codificada por este gene age como receptor para a vasopressina. Este receptor pertence à subfamília dos receptores associados à proteína G, que inclui os receptores AVPR1A, V2R e OXT. Sua atividade é mediada por proteínas G que estimulam o sistema de segundo mensageiro fosfatidil-inositol-cálcio. O receptor está primariamente localizado na hipófise anterior, onde estimula a liberação de ACTH. Ele é bastante expresso em adenomas de hipófise secretores de ACTH, assim como em carcinomas brônquicos responsáveis pela síndrome de ACTH ectópica. Um transcrito antisense processado (<i>spliced</i>) deste gene foi registrado, mas a sua função é desconhecida. (Fornecido por RefSeq)	SwissProt: P47901 # Receptor de vasopressina. A atividade deste receptor é mediada por proteínas G que ativam o sistema de segundo mensageiro fosfatidil-inositol-cálcio.
ESR1	Receptor de estrogênio 1	6	+	151977826	152450754	472928	Este gene codifica um receptor de estrogênio, um fator de transcrição ativado por ligante composto por diversos domínios importantes para a ligação hormonal, ligação de DNA e ativação de transcrição. A proteína se localiza no núcleo onde ela deve formar um homodímero ou heterodímero com o receptor de estrogênio 2. O estrogênio e seus receptores são essenciais para o desenvolvimento sexual e a função reprodutiva, mas também desempenham funções em outros tecidos, como o ósseo. Os receptores de estrogênio também estão envolvidos em processos patológicos que incluem o câncer de mama, o câncer endometrial e a osteoporose. Processamentos (<i>splicing</i>) alternativos resultam em diversas variantes de transcrição que diferem em suas porções 5' UTRs e utilizam diferentes promotores. (Fornecido por RefSeq)	SwissProt: P03372 # Receptor de hormônio nuclear. Os hormônios esteroides e seus receptores estão envolvidos na regulação da expressão gênica eucariótica e afetam a proliferação e diferenciação celular em tecidos alvo. Podem ativar a atividade transcricional de TFF1.

Cont.

Tabela 8 – Continuação

Símbolo	Descrição	Cro	Fita	Início	Término	PB	Sumário do EntrezGene	Função UniProt
FOS	Homólogo do oncogene viral de osteosarcoma murino FBJ	14	+	75745481	75748937	3456	A família gênica Fos consiste em 4 membros: FOS, FOSB, FOSL1, and FOSL2. Estes genes codificam proteínas com zíper de leucina que podem dimerizar com proteínas da família JUN, desta maneira formando o complexo de transcrição AP-1. Desta maneira, as proteínas FOS foram implicadas na regulação de proliferação, diferenciação e transformação celular. Em alguns casos, a expressão do gene FOS também foi associada com a morte celular apoptótica. (Fornecida por RefSeq)	SwissProt: P01100 # Fosoproteína nuclear que forma um complexo de ligação firme mas não covalente com o fator de transcrição JUN/AP-1. No heterodímero, cada região básica de FOS e JUN/AP-1 parece interagir com meio sítios simétricos de DNA. Tem uma função crítica na regulação do desenvolvimento de células destinadas a formação e manutenção do esqueleto. É portanto, associada a transdução de sinal, proliferação e diferenciação celulares.
HCRT	Precursor do neuropeptídeo hipocretina (orexina)	17	-	40336078	40337470	1392	Este gene codifica uma proteína precursora de um neuropeptídeo hipotalâmico que origina dois neuropeptídeos maduros, orexina A e orexina B, por proteólise. A orexina A e a orexina B, que se ligam aos receptores órfãos HCRTR1 e HCRTR2, associados à proteína G, funcionam na regulação da vigília e do sono. Este conjunto de neuropeptídeos também pode ter alguma função no comportamento alimentar, metabolismo e homeostase. (Fornecido por RefSeq)	SwissProt: O43612 # Neuropeptídeos associados significativamente na regulação da ingesta alimentar e no ciclo sono-vigília, possivelmente coordenando as complexas respostas comportamentais e fisiológicas destas funções homeostáticas complementares. Uma função mais ampla na regulação homeostática do metabolismo energético, funções autonômicas, equilíbrio hormonal e na regulação de fluidos corporais também foi sugerida. A orexina-A se liga com alta afinidade tanto a OX1R como OX2R, enquanto orexina-B se liga apenas a OX2R com alta afinidade semelhante.
OXT	Pre-pro-peptídeo de oxitocina	20	+	3052266	3053163	897	Há duas proteínas codificadas por este gene, oxitocina e neurofina I. Este hormônio contrai o músculo liso durante o parto ou lactação. Também está envolvido na cognição, tolerância, adaptação e comportamentos sexuais e maternos complexos, assim como na regulação da excreção hídrica e funções cardiovasculares. (Fornecido por RefSeq) .	SwissProt: P01178 # A oxitocina provoca contração do músculo liso do útero e da glândula mamária.
OXTR	Receptor de oxitocina	3	-	8792094	8811314	19220	A proteína codificada por este gene pertence à família de receptores associados à proteína G e age como receptor de oxitocina. Sua atividade é mediada por proteínas G que ativam o sistema de segundo mensageiro fosfatidil-inositol-cálcio. O sistema oxitocina-receptor de oxitocina tem uma importante função sobre o útero durante o parto. (Fornecido por RefSeq)	SwissProt: P30559 # Receptor de oxitocina. A atividade deste receptor é mediada por proteínas G que ativam o sistema de segundo mensageiro fosfatidil-inositol-cálcio.

Cont.

Tabela 8 – Continuação

Símbolo	Descrição	Cro	Fita	Início	Término	PB	Sumário do EntrezGene	Função UniProt
PRL	Prolactina	6	-	22287475	22303082	15607		SwissProt: P01236 # A prolactina age primariamente na glândula mamária promovendo a lactação.
PRLH	Hormônio liberador de prolactina	2	+	238475217	238475818	601		SwissProt: P81277 # \ Estimula a liberação de prolactina (PRL) e regula a expressão de prolactina através de seu receptor GPR10. Pode estimular lactótrofos diretamente para a secreção de PRL.
PRLR	Receptor de prolactina	5	-	35048861	35230794	181933	Este gene codifica um receptor para o hormônio prolactina, da hipófise anterior, e pertence à família de receptores de citocinas do tipo I. A sinalização dependente de prolactina ocorre como resultado da dimerização induzida por ligante do receptor de prolactina. Diversas variantes de transcritos por processamentos (<i>splicing</i>) alternativos codificando diferentes isoformas ligadas a membrana ou solúveis foram descritas para este gene, e podem funcionar na modulação de efeitos endócrinos ou autócrinos da prolactina em tecidos normais ou malignos. (Fornecido por RefSeq)	SwissProt: P16471 # Este é um receptor para o hormônio da hipófise anterior prolactina (PRL). A isoforma 4 é incapaz de transmitir a sinalização de proloactina. A isoforma 6 é incapaz de transmitir a sinalização de prolactina.
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina	3	+	129693114	129696781	3667	Este hormônio é responsável pela regulação e liberação do hormônio estimulador da tireóide, assim como da prolactina. A deficiência deste hormônio foi associada ao hipotireoidismo hipotalâmico. (Fornecido por RefSeq)	SwissProt: P20396 # Funciona como regulador da biosíntese de TSH na hipófise anterior, e como neurotransmissor/neuromodulador nos sistemas nervosos centrais e periféricos. Pode promover alongamento da fibra capilar, prolonga a fase de crescimento do ciclo capilar (anágena) e antagoniza as suas terminações por TGFB2. Também pode aumentar a proliferação e a apoptose inibida de queratinócitos da matriz do cabelo.

Cro: Cromossomo; PB: pares de base, o tamanho dos genes;

4.5 - Comparação da rede funcional de oxitocina

A investigação do nível de conservação do conjunto dos 12 genes, que compõem a rede funcional da oxitocina nas 36 espécies de vertebrados está apresentada na tabela 9.

De um modo geral, como esperado, todos os 12 genes da rede funcional são extremamente conservados em primatas, com um valor médio de identidade em torno de 96%. Mas quando se observa os mamíferos como um todo, outro padrão emerge: parece haver dois grupos de genes: os agrupados com a oxitocina (Grupo 1 - *AVP*, *AVPR1A*, *AVPR1B*, *ESR1*, *FOS*, *HCRT* e *OXTR*) e outro com a prolactina (Grupo 2 - *PRLH*, *PRLR* e *TRH*).

A identidade média do grupo dos mamíferos, excluindo os primatas, para o grupo 1 (*AVP*, *AVPR1A*, *AVPR1B*, *ESR1*, *FOS*, *HCRT*, *OXTR* e *OXT*) é cerca de 82% enquanto que para o grupo 2 (*PRL*, *PRLH*, *PRLR* e *TRH*) fica em torno de 65%. Esse padrão fica mais claro quando comparamos a variação do grupo 1 contra o 2, em cada uma das espécies do estudo, através do teste de Mann-Whitney. Ou seja, quando todas as amostras da ordem dos roedores, dos lagomorfa, dos morcegos e do grande grupo dos cetartiodáctilos (cetáceos e artiodáctilos) são analisadas, diferem significativamente quando os grupos 1 e 2 são comparados. Outros mamíferos como o cachorro e o hírax também apresentam valores significativos quando comparados. Além disso, outros vertebrados como a rã e duas espécies de peixes também apresentam este mesmo padrão de diferenciação. Resumindo, a análise encontrou um distinto e significativo padrão envolvendo os genes agrupados com a oxitocina (mais conservados) daqueles da prolactina (mais diversos) em vários *clusters* de espécies.

Deste modo, é importante ressaltar alguns aspectos envolvendo a prolactina. Inicialmente esse hormônio foi associado à produção de leite materno em humanos. Porém estudos posteriores revelaram que a prolactina está na verdade envolvida com mais de 300 funções em diversos vertebrados, incluindo efeitos no balanceamento dos líquidos e sais (pressão sanguínea), no desenvolvimento e crescimento, sistema endócrino, metabolismo, funções cerebrais e comportamentais, reprodução, sistema imune, contribuindo ainda para

síntese do surfactantes pulmonares no feto, e na tolerância imune materno-fetal (Bole-Feysot *et al*, 1998; Craven *et al*, 2006). Tem sido descrito também que existem várias formas variantes da prolactina mesmo dentro de uma mesma espécie. Espécies de peixes, por outro lado, apresentam o gene duplicado, enquanto em muitos outros vertebrados, incluindo os humanos, proteínas relacionadas às somatolactinas, cuja estrutura é muito similar a prolactina, também são encontradas (Amemiya *et al*, 1999; Rand-Weaver *et al*, 1992). Talvez a presença das diversas variantes e hormônios similares (somatolactinas), ou ainda, o fato da prolactina interagir com o seu receptor (PRLR) e também com um grande número de diferentes outros receptores, permitiu que a prolactina, bem como aquelas proteínas relacionadas funcionalmente a esta (o grupo 2 da presente análise), estivessem sujeitas a um relaxamento da seleção purificadora. Adicionalmente podemos estar diante de pressão seletiva do tipo darwiniana, ou positiva, visto o padrão da variação ser também cluster-específico. No entanto, estas hipóteses deverão ser testadas em estudos adicionais.

Finalmente, a compilação apresentada na Tabela 1 dá uma idéia da extensão da diversidade comportamental dos primatas investigados aqui. Não é diferente com outros vertebrados. Qualquer associação dessas características com os resultados aqui encontrado devem ser considerados com cautela, visto que ainda estamos longe de entender a conexão entre genótipos e fenótipos complexos, bem como as causas genéticas das variações normais do comportamento encontradas dentro e entre espécies de vertebrados, incluindo primatas. Isso se deve basicamente ao fato de que em espécies que evoluem em condições naturais, fenótipos complexos resultam da interação intrincada de uma rede de genes de pequeno efeito, e que ainda podem apresentar penetrância incompleta, expressividade variável e pleiotropia. Neste contexto, comportamentos normais relativos aos cuidados parentais e outras ações relacionadas encontradas no reino animal estão evidentemente inseridos. Além disso, quando se trata de comportamento, não se pode negligenciar o fato de que animais com memória e cognição notáveis como os primatas, possuem a capacidade de aprendizado que pode ser transmitido e perpetuado ao longo de

gerações (Avital & Jablonka, 2000), promovendo círculos virtuosos de co-evolução gene-cultura.

Tabela 8. Comparação da Conservação da Rede Funcional da Oxitocina

Ordem/ Infraclasse/ Classe	Gene	AVP	AVPR1A	AVPR1B	ESR1	FOS	HCRT	OXT	OXTR	PRL	PRLH	PRLR	TRH	<i>P-value</i> (Class1 x Class 2)		
		(164 aa)	(418 aa)	(424 aa)	(595 aa)	(380 aa)	(131 aa)	(125 aa)	(389 aa)	(227 aa)	(87 aa)	(622 aa)	(242 aa)			
	Classe	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2			
Mamíferos	Primates	Chimp	94,5	99	99	99,2	99,7	99,2	98,4	99	99	ND	100	97,5	0,921	
		Gorilla	89,9	95	99	99	99,7	100	96	99	97,8	98,9	98,7	91,7	0,368	
		Orang	97	98	96	99	99,5	98,5	96	98	99	98,9	98,4	97,5	0,461	
		Gibbon	97	98	97	98	98,9	97,7	95,2	99	98	95,4	98,6	96,7	0,683	
		Macaque	97	96,4	96	99	98,4	95,4	97,6	97	98	92	96	91,7	0,154	
		Marmoset	93,9	92	90	97	88,7	68,7	88,8	94	90	82,8	88,4	78,1	0,109	
	Roedores e lagomorfas	Mouse	79,8	82	80,9	89	93,7	81,7	87,2	92	60	70,1	67,2	52,6	0,004	
		Rat	78,6	82,1	81,4	89	94,2	83,2	88	92	62	61,1	59,8	51,7	0,004	
		Guinpig	82,3	84,2	80,9	86	95,8	80,9	86,4	89	55	60,9	65,9	36,8	0,004	
		Rabbit	88,7	86,6	84,4	91	93,9	90,1	84,4	88,3	79	75,9	75,3	78,3	0,04	
		Pika	77	ND	81	89	91,3	85,5	67,2	89,7	76,6	64,8	68,6	63,4	0,024	
	Placentalia	Cetartiodactilas	Dolphin	82,8	83,1	84	87	93,4	80,2	56,8	92,1	78,7	66,7	71,4	74,9	0,048
			Cow	89,2	79,3	81	90	96,3	90,1	88	90,3	72,5	66,3	64,6	72	0,004
			Pig	88,1	83,3	84,4	ND	96,8	90,1	86	ND	79,5	ND	72	76,5	0,024
	Carnívoros	Cat	ND	88	75	ND	97,1	69,5	29,6	93	71,2	68,2	60,1	52,9	0,171	
		Panda	59,8	85,4	79,7	90	97,4	ND	43,2	87,4	65,9	40,2	73,3	76,6	0,164	
		Dog	86,1	81,1	76,3	76	97,1	89,3	81,7	88,2	76,7	59,2	75	79	0,028	
	Morcegos	Microbat	ND	78,9	84,7	84	93,7	88,5	ND	88	62,2	49,4	67,4	80,2	0,032	
		Megabat	73,5	86,4	83	89	95,5	86,4	72	84,3	67	59,8	74,1	55,7	0,016	
	Afrotheria	Hedgehog	63,4	ND	81	71	84,5	81,7	ND	84,3	72,2	ND	62,1	ND	0,286	
		Elephant	80,8	86,1	84	ND	75,3	75,6	47,2	88,1	66,2	55,1	72,6	71,6	0,073	
		Hyrax	72,1	83,3	81	ND	93,4	86,3	79,2	91,3	51,5	59,1	41,5	ND	0,017	
		Tenrec	ND	76,5	81,5	73	50,8	81,7	ND	85,2	68,6	ND	58,8	66,3	0,167	
Xernathras	Sloth	ND	84	86	ND	34,2	ND	62,4	90	76	ND	42,4	ND	0,571		
Marsupiais	Opossum	70,6	80,3	74	86,6	89	66,4	77	75,1	75	ND	64,5	35,8	0,085		
	Tasdevil	53	79,3	74	86,6	74,8	67,9	35,3	75,7	73,8	ND	67,4	40,5	0,279		
Monotremata	Platypus	65,5	67,6	73	73	77,2	ND	73	78	70	ND	58	21,1	0,067		

Cont.

Tabela 8. Cont

Ordem/ Infraclasse/ Classe	Gene	AVP (164 aa)	AVPR1A (418 aa)	AVPR1B (424 aa)	ESR1 (595 aa)	FOS (380 aa)	HCRT (131 aa)	OXT (125 aa)	OXTR (389 aa)	PRL (227 aa)	PRLH (87 aa)	PRLR (622 aa)	TRH (242 aa)	<i>P-value</i> (Class1 x Class 2)
	Classe	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	
Aves	Turkey	57,9	ND	59	78,7	ND	49,7	65,4	65	65	ND	37,4	33,7	0,167
	Chick	ND	71	66	78,2	ND	ND	ND	79	67,7	ND	ND	ND	0,8
	Zebra Finch	AVP (164 aa)	71	61	77,7	ND	ND	ND	40,4	68	ND	ND	ND	0,99
Anfíbios	Frog	53	63,8	53,5	70	64,4	38,9	64,8	65,9	60	26,9	47,2	29,8	0,048
Peixes	Tetradon	49,7	57,9	ND	45,9	56,2	33,3	ND	62	33,3	ND	ND	32,4	0,071
	Fugu	ND	56,3	ND	43,6	53,1	20,6	ND	61,9	30	ND	34,7	30,9	0,25
	Strback	50,6	53,3	ND	47,1	40,7	20,6	ND	61	30,6	ND	27,9	33,2	0,167
	Medaka	ND	56,2	ND	45,7	45,3	36,1	ND	62	32,2	ND	33,1	33,3	0,036
	Zebfish	46,4	53,6	53,8	47,7	54,5	31,2	46,1	62,3	33,3	24,8	34,2	36,2	0,026

A variação da conservação entre os grupos 1 e 2, dos genes, foi verificada por um teste de Mann-Whitney.

Referências Bibliográficas

Abel JJ, Macht DI (1919) Histamine and pituitary extract. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 14(3): 279-293.

Acher R (1968) Neurophysin and neurohypophysial hormones. *Proc Roy Soc B* 170:7-16.

Acher R, Chauvet J (1995) The neurohypophysial endocrine regulatory cascade: precursors, mediators, receptors, and effectors. *Front Neuroendocrinol* 16(3):237-89.

Acher R, Chauvet J, Chauvet MT (1995) Man and the chimaera. Selective versus neutral oxytocin evolution. *Adv Exp Med Biol* 395:615-27.

Animal Diversity Web - University of Michigan Museum of Zoology, acessado no dia 10/03/12 em <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Primates.html>

Anisimova et al.(2001) The accuracy and power of likelihood ratio tests to detect positive selection at amino acid sites. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1585-1592.

Anisimova, M., Bielawski JP, Yang Z (2002) Accuracy and power of Bayes prediction of amino acid sites under positive selection. *Mol. Biol. Evol.* 19: 950-958;

Avital E & Jablonka E (2000) *Animal traditions: behavioural inheritance in evolution.* Cambridge University Press, Cambridge.

Barbujani G, Colonna V (2010) Human genome diversity: frequently asked questions. *Trends in Genetics* 26(7):285-295.

Barnett, A. 2005. *Cacajao melanocephalus*. Mammalian Species, No. 776: 1-6.

Bell WB, Hich P (1909) Observations on the physiology of the female genital organs. *The British Medical Journal* 1:777.

Bell WB (1909) The pituitary body [and the therapeutic value of the infundibular extract in shock, uterine atony, and intestinal paresis]. *British Medical Journal* 2:1609–1613.

Bell WB (1915) Infundibulin in Primary Uterine Inertia and in the Induction of Labour. *Proc R Soc Med* 8(Obstet Gynaecol Sect):71-7.

Bohus B, Kovács GL, De Wied D (1978) Oxytocin, vasopressin and memory: Opposite effects on consolidation and retrieval processes. *Brain Res* 157: 414–417.

Bole-Feysot, C.; Goffin, V.; Edery, M.; Binart, N.; Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine reviews* 19 (3): 225–268.

Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H (1980) Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 207(4429):373-8.

Carroll SB (2006) *The Making of the Fittest – DNA and the ultimate forensic record of evolution*. 1a ed. W. W. Norton & Company, Inc.

Carter DA & Murphy D (1991) Rapid changes in poly(A) tail length of vasopressin and oxytocin mRNAs form a common early component of neurohypophysial peptide gene activation following physiological stimulation. *Neuroendocrinology* 53: 1–6, 1991.

Chatterjee HJ, Ho SY, Barnes I, Groves C (2009) Estimating the phylogeny and divergence times of primates using a supermatrix approach. *BMC Evol Biol.* 9:259.

Craven AJ, Nixon AJ, Ashby MG, et al. (November 2006). "Prolactin delays hair regrowth in mice". *J. Endocrinol.* 191 (2): 415–25.

Dale HH (1906) On some physiological actions of ergot. *J Physiol* 34 (3) 163-206.

Dale HH (1909) The Action of Extracts of the Pituitary Body. *The Biochemical Journal* 4(9):427-47.

De Wied D (1965) The influence of the posterior and intermediate lobe of the pituitary and pituitary peptides on the maintenance of a conditioned avoidance response in rats. *Int J Neuropharmacol* 4:157–167.

De Wied D (1997) The neuropeptide story. *Frontiers in Neuroendocrinology* 18:101–113.

Dudley HW (1919) Some observations on the active principles of the pituitary gland. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 14(4): 295-312.

Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S (1953a) The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem* 205(2):949-57.

Du Vigneaud V, Ressler C, Roberts CW, Katsoyannis PG, Gordon S (1953b) The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *J Am Chem Soc* 75(19): 4879–4880.

Elands JPM, Van Dorenmalen E, Spruijt B, De Kloet ER (1991) Oxytocin receptors in the rat hypothalamic ventromedial nucleus a study of possible mediators of female sexual behavior. In: Jard S, Janison R, Eds. *Proceedings of the Third Vasopressin Conference.* John Libbey, London, 311–319.

Fuller JL, Simmel EC (1983) Behavior Genetics: Principles and applications. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, EUA.

Gimpl G, Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81(2):629-83.

Goodson JL (2008) Nonapeptides and the evolutionary patterning of sociality. *Prog Brain Res* 170:3-15.

Grantham R (1974) Amino acid difference formula to help explain protein evolution *Science* 6;185(4154):862-4

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

Ivell R, Richter D (1984) The gene for the hypothalamic peptide hormone oxytocin is highly expressed in the bovine corpus luteum: biosynthesis, structure and sequence analysis. *The EMBO Journal* 3(10):2351-4.

Ivell R, Kimura T, Müller D, Augustin K, Abend N, Bathgate R, Telgmann R, Balvers M, Tillmann G, Fuchs AR (2001) The structure and regulation of the oxytocin receptor. *Exp Physiol* 86(2):289-96.

Hoyle CH (1998) Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Regul Pept* 73(1):1-33.

Jameson NM, Hou ZC, Sterner KN, Weckle A, Goodman M, Steiper ME, Wildman DE (2011) Genomic data reject the hypothesis of a prosimian primate clade. *J Hum Evol.* 61(3):295-305.

Kaessmann H, Wiebe V, Weiss G, Pääbo S (2001) Great ape DNA sequences reveal a reduced diversity and an expansion in humans. *Nature Genetics* 27:155 - 156.

Kappeler PM, van Schaik CP (2006) *Cooperation in primates and humans: mechanisms and evolution*. Springer, Berlin.

van Kesteren RE, Smit AB, Dirks RW, de With ND, Geraerts WP, Joosse J (1992) Evolution of the vasopressin/oxytocin superfamily: characterization of a cDNA encoding a vasopressin-related precursor, preproconopressin, from the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10):4593-7.

Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H (1992) Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356(6369):526-9.

Klopfer PH (1971) Mother love: what turns it on? *Am Sci* 59(4):404-7.

Kumar S, Hedges SB (1998) A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*; 392: 917-920.

Land H, Grez M, Ruppert S, Schmale H, Rehbein M, Richter D, Schütz G (1983) Deduced amino acid sequence from the bovine oxytocin-neurophysin I precursor cDNA. *Nature* 302(5906):342-4.

Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH, Young WS 3rd (2009) Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol* 88(2):127-51.

Lee AG, Cool DR, Grunwald WC Jr, Neal DE, Buckmaster CL, Cheng MY, Hyde SA, Lyons DM, Parker KJ (2011) A novel form of oxytocin in New World monkeys. *Biol Lett.* 7(4):584-7.

Li WH, Wu CI, Luo CC (1984) Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *J Mol Evol.* 21(1):58-71.

Mayr E (1970) *Populations, Species, and Evolution: An Abridgment of Animal Species and Evolution.* Harvard University Press, Cambridge, EUA.

Minakata H (2010) Oxytocin/vasopressin and gonadotropin-releasing hormone from cephalopods to vertebrates. *Ann N Y Acad Sci*1200:33-42.

Myers P (2000) "Primates" (On-line), Animal Diversity Web. Acessado no dia 10/03/2012 em <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Primates.html>.

Neumann ID (2008) Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol* 20(6):858-65.

Ott I, Scott JC (1910) The Action of Infundibulin upon Mammary Secretion. *Proc Soc Exp Biol.* 8:48–49.

Oumi T, Ukena K, Matsushima O, Ikeda T, Fujita T, Minakata H, Nomoto K (1996) Annetocin, an annelid oxytocin-related peptide, induces egg-laying behavior in the earthworm, *Eisenia foetida*. *J Exp Zool* 276(2):151-6.

Pedersen CA, Prange AJ Jr. (1979) Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(12):6661-5.

Pereira TV, Salzano FM, Mostowska A, Trzeciak WH, Ruiz-Linares A, Chies JAB, Saavedra C, Nagamachi C, Hurtado AM, Hill K, Castro-de-Guerra D, Silva-Júnior WA, Bortolini MA (2006) Natural selection and molecular evolution in primate

PAX9 gene, a major determinant of tooth development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(15):5676-5681.

Rao VV, Löffler C, Battey J, Hansmann I (1992) The human gene for oxytocin-neurophysin I (OXT) is physically mapped to chromosome 20p13 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 61(4):271-3.

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

Ruppert S, Scherer G, Schütz G (1984) Recent gene conversion involving bovine vasopressin and oxytocin precursor genes suggested by nucleotide sequence. *Nature* 308(5959):554-7.

Rutishauser J, Kopp P, Gaskill MB, Kotlar TJ, Robertson GL (1999) A novel mutation (R97C) in the neurophysin moiety of prepro-vasopressin-neurophysin II associated with autosomal-dominant neurohypophyseal diabetes insipidus. *Mol Genet Metab* 67(1):89-92.

Ruvolo M (1997) Genetic diversity in hominoid primates *Annu Rev Anthropol* 26:515-40.

Sadeghi HM, Innamorati G, Dagarag M, Birnbaumer M (1997) Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor. *Mol Pharmacol*. 52(1):21-9.

Schneider H (2000) The current status of the New World monkey phylogeny. *An Acad Bras Cienc.* 72(2):165-72.

Schüle R, Liebenhoff U, Müller H, Birnbaumer M, Rosenthal W (1996) Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site-directed mutagenesis of its putative palmitoylation site. *Biochem J.* 313 (Pt 2):611-6.

Soloff MS, Alexandrova M, Fernstrom MJ (1979) Oxytocin receptors: triggers for parturition and lactation? *Science* 204(4399):1313-5.

Tavaré S, Marshall CR, Will O, Soligos C, Martin RD (2002) Using the fossil record to estimate the age of the last common ancestor of extant primates. *Nature*; 416: 726-729.

Teltsh O, Kanyas-Sarner K, Rigbi A, Greenbaum L, Lerer B, Kohn Y (2011) Oxytocin and vasopressin genes are significantly associated with schizophrenia in a large Arab-Israeli pedigree. *Int J Neuropsychopharmacol.* 7:1-11.

Terkel J, Rosenblatt JS (1972) Humoral factors underlying maternal behavior at parturition: cross transfusion between freely moving rats. *J Comp Physiol Psychol* 80(3):365-71.

Tessmar-Raible K, Raible F, Christodoulou F, Guy K, Rembold M, Hausen H, Arendt D (2007) Conserved sensory-neurosecretory cell types in annelid and fish forebrain: insights into hypothalamus evolution. *Cell* 129(7):1389-400.

Wayne, RK & vonHoldt, BM (2012) Evolutionary genomics of dog domestication *Mamm Genome*, 23:3–18.

Wesley VJ, Hawtin SR, Howard HC, Wheatley M (2002) Agonist-specific, high-affinity binding epitopes are contributed by an arginine in the N-terminus of the human oxytocin receptor. *Biochemistry.*41(16):5086-92.

Xu Y, Xue Y, Asan, Daly A, Wu L, Tyler-Smith C (2008) Variation of the oxytocin/neurophysin I (OXT) gene in four human populations. *J Hum Genet* 53(7):637-43.

Yang, Z (2002) Inference of selection from multiple species alignments. *Curr. Opin Genet. Devel.* 12: 688-694.

Yang, Z & Bielawski JP (2000) Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol. Evol.* 15: 496-503.

Zingg HH, Laporte SA (2003) The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab* 14(5):222-7.