

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**A EVOLUÇÃO MOLECULAR DO SISTEMA DA OXITOCINA EM  
PRIMATAS**

**PEDRO VARGAS PINILLA**

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

**Maria Cátira Bortolini**

**Orientadora**

**Porto Alegre – RS**

**MARÇO DE 2014**

Este trabalho foi realizado no laboratório de Evolução Humana e Molecular do Departamento de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Rio Grande do Sul e foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela CAPES e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

*A los que con el anhelo de su presencia, hacen que miles de kilómetros se vuelvan  
segundos a la velocidad de un abrazo.*

*A los que te dan dos regalos todos los días y aunque siempre son los mismos, cada vez son  
diferentes.*

*A los que esperan que vuelvas corriendo en la noche, pero te animan a seguir volando  
durante años.*

*A los que te educan con su ejemplo, te moldean con amor y te iluminan con su espíritu.*

*A los que, aunque no te entiendan, o no los entiendas, te hacen sentir en casa.*

*A los que comparten tus manías, vicios y placeres; gracias a ellos pareces normal.*

*A los que te abren las puertas sin saber quién eres, te reciben como a un hijo, te animan y  
te exigen como a un colorado (o gremista).*

*A los que escriben contigo en el cuaderno de la vida lo que dicta el alma al compás del  
corazón.*

## **Agradecimentos**

Ao Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ-FEEMA) e à Estação Ecológica Estadual Paraíso (ESEC/ FEEMA), por disponibilizarem material científico para a 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.

## Sumário

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
Complexo OXT-OXTR e outros sistemas relacionados.....	9
Evolução do sistema <i>OXT/OXTR</i> e proteínas relacionadas.....	11
Receptores, interação com os hormônios e expressão diferencial.....	14
Primatas.....	22
O sistema <i>OXT</i> e <i>OXTR</i> em primatas.....	23
2. OBJETIVOS.....	24
3. RESULTADOS.....	25
4. MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
ABSTRACT.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
INTRODUCTION.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
MATERIAL AND METHODS.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<i>DNA samples, sequencing and data mining</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<i>Data analyses</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
RESULTS.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<i>OXT variability and selection analyses</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<i>OXTR variability and selection analyses</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<i>Coevolution</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<i>OXT forms and ecological/social behavior traits</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DISCUSSION.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
CONCLUSION.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5. DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÃO.....	28

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AVP – Vasopressina

AVPR1a – Receptor da vasopressina 1a

AVPR1b – Receptor da vasopressina 1b

AVPR2 – Receptor da vasopressina 2

GP – Glicopéptido

GPCRs – Receptores acoplados as proteínas G

NP – Neurofisina

OXT – Oxitocina

OXTR – Receptor da oxitocina

PVN – Núcleo paraventricular

SP – Peptídeo sinalizador

## RESUMO

A oxitocina (OXT) é um nonapeptídeo envolvido em um amplo espectro de funções fisiológicas e comportamentais. Até recentemente acreditava-se em uma conservação de milhões de anos da sequência de aminoácidos, levando a pensar numa única proteína para todos os mamíferos placentários. Neste estudo foi analisada a oxitocina de 29 espécies de primatas, e desse grupo, foram estudados também os receptores de oxitocina (OXTR) de 21 espécies. Registramos aqui uma quebra na linha de conservação descrevendo 3 novas formas de OXT em macacos do Novo Mundo e reportamos um aminoácido (OXT-8Pro) com seleção positiva na família Cebidae; essa mesma posição registrou uma significância estatística ( $p= 0.003$ ), numa análise de correlação com o tamanho da ninhada. Reforçando essa correlação, descrevemos uma nova forma de OXT (OXT-3Val-8Pro) nos *Saguinus* (Cebidae), um gênero com um pronunciado cuidado parental dos machos aparentados ou não. Em OXTR também foram detectados aminoácidos sob seleção positiva, assim como processos de coevolução intramolecular e intermolecular com seu ligante, OXT. Com os resultados aqui obtidos, propomos possíveis cenários da interação dessas novas formas de OXT com seus receptores e propomos perspectivas para o estudo do sistema OXT-OXTR e sua relação com outros sistemas.

## ABSTRACT

Oxytocin (OXT) is a nonapeptide involved with a wide range of physiological and behavior functions. Until recently it was believed that an unmodified oxytocin sequence was present in all placental mammals. This study analyzed the oxytocin in 29 primate species, and the oxytocin receptor (OXTR) was also investigated in 21 of these species. We reported here an unprecedented lack of conservation, describing three novel OXT forms in the New World Monkeys. A signal of positive selection was detected in OXT- 8Pro in the Cebidae family and the same position showed a statistically significance ( $p= 0.003$ ) correlation with litter size. Reinforcing this correlation, we describe here a novel OXT form (OXT-3Val-8Pro) in *Saguinus* (Cebidae), a genus with a pronounced male parental care. In OXTR amino acids under positive selection as well as intramolecular and intermolecular coevolutionary process with his ligand, OXT, were detected. We suggest some interaction

scenarios of the novel OXT forms with their receptors and we propose perspectives for the study of the OXT-OXTR system as well as its relationship with other systems.

## 1. INTRODUÇÃO

Um sistema que facilita a reprodução em todos os mamíferos: assim podem ser definidos o nonapeptídeo cíclico oxitocina (OXT) e as demais proteínas estruturalmente ligadas a ele. A oxitocina tem sido relacionada com um amplo espectro de efeitos centrais e periféricos, entre eles a modulação de reflexos neuroendócrinos e o estabelecimento de complexos comportamentos sociais (Bielsky & Young, 2004; Donaldson & Young, 2008; Gimpl & Fahrenholz, 2001; Soloff et al., 1979).

Dentro desse amplo espectro, pode-se falar dos sistemas reprodutivos. Os comportamentos monogâmicos e poligâmicos têm sido largamente estudados e são um exemplo da importância de se analisar a ação da oxitocina e das proteínas a ela relacionadas em animais (Young et al., 1998).

De 3-5% das espécies de mamíferos têm comportamentos monogâmicos (Kleiman, 1977). Uma delas é o arganaz do campo (*Microtus ochogaster*), que vive nas pradarias da América do Norte e apresenta relações monogâmicas estáveis. Após um intenso período de união inicial, o macho e a fêmea formam um casal e vivem juntos em um único ninho. O macho defende furiosamente sua parceira, e ambos os progenitores cooperam no cuidado a longo prazo de seus filhotes. Ao contrário, o arganaz montanhês (*Microtus montanus*), que vive em terras altas, é pouco sociável e bastante promíscuo. Cada indivíduo vive em um ninho isolado, os machos não tomam parte nos cuidados com os filhotes, e as fêmeas cuidam da ninhada por pouco tempo (Wang & Young, 1997; Young, et al., 1996).

Qual seria a razão dessas diferenças no comportamento, se ambas as espécies pertencem ao mesmo gênero e partilham 99% da informação genética? (Magon & Kalra, 2011). Ao se observarem os processos endócrinos, pôde-se achar uma possível resposta. Quando os arganazes de campo copulam, dois hormônios são liberados da pituitária anterior: oxitocina (OXT) e vasopressina (AVP). Se a liberação desses hormônios é bloqueada, o comportamento do arganaz do campo fica muito semelhante ao de seus primos da montanha (Neumann, 2008). Por outro lado, se forem aplicadas injeções de OXT e de AVP nos arganazes de campo, ao mesmo tempo em que a cópula é evitada, eles ainda



têm preferência pelo seu parceiro (Ross et al., 2009; Ross & Young, 2009), evidenciando a importância desses dois hormônios neste comportamento para a espécie do campo.

No entanto, quando OXT e AVP são aplicadas no arganaz montanhês, não é determinada nenhuma mudança no seu comportamento. É possível especular que a ausência de resposta, nesse caso, se deva ao fato de esses animais não terem receptores em determinadas regiões do cérebro para interagir com os hormônios nas condições fornecidas pelo experimento.

Esse exemplo ilustra muito bem o fato de que, assim como os hormônios, seus receptores — OXTR para OXT e AVPR1a, AVPR1b e AVPR2 para AVP — são igualmente importantes para determinar um fenótipo comportamental como os descritos anteriormente.

De fato, se os receptores são inativados por antagonistas, a formação do casal arganaz do campo é evitada pela fêmea, por meio da inativação de OXTR, e pelo macho, por meio da inativação de AVPR1A, AVPR1B e AVPR2 (Winslow et al., 1993).

Esses achados sugerem hipóteses muito interessantes acerca da evolução de comportamentos sociais complexos. Dentre essas poderíamos nos perguntar: em que medida as mudanças no repertório de comportamentos reprodutivos como os acima referidos seriam explicadas por mutações nos genes dos hormônios e/ou quantas seriam decorrentes de mutações em seus receptores?

### **Complexo OXT-OXTR e outros sistemas relacionados**

Desde 1906, quando H.H. Dale, farmacologista britânico, descreveu o que ele denominou como *ergot*, têm-se estudado as propriedades da oxitocina (Dale, 1906). O primeiro processo com o qual relacionou-se esse hormônio foi o parto, determinando o seu nome – oxitocina –, um neologismo grego que significa “parto rápido”. Anos depois, Ott e Scott (1910) propuseram sua relação com a lactação. Já a sequência de nove aminoácidos que compõem a oxitocina foi revelada em 1953 (Du Vigneaud, Ressler, & Trippett), e sintetizada um ano depois (Du Vigneaud, 1954). Posteriormente, foi descoberta a presença de um pré-hormônio, constituído pela oxitocina e pela neurofisinina, a qual participa do transporte da OXT do hipotálamo à pituitária posterior (Brownstein et al., 1980). O gene do receptor da oxitocina (*OXTR*), por sua vez, foi clonado em 1992 (Kimura, et al., 1992).

Esses e muitos outros estudos têm definido as funções da oxitocina bem como de seu receptor. É importante salientar o duplo papel que ela exerce, já que atua tanto como neurotransmissor quanto como hormônio, seja em humanos ou em outros mamíferos. As ações periféricas do complexo ativado incluem a estimulação para a dilatação cervical, a contração uterina durante o parto, a liberação do leite em mães lactantes e o orgasmo durante a atividade sexual. Uma recente revisão (Lucion & Bortolini, 2014) traz detalhes sobre abordagens adotadas para o entendimento dos mecanismos envolvidos no cuidado parental, dentre estas, aspectos fisiológicos e genéticos, dos quais os sistemas OXT-AVP têm papel de destaque. No cérebro, a OXT influencia nas funções cognitivas, emocionais e sociais e, também, em comportamentos maternos e sexuais (Ebstein, et al., 2012).

A OXT é um nonapeptídeo composto por Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly, sequência na qual as duas cisteínas (Cys) são conectadas por uma ponte dissulfeto (Figura 1). Sua estrutura é similar à da AVP, diferenciando-se em dois aminoácidos. Seus respectivos genes (*OXT* e *AVP*), são conservados através de inúmeras espécies de diferentes *taxa* (Hoyle, 1998; Tessmar-Raible et al., 2007).

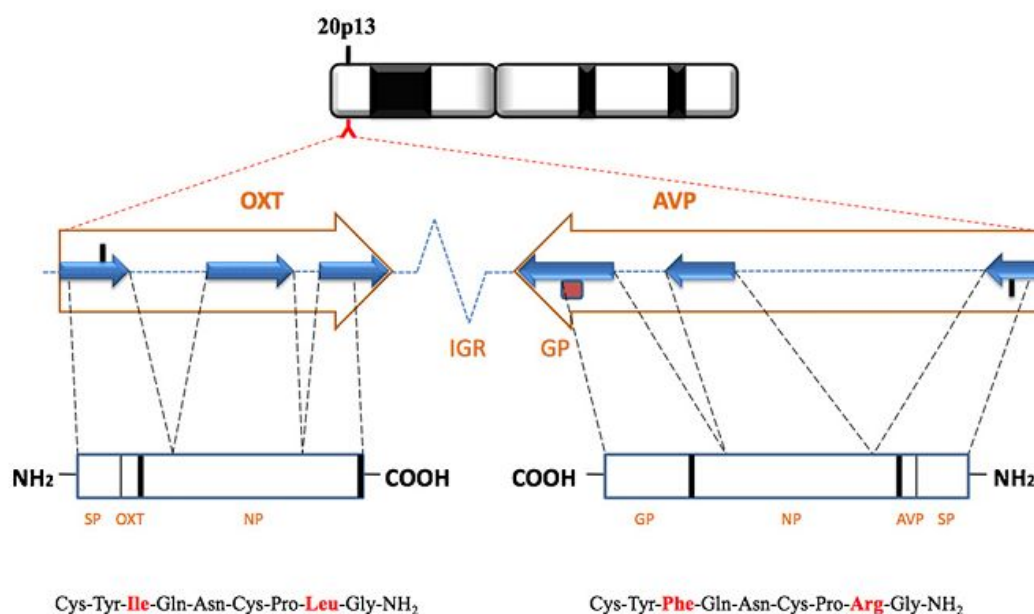


Figura 1. Diagrama dos genes de oxitocina e vasopressina (respectivamente, OXT e AVP, representados pelas setas grandes), enquanto os pré-pró-hormônios são ilustrados pelas caixas. A sequência de aminoácidos de cada um dos nonapeptídeos aparece abaixo e a localização destes no cromossomo 20 humano é ilustrada acima. Os éxons são mostrados como setas azuis pequenas, e os íntrons como linhas pontilhadas. IGR representa a região intergênica; SP, peptídeo sinalizador; NP, neurofísina; GP, glicopeptídeo. Os resíduos de aminoácidos que diferem entre as moléculas estão representados em vermelho (Extraído de Lee et al., 2009).

O gene *OXT* está localizado no mesmo cromossomo onde também se localiza o gene *AVP*, mas ambos estão orientados numa direção transcricional contrária (cromossomo 2 em camundongos, e 20 em humanos; Figura 1). Esse fenômeno é visto ainda em outros mamíferos. Ambos os genes possuem três éxons e dois íntrons com uma alta identidade e estão separados por uma região intergênica que varia em todas as espécies (1,1 kb em ratos e humanos, e 3,6 kb em camundongos). Essa porção, normalmente conservada, possui sequências reguladoras (Gainer, et al., 2001).

A Figura 1 também mostra que o chamado pré-hormônio é formado pela sequência da *OXT*, da neurofisina (*NP*) e do peptídeo sinal (*SP*), enquanto o outro pré-hormônio relacionado envolve a sequência da *AVP*, da neurofisina (*NP*) e do peptídeo sinal (*SP*), acrescida da sequência de um glicopeptídeo (*GP*).

### **Evolução do sistema *OXT/OXTR* e proteínas relacionadas**

Virtualmente, todas as espécies de vertebrados possuem sistemas como o da *OXT* e da *AVP* ou proteínas similares a essas, contabilizando um total de 13 nonapeptídeos (Tabela 1). A vasotocina, por exemplo, similar à vasopressina e à *OXT*, foi encontrada nos Ciclostomados (lampreias) e em peixes ósseos. A diferença entre *AVP* e vasotocina é a presença de uma Ile (vasotocina) ou Phe (*AVP*) na posição 3; por outro lado, a diferença entre *OXT* e vasopressina é uma Arg (vasotocina) ou uma Leu (*OXT*) na posição 8 (Figura 2). A mesotocina, por sua vez, difere da *OXT* pela presença de uma Ile na posição 8 (Leu em *OXT*) e pode ser observada em peixes pulmonados africanos e australianos, anfíbios, répteis e aves, encontrando-se também em marsupiais, particularmente em duas espécies que apresentam, além da mesotocina, a *OXT* (Tabela 1).

A pouca variação do hormônio pode ser observada em todos os vertebrados ósseos já investigados, com exceção dos peixes cartilagosos, que apresentam variabilidade e dualidade no sistema, como mostra a Tabela 1. Por exemplo, além da vasotocina, as raia da subclasse Selachii possuem o hormônio glumitocina (presença de uma glicina na posição 8, quando comparada à oxitocina), enquanto os tubarões possuem dois peptídeos: aspartocina, (presença de uma asparagina na posição 4) e valitocina (presença de uma valina na posição 8) quando comparadas à oxitocina. A mesma comparação pode ser feita

com o cação, no qual se encontra a asvatocina (uma asparagina na posição 4, e uma valina na posição 8) e a phasvatocina (fenilalanina, asparagina e valina nas posições 3, 4 e 8 respectivamente).

Esses peixes cartilagosos utilizam a ureia como elemento de osmorregulação, e uma gama maior de hormônios similares à OXT pode ter ajudado nessa função, de acordo com alguns autores (Acher, et al., 1995).

Figura 2. Homólogos de oxitocina e vasopressina. Extraído de Donaldson e Young, (2008).

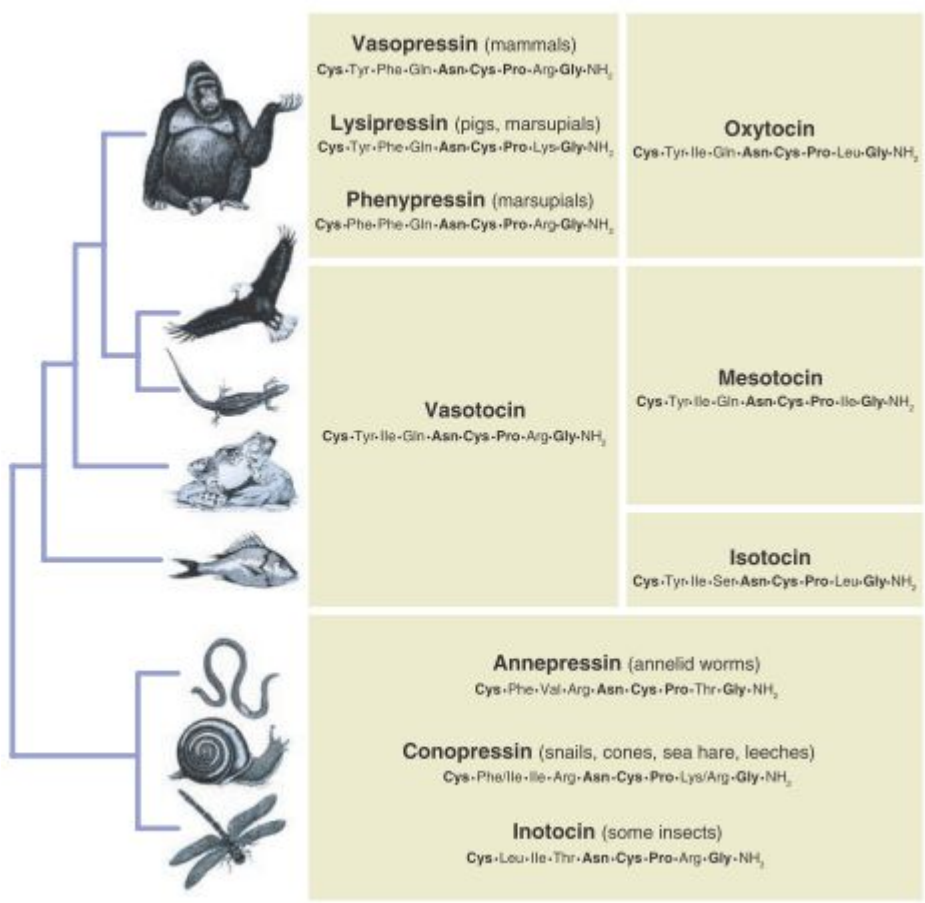


Tabela 1. Oxitocina e peptídeos relacionados.

Hormônio	Aminoácidos <sup>a</sup>				Animais onde se faz(em) presente(s)
	2	3	4	8	
<b>Oxitocina</b>	Tyr	Ile	Gln	Leu	Mamíferos placentários, alguns marsupiais
<b>Mesotocina</b>	*	*	*	Ile	Marsupiais, tretrápodos não mamíferos <sup>b</sup>
<b>Isotocina</b>	*	*	Ser	Ile	Osteíctios (peixes ósseos)
<b>Aspargtocina/ Valitocina</b>	*	*	Asp/*	*/Val	Condrictios (peixes cartilagosos)
<b>Asvatocina/ Phasvatocina</b>	*	*/Phe	Asp	Val	Condrictios (peixes cartilagosos)
<b>Cephalotonina</b>	*	Phe	Arg	Ile	Moluscos ( <i>Octopus vulgaris</i> )
<b>Annetocina</b>	Phe	Val	Arg	Thr	Anelídeos
<b>Vasotocina</b>	*	*	*	Arg	Vertebrados não mamíferos, ciclóstomos
<b>Vasopressina</b>	*	Phe	*	Arg	Mamíferos
<b>Lysipressina</b>	*	Phe	*	Lys	Porco, alguns marsupiais
<b>Fenipressina</b>	Phe	Phe	*	Arg	Macropódidos (Marsupiais)
<b>Locupressina</b>	Leu	*	Thr	Arg	Insetos ( <i>Locusta migratoria</i> )
<b>Conopressina</b>	Ile/Ph	*	Arg	Arg/Lys	Moluscos

e

<sup>a</sup>Os aminoácidos 1Cys, 5Asn, 6Cys, 7Pro e 9Gly (NH<sub>2</sub>) são conservados.

<sup>b</sup>Inclui peixes pulmonados.

\*Aminoácidos iguais aos presentes na oxitocina (Acher et al., 1995).

## Receptores, interação com os hormônios e expressão diferencial.

O único receptor conhecido para a oxitocina, o OXTR, é um polipeptídeo de 389 aminoácidos, com sete domínios transmembrana, que faz parte dos receptores acoplados à proteína G de classe I denominados GPCRs (G-protein coupled receptors). No genoma humano, o gene *OXTR* está localizado na região 3p25–3p26.2 (Kimura et al., 1992) e apresenta 17 kb, tendo 4 éxons e 3 íntrons. No entanto, somente os éxons 3 e 4, os quais estão separados por um íntron de 12 kb, são traduzidos. O quarto éxon codifica o último domínio transmembrana, como ilustra a Figura 3.

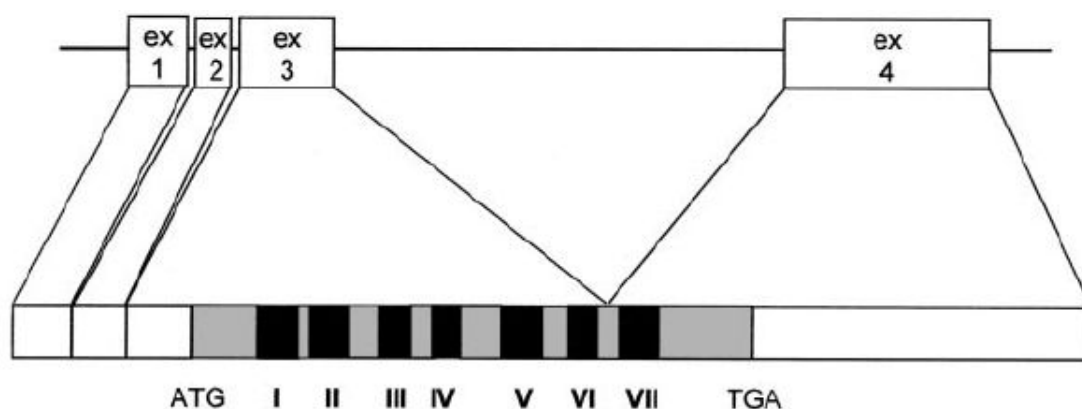
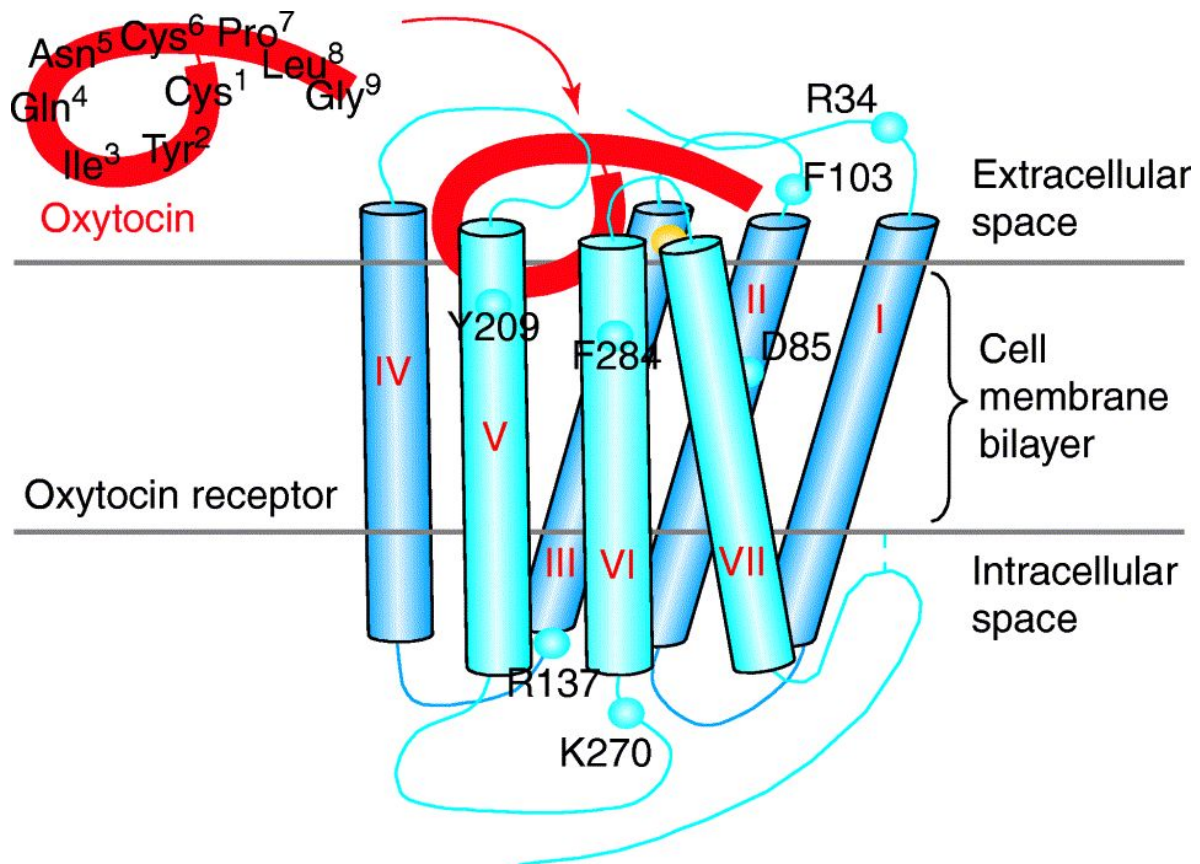


Figura 3. Esquema gráfico do gene *OXTR* e sua correspondência com a estrutura do receptor da oxitocina. As áreas escuras, numeradas por algarismos romanos, correspondem aos domínios transmembrana de *OXTR* (extraído de Gimpl & Fahrenholz, 2001).

O RNAm do receptor foi reportado como tendo dois tamanhos: 3,6 kb no seio de mães lactantes e 4,4 kb no ovário, endométrio uterino e miométrio. Isso pode ter influência sobre o incremento do número de receptores no trabalho de parto, pois um RNAm maior (cauda poli A) aumenta a estabilidade da molécula e facilita a tradução (Kimura et al., 1992).

A classe I da família de receptores GPCR, à qual pertence o receptor *OXTR*, apresenta um mecanismo comum de ativação e tradução de sinal à proteína G. Essa ativação se caracteriza por uma mudança na orientação do domínio transmembrana 3 e 6 (Figura 5), liberando os sítios de união à proteína G (Gimpl & Fahrenholz, 2001).



*TRENDS in Endocrinology & Metabolism*

Figura 4. Modelo esquemático da estrutura da OXT e de OXTR. A oxitocina é mostrada acima, à esquerda, em vermelho, com seus resíduos de aminoácidos numerados de 1 a 9. O receptor, em azul, mostra a interação do hormônio quando o complexo está ativado. Os sete domínios intermembrana de OXTR estão indicados por números romanos. O círculo amarelo denota os resíduos L114, V115 e K116, pontos de contato específicos dos antagonistas da OXT. Compilado de (Zingg & Laporte, 2003).

Vários estudos mostraram também que a parte cíclica da OXT interage com o terço superior do receptor, especificamente com os domínios transmembrana 3, 4 e 6 (Figura 5). Por outro lado, a parte carboxiterminal da OXT permanece mais em contato com os domínios 2 e 3 na superfície e com o primeiro *loop* do receptor OXTR (Zingg & Laporte, 2003).

Através de construtos quiméricos e truncados, tem se demonstrado que a região N terminal do receptor é fundamental para a união à OXT. Dentro dessa região, a arginina, na posição 34 da cadeia de aminoácidos do OXTR (Arg-34-OXTR), teria um papel



fundamental, já que é conservada nas posições correspondentes nos receptores de hormônios de diferentes *taxa*, como é o caso da mesotocina, isotocina, vasotocina, bem como nos três tipos de receptores da vasopressina (Wesley et al., 2002).

Chini e colaboradores (1996), por sua parte, demonstraram que a fenilalanina na posição 103 da cadeia de aminoácidos do OXTR (Phe-103-OXTR), localizada na região da primeira alça extracelular, é muito importante para a efetivação da ligação com OXT, especificamente com o oitavo aminoácido, a leucina (Tabela 2). Vale lembrar que é nesse sítio da cadeia de aminoácidos da oxitocina que está localizada uma das diferenças entre esse hormônio e a vasopressina; na posição 8, há uma leucina na oxitocina e uma arginina na vasopressina (Arg-8-AVP; Figuras 1 e 2).

Um ano antes, o mesmo autor (Chini et al., 1995), descreveu a possível interação entre Arg-8-AVP e a tirosina 115 do receptor AVPR1A (Tyr-115- AVPR1A). Curiosamente, Tyr-115- AVPR1A está localizado na primeira alça extracelular do receptor, sendo homóloga à posição Phe-103-OXTR, mostrando uma interação significativa ao substituir esse aminoácido (Tyr) pelo equivalente no OXTR (Phe), evidenciando, deste modo, o papel importante desse sítio na afinidade e na seletividade do receptor (Tabela 2).

Estudos adicionais mostraram que os aminoácidos Tyr 209 e Phe 284 do OXTR apresentam papel importante na interação com o hormônio, interagindo possivelmente com o segundo resíduo aromático (Tyr) e o terceiro hidrofóbico (Ile) da OXT (Figura 3). É interessante notar que a Ile na posição 3 (Ile-3-OXT) é o resíduo que difere entre a oxitocina e a vasopressina (Phe-3-AVP) na parte circular da molécula (Figura 2). Essas diferenças poderiam estar contribuindo com o reconhecimento específico da molécula com seu receptor, (Chini et al., 1996; Tabela 2). Vale lembrar ainda que a AVP pode agir como um agonista completo ou parcial do receptor OXTR humano (Chini et al., 1996). Deve-se considerar, também, que os aminoácidos Arg-137-OXTR e Asp-85-OXTR, entre outros, foram objeto de estudos através de mutações induzidas em organismos modelos e simuladas computacionalmente (Fanelli et al., 1999). Mutações Arg-137-Ala e Asp-85-Ala levaram a um receptor constitutivamente ativo e inativo, respectivamente. Com isso, podem-se inferir seus papéis na ativação do complexo, no reconhecimento do agonista, bem como na interação com a proteína G (Fanelli et al., 1999).



Tabela 2. Alguns aminoácidos importantes do OXTR que interagem direta ou indiretamente na ativação do complexo.

<b>Aminoácido</b>	<b>Posição (aa)</b>	<b>Provável função</b>	<b>Referência</b>
Arg	34	União ao hormônio	(Wesley et al., 2002)
Asp	85	Ativação, reconhecimento do agonista, interação com a proteína G	(Fanelli, et al., 1999)
Phe	103	União ao hormônio; OXT-8-Leu	(Chini, 1996)
Arg	137	Ativação, reconhecimento do agonista, interação com a proteína G	(Fanelli et al., 1999)
Tyr	209	União ao hormônio; OXT-3-Iso	(Chini, et al., 1996)
Phe	284	União ao hormônio; OXT-3-Iso	(Chini et al., 1996)
Trp	288	Ativação	(Fanelli et al., 1999)
Glu	307	Ativação	(Fanelli et al., 1999)

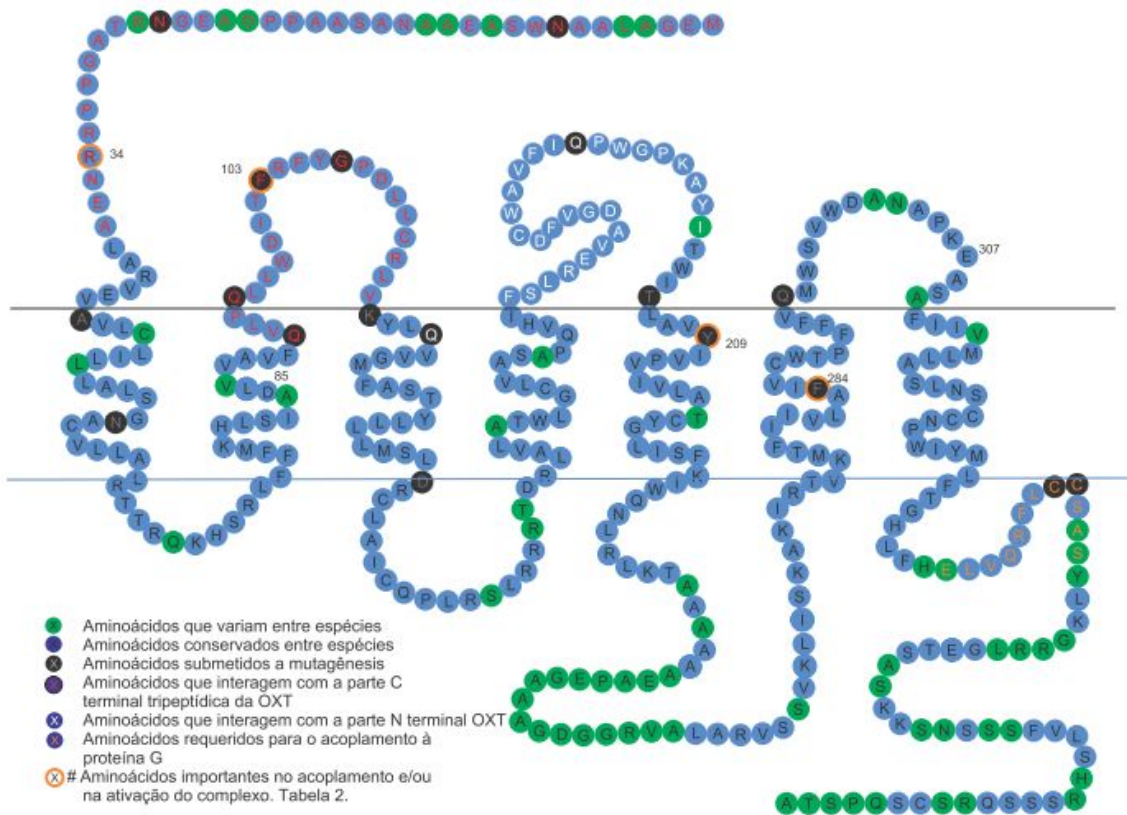


Figura 5. Modelo esquemático do OXTR indicando quais são aminoácidos conservados (azuis) entre os receptores de diferentes espécies (*Homo sapiens*, *Macaca mulatta*, *Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Ratus ratus* e *Mus musculus*; Gimpl & Fahrenholz, 2001). Os aminoácidos verdes apresentam variações entre as espécies. Em preto, aminoácidos que foram objeto de estudos através de mutações induzidas em organismos modelos e simuladas computacionalmente, ver texto. Aminoácidos com letra laranja são importantes no acoplamento e/ou ativação da proteína G. Aminoácidos delimitados por círculo laranja participam na ligação ao hormônio e/ou na ativação do complexo (Tabela 2). Tomado e modificado de (Gimpl & Fahrenholz, 2001).

Diferentemente de muitos outros membros da família de receptores acoplados à proteína G, OXTR apresenta mudanças marcantes nos níveis de expressão em células específicas. No útero, a expressão do OXTR aumenta duas vezes durante a gestação. Depois do parto, há queda dessa expressão, enquanto que, nas glândulas mamárias, essa é mantida durante o período de lactação. Essa distribuição tecido-específica permite que a interação OXT-OXTR seja mais ou menos ativa em períodos específicos (Zingg & Laporte, 2003).

Camundongos nocaute são ferramentas importantes para estudos que buscam informações sobre a funcionalidade de um determinado gene. Por exemplo, os camundongos sem nenhum RNA mensageiro que codifique a OXT, mas sem alterações na expressão de AVP, possuem um comportamento sexual e fertilidade aparentemente normais. Assim, pode-se interpretar que a AVP pode compensar a ausência de OXT nos camundongos nocaute para este gene (Bales & Perkeybile, 2012). Takayanagi (2005), por sua vez, gerou camundongos nocaute para OXTR, as fêmeas não apresentaram déficits evidentes de fertilidade ou comportamento reprodutivo. No entanto, após um parto normal, foi observado que elas apresentaram problemas na lactação. Filhotes sem o receptor emitiram menor quantidade de vocalizações ultrassônicas em resposta ao isolamento social. Na idade adulta, os machos mostraram déficit na discriminação social e elevados índices de comportamentos violentos.

Experiências como estimulação precoce de recém-nascidos, alterações da estrutura familiar, até agentes mais extremos, como estresse neonatal e manipulações farmacológicas, podem potencialmente produzir mudanças na expressão dos receptores do sistema da oxitocina.

Ruthschilling et al. (2012) avaliaram as respostas em mães camundongo que lambiam sua prole de forma frequente ou infrequente, e perceberam que as mães que lambiam infreqüentemente tinham níveis mais elevados do RNAm do OXTR no bulbo olfatório e no hipocampo, quando comparadas com aquelas que lambiam suas crias freqüentemente.

Esse e outros trabalhos vêm demonstrando que a expressão dos receptores pode ser induzida por estímulos sociais positivos, tais como calor, contato corporal, presença

parental, como também por estímulos sociais negativos, por exemplo, separação da figura de apego ou outros relacionamentos em dificuldades (Bales & Perkeybile, 2012). A Tabela 3 mostra experimentos onde a expressão desses hormônios, bem como de seus receptores, foi avaliada sob diferentes condições experimentais.

Tabela 3. Experimentos farmacológicos e sociais relacionados com OXT e seus registros em longo prazo dos níveis OXTR e AVPR em diferentes zonas do cérebro.

<b>Tipo de experiência</b>	<b>Sexo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Expressão OXTR em adulto</b>	<b>Expressão AVPR1A em adulto</b>	<b>Referência</b>
Fornecimento de OXT em recém-nascidos	Macho	<i>Microtus ochrogaster</i>	Nenhuma mudança	Elevada em PCC	(Bales et al., 2007)
Fornecimento de antagonista de OXT em recém-nascidos	Machos	<i>Microtus ochrogaster</i>	Nenhuma mudança	Inferior em MPOA, BNST e LS	(Bales et al., 2007)
Fornecimento de OXT em recém-nascidos	Fêmeas	<i>Microtus ochrogaster</i>	Nenhuma mudança	Inferior em MPOA, BNST, LS, PCC e MdThal	(Bales et al., 2007)
Fornecimento de antagonista de OXT em recém-nascidos	Fêmeas	<i>Microtus ochrogaster</i>	Nenhuma mudança	Inferior em BNST e PCC	(Bales et al., 2007)
Exposição pré-natal a estrógenos	Ambos	<i>Microtus bavaricus</i>	Diminui em CC	Não avaliado	(Engell et al., 2006)
Crescimento do recém-nascido: cuidado biparental X só da mãe	Ambos	<i>Microtus ochrogaster</i>	Marginalmente elevado em BNST em biparental	Nenhuma mudança	(Ahern & Young, 2009)
Crescimento do recém-nascido: comunitário X só mãe	Ambos	<i>Mus musculus</i>	Elevado em LS dorsal e ventral, BNST	Diminui em LS dorsal em cresc. comunitário	(Curley et al., 2009)
Mãe que lambe com frequência	Fêmeas	<i>Rattus norvegicus</i>	Elevado em CeA e BNST	Nenhuma mudança	(Champagne, et al., 2001)
Mãe que lambe com frequência	Machos	<i>Rattus norvegicus</i>	Nenhuma mudança	Elevado em CeA	(Champagne & Meaney, 2006)
Separação materna	Macho	<i>Rattus norvegicus</i>	Inferior em InsCtx agranular, LS e CP	Inferior em Arc	(Lukas, et al., 2010)
Sem estimulação	Fêmeas	<i>Microtus ochrogaster</i>	Elevado Nacc, LS e BNST	Nenhuma mudança	(Bales, et al., 2011)
Sem estimulação	Machos	<i>Microtus ochrogaster</i>	Elevado em BNST	Nenhuma mudança	(Bales et al., 2011)
Mãe que lambe com pouca frequência	Ambos	<i>Rattus norvegicus</i>	Elevado em OB e HP	Não avaliado	(Ruthschilling et al., 2012)
Mãe que lambe com frequência	Ambos	<i>Rattus norvegicus</i>	Diminui em OB e HP	Não avaliado	(Ruthschilling et al., 2012)
Nocaute para OT	Ambos	<i>Mus musculus</i>	Nenhuma mudança	Nenhuma mudança	(Nishimori et al., 1996)

Arc: Núcleo arqueado; CeA: Amígdala central; BNST: Estria terminalis; CC: Cortex cingulate; CP: Putâmen; HP: Hipocampo; InsCtx agranular: Córtex insular agranular; LS: Septum lateral; MPOA: Área pré-óptica medial; MdThal: Tálamo médio dorsal; OB: Bulbo Olfatório; PCC: Cingulate posterior. Compilado e adaptado de Bales & Perkeybile (2012).

## Primatas

Os primatas são reconhecidos por um conjunto de particularidades, entre elas rosto curto, órbitas oculares frontais associadas à visão estereoscópica, capacidade craniana relativamente grande e polegares oponíveis. Também apresentam características cerebrais como perda na área olfativa e maior espaço do cérebro – especificamente do córtex – correlacionado com o incremento da dependência da visão e mudanças nos comportamentos sociais (Myers, 2000).

O registro fóssil mais antigo dos primatas corresponde ao Eoceno (54-55 milhões de anos). Tavaré (2002) sugere, a partir de dados moleculares, a presença de um ancestral comum para esse grupo, cuja existência poderia ter ocorrido há 81,5 milhões de anos.

Dentro dos primatas, dois grandes grupos são encontrados: Strepsirrhini e Haplorrhini; os primeiros apresentam nariz longo e desprotegido pela ausência de uma estrutura cartilaginosa, os dentes incisivos inferiores em forma de pente e não dispõem de uma placa óssea que separe a órbita da fossa temporal. Esse clado encontra-se dividido em Lemuriformes e Lorisiformes. A maioria das espécies são arbóreas, mas, ao mesmo tempo, alguns possuem uma especiação extrema a hábitos particulares de vida (Goodman et al., 1998).

Os *Haplorrhini*, por sua vez, apresentam uma placa que divide a órbita da fossa temporal. Dois grandes grupos aparecem no clado: *Platyrrhini* (primatas do novo mundo) e *Catarrhini* (primatas do velho mundo), e a diferença externa mais evidente entre estes encontra-se na estrutura do nariz; nos primeiros ele é achatado, com narinas dirigidas à frente, enquanto nos últimos são direcionadas para baixo.

*Platyrrhini* é considerado um grupo monofilético com 120 espécies reconhecidas, com pelo menos 16 gêneros. As espécies do grupo são classificadas em três famílias: Cebidae, Athelidae e Pitheciidae. Embora Goodman (1998) o classifique numa quarta família, inclui-se o macaco da noite (gênero *Aotus nancymae*) na família Cebidae, na qual também são encontrados, entre outros, o macaco prego (*Cebus apella*), o macaco do cheiro (*Saimiri sciureus*) e o sagui (*Callithrix jacchus*). A família Atelidae inclui o macaco aranha (*Ateles*), o

macaco barrigudo (*Lagothrix*), o bugio (*Allouata*) e o miqui (*Brachyteles*). A família Pitheciidae é composta pelo sakí (*Pithecia*), o uacari (*Cacajao*), o cuxiú (*Chiropotes*) e o titi (*Callicebus*) (de Oliveira et al., 2012).

Porém, a maioria dos estudos concordam quanto à classificação dos *Platyrrhini* em 11 gêneros, em 3 clados monofiléticos: a) macacos grandes com rabo preênsil, da família Atelidae, com os gêneros *Alouatta*, *Ateles*, *Lagothrix* e *Brachyteles*; b) consumidores de sementes, da família Pitheciidae, com os gêneros *Pithecia*, *Chiropotes* e *Cacajao* e c) pequenos macacos com garras, da subfamília Calitrichinae (Família Cebidae, gêneros *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callithrix* e *Cebuella*) (de Oliveira et al., 2012; Goodman et al., 1998).

A maioria das espécies de primatas vivem nos trópicos, embora alguns vivam em regiões de maior latitude e em climas extremos, como é o caso dos humanos. Exceto por alguns terrestres, os primatas são arbóreos. A ampla diversidade de tamanhos, dietas, sistemas sociais, sistemas de acasalamento, número de filhos, entre outros fatores que os caracterizam é resumidamente apresentada em *Table S2* do manuscrito no capítulo 2.

### **O sistema *OXT* e *OXTR* em primatas**

Até o ano 2011, pensava-se que a sequência do gene *OXT* era conservado entre todos mamíferos placentários. Porém, naquele ano, Lee e colaboradores reportaram uma modificação na sequência do gene *OXT* em macacos do novo mundo (Lee et al., 2011). A mutação C → T, que leva a uma substituição de uma leucina por uma prolina na posição 8 da cadeia de aminoácidos, foi detectada em *Saimiri sciureus* (macaco de cheiro), *Cebus apella* (macaco prego), *Aotus nancymae* (macaco da noite), *Callithrix jacchus* (sagui), e em *Tupaia belangeri* (musaranho).

Já o *Callicebus cupreus*, pertencente à família Pitheciidae, não apresentava a mutação. Esse trabalho corrobora a ideia de que, embora conservado ao longo da evolução, um gene pode mudar em alguns ramos de uma dada filogenia, como atesta um estudo de nosso grupo de pesquisa com o gene *PAX9* (Pereira et al., 2006).

Em outro estudo de nosso grupo de pesquisa, avaliou-se a diversidade de *OXTR* (Vieira, et al., 2012) em nove espécies de macacos do novo mundo, junto com sequências de outros primatas disponíveis em bancos de dados públicos. Nesse trabalho, foram detectadas 30 variações não-sinônimas em 22 sítios diferentes. O domínio intracelular 4 mostrou ser uma região pouco conservada.

Vale ressaltar que nenhum estudo avaliou até o momento se as mudanças encontradas por Lee e seus colegas na sequência de *OXT*, estariam presentes em outras espécies de macacos do novo mundo, nem tampouco se estas mudanças estariam relacionadas com alguma alteração específica no *OXTR* encontradas por nosso grupo de pesquisa (Vieira et al., 2012). A conexão do sistema *OXT/OXTR* com outros correlacionados, tais como *AVP/AVPR1/AVPR2/AVPR3*, também nunca foi avaliada.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Contribuir para o delineamento do cenário evolutivo em nível molecular do sistema da *OXT-OXTR*.

### **Objetivos específicos**

- a) Avaliar a variabilidade na região codificadora do gene da oxitocina (*OXT*) nos primatas;
- b) Estimar índices que inferem padrões evolutivos para os genes *OXT* e *OXTR* em primatas;
- c) Comparar as variantes do gene *OXTR* com aquelas encontradas no gene *OXT* e avaliar se as mesmas estariam co-evoluindo;
- d) Fazer inferências sobre a variabilidade encontrada no sistema *OXT-OXTR* e se esta poderia estar relacionada com algum dos traços reprodutivos e comportamentais espécie ou grupo-específicos presentes nos primatas estudados.



### 3. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho são apresentados sob forma de um manuscrito em preparação. Ali também poderão ser encontrados detalhes sobre as amostras e métodos empregados. Na introdução do manuscrito haverá uma inevitável repetição de temas já apresentados na introdução da presente Dissertação.

### 5. DISCUSSÃO

O sistema OXT-OXTR fornece uma oportunidade promissora para analisar as interações receptor-ligando, bem como para avaliar a coevolução de genes/proteínas. Quando essas questões podem ser investigadas em primatas, novas e instigantes questões são apresentadas, dada a complexidade comportamental e cognitiva desses animais.

Tendo em vista que o manuscrito já discute os resultados, somente observações mais gerais serão aqui consideradas, embora seja inevitável alguma redundância do que já foi discutido.

As novas formas de OXT apresentadas neste estudo sugerem que a variabilidade do sistema pode se dar em nível da sequência de aminoácidos, diferente da variabilidade mais conhecida e reportada, que se dá através das modificações na distribuição do receptor no cérebro e outros órgãos, ou seja, apenas em nível de regulação (Insel & Young, 2000; Wang, et al., 1996).

As modificações descritas em OXT mostram sinais de seleção positiva. Além disso, foram detectados sinais de coevolução com mudanças específicas no receptor OXTR que parecem ser concomitantes com aquelas presentes no nonapeptídeo. Vale lembrar que estudos anteriores já reportaram achados de coevolução intermolecular (nonapeptídeo-receptor), no caso entre isotocina e seu receptor, e mesotocina e seu receptor (Koehbach et al. 2013).

Ao mesmo tempo, ao se compararem as distâncias genéticas descritas dentro do neuropeptídeo com as descritas dentro do receptor (*Table S7* do manuscrito), pode-se

identificar que os grupos de espécies que apresentam as maiores distâncias genéticas para OXT também tendem a apresentar as maiores distâncias quando se considera o receptor OXTR. Esses eventos, segundo Park et al., (2002), descrevem um fenômeno comum no nível molecular, já que as forças evolutivas estão dirigidas para manter a afinidade ligante-receptor, garantindo assim eficiência na ativação, no processamento e na degradação das moléculas envolvidas. Salienta-se aqui que é a primeira vez que o fenômeno é descrito em macacos do Novo Mundo considerando o sistema OXT-OXTR.

Diferentes estudos através de um amplo espectro de espécies demonstram que AVP é mais abundante e possui maiores efeitos em machos do que em fêmeas, especialmente na região hipotalâmica. A mesma relação pode ser descrita nas fêmeas em comparação com os machos no que diz respeito à OXT (Grober & Sunobe, 1996; Insel & Young, 2000).

A relação de AVPR1a com comportamento tem sido estudada em diferentes organismos como macacos do Novo Mundo (Babb et al., 2010), chimpanzés (Hopkins et al., 2012) e humanos (Hammock & Young, 2006). Especial atenção têm recebido os arganazes (McCall & Singer, 2012; Young & Hammock, 2007). Neles foi descrita a presença de regiões repetitivas, determinantes nos padrões de expressão do receptor no cérebro, que, por sua vez, influenciam nas diferenças de estrutura social entre as espécies. Todos esses trabalhos descrevem variações intraespecíficas no receptor da vasopressina, sugerindo possíveis ligações deste com os comportamentos das espécies estudadas. Aqui apresentamos evidência estatística significativa de uma correlação entre caracteres ecológicos com mutações em OXT. Sugerimos que as modificações em OXT poderiam ter um efeito, tanto na interação com seu receptor nativo, OXTR, como com receptores da vasopressina (AVPR1a, AVPR1b e AVPR2). Assim, a associação significativa de OXTs e partos de gêmeos, especialmente nos Cebidae, pode estar relacionada com comportamentos colaborativos dos machos (parentes e não parentes) no cuidado com os infantes.

Por outro lado, devem-se levar em conta outras variáveis no sistema que podem estar relacionadas com comportamento — incluindo aqueles ligados ao cuidados com a prole e infantes —, tais como as diferenças dos efeitos do hormônio em machos e fêmeas, fatores epigenéticos, dentre outros (McCall & Singer, 2012). No entanto, no caso dos *Saguinus* não se acham mudanças no nível de expressão da oxitocina, quando se comparam machos e fêmeas

(Snowdon et al., 2010). Também em *Callithrix jacchus* não se acha nenhuma diferença no cérebro na distribuição de neurônios imunorreativos à OXT, mas sim observa-se um padrão dismórfico sexual na distribuição de células reativas à vasopressina, sendo os machos os que mais as possuem nos núcleos supraóptico e paraventricular no hipotálamo (Wang et al., 1997).

Em uma observação geral dos eventos evolutivos nas espécies estudadas, pode-se denotar uma tendência do sistema OXT-OXTR em aumentar as afinidades com a AVP e seus receptores (Figura 6); assim, a modificação encontrada no *Saimiri sciureus* poderia aumentar a afinidade de OXTR por AVP, reportada como 100 vezes menor que a afinidade de OXTR por OXT (Chini et al., 1995).

De outra parte, as modificações no gênero *Saguinus* poderiam influenciar na afinidade de OXT por AVPRs, que pode ser até 1.000 vezes menor do que a afinidade de AVP por seus receptores (Figura 6).

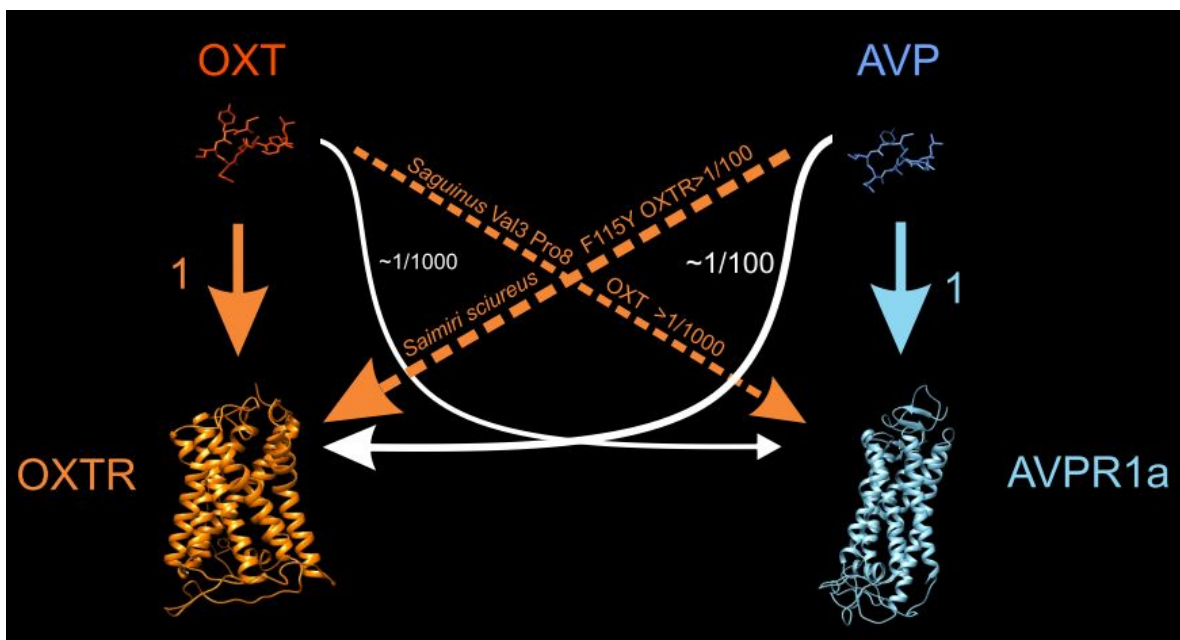


Figura 6. Sistema de ativação cruzada de OXT e AVP com seus receptores (no caso AVPR1a). Flechas diagonais pontilhadas mostram um cenário possível para explicar nossos resultados que aumentariam afinidades cruzadas.

Finalmente, esses resultados evidenciam somente modificações na cadeia de aminoácidos de OXT e OXTR. Não se pode pretender que o sistema OXT-OXTR seja uma unidade evolutiva isolada, de modo que outras moléculas que interagem com eles devem ser consideradas, em especial AVP e seus receptores.

## 6. CONCLUSÃO

No presente estudo, detectamos uma quebra na linha de conservação mantida na oxitocina por milhões de anos, reportando 3 novas formas de OXT em macacos do Novo Mundo. Registrou-se um aminoácido (OXT-8Pro) com seleção positiva na família Cebidae; esse mesmo resíduo teve uma significância estatística na sua correlação com cuidado parental. Reforçando essa associação, descrevemos uma nova forma de OXT (OXT-3Val-8Pro) nos *Saguinus* (Cebidae), um gênero com um pronunciado cuidado parental dos machos, aparentados ou não. No OXTR foram detectados aminoácidos sob seleção positiva, assim como processos de coevolução intramolecular e intermolecular com seu ligante OXT. Formulamos aqui possíveis cenários na interação dessas novas formas de OXT com seus receptores e propomos perspectivas sobre o estudo do sistema OXT-OXTR e sua relação com outros sistemas.

## Referências

- Acher, R., Chauvet, J., & Chauvet, M. T. (1995). Man and the chimaera. Selective versus neutral oxytocin evolution. *Adv Exp Med Biol*, 395, 615-627.
- Ahern, T. H., & Young, L. J. (2009). The impact of early life family structure on adult social attachment, alloparental behavior, and the neuropeptide systems regulating affiliative behaviors in the monogamous prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Front Behav Neurosci*, 3, 17.
- Babb, P. L., Fernandez-Duque, E., & Schurr, T. G. (2010). AVPR1A sequence variation in monogamous owl monkeys (*Aotus azarai*) and its implications for the evolution of platyrrhine social behavior. *J Mol Evol*, 71(4), 279-297.
- Bales, K. L., Boone, E., Epperson, P., Hoffman, G., & Carter, C. S. (2011). Are behavioral effects of early experience mediated by oxytocin? *Front Psychiatry*, 2, 24. doi: 10.3389/fpsy.2011.00024
- Bales, K. L., & Perkeybile, A. M. (2012). Developmental experiences and the oxytocin receptor system. *Horm Behav*, 61(3), 313-319.
- Bales, K. L., Plotsky, P. M., Young, L. J., Lim, M. M., Grotte, N., Ferrer, E., & Carter, C. S. (2007). Neonatal oxytocin manipulations have long-lasting, sexually dimorphic effects on vasopressin receptors. *Neuroscience*, 144(1), 38-45.
- Bielsky, I. F., & Young, L. J. (2004). Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides*, 25(9), 1565-1574.
- Brownstein, M. J., Russell, J. T., & Gainer, H. (1980). Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science*, 207(4429), 373-378.
- Champagne, F., Diorio, J., Sharma, S., & Meaney, M. J. (2001). Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(22), 12736-12741.
- Champagne, F. A., & Meaney, M. J. (2006). Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. *Biol Psychiatry*, 59(12), 1227-1235.
- Chini, B., Mouillac, B., Ala, Y., Balestre, M. N., Trumpp-Kallmeyer, S., Hoflack, J., . . . Jard, S. (1995). Tyr115 is the key residue for determining agonist selectivity in the V1a vasopressin receptor. *EMBO J*, 14(10), 2176-2182.
- Chini, B., Mouillac, B., Balestre, M. N., Trumpp-Kallmeyer, S., Hoflack, J., Hibert, M., . . . Barberis, C. (1996). Two aromatic residues regulate the response of the human

- oxytocin receptor to the partial agonist arginine vasopressin. *FEBS Lett*, 397(2-3), 201-206. doi: S0014-5793(96)01135-0 [pii]
- Curley, J. P., Jordan, E. R., Swaney, W. T., Izraelit, A., Kammel, S., & Champagne, F. A. (2009). The meaning of weaning: influence of the weaning period on behavioral development in mice. *Dev Neurosci*, 31(4), 318-331.
- Dale, H. H. (1906). On some physiological actions of ergot. *J Physiol*, 34(3), 163-206.
- de Oliveira, E. H., Neusser, M., & Müller, S. (2012). Chromosome evolution in new world monkeys (Platyrrhini). *Cytogenet Genome Res*, 137(2-4), 259-272.
- Donaldson, Z. R., & Young, L. J. (2008). Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science*, 322(5903), 900-904.
- Du Vigneaud, V. (1954). Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin. *Harvey Lect*, 50, 1-26.
- Du Vigneaud, V., Ressler, C., & Trippett, S. (1953). The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem*, 205(2), 949-957.
- Ebstein, R. P., Knafo, A., Mankuta, D., Chew, S. H., & Lai, P. S. (2012). The contributions of oxytocin and vasopressin pathway genes to human behavior. *Hormones and Behavior*, 61(3), 359-379.
- Engell, M. D., Godwin, J., Young, L. J., & Vandenbergh, J. G. (2006). Perinatal exposure to endocrine disrupting compounds alters behavior and brain in the female pine vole. *Neurotoxicol Teratol*, 28(1), 103-110.
- Fanelli, F., Barbier, P., Zanchetta, D., de Benedetti, P. G., & Chini, B. (1999). Activation mechanism of human oxytocin receptor: a combined study of experimental and computer-simulated mutagenesis. *Mol Pharmacol*, 56(1), 214-225.
- Gainer, H., Fields, R. L., & House, S. B. (2001). Vasopressin gene expression: experimental models and strategies. *Exp Neurol*, 171(2), 190-199.
- Gimpl, G., & Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*, 81(2), 629-683.
- Goodman, M., Porter, C. A., Czelusniak, J., Page, S. L., Schneider, H., Shoshani, J., . . . Groves, C. P. (1998). Toward a phylogenetic classification of Primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. *Mol Phylogenet Evol*, 9(3), 585-598.
- Grober, M. S., & Sunobe, T. (1996). Serial adult sex change involves rapid and reversible changes in forebrain neurochemistry. *Neuroreport*, 7(18), 2945-2949.
- Hammock, E. A., & Young, L. J. (2006). Oxytocin, vasopressin and pair bonding: implications for autism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1476), 2187-2198.
- Hopkins, W. D., Donaldson, Z. R., & Young, L. J. (2012). A polymorphic indel containing the RS3 microsatellite in the 5' flanking region of the vasopressin V1a receptor gene is associated with chimpanzee (*Pan troglodytes*) personality. *Genes Brain Behav*, 11(5), 552-558.
- Hoyle, C. H. (1998). Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Regul Pept*, 73(1), 1-33.
- Insel, T. R., & Young, L. J. (2000). Neuropeptides and the evolution of social behavior. *Curr Opin Neurobiol*, 10(6), 784-789.
- Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M. J., & Okayama, H. (1992). Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature*, 356(6369), 526-529.
- Kleiman, D. G. (1977). Monogamy in mammals. *Q Rev Biol*, 52(1), 39-69.

- Koehbach, J., Stockner, T., Bergmayr, C., Muttenthaler, M., & Gruber, C. W. (2013). Insights into the molecular evolution of oxytocin receptor ligand binding. *Biochem Soc Trans*, *41(1)*, 197-204.
- Lee, A. G., Cool, D. R., Grunwald, W. C., Neal, D. E., Buckmaster, C. L., Cheng, M. Y., . . . Parker, K. J. (2011). A novel form of oxytocin in New World monkeys. *Biol Lett*, *7(4)*, 584-587.
- Lee, H. J., Macbeth, A. H., Pagani, J. H., & Young, W. S. (2009). Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol*, *88(2)*, 127-151. doi: S0301-0082(09)00046-X
- Lucion AB, Bortolini MC. Mother-Pup Interactions: Rodents and Humans. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014 Feb 26;5:17. eCollection 2014. Review.
- Lukas, M., Bredewold, R., Neumann, I. D., & Veenema, A. H. (2010). Maternal separation interferes with developmental changes in brain vasopressin and oxytocin receptor binding in male rats. *Neuropharmacology*, *58(1)*, 78-87. doi: S0028-3908(09)00174-9
- Magon, N., & Kalra, S. (2011). The orgasmic history of oxytocin: Love, lust, and labor. *Indian J Endocrinol Metab*, *15 Suppl 3*, S156-161.
- McCall, C., & Singer, T. (2012). The animal and human neuroendocrinology of social cognition, motivation and behavior. *Nat Neurosci*, *15(5)*, 681-688.
- Myers, P. (2000). "Primates" (On-line), Animal Diversity Web. Retrieved Accessed November 09, 2012
- Neumann, I. D. (2008). Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol*, *20(6)*, 858-865.
- Nishimori, K., Young, L. J., Guo, Q., Wang, Z., Insel, T. R., & Matzuk, M. M. (1996). Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93(21)*, 11699-11704.
- Ott, I., & Scott, J. C. (1910). The action of infundibulum upon mammary secretion. *Proc. Soc. Exp. Biol*, *8*, 48-49.
- Park, Y., Kim, Y. J., & Adams, M. E. (2002). Identification of G protein-coupled receptors for Drosophila PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99(17)*, 11423-11428.
- Pereira, T. V., Salzano, F. M., Mostowska, A., Trzeciak, W. H., Ruiz-Linares, A., Chies, J. A., . . . Bortolini, M. C. (2006). Natural selection and molecular evolution in primate PAX9 gene, a major determinant of tooth development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103(15)*, 5676-5681.
- Ross, H. E., Cole, C. D., Smith, Y., Neumann, I. D., Landgraf, R., Murphy, A. Z., & Young, L. J. (2009). Characterization of the oxytocin system regulating affiliative behavior in female prairie voles. *Neuroscience*, *162(4)*, 892-903.
- Ross, H. E., & Young, L. J. (2009). Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Front Neuroendocrinol*, *30(4)*, 534-547.
- Ruthschilling, C. A., Albiero, G., Lazzari, V. M., Becker, R. O., de Moura, A. C., Lucion, A. B., . . . Giovenardi, M. (2012). Analysis of transcriptional levels of the oxytocin receptor in different areas of the central nervous system and behaviors in high and low licking rats. *Behav Brain Res*, *228(1)*, 176-184.
- Snowdon, C. T., Pieper, B. A., Boe, C. Y., Cronin, K. A., Kurian, A. V., & Ziegler, T. E. (2010). Variation in oxytocin is related to variation in affiliative behavior in monogamous, pairbonded tamarins. *Horm Behav*, *58(4)*, 614-618.



- Soloff, M. S., Alexandrova, M., & Fernstrom, M. J. (1979). Oxytocin receptors: triggers for parturition and lactation? *Science*, 204(4399), 1313-1315.
- Takayanagi, Y., Yoshida, M., Bielsky, I. F., Ross, H. E., Kawamata, M., Onaka, T., . . . Nishimori, K. (2005). Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(44), 16096-16101.
- Tavaré, S., Marshall, C. R., Will, O., Soligo, C., & Martin, R. D. (2002). Using the fossil record to estimate the age of the last common ancestor of extant primates. *Nature*, 416(6882), 726-729.
- 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), 1389-1400.
- Vieira, C. M. A. G., Paixão-Côrtes, V., Bortolini, M. C., & Salzano, F. M. (2012). A evolução molecular da rede gênica da oxitocina em primatas e outros vertebrados. *Disertação de tESIS*. Programa Pós-Graduação em Genética e Biologia. Universidade do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.
- Wang, Z., Moody, K., Newman, J. D., & Insel, T. R. (1997). Vasopressin and oxytocin immunoreactive neurons and fibers in the forebrain of male and female common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Synapse*, 27(1), 14-25.
- Wang, Z., & Young, L. J. (1997). Ontogeny of oxytocin and vasopressin receptor binding in the lateral septum in prairie and montane voles. *Brain Res Dev Brain Res*, 104(1-2), 191-195.
- Wang, Z., Zhou, L., Hulihan, T. J., & Insel, T. R. (1996). Immunoreactivity of central vasopressin and oxytocin pathways in microtine rodents: a quantitative comparative study. *J Comp Neurol*, 366(4), 726-737.
- Wesley, V. J., Hawtin, S. R., Howard, H. C., & 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), 5086-5092.
- Winslow, J. T., Shapiro, L., Carter, C. S., & Insel, T. R. (1993). Oxytocin and complex social behavior: species comparisons. *Psychopharmacol Bull*, 29(3), 409-414.
- Young, L. J., & Hammock, E. A. (2007). On switches and knobs, microsatellites and monogamy. *Trends Genet*, 23(5), 209-212.
- Young, L. J., Huot, B., Nilsen, R., Wang, Z., & Insel, T. R. (1996). Species differences in central oxytocin receptor gene expression: comparative analysis of promoter sequences. *J Neuroendocrinol*, 8(10), 777-783.
- Young, L. J., Wang, Z., & Insel, T. R. (1998). Neuroendocrine bases of monogamy. *Trends Neurosci*, 21(2), 71-75.
- Zingg, H. H., & Laporte, S. A. (2003). The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab*, 14(5), 222-227.