

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EVOLUÇÃO MOLECULAR DOS RECEPTORES DA OXITOCINA E DA
VASOPRESSINA EM ANIMAIS DOMESTICADOS E DE INTERESSE COMERCIAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Pamela Laiz Paré da Rosa

Uruguaiana, RS, Brasil

2013

PAMELA LAIZ PARÉ DA ROSA

**EVOLUÇÃO MOLECULAR DOS RECEPTORES DA OXITOCINA E DA
VASOPRESSINA EM ANIMAIS DOMESTICADOS E DE INTERESSE COMERCIAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ernani Henkes

Co-orientador: Profa. Dra. Maria Cátira Bortolini

**Uruguaiiana
2013**

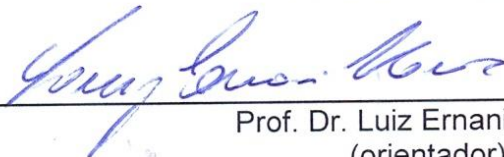
PAMELA LAIZ PARÉ DA ROSA

**EVOLUÇÃO MOLECULAR DOS RECEPTORES DA OXITOCINA E DA VASOPRESSINA
EM ANIMAIS DOMESTICADOS E DE INTERESSE COMERCIAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Dissertação defendida e aprovada em: 05 de agosto de 2013.

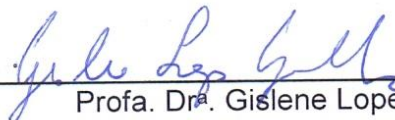
Banca examinadora:



Prof. Dr. Luiz Ernani Henkes
(orientador)
(UNIPAMPA)



Prof. Dr. FERNANDO SILVEIRA MESQUITA
(UNIPAMPA)



Profa. Dr. Gislene Lopes Gonçalves
(UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Luiz Ernani Henkes que me selecionou como orientanda e por estar sempre a postos para as questões pertinentes a pesquisa, oferecendo todo o apoio necessário;

A profa. Maria Cátira Bortolini por ter me acolhido como orientanda e ter desempenhado um papel determinante em minha formação; Juntamente com Vanessa Rodrigues Paixão Côrtes me instruindo e auxiliando em todo o crescimento possível;

Ao prof. Francisco Mauro Salzano pelo gosto de participar de suas aulas e por toda a disponibilidade demonstrada aos alunos sempre que o solicitam;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Evolução Humana e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Agatha Xavier, Caio Cesar de Cerqueira, Carla Krause, Carlos Eduardo Amorim, Eli Vieira, Lucas Viscardi, Pedro Vargas Pinilha, Rafael Bisso Machado, Tábita Hunemeier e Virginia Ramalho. Pessoas, que partilham desde boas conversas, *papers*, a finais de semana para trabalhar;

Aos integrantes da primeira turma do Programa de Pós – Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa: Ângelo Giotto, Antônio Guimarães, Cibele Lhamas, Fernanda Porcela, Maurício Fagundes e Tatiane Goulart de Lima pelo companheirismo demonstrado como colegas.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal que contribuíram com meu crescimento intelectual; Em especial ao prof. Mário Celso Sperotto Brum por seu empenho nas explicações durante as aulas;

Aos Técnicos Agrícola Mauro Faria Souza e Daniel Prudente de Moraes que auxiliaram em todo o trabalho em campo;

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

A Embrapa Pecuária Sul pela doação de material biológico para a pesquisa;

A CAPES pelo suporte financeiro e incentivo a novos pesquisadores;

A aqueles que sempre me deram todo o suporte e apoio necessários, meus pais Vilmar da Rosa e Janete Moreira Paré;

A meus irmãos Luci Paola Paré da Rosa e Bernardo Paré da Rosa que me renovam e me completam;

Ao Carlos Eduardo Soares Rocha, que partilha de todos os momentos da minha vida, demonstrando carinho e compreensão;

Enfim, a todos aqueles que participaram direta ou indiretamente do desenvolvimento dessa pesquisa e de meu próprio, desde palavras de incentivo a assuntos enriquecedores.

Worst of all, love is just chemicals stimulating neural activity on well-defined circuits, and not meant to elevate us to some kind of higher spiritual plane, but to lure us unthinkingly into reproduction, maximizing our evolutionary "*fitness*".

Larry Young

RESUMO

A oxitocina e a vasopressina são nonapeptídeos intimamente relacionados que surgiram a partir de duplicações em *tandem* ocorridas no ancestral comum dos vertebrados mandibulados e que desempenham importantes funções fisiológicas e comportamentais em muitos organismos. Suas atividades são mediadas através das interações com o receptor da oxitocina (OXTR) e com os receptores da vasopressina (AVPR1a, AVPR1b e AVPR2). O objetivo do presente estudo é caracterizar a evolução molecular dessa família de receptores num conjunto grande de organismos. Assim como, avaliar a variabilidade genética de *OXTR* na espécie *Ovis aries* que ainda não possui seu genoma disponível nos bancos de dados. Devido à conservação dos nonapeptídeos, ao menos considerando os mamíferos, acredita-se que a evolução do sistema esteja ocorrendo através de seus receptores, que, portanto são o centro deste estudo. Através de sequências nucleotídicas e proteicas para todos os receptores da oxitocina e da vasopressina obtidas nos bancos de dados HMMER e Uniprot foram realizadas análises filogenéticas por máxima verossimilhança no programa Mega 5.0. Os dados disponíveis no site Genomicus foram utilizados para a realização da sintenia e vizinhança. O padrão de evolução molecular foi estabelecido utilizando um conjunto de 23 espécies de mamíferos usando o pacote Paml 4.6. A fim de contribuir com o conhecimento da espécie *Ovis aries* analisou-se o gene *OXTR*, na raça Crioula Lanada (N=35) que apresenta um padrão distinto de seleção em comparação com as raças Ile de France (N=6) e Ideal (N=5) que são selecionadas para corte e lã. Nossos resultados indicam que *OXTR*, *AVPR1a*, *AVPR1b*, *AVPR2* e o bloco sintênico desses receptores emergiram com o ancestral comum dos vertebrados no primeiro evento de duplicação do genoma. Primeiramente foram originados, o gene ancestral de *AVPR1a* e *AVPR1b* e o gene ancestral de *OXTR* e *AVPR2*. Os quatro receptores observados hoje se originaram após o segundo evento de duplicação do genoma ter ocorrido no ancestral comum dos vertebrados. Em termos de evolução molecular foram encontrados padrões distintos entre animais domesticados e selvagens nos receptores *AVPR1a* e *AVPR1b*. Isso indica que os animais domesticados estão sob seleção positiva para esses genes, clara marca molecular que pode estar ligada ao processo de seleção para docilidade, num contexto de evolução convergente. Para a espécie *Ovis aries* foi amplificado um total de 1644 pares de base (pb) obtidos do DNA das três raças

ovinas estudadas. Embora tenha sido registrada variação entre as raças, não há uma quebra no padrão de evolução neutro com sinal de seleção purificadora. O que reforça a ideia que o sistema todo esteja evoluindo via os dois receptores de AVP, cuja origem filogenética é comum, *AVPR1a* e *AVPR1b*.

Palavras-chave: Evolução molecular. OXTR. Ovelhas. Mamíferos. Domesticção.

ABSTRACT

Oxytocin and vasopressin are closely related nonapeptides that arose from tandem duplication occurred in the common ancestor of jawed vertebrates and play important physiological and behavioral functions in many organisms. Its activities are mediated through interactions with the oxytocin receptor (OXTR) and vasopressin receptors (AVPR1a, AVPR1b and AVPR2). The aim of this study is to characterize the molecular evolution of this family of receptors in a large set of organisms. As well as, assess the genetic variability of the *OXTR* from *Ovis aries* species that does not have its genome available in databases. Due to the conservation of nonapeptides, at least considering the mammals, it is believed that the evolution of the system is going through their receptors, which therefore are the focus of this study. Through nucleotide and protein sequences for all oxytocin and vasopressin receptors obtained in databases UniProt and HMMER, phylogenetic analyzes were performed by maximum likelihood in the Mega 5.0 program. Available data on the website Genomicus were used to carry out the synteny and neighborhood. The pattern of molecular evolution was established using a set of 23 mammalian species using the Paml 4.6 package. To contribute to the knowledge of the *Ovis aries* species it was analyzed the *OXTR* gene, in the Creole Lanada breed (N = 35) that presents a distinct pattern of selection compared to the breeds Ile de France (N = 6) and Ideal (N = 5) that are selected for cutting and wool. Our results indicate that *OXTR*, *AVPR1A*, *AVPR1b*, *AVPR2* and the sintenic block of these receptors emerged with the common ancestor of vertebrates in the first genome duplication event. First, was originated the ancestral gene of *AVPR1A* and *AVPR1b* and the ancestral gene of *OXTR* and *AVPR2*. The four receptors observed today originated after the second genome duplication event occurred in the common ancestor of vertebrates. In terms of molecular evolution were found distinct patterns between domesticated and wild animals in the *AVPR1A* and *AVPR1b* receptors. This indicates that domesticated animals are under positive selection for these genes, clearly molecular mark which may be linked to the process of selection for docility, in the context of convergent evolution. For the *Ovis aries* species was amplified a total of 1644 base pairs (bp) of DNA obtained from three sheep breeds studied. Although has been found variation between the breeds, there is no break in the pattern of neutrality with signal of purifying selection. This strengthens the idea that the whole system is evolving

through the two AVP receptors, whose phylogenetic origin is common, *AVPR1A* and *AVPR1b*.

Keywords: Molecular evolution. OXTR. Sheep. Mammals. Domestication.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Homólogos dos nonapeptídeos OXT e AVP.....	17
Figura 2 - Diagrama esquemático dos genes <i>OXT</i> e <i>AVP</i>	18
Figura 3 - Sintenia dos genes <i>OXT</i> e <i>AVP</i> nos cordados.....	19
Figura 4 - Modelo esquemático de OXTR, AVPR1a, AVPR1b e AVPR2.....	20

CAPÍTULO I

Figure 1 - Evolution scenario proposed for <i>OXTR-AVPR</i> -like genes.....	38
Figure 2 - Bayes Empirical Bayes of Model 8 for <i>AVPR1a</i> in domesticated animals.....	45
Figure 3 - Bayes Empirical Bayes of Model 8 for <i>AVPR1b</i> in domesticated animals.....	45
Figure 4 - Situation of important binding sites of AVPR1a (A) and AVPR1b (B) receptors in domesticated animals.....	47
Figure S1 - Phylogenetic tree of mammals including in this study.....	52
Figure S2 - Phylogenetic tree to the OXTR, AVPR1a, AVPR1b and AVPR2 receptors constructed by Maximum Likelihood method.....	53

CAPÍTULO II

Figura 1- Sequência consenso das regiões codificantes de <i>OXTR</i>	62
Figura 2 – Variações intraespecíficas não sinônimas em <i>Ovis aries</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sítios importantes para a interação de OXTR, AVPR1a, e AVPR1b com seus respectivos ligantes, OXT e AVP.....	21
--	----

CAPÍTULO I

Table 1 - Estimated parameters under different codon substitution models for <i>AVPR1a</i>	43
Table 2 - Estimated parameters under different codon substitution models for <i>AVPR1b</i>	44
Table 3 - <i>AVPR1a</i> sites with higher probability of are with ω rate 999 for the Model 8.....	46
Table 4 - <i>AVPR1b</i> sites with higher probability of are with ω rate 2.1 for the Model 8.....	46
Table S1 - Estimated parameters under different codon substitution models for <i>OXTR</i>	54
Table S2 - Estimated parameters under different codon substitution models for <i>AVPR2</i>	55

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Primers utilizados para a amplificação do gene <i>OXTR</i>	63
Tabela 2 - Frequências genótípicas e alélicas para os sítios polimórficos das regiões codificantes de <i>OXTR</i>	63
Tabela 3 - Comparação das mutações não sinônimas encontradas em <i>OXTR</i> na espécie <i>Ovis aries</i> com animais filogeneticamente mais relacionados.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OXT – Oxitocina

AVP – Vasopressina

PVN – Núcleo paraventricular

SON - Núcleo supra-óptico

GPCRs – Receptores acoplados as proteínas G

OXTR – Receptor da oxitocina

AVPR1a – Receptor da vasopressina 1a

AVPR1b – Receptor da vasopressina 1b

AVPR2 – Receptor da vasopressina 2

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

ARCO – Associação Rio-grandense dos Criadores de Ovinos

ABCOC – Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos Crioulos

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 SISTEMA OXITOCINÉRGICO	16
1.1.1 Os nonapeptídeos: Oxitocina (OXT) e Vasopressina (AVP).....	16
1.1.2 A origem dos nonapeptídeos: OXT e AVP.....	18
1.1.3 Receptores: O receptor da oxitocina (OXTR) e os receptores da vasopressina (AVPR1a, AVPR1b e AVPR2).....	20
1.2 ESTUDOS COMPORTAMENTAIS.....	22
1.3 ANIMAIS DOMESTICADOS	23
1.4 OVINOS	24
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
CAPÍTULO I	30
ARTIGO CIENTÍFICO: OXYTOCIN AND ARGININE VASOPRESSIN RECEPTOR DIVERSITIES: IMPLICATIONS IN THE ADAPTIVE NOVELTIES IN VERTEBRATES AND ANIMAL DOMESTICATION	30
1. INTRODUCTION	32
2. MATERIAL AND METHODS	34
2.1 DATA MINING.....	34
2.2 DATA ANALYSIS	35
3. RESULTS AND DISCUSSION	36
3.1 PHYLOGENETIC, SYNTENY AND NEIGHBORHOOD ANALYSIS	36
3.2 MOLECULAR EVOLUTIONARY PATTERNS AND DOMESTICATION	39
REFERENCES	48
WEB REFERENCES	51
CAPÍTULO II	56
ARTIGO CIENTÍFICO: VARIAÇÃO E EVOLUÇÃO MOLECULAR DO GENE DO RECEPTOR DA OXITOCINA EM <i>Ovis aries</i>	56
1 INTRODUÇÃO	57
2 MATERIAIS E MÉTODOS	58
2.1 AMOSTRAS DE DNA E SEQUENCIAMENTO.....	58
2.2 ANÁLISE DE DADOS	59
2.2.1 Análise estatística	59
2.2.2 Predição de proteínas.....	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
REFERÊNCIAS	64
4 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Pesquisadores do mundo inteiro têm demonstrado interesse em conhecer melhor a oxitocina, pequeno peptídeo com somente nove aminoácidos em sua versão funcional, e sua provável ação na ligação afetiva das pessoas, o que o deixou popularmente conhecido como “*hormônio do amor*”.

Somente nas últimas décadas um volume maior de conhecimento sobre a oxitocina (OXT), bem como a vasopressina (AVP), e suas conexões com traços de comportamento vem sendo obtidos. Vários estudos demonstraram que estes dois hormônios também atuam como neurotransmissores, estando desta forma, também conectados com doenças psiquiátricas tais como o autismo e a esquizofrenia (MCCALL & SINGER 2012; ANDERS et al., 2011; HIGASHIDA et al., 2012).

O papel fisiológico da oxitocina, no entanto, já era conhecido há muito tempo. Dale descreveu em 1906 o efeito da hipófise sobre a contração uterina, ao mostrar a persistência de uma resposta do miométrio à sua administração endovenosa (DALE, 1906). O nome oxitocina deriva inclusive do grego e significa “nascimento rápido”, portanto faz referência a participação desse hormônio no parto. Posteriormente se identificou que a oxitocina era o hormônio responsável também pela ejeção do leite materno durante a amamentação. Já a vasopressina, produzida pelo gene parálogo de OXT, denominado AVP, atuaria na homeostase sanguínea e da água (YOUNG & FLANAGAN-CATO, 2012). O termo vasopressina, por sua vez, deriva do Latim e seu significado está relacionado com o seu efeito vasopressor.

A oxitocina foi o primeiro hormônio a ser sintetizado, o que conferiu o prêmio Nobel à Vicent du Vigneaud em 1955. Vinte nove anos depois, a oxitocina teve sua estrutura elucidada por Ivell & Richter, (1984).

A principal fonte de OXT e AVP é o hipotálamo, onde são produzidos juntamente com um peptídeo sinal, e as neurofisinas I e II, respectivamente (BROWNSTEIN et al., 1980) a partir do processamento de RNAs mensageiros transcritos dos genes OXT e AVP.

São conhecidos quatro receptores para esses dois nonapeptídeos produzidos pelos seguintes genes: OXTR, AVPR1a, AVPR1b e AVPR2. O entendimento sobre a complexa conexão entre esses hormônios/neurotransmissores e seus receptores não é uma tarefa fácil, ainda mais quando estamos diante de uma família gênica com uma história de evolução molecular desconhecida. Vale lembrar

que *OXT*, *AVP*, seus receptores, ou homólogos desses, estão presentes desde insetos até o *Homo sapiens*. Tendo em vista a conservação dos nonapeptídeos, ao menos considerando os mamíferos, acredita-se que a evolução do sistema esteja ocorrendo através de seus receptores, que, portanto são o centro deste estudo.

Aqui buscamos contribuir para o entendimento sobre a evolução molecular da família dos receptores da oxitocina (*OXTR*) e dos receptores da vasopressina (*AVPR1a*, *AVPR1b* e *AVPR2*) num conjunto grande de animais cujos genomas já são conhecidos. Também verificar padrões de evolução entre grupos distintos de animais, selvagens e domesticados. Adicionalmente foi avaliada a variabilidade genética de *OXTR* na espécie *Ovis aries*, auxiliando no conhecimento dessa espécie que ainda não possui seu genoma disponível nos bancos de dados.

1.1 Sistema oxitocinérgico

1.1.1 Os nonapeptídeos: Oxitocina (*OXT*) e Vasopressina (*AVP*)

O nonapeptídeo oxitocina é constituído de uma sequência de nove aminoácidos (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly; LEE et al., 2009), cíclico devido à formação de pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína 1 e 6 (BARBERIS et al., 1998). Todos os membros da família *OXT* e *AVP* apresentam esse anel chamado N-terminal de seis resíduos e uma cauda flexível C-terminal de três resíduos (KOEHBACH et al., 2013), o que possibilita a interação de *OXT* e *AVP* com seus receptores (HOYLE, 1998).

A oxitocina difere somente em dois aminoácidos com relação ao nonapeptídeo vasopressina (Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly), sendo ambos encontrados nos mamíferos placentários (Eutérios), com algumas variações (KOEHBACH et al., 2013). Note que a presença de um aminoácido neutro ou básico na posição 8 é o que difere os nonapeptídeos pertencentes à família da oxitocina e da vasopressina, respectivamente (GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001). Figura 1 ilustra os nonapeptídeos *OXT* e *AVP* bem como seus homólogos em diferentes grupos animais.

Pensava-se que o sistema *OXT-AVP* era extremamente conservado, ao menos considerando os mamíferos placentários. Contudo, recentes publicações têm demonstrado que existem algumas variações (WALLIS, 2012; STOOP, 2012). Um

dos relatos mais interessantes foi publicado por Lee et al. (2011). Das seis espécies investigadas por esses autores, foi constatado que cinco espécies de macacos do novo mundo apresentavam uma mutação T->C no gene *OXT*, que resultava numa substituição não sinônima na cadeia de aminoácidos (Leu->Pro 8). Isso denota que mais estudos são necessários para o completo entendimento sobre a exata extensão da variabilidade do gene *OXT*.

A vasopressina, por sua vez, também é relativamente conservada, sendo raras as variações relatadas em mamíferos. Pode-se citar uma mutação não sinônima no porco e no gambá (Arg->Lys 8; FERGUSON, 1969; Wallis, 2012). Entretanto, as consequências fenotípicas dessas alterações continuam desconhecidas.

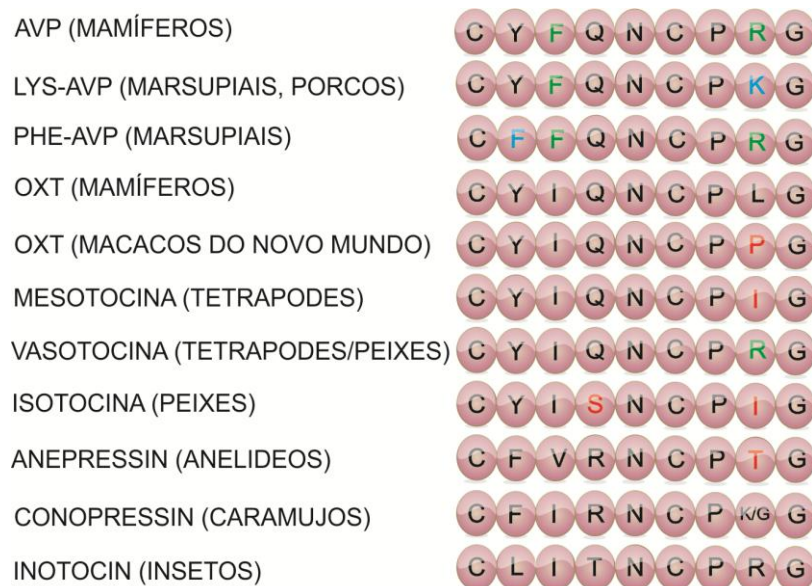


FIGURA 1 - Homólogos dos nonapeptídeos OXT e AVP. Figura adaptada de Stoop, (2012).

Os genes que codificam OXT e AVP estão localizados no mesmo loco cromossômico, mas são transcritos em direções opostas. Tanto *OXT*, quanto *AVP* contém três éxons e dois íntrons, que apresentam grande homologia (Figura 2; LEE et al., 2009).

A principal fonte de oxitocina e de vasopressina é o hipotálamo, onde são liberadas via neurônios magnocelular dos núcleos supra-óptico e paraventricular (PVN e SON) e pelo neurônio parvocelular do PVN. Via neurônio magnocelular OXT e AVP são liberados na corrente sanguínea e atuam como hormônios, e via parvocelular são projetados para diferentes áreas do cérebro e atuam como neuromoduladores (GABOR et al., 2012). A vasopressina através do neurônio

parvocelular também atua principalmente no eixo-hipotálamo-pituitária-adrenal (KOSHIMIZU et al., 2012). Outras regiões do cérebro, assim como órgãos periféricos, também são fontes de OXT e AVP (GWEE et al., 2009).

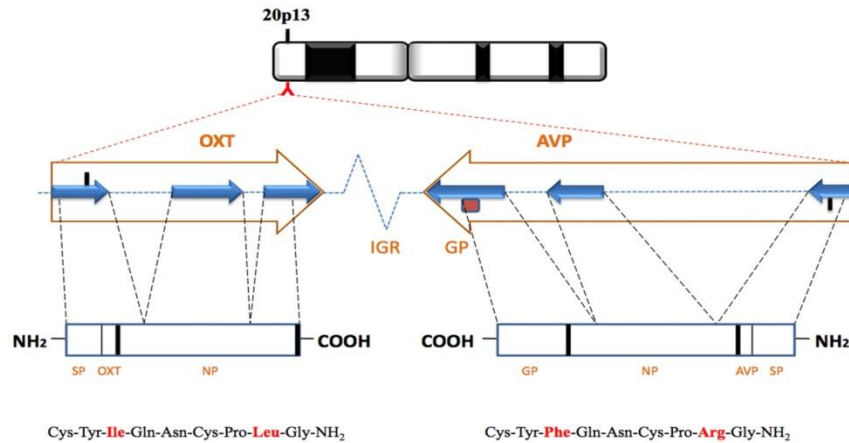


FIGURA 2 - Diagrama esquemático dos genes *OXT* e *AVP* (setas grandes), pré-pró-hormônios (caixas) e os nonapeptídeos (sequência de aminoácidos abaixo). Acima é exibida a localização cromossômica em humanos. As setas azuis pequenas representam os éxons e as linhas pontilhadas representam os íntrons. *IGR*, região intergênica; *SP*, peptídeo sinal; *NP*, neurofisina; *GP*, glicopeptídeo. Os aminoácidos que diferem entre os peptídeos estão representados em vermelho. Fonte: Lee et al., (2009).

1.1.2 A origem dos nonapeptídeos: *OXT* e *AVP*

Os nonapeptídeos *OXT* e *AVP* encontrados em mamíferos descendem de um ancestral comum que data da Era Pré-Cambriana, a cerca de 500-600 milhões de anos atrás (ACHER et al., 1995). Como já mencionado, seus homólogos estão presentes em vertebrados e invertebrados, tais como: peixes, moluscos, anelídeos e vários insetos, incluindo as formigas (GRUBER & MUTTENTHALER, 2012).

Os peixes sem mandíbula atuais (Lampreia como representante) apresentam uma única forma de nonapeptídeo, a vasotocina. Portanto, este é considerado como similar ao nonapeptídeo ancestral tanto da oxitocina quanto da vasopressina, que teriam se originado a partir de uma duplicação gênica ocorrida no ancestral comum dos peixes mandibulados por volta de 500-600 milhões de anos atrás (GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001). Os estudos realizados por Gwee et al., (2009) confirmam essa hipótese, visto que a sintonia e a ordem dos genes (Figura 3) são conservadas na lampreia, no tubarão, no celacanto e nos tetrápodes, e a

inversão gênica observada nos humanos provavelmente ocorreu no genoma do ancestral comum dos roedores. Os peixes teleósteos sofreram mais rearranjos, o que provavelmente foi facilitado por eventos de duplicação no genoma do seu ancestral comum (CHRISTOFFELS et al., 2004).

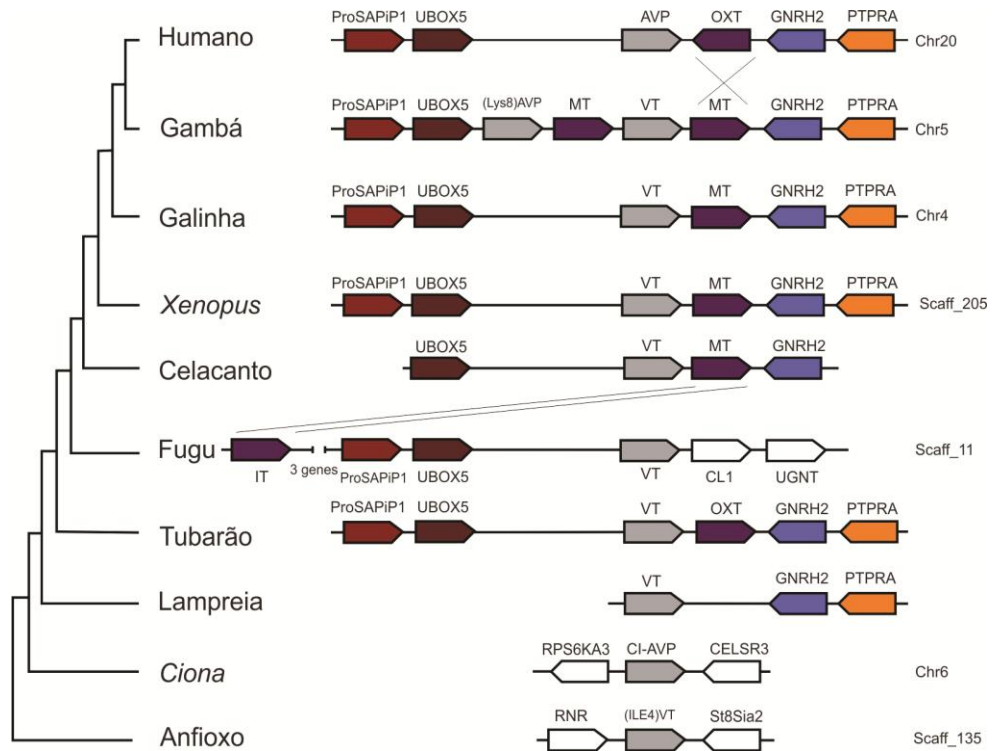


FIGURA 3 - Sintenia dos genes *OXT* e *AVP* nos cordados. Setas representam os genes e indicam a orientação da transcrição. (Lys8) AVP, lys-vasopressina; VT, vasotocina; MT, mesotocina; OXT, oxitocina; IT, isotocina; Ci-AVP, Ciona-vasopressina. Adaptado de Gwee et al., (2009).

Invertebrados possuem um nonapeptídeo pertencente à família da oxitocina ou da vasopressina. Enquanto que, todos os vertebrados, possuem um nonapeptídeo pertencente à família da oxitocina (isotocina/mesotocina/oxitocina) e da vasopressina (vasotocina/vasopressina), com exceção da lampreia que possui somente uma forma de vasopressina (Figura 1; GWEE et al., 2009). A isotocina é comum nos peixes ósseos, e a mesotocina nos répteis e aves e em alguns marsupiais. A oxitocina e a vasopressina são as formas mais comumente encontradas nos mamíferos, embora variações tenham sido descritas como já mencionado (GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001; STOOP, 2012).

Ainda não há estudos que demonstrem uma clara relação entre as variações existentes, principalmente em termos de oxitocina com variabilidade fenotípica, e/ou possíveis vantagens evolutivas. Há algumas sugestões como a dos autores

Yamashita & Kitano, (2013). Para eles, as mudanças, principalmente de isotocina para mesotocina estariam ligadas a evolução do útero nos Eutéria. Wallis, (2012) por sua vez, também destaca um fato curioso no que diz respeito a aspectos reprodutivos: os monotremados, animais mais basais no ramo dos mamíferos, apresentam a forma mais atual de oxitocina, enquanto que alguns marsupiais ainda retêm a mesotocina.

1.1.3 Receptores: O receptor da oxitocina (OXTR) e os receptores da vasopressina (AVPR1a, AVPR1b e AVPR2).

O receptor da oxitocina, assim como os três receptores da vasopressina pertencem à classe 1 da família dos receptores acoplados as proteínas G (GPCRs; Figura 4). Esses receptores são compostos por 4 domínios extracelulares, 4 domínios intracelulares, e 7 domínios transmembrana, em que a formação de uma ponte dissulfeto entre os resíduos de cisteína dos domínios extracelulares 2 e 3 é importante para a conformação e estabilização dessas regiões transmembrana (BOCKAERT & PIN, 1999).

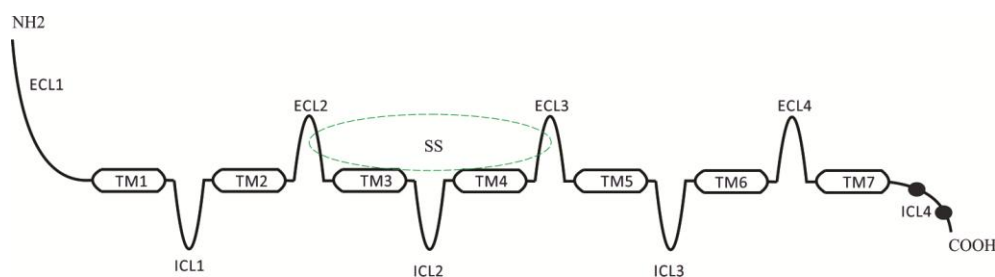


FIGURA 4- Modelo esquemático de OXTR, AVPR1a, AVPR1b e AVPR2. São representados os quatro domínios extracelulares (ECL1-ECL4), quatro domínios intracelulares (ICL1-ICL4), e os sete domínios transmembrana (TM1-TM7). SS representa a formação de pontes dissulfeto entre os domínios que estão dentro do pontilhado. Elipses na região ICL4 indicam a presença de motivos importantes para interação com as proteínas G. Figura adaptada de Yamashita & Kitano, (2013).

Os sítios importantes para interação do receptor com seu respectivo agonista (OXT e AVP; Tabela 1) estão descritos para as regiões extracelulares e transmembrana dos receptores (OXTR, AVPR1a, e AVPR1b; ZINGG & LAPPORTE, 2003; KOEHBACH et al., 2013; KOSHIMIZU et al., 2012). Mais detalhes sobre AVPR2 podem ser consultados em Birnbaumer et al., (1992) e Lolait et al., (1992).

Embora OXT e AVP possam se ligar a todos os receptores listados acima, essas ligações não ocorrem com a mesma afinidade (KOSHIMIZU et al., 2012).

Tabela 1 – Sítios importantes para a interação de OXTR, AVPR1a, e AVPR1b com seus respectivos ligantes OXT e AVP.

Receptores	Sítios de ligação																			
OXTR	Arg 34	Phe 103	Tyr 209	Phe 284	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AVPR1a	Arg 46	Leu 50	Asp 97	Gln 104	Tyr 115	Arg 116	Arg 125	Gln 131	Gly 134	Tyr 186	Asp 202	Try 204	Phe 207	Ser 213	Tyr 216	Tyr 300	Ile 309	Gln 311	Thr 323	Pro 328
AVPR1b	Asp 95	Val 169	Pro 196	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

O gene que codifica OXTR está localizado no cromossomo 3 em humanos e está composto por 4 éxons, em que somente os dois últimos são codificantes. O receptor é expresso no sistema nervoso central e em órgãos periféricos, tais como: glândulas mamárias e útero (GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001).

Os três receptores da vasopressina (AVPR1a, AVPR1b e AVPR2) são codificados por genes que estão localizados em diferentes cromossomos: 12, 1 e X, respectivamente. Os genes para AVPR1a e AVPR1b possuem 2 éxons que são codificantes para a proteína, e AVPR2 possui 4 éxons em que somente 2 codificam a proteína (ENSEMBLE, <http://www.ensembl.org>). Os receptores da vasopressina AVPR1a e AVPR1b são expressos no sistema nervoso central e estão envolvidos na modulação do comportamento, além de mediar importantes ações fisiológicas (GABOR et al., 2012). A vasoconstrição é mediada por AVPR1a quando expresso nas paredes dos vasos sanguíneos, enquanto que a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é mediada via AVPR1b, sendo desse modo elemento chave na regulação do estresse. O AVPR2 é o único receptor a ser expresso somente nos rins e é importante para a homeostase da água (KOSHIMIZU et al., 2012).

A filogenia dos receptores foi recentemente estabelecida por Yamashita & Kitano, (2013) que encontraram que esses genes surgiram através dos eventos de duplicação do genoma no ancestral comum dos vertebrados, ao contrário dos nonapeptídeos que se originaram por uma duplicação em *tandem*. Os autores, citados acima não encontraram um sinal claro de divergência na formação da rede,

mas obtiveram um cluster para OXTR e três clusters para os receptores da vasopressina (AVPR1a, AVPR1b e AVPR2).

É importante destacar que os peixes e a linhagem que deu origem aos vertebrados terrestres se separaram por volta de 542 milhões de anos atrás no período Cambriano. Até esse momento aconteceram dois eventos de duplicação no genoma, o que deixou sinais nos vertebrados terrestres. O terceiro evento de duplicação do genoma ocorreu nos peixes teleósteos e o mais recente evento ocorreu no tetraploide *Xenopus* (VAN DE PEER et al., 2009).

1.2 Estudos comportamentais

Os estudos comportamentais envolvem principalmente OXT e são mais recentes, sendo que os primeiros focaram mais nas clássicas funções descritas para esse hormônio (YOUNG & FLANAGAN-CATO, 2012). A oxitocina é importante para a memória social e para o apego, comportamento sexual e maternal. A vasopressina também está envolvida no comportamento, mas com maior efeito no homem (MCCALL & SINGER, 2012).

Através de uma série de estudos com camundongos nocautes, recentemente revisados por Gabor et al., (2012), foi demonstrado que a atuação de OXT no comportamento social não é suprida por AVP e que a interação com receptores específicos também media ações únicas. OXT é importante para a primeira instância de um comportamento social, reconhecimento, enquanto que AVP é importante para manter as relações sociais. Por isso várias desordens humanas caracterizadas por interações sociais anormais como o autismo e a esquizofrenia, têm sido relacionadas com OXT. Estudos com camundongos têm trazido resultados instigantes, e já demonstraram que polimorfismos em genes ligados a regulação da expressão de oxitocina constituem-se em fatores de risco para distúrbios cognitivo-comportamentais (HIGASHIDA et al., 2012).

Um clássico exemplo envolve a chamada ratazana de pradaria, uma espécie Norte Americana que tem sido um bom modelo para a compreensão da neurobiologia do comportamento. Esses roedores são monogâmicos e foram testados através da infusão de um inibidor de oxitocina, o que resultou na não formação de pares, o padrão de preferência que normalmente ocorre com esses animais após o acasalamento (INSEL & YOUNG, 2001). Crockford et al., (2013), por

sua vez, estudando os níveis de oxitocina em chimpanzés em ambiente natural, encontraram níveis maiores de oxitocina após o estabelecimento de contatos *grooming* com outro chimpanzé, independente de parentesco ou interesse sexual.

Outros animais que se constituem em modelos para estudos de comportamento de apego são as ovelhas. Indivíduos desta espécie aceitam como regra, somente seus cordeiros, enquanto rejeitam todos os outros. Através de estímulo vagino-cervical, com a liberação de esteroides gonadais, o comportamento materno pode ter início. Fêmeas que passaram por cesárea podem se tornar mais receptivas a seus filhotes e fêmeas virgens podem adotar um filhote alheio (KENDRICK et al., 1997). A liberação de oxitocina através desses estímulos pode induzir o alicite materno para a vida toda (INSEL & YOUNG, 2001).

1.3 Animais domesticados

Driscoll e colaboradores (2009) definem o animal domesticado como “aquele cuja reprodução é pré-determinada pelo homem através da escolha de um parceiro, onde a docilidade é pré-determinada geneticamente”.

Dentre os efeitos mais notáveis da domesticação, após sucessivos eventos de seleção para tolerância ao homem nos nichos criados por este (DRISCOLL et al., 2009), estão às mudanças morfológicas, tais como na pigmentação da pelagem e morfologia dos cornos (KIJAS et al., 2012). No entanto, o processo resultou em traços que vão muito além, e envolve também outros traços de comportamento, além da docilidade para com humanos. Animais domesticados passam, por exemplo, a se reproduzir mais vezes durante o ano e adquirem a capacidade de reprodução em qualquer estação (TRUT et al., 2009).

O início da domesticação se deu quando o *Homo sapiens* anatomicamente moderno ainda era uma espécie nômade e seus hábitos de vida e dieta eram de caçador-coletor. A primeira espécie a ser domesticada foi o cão, em data ainda controversa ≈15.000 - 30.000 anos antes do presente (SKOGLUND et al., 2011). Desde então, o cão se mostrou um bom guarda e caçador e a sua domesticação foi se dando, até certo ponto, ainda por seleção natural. Somente há ≈4.000 anos que o homem começou a ter controle completo sobre os cruzamentos dos cães, e nesse ponto a seleção artificial começa a ter papel de destaque, resultando em inúmeras

raças conhecidas, de interesses diversos e comportamentos distintos (DRISCOLL et al., 2009).

Em dado momento, a cerca de 6-15 mil anos antes do presente em vários continentes e de maneira concomitante os humanos deram início às atividades de agricultura e pecuária, resultando para a maior parte das populações no fim do nomadismo e no início do sedentarismo. Nesse período de tempo, a ovelha, o cavalo, a cabra, o gado e o porco foram domesticados (ZEDER, 2008). Já a domesticação do gato, um animal oportunista também teve início nesse período, mas somente quando o homem estava bem estabelecido nas áreas urbanas, ou seja, nos primeiros agrupamentos ou vilas. Também aqui, a característica comum a todos é o fato de serem dóceis com humanos (DRISCOLL et al., 2009).

Estes eventos, domesticação de plantas e animais, promoveram a chamada “Revolução do Período Neolítico” e pode ser considerado um marco na evolução humana. Tal período vem acompanhado por redução na biodiversidade e alterações nos ecossistemas e atmosfera de nosso planeta (ZEDER, 2008). Contudo, possibilitou uma rica utilização de plantas e animais, proporcionando o chamado desenvolvimento civilizatório, caracterizado pelo crescimento econômico, desenvolvimento da vida urbana e o surgimento de grandes inovações.

1.4 Ovinos

As ovelhas, assim como todos os animais que fazem parte do grande grupo dos Ungulados, são os mamíferos que possuem cascos e habitam praticamente todos os ambientes terrestres, com exceção da Antártida e constituem a maioria dos grandes herbívoros existentes atualmente (HUFFMAN, 2013).

Os ovinos estão incluídos na família Bovidae, que pertence a Ordem Artiodactyla, a qual era pensada ser um grupo monofilético. Contudo, recentes dados moleculares demonstraram que os Cetáceos, evoluíram a partir de um ancestral Artiodactyla. Portanto, foi proposto um grande grupo denominado Cetartiodactyla, que inclui os Cetáceos e os Artiodactyla (BOISSERIE et al., 2005).

Como visto no item anterior, entre os primeiros animais a serem domesticados estavam as ovelhas. Conforme relatado nos textos bíblicos, Jacó selecionou as ovelhas manchadas e listradas do rebanho de seu sogro Labão com o intuito de aumentar essas proles e concomitantemente seus lucros (Genesis 30: 25–

43). Embora os textos bíblicos possam ficar na seara dos mitos da civilização ocidental, o registro certamente antigo, reporta a prática de seleção artificial. Ainda hoje, no sudoeste da Ásia habita uma raça conhecida como as “ovelhas de Jacó” e que recentemente contribuíram para a compreensão da história da domesticação das ovelhas. A ovelha (*Ovis aries*) não tem sua origem bem determinada, mas acredita-se que as ovelhas domésticas se originaram da raça selvagem muflão (*Ovis orientalis*) na Ásia. Estudo com o DNA mitocondrial, não exclui essa possibilidade, mas demonstra que os ovinos domésticos podem ter duas linhagens distintas, uma com origem na Europa e outra na Ásia (HIENDLEDER et al., 1998).

Estudo realizado por Chessa et al., (2009) apresenta evidências de que a domesticação das ovelhas ocorreu em dois eventos subsequentes. Primeiramente na Europa, envolvendo as raças mais primitivas, como a selvagem Muflão e um segundo evento envolvendo as raças encontradas atualmente com traços de produção melhorados incluindo as ovelhas de Jacó.

A domesticação dos ovinos originalmente objetivou o consumo de carne e uso da pele, e posteriormente a utilização da lã, quando o homem começou a trabalhar com tecelagem. Ao longo do tempo, o pastoreio de ovinos se espalhou pela Europa e Ásia, tornando a lã a fibra mais comumente utilizada nas vestimentas. A raça Merino foi selecionada na Espanha com uma alta qualidade do velo no século XII, então um monopólio da raça foi estabelecido. Isso auxiliou a Espanha a criar sua riqueza e usá-la para explorar o Novo Mundo (MCMANUS et al., 2010).

No Brasil, as raças Ibéricas foram trazidas pelos colonizadores portugueses e espanhóis e evoluíram ao longo dos séculos. Tais raças se adaptaram as condições sanitárias, de clima e manejo nos diferentes ecossistemas, originando as raças naturalizadas brasileiras (EGITO et al., 2002). Dentre essas, a maioria é caracterizada como tipo deslanadas, incluindo: Santa Inês, Morada Nova, Somali, Barriga Preta, Cariri e Rabo Largo. Já as raças Crioula Lanada e Bergamascia são do tipo lanada (MCMANUS et al., 2010).

Os rebanhos introduzidos no Rio Grande do Sul no período de colonização no século XVII deram origem à raça ovina Crioula Lanada, a qual é considerada um patrimônio sócio-cultural econômico e ecológico brasileiro (SILVA et al., 2010). Henkes et al., (1993) através de estudos com polimorfismos de proteínas em ovelhas Crioula e de outras 11 raças espanholas, demonstrou que a raça espanhola Churra, a qual se acreditava ter originado a raça Crioula Lanada, não poderia ser

excluída como uma das raças envolvidas na origem desta última. Porém, a raça Lacha teria tido uma maior participação no processo de surgimento da Crioula Lanada. Além disso, os autores sugerem ainda fluxo gênico entre a Crioula Lanada e outras raças do Sul do Brasil, Corriedale e Romney Marsh.

A raça Crioula Lanada se divide em quatro ecótipos: Fronteira, Serrana, Zebua e Comum. No Rio Grande do Sul ocorrem os ecótipos Fronteira e Serrana, distribuídos em planícies da metade sul e norte do estado e Santa Catarina, respectivamente (VAZ, 2000). Dados do DNA mitocondrial e nuclear demonstraram que há distinção genotípica entre esses dois ecótipos. O ecótipo Fronteira pode ser agrupado num clado monofilético e o ecótipo Serrana num clado parafilético, pela substituição de somente dois nucleotídeos na rede haplotípica mitocondrial. Esse fato possivelmente é resultado do isolamento geográfico, associado com diferentes maneiras de manejo (GONÇALVES et al., 2010).

O temperamento da raça Crioula possivelmente auxiliou na sua preservação e adaptação com as condições climáticas no sul do Brasil (MONTANO et al., 2007). Ovelhas Crioulas são bem adaptadas às condições locais, possuem grande rusticidade, fertilidade e alta taxa de sobrevivência dos cordeiros. Estas características tem despertado um crescente interesse do ponto de vista econômico para a produção pecuária, a qual utiliza estes animais para a produção de lã, carne e pele (SILVA et al., 2010).

A ovinocultura no Rio Grande do Sul teve grande impulso a partir da criação da ARCO (Associação Rio-grandense dos Criadores de Ovinos, hoje Associação Brasileira de Criadores de Ovinos) em 1942. A partir da década de 40, o então Ministério da Agricultura, fomentou o uso da técnica de inseminação artificial em ovinos com sêmen fresco, ensinando e auxiliando os interessados, o que culminou com um expressivo percentual de ovelhas inseminadas na década de 70 (MORAES, 2002). Mas com o advento das fibras sintéticas nos anos 80, juntamente com uma grande oferta do mercado internacional, acarretou em desestímulo no setor, sendo que a produção de lã era o eixo da economia, enquanto que, a produção de carne tinha pouca expressão econômica, mais voltada ao consumo doméstico.

As ovelhas Crioulas foram muito importantes para a ovinocultura no início do século XX, mas quase desapareceram com a introdução de outras raças. O reconhecimento da ovelha Crioula como raça, foi um processo bastante lento e dispendioso. Uma das principais atitudes para a preservação da raça ocorreu em

1983, após sua crítica diminuição. Foi formado o primeiro rebanho *in situ* de ovelhas Crioula Lanada localizado na Embrapa Pecuária Sul, no município de Bagé, RS. Segundo as informações disponíveis do site da ABCOC, após inúmeras tentativas para o reconhecimento da raça, ela foi avaliada reprodutivamente e morfologicamente. Registros de 19 anos da Embrapa Pecuária Sul contribuíram para a análise, além de 4.000 animais do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A criação da ABCOC (1999) e novos estudos da raça levaram a solicitação de seu reconhecimento oficial em 2000, que foi assinado e publicado no Diário Oficial da União (VAZ et al., 2011).

Hoje, há um grande estímulo na revitalização da ovinocultura no RS, principalmente na região da campanha e fronteira oeste. Nessas regiões, a ovinocultura tem um grande potencial socioeconômico que está ligado a sua longa tradição, vocação e as condições geográficas favoráveis para a criação ovina (VIANA & SILVEIRA, 2009). O aumento da demanda de fibras naturais voltou a estimular a produção de lã, mas atualmente a produção de carne ovina é o mercado mais promissor, tanto para o consumo interno, quanto para a exportação. Assim, a ovinocultura tem potencial de servir tanto para o agronegócio, quanto para a agricultura familiar. No entanto, o mercado atual é extremamente exigente e requer, além da regularidade de produção, concordância com normas de rastreabilidade, bem-estar animal, tipificação da carcaça e rígidos padrões sanitários. Porém a ovinocultura precisa de sistemas de produção mais eficazes, a fim de absorver a mão de obra local para auxiliar a fixação do homem no campo.

Atualmente o consórcio “*The International Sheep Genomics Sequencing Consortium*” (<http://www.sheephapmap.org/refgenome.php>) executa uma tarefa importante ao fornecer dados e publicações que buscam desvendar o genoma da espécie *Ovis aries*, incluindo exemplares da chamada “Crioula”. O estudo busca também avaliar a variação entre raças, tarefa essencial para alcançar o melhoramento genético através de estudos de associação entre variantes e fenótipos complexos de interesse. Mais detalhes sobre achados vinculados ao Consórcio serão vistos no Capítulo II.

2 OBJETIVOS

2.1 Caracterizar a evolução molecular da família dos receptores da oxitocina (*OXTR*) e dos receptores da vasopressina (*AVPR1a*, *AVPR1b* e *AVPR2*) num conjunto grande de animais;

2.2 Avaliar a variabilidade genética de *OXTR* na espécie *Ovis aries*, auxiliando a ampliar o conhecimento dessa espécie que ainda não possui seu genoma disponível nos bancos de dados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para alcançar o objetivo listado no item 2.1 foram utilizados métodos específicos para análises de sintenia e vizinhança, bem como de padrões de evolução molecular que estão descritos em detalhe no item *Material and Methods* do Capítulo I.

Para alcançar o objetivo 2.2 foram utilizados os procedimentos descritos no item Materiais e Métodos do Capítulo II.

CAPÍTULO I

Artigo científico: Oxytocin and arginine vasopressin receptor diversities: implications in the adaptive novelties in vertebrates and animal domestication

Paré P, Paixão-Cortes V, Vargas-Pinilla P, Salzano FM, Henkes LE, and Bortolini MC

A ser submetido para a revista *Molecular Phylogenetics and Evolution*

ABSTRACT

A search was performed in public databases including 152 chordates, looking for oxytocin (OXTR) and three arginine vasopressin (AVPR2, AVPR1a, AVPR1b) receptors. Based on shared synteny, neighborhood analysis, and phylogenetic tree topology, we suggested that the first round of genome duplication afforded the emergence, in the vertebrate ancestor, of two genes, named here *AVPR1a/AVPR1b*, and *AVPR2/OXTR*. Afterwards, a second genome round of duplication occurred in the vertebrate lineage, originating the four *OXTR-AVPR*-like genes observed today. Our results revealed that *OXTR*, *AVPR2*, *AVPR1a*, *AVPR1b* and *OXTR-AVPR*-like genes share a similar synteny with Rho GTPase Activating Protein genes, which have an important role in neuronal morphogenesis and migration during cerebral development. The DNA and protein of 23 placental mammal species (including seven domesticated) were then subjected to a detailed analysis. Search for positive selection indicated that it was restricted to the domesticated species and more specifically to *AVPR1a* and *AVPR1b*, indicating for the first time an important role of these genes in the acquisition of traits such as tameness and reduction of stress and anxiety, indispensable for domestication. Furthermore, our results show that the molecular basis for some key behavior phenotypes in the distinct domesticated species could be due to independent mutations in *AVPR1a* and *AVPR1b* genes, a process similar to that of convergent evolution observed in nature. These results provide insights on the nature of the domestication process, an event of key importance in the evolution of human and other species.

Keywords: Oxytocin receptors; Arginine vasopressin receptors; Animal domestication; Molecular evolution.

1. Introduction

It was proposed, in recent years, that the oxytocin (OXT) and arginine vasopressin (AVP)-like genes were originated due to a tandem duplication of the ancestral vasotocin gene (VT), which occurred ~500 million years ago. This event would ensure that at least one homolog would be present in jawed vertebrates (Gimpl and Fahrenholz, 2001), although many aspects of the origin and evolution of these genes remain unknown (Yamashita and Kitano, 2013). In mammals the products of these genes (small peptides with only nine amino acids, acting as hormones and neurotransmitters) play an important role during lactation, uterine contractions, offspring care, response to stress, and other reproductive and behavior traits (Gimpl and Fahrenholz, 2001; Young and Flanagan-Cato, 2012; McCall and Singer, 2012). Central and peripheral physiological functions have also been described, especially for AVP, which include signaling for other hormone secretions and water homeostasis (Koshimizu et al., 2012).

OXT and AVP human genes are located in the same chromosome, at 20p13, but in opposite orientation (Rao et al., 1992). They differ by two amino acids at positions 3 and 8, namely OXT: Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly, and AVP: Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly. Both peptides are highly conserved in all placental mammals, but with some exceptions. For instance, Lee et al., (2011), studying six New World monkey species, found in five of them a T>C mutation changing leucine to proline at position 8 of OXT. In opossum and pigs an AVP mutation, leading to an arginine to lysine substitution at position 8, was also reported (Ferguson, 1969; Yamashita and Kitano, 2013). The consequences of these changes, however, remain unknown.

Noteworthy that variability at amino acid chain positions 2-5 and/or 8 characterizes the non-placental AVP/OXT-like nonapeptides (Wallis, 2012; Koehbach et al., 2013).

The unique oxytocin and the three arginine vasopressin receptors (OXTR, AVPR2, AVPR1a, and AVPR1b, located in human chromosomes 3, X, 12 and 1, respectively) belong to the G-protein coupled receptor family (<http://www.ensembl.org>), since they use G-proteins as transducer signals across the cell membranes. OXTR, AVPR2, AVPR1a, and AVPR1b receptors have seven transmembrane domains (named TM1-TM7), in addition to four extracellular (ECL1-

ECL4) and four intracellular domains (ICL1-ICL4). Transmembrane and extracellular regions are important for the interaction with the nonapeptides, while intracellular regions have important sites for the G-protein interaction (Zingg and Laporte, 2003). More recently, Koehbach et al. (2013) reported the presence of OXT binding sites within the transmembrane domains of OXTR, suggesting that changes in these regions might also be implicated in G-protein signaling.

OXT and AVP can bind to each one of the four above-indicated receptors, but not with the same affinity, since the most important binding sites for the interactions differ slightly among the four receptors (Zingg and Laporte, 2003; Koshimizu et al., 2012). OXT and AVP products occur basically in neurons of the hypothalamus, but their systemic and/or tissue/organ specificity depend on a satisfactory interaction with their receptors. Receptor synthesis, on the other hand, can be site-specific (OXTR and AVPR1a are expressed in several tissues, while the expression of AVPR2 and AVPR1b is more limited). The V1a protein, encoded by AVPR1a, for example, is found in artery walls and is responsible for vasoconstriction, while the production of the OXTR receptor in the uterus and mammal glands guarantees the uterine contraction and milk ejection, respectively (Kimura et al., 1992; Yamashita and Kitano, 2013). Protein V2, encoded by AVPR2, on the other hand, is exclusively produced in the renal ducts, and V1b, encoded by AVPR1b in the anterior pituitary gland, mediates the water absorption and secretion of the adrenocorticotrophic hormone (ACTH), respectively (Koshimizu et al., 2012). Note that ACTH is an important component of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, a key system for metabolism regulation, the immune system, inflammatory processes, and brain functions (Terenina et al., 2013).

Yamashita and Kitano (2013) confirmed that these four receptors probably arose from two rounds of genome duplication in the vertebrates' common ancestor. The authors, however, remarked that it is difficult to clarify the order of divergence among the receptors based in phylogenetic networks only.

In contrast to the observed OXT and AVP conservation, hundreds of mutations in the OXTR, AVPR2, AVPR1a, and AVPR1b genes have been reported in placental mammals. For example, 170 different AVPR2 mutations were identified in humans, and several of them have important clinical consequences, such as hypernatremic dehydration, polyuria, polydipsia, fever, and constipation (Schulz et al., 2002). In pigs, AVPR1a and AVPR1b mutations have been associated with

responses to stress and aggressive behavior, through their connection with ACTH and HPA, as well as with other unknown neuronal functions (Muráni et al., 2010; Terenina et al., 2013).

The present study updated the OXTR, AVPR2, AVPR1a, and AVPR1b genes phylogeny, considering also their ortholog and/or paralog genes (named here as OXTR-AVPR-like genes), using the highest number of species already investigated. The OXTR, AVPR2, AVPR1a, AVPR1b, and OXTR-AVPR-like sharing synteny and/or conserved side-by-side neighborhood were searched in species whose complete genomes are available.

We also estimated the OXTR, AVPR2, AVPR1a, and AVPR1b genes nucleotide diversity in a set of wild and domesticated mammal species, to determine whether processes such as artificial selection left molecular footprints.

As a whole, our goal was to contribute to the understanding of OXTR, AVPR2, AVPR1a, and AVPR1b genes molecular evolution and unravel their connection with possible adaptive novelties which would have occurred during chordate radiation, as well as in the animal domestication processes.

2. Material and methods

2.1 Data Mining

We applied the HMMER (hidden Markov models) web service to search in the NR and Uniprot collections for OXTR, AVPR2, AVPR1a, AVPR1b, and OXTR-like protein homologs or translated amino acid sequences (Finn et al., 2011). Data from 152 chordates (150 vertebrate species plus *Ciona intestinalis* and *Branchiostoma floridae*) were retrieved for this analysis.

OXTR, AVPR2, AVPR1a, and AVPR1b nucleotide sequences of 23 placental mammals species were obtained from the NCBI GenBank genomic databases (GenomicBLAST, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=8496&database=8496) and Ensemble (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>). The sequences were aligned using the MUSCLE algorithm (Edgar, 2004) included in the Mega 5.0 version software (Tamura et al., 2011), and with the GUIDANCE web service using the enclosed MAFFT algorithm. Unreliable sequences with confidence score below 0.750 were removed from the analysis (Penn et al., 2010).

2.2 Data analysis

Phylogeny analysis was performed using the Maximum Likelihood method (Mega 5.0 version; Tamura et al., 2011). The best fit model for protein evolution was selected using the Akaike Information Criterion (AIC) and the Bayesian Information Criterion (BIC) in the Datamonkey.org web server (JTT matrix-based model +F; Jones et al., 1992; Delpont et al., 2010), bootstrap support were run for the analysis.

Mapping adjacent genes in synteny and/or neighborhood with OXTR, AVPR2, AVPR1a, AVPR1b and OXTR-AVPR-like genes was performed using the Genomicus website v70.01 (<http://www.dyogen.ens.fr/genomicus-70.01/cgi-bin/search.pl>; Louis et al., 2012). Additionally, we have also manually searched the Ensembl (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>) and UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) genome browsers with the same purpose. Data from 66 vertebrate species which had their complete genomes available were compiled for this analysis.

The OXTR, AVPR2, AVPR1a, and AVPR1b nucleotide sequences of 23 placental mammals' species were used to estimate molecular evolutionary patterns. Seven of them can be considered as domesticated animals. The literature provides numerous ways to define domesticated animals (Larson and Burger, 2013), but here we use the following definition: "A domestic animal is one whose mate choice is influenced by humans and whose tameness and tolerance of humans is genetically determined" (Driscoll et al., 2009). Nine wildlife species with a phylogenetic relationship to the domesticated species were also selected. The remaining species belong to the primate order (Fig. S1).

The Grantham score was then used to categorize all amino acid changes into classes of chemical similarity. The changes were classified as conservative (Grantham score 0-50), moderately conservative (51-100), moderately radical (101-150) and radical (>151; Grantham, 1974; Li et al., 1984).

The molecular evolutionary analysis was carried out using the Nnsites variable which allows the ω ratio to vary among sites in a codon substitution model through the PAML 4.6 package (Yang, 2007). The Bayes Empirical Bayes approaches implemented in CODEML was used to verify which sites could be evolving under positive selection. The unrooted trees necessary for the construction

of the input files for the PAML4.6 analyses were the phylogenetic trees provided by Ensembl, and edited with PhyloWidget (Jordan and Piel, 2008).

3. Results and Discussion

3.1 Phylogenetic, synteny and neighborhood analysis

The Maximum Likelihood tree (Fig. S2) presents well-defined clusters that separated the four gene receptors. The topology of the tree indicates that AVPR1a and AVPR1b have a clear common origin, while the connection of both with OXTR is less evident. AVPR2, on the other hand, seems to be more phylogenetically distant from the other three genes. Functionally AVPR2 differs from AVPR1a, AVPR1b, and OXTR, since it activates adenylyl cyclase instead of phospholipases to interact with the G-protein. This particularity and its specialization of expression in the kidneys could explain, in part, the topology of the tree.

The OXTR, AVPR2, AVPR1a, AVPR1b, and OXTR-AVPR-like genes, located in different chromosomes, have a conserved synteny and/or neighborhood with other genes among different vertebrate species. The conservation is higher in tetrapods, while in teleost fishes some variation is observed, probably as a consequence of a plus genome duplication (Van de Peer et al., 2009).

A remarkable finding is that OXTR, AVPR2, AVPR1a, AVPR1b and OXTR-AVPR-like genes share a similar synteny, i.e they are always in the same chromosome with Rho GTPase Activating Protein genes, which have an important role in neuronal morphogenesis and migration during cerebral development. As shown in Fig. 1, AVPR1a is linked to SRGAP1; AVPR1b with SRGAP2, AVPR2 with ARHGAP4 and OXTR with SRGAP3. This is true including the lamprey (*Petromyzon marinus*), a basal vertebrate. The presence of a conservative block of genes related with brain function has been associated with the probable maintenance of the same regulatory apparatus and to adaptive properties, including those that emerged with the tetrapods (Mota et al., 2012).

AVPR1a and AVPR1b revealed a striking conservation of their synteny (RASSF3, TBK1, SRGAP1, AVPR1a, DIRK2, that are paralogues of RASSF5, IKBKE, SRGAP2, AVPR1b, DIRK3, respectively). AVPR2, on the other hand, have several genes in common with OXTR (PNCK, ARHGAP4, AVPR2, L1CAM that are

paralogues of CAMK1, SRGAP3, OXTR, CHL1, respectively). This strongly suggests that AVPR2 is more closely related to OXTR than to AVPR1a and AVPR1b.

Note also the inversion of part of the RASSF5, IKBKE, SRGAP2, AVPR1b, DIRK3 block in humans (Fig. 1). Studies with *Drosophila* and other organisms have shown that inversions could affect the function and/or expression of genes near or inside it (Puig et al., 2004), although only functional studies could establish if this is true for this specific case.

Our analysis reveals also that neighborhoods (genes side-by-side in the same order) vary. For example, in humans, seven genes are found, between AVPR1a and RASSF3, while between AVPR1b and RASSF5 only five can be identified. On the other hand, the same number of two genes separates SRGAP1 and AVPR1a of their paralogues SRGAP2 and AVPR1b.

Fig.1 shows that while the OXTR-AVPR/SRGAP-like block is detected in the lamprey, this genetic region was not found in tunicates (*Ciona intestinalis* and *Ciona savignyi*), the most basal chordates in our analysis. The lamprey has also at least four copies of OXTR-AVPR like receptors.

The domestic pig (*Sus scrofa*) presents a tandem duplication of AVPR1a in chromosome 5, and other genome particularity (a translocation) in this domesticated species has been reported by Mota et al., (2012) involving a block of neurogenesis and dopaminergic neurotransmission genes.

Based on shared synteny, neighborhood analysis, and phylogenetic tree topology, a complementary scenario from that proposed by Yamashita and Kitano (2013) (see the introduction) can be suggested, specifically in relation to the receptors. The ancestral OXTR-AVPR/SRGAP-like syntenic block emerged with the vertebrate ancestor before the first round of duplication (1RWGD), since that block is present in all four receptor copies. Furthermore, the OXTR-AVPR/SRGAP block emerged before the split of jawless and jawed vertebrates, since it is already present in the lamprey, a basal vertebrate. The first round of duplication originated the ancestor gene of AVPR1a and AVPR1b and the ancestor gene of AVPR2 and OXTR (named, respectively, AVPR1a/AVPR1b and AVPR2/OXTR genes in Fig. 1).

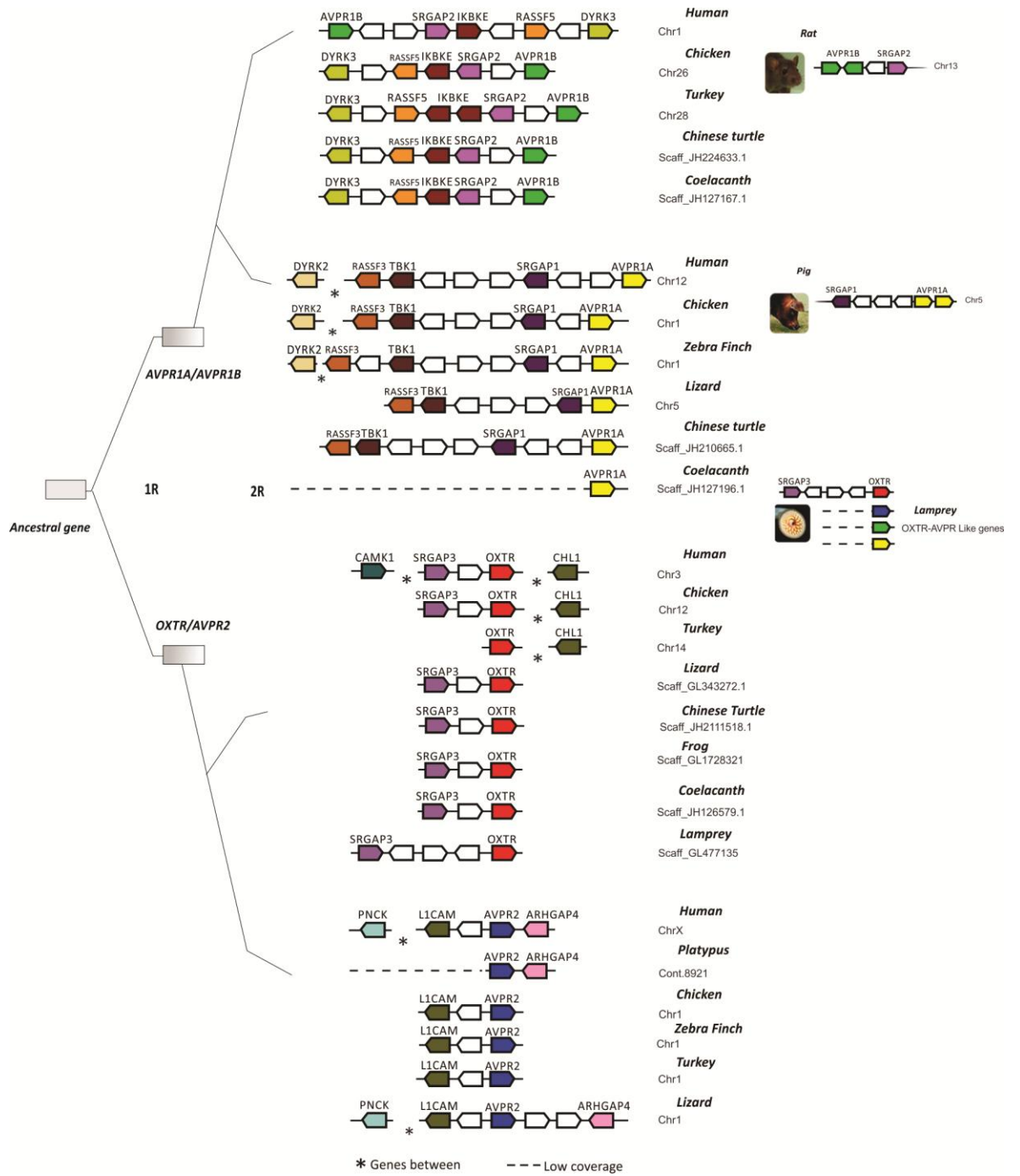


Fig. 1. Evolution scenario proposed for OXTR-AVPR-like genes. The OXTR, AVPR2, AVPR1a, AVPR1b, and OXTR-AVPR-like genes, located in different chromosomes, have conserved synteny and/or neighborhood among different vertebrate species.

Afterwards, a 2RWGD occurred in the vertebrate ancestor, originating the four OXTR-AVPR-like genes observed today. The OXT-AVP tandem duplication, in turn, occurred in the jawed vertebrate ancestor. Yamashita and Kitano (2013) suggested that the original expression site of the four receptors could have been the central nervous system. Thus the diversification (AVPR1a and OXTR) and specification (AVPR1b and AVPR2) of the expression of these receptors should have happened after the OXT-AVP tandem duplication, and probably these events can be associated with the emergence of adaptive novelties at the jawless/jawed vertebrate transition. Since OXTR-AVPR-like receptors were present before the mammals emergence, the uterine contraction and milk ejection functions are a probable exaptation of the OXT-OXTR system.

3.2 Molecular evolutionary patterns and domestication

Parameter estimates and log-likelihood values under models of variable ω (dN, nonsynonymous/ds, synonymous DNA changes ratio) indicate that, for all category of investigated mammals, the model that fits the OXTR and AVPR2 receptors molecular evolution is the discrete Model 3, indicating that although purifying selection is preponderant, some sites suggest relaxation of functional constraints (Tables S1 and S2).

For the AVPR1a and AVPR1b receptors we found that the number of non-synonymous substitutions is higher than synonymous substitutions. For both receptors the model that better fits their molecular evolution is Model 8, which admits positive selection. Interestingly, the significance of the differences is due to the domesticated animals, since when they are removed from the analyses the significance is lost (Tables 1 and 2). For the domesticated animals, one AVPR1a site (at position 22 of the amino acid chain) is variable in all species ($\omega = 999$), while in AVPR1b, 3% of the sites are under positive selection ($\omega = 2.16$).

Figs. 2 and 3 show the Bayesian analyses and reveal that ECL1 and ICL4 are the most variable domains in respectively the AVPR1a and AVPR1b proteins: the intracellular domain 3 (ICL3) is equally variable in both. Tables 3 and 4 indicated the sites with higher probabilities of being under positive selection in the domesticated species. Note that ECL1 in AVPR1a is an important domain of interaction with the AVP and OXT nonapeptides, presenting four positively selected sites with 19 amino

acid changes, 10% of them classified as moderately radical. Fifty two changes were observed in AVPR1b, 23% of them being moderately radical, and one, present in dog ICL4, is radical (GS = 152). Figures 4a and b illustrate important AVPR1a and AVPR1b interaction and/or positive selected sites.

The domestication phenomenon was not gone unnoticed by Charles Darwin, who was interested in understanding the mechanisms behind this process. In January, 1868, he published the book “The variation of animals and plants under domestication”, devoted to this instigating topic (Darwin, 1868). The genetic basis of domestication, however, is still largely unknown, with some exceptions. SOX6 and PROM1, two modulators of brain development, for instance, showed up regulation in domesticated animals, when they were compared with wild animals (Albert et al., 2012). They suggested that these differences could be related to specific development or maturation of the frontal cortex and retention of juvenile traits and behaviors into adult animals. Furthermore, Albert et al., (2012) identified 28 genes that differ in expression between tame and aggressive rats (*Rattus norvegicus*), subjected to several generations of artificial selection. DLL3 and DHDH are two of these genes whose products can influence tameness and aggression in rats, although the functional consequences of them at the cerebral level are unknown (Albert et al., 2012). The thyroid stimulating hormone receptor (TSHR), that plays a crucial role in metabolic regulation, photoperiod control, and reproduction in vertebrates, on the other hand, was reported to have been under selection during the chicken domestication (Rubin et al., 2010).

We found molecular footprints of positive selection in two of the three vasopressin receptors (AVPR1a and AVPR1b), which could be connected with the domestication process based on selection for tameability, (i.e.adaptation to live with humans in the niches created by them). Note that Yamashita and Kitano (2013) also found higher evolutionary rates in AVPR1a and AVPR1b genes on Eutheria mammals, which is probably due to the presence of domesticated species included in their analyses.

Interestingly, the most variable sites in AVPR1a (Fig. 4a) and AVPR1b (Fig. 4b) are located in important regions for nonapeptide interaction and protein phosphorylation, both processes indispensable for transducing signals across the cell membrane. For example, at position 45, four different residues are found in domesticated animals (Table 3). This site is a neighbor of Arg46, a recognized

binding site for interaction with nonapeptides (Fig. 4a). Fig. 4b shows that all AVPR1b variable sites are located in the loops correspondents the ICL3 and ICL4 domains.

When subjected to systematic selection for tameability, animals evolve in a correlated way. For instance, studies with silver foxes subjected to rigorous artificial selection carried out by Russian researchers for over 50 years, showed concomitant with the loss of the wild-type behavioral response to humans, acquisition of some classical morphological attributes which occur in domesticated animals, such as white spotting, floppy ears, and curly tails (Trut et al., 2009). Additionally, the domesticated foxes presented, in the plasma, reduced basal level of ACTH, an important hormone of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Trut et al., 2009). The ACTH secretion in the HPA axis is modulated by the AVPR1b receptor (Kalsbeek et al., 2012; Terenina et al., 2013). AVPR1b knockout mice showed normal predatory behavior, but also presented a reduced level of attack against individuals of its own species (Wersinger et al., 2007).

These results indicate that the product of AVPR1b may exert a key role in the mammal stress responsiveness and aggressive behavior through their connection with the ACTH hormone and HPA axis. In fact, this association has been demonstrated in pigs (Muráni et al., 2010; Terenina et al., 2013).

Studies with mutant mice null for the AVPR1a, in its turn, revealed that males exhibit a markedly reduced anxiety-like behavior, among other changes in behavioral traits (Keverne and Curley, 2004).

Tameness and the reduction of stress and anxiety signals are traits that have allowed domesticated animals to coexist and coevolve with humans in their constructed niches (Künzl and Sacher, 2009). Our findings suggest for the first time an important role of the AVPR1a and AVPR1b genes in this process. Furthermore, they show that the genetic basis for behavior phenotypes indispensable for domestication could be due to independent mutations. This process can be compared to that of natural convergent evolution, where traits evolve repeatedly as a result of different functional mutations and similar selective pressures. Protas et al., (2006), for example, showed that two albino cavefish species belonging the *Astyanax* genus, presented albinism due to independent mutations in *OCA2*, a known pigmentation gene. Meyer et al. (2013), in turn, suggested distinct molecular paths to the blue iris pigmentation in humans, Japanese macaques, spider monkeys and lemurs.

The mostly conservative results for OXTR and AVPR2 can be attributed to their particularities. AVPR2 is expressed only in kidneys and mediates water homeostasis (Koshimizu et al., 2012; Yamashita and Kitano, 2013). Therefore, its connection with the domestication route seems not to be as clear as in the case of AVPR1a and AVPR1b. OXTR, on the other hand, is the only oxytocin receptor, it is expressed in different organs/tissues, among them the brain, and therefore influences cognitive, emotional, and social functions (Kimura et al., 1992; Gimpl and Fahrenholz, 2001; Caldwell and Young 2006; Yamashita and Kitano, 2013). Based on OXTR role in the central nervous system could be expected its recruitment during the domestication process, but no indications of positive selection could be found by us. Indeed, our results indicated that the evolvability, i.e. the ability of a biological system to evolve, under the domestication process should have been mediated by the two phylogenetic close AVPR1a and AVPR1b gene receptors.

Table 1Estimated parameters under different codon substitution models for *AVPR1a*.

	Model	dN/dS^*	Estimated parameters ^c	ℓ	P-value
Domesticated animals	M0: one-ratio	0.156	$\omega=0.15596$	-3829.66	
			$p_o=0.75059, p_1=0.24686, (p_2=0.00255)$		<0.001
	M3: discrete	2.734	$\omega_o=0.03605, \omega_1=0.64572, \omega_2=998.99883$	-3754.11	
	M1a: neutral	0.2309	$p_o=0.81460, (p_1=0.18540)$ $(\omega_o=0.05580), (\omega_1=1.00000)$	-3762.14	>0.999
	M2a: selection	0.2309	$p_o=0.81460, p_1=0.13803, (p_2=0.04737)$ $(\omega_o=0.05580), (\omega_1=1.00000), \omega_2=1.00000$	-3762.14	
	M7: β	0.1902	$p=0.19445, q=0.82184$	-3759.26	
		$p_o=0.99729, (p_1=0.00271), p=0.20462$		<0.001	
	M8: β & ω	2.893	$q=0.88623, \omega=999.00000$	-3754.08	
Wildlife	M0: one-ratio	0.0889	$\omega=0.08890$	-4608.23	
			$p_o=0.58912, p_1=0.37610, (p_2=0.03479)$		<0.001
	M3: discrete	0.1058	$\omega_o=0.00000, \omega_1=0.18713, \omega_2=1.01905$	-4531.03	
	M1a: neutral	0.1247	$p_o=0.92996, (p_1=0.07004)$ $(\omega_o=0.05877), (\omega_1=1.00000)$	-4557.88	>0.999
	M2a: selection	0.1247	$p_o=0.92996, p_1=0.07004, (p_2=0.00000)$ $(\omega_o=0.05877), (\omega_1=1.00000), \omega_2=57.88326$	-4557.88	
	M7: β	0.1019	$p=0.22738, q=1.91290$	-4535.54	
		$p_o=0.98636, (p_1=0.01364), p=0.26803,$		0.135	
	M8: β & ω	0.1051	$q=2.65888, \omega=1.39744$	-4533.79	
Mammals	M0: one-ratio	0.0992	$\omega=0.09921$	-7665.18	
			$p_o=0.67865, p_1=0.25740, (p_2=0.06394)$		<0.001
	M3: discrete	0.1196	$\omega_o=0.01515, \omega_1=0.22101, \omega_2=0.81930$	-7425.63	
	M1a: neutral	0.1693	$p_o=0.88125, (p_1=0.11875)$ $(\omega_o=0.05740), (\omega_1=1.00000)$	-7497.88	>0.999
	M2a: selection	0.1693	$p_o=0.88125, p_1=0.11701, (p_2=0.00174)$ $(\omega_o=0.05740), (\omega_1=1.00000), \omega_2=1.00000$	-7497.88	
	M7: β	0.1242	$p=0.22725, q=1.54938$	-7428.95	
		$p_o=0.96305, (p_1=0.03695), p=0.29212.$		<0.001	
	M8: β & ω	0.1208	$q=2.91005, \omega=1.00000$	-7424.6	

ω , dN/dS ratio; p , proportion of codons in each ω class; M0-M3: chi-square, $df:4$; M1a-M2a:chi-square, $df:2$; M7-M8: chi-square, $df:2$; dN/dS^* , ω average rate about all codons;

^c Parentheses indicate fixed parameters.

Table 2Estimated parameters under different codon substitution models for *AVPR1b*.

	Model	dN/dS^*	Estimated parameters ^c	ℓ	P-value
Domesticated animals	M0: one-ratio	0.1603	$\omega=0.16030$	-4424.35	
	M3: discrete	0.2282	$p_o=0.77028, p_1=0.21286, (p_2=0.01686)$ $\omega_o=0.05221, \omega_1=0.63518, \omega_2=3.13322$	-4351.47	<0.001
	M1a: neutral	0.2259	$p_o=0.83091, (p_1=0.16909)$ $(\omega_o=0.06832), (\omega_1=1.00000)$	-4354.39	0.368
	M2a: selection	0.2448	$p_o=0.83221, p_1=0.16165, (p_2=0.00614)$ $(\omega_o=0.06981), (\omega_1=1.00000), \omega_2=4.08124$	-4353.81	
	M7: β	0.1973	$p=0.24988, q=1.00575$	-4356.86	
	M8: β & ω	0.2246	$p_o=0.96563, (p_1=0.03437), p=0.34991,$ $q=1.84824, \omega=2.15807$	-4352.74	<0.001
Wildlife	M0: one-ratio	0.1407	$\omega=0.14067$	-4916.61	
	M3: discrete	0.1779	$p_o=0.37923, p_1=0.46172, (p_2=0.15905)$ $\omega_o=0.00000, \omega_1=0.12126, \omega_2=0.76672$	-4830.27	<0.001
	M1a: neutral	0.2134	$p_o=0.84118, (p_1=0.15882)$ $(\omega_o=0.06489), (\omega_1=1.00000)$	-4837.28	>0.999
	M2a: selection	0.2134	$p_o=0.84118, p_1=0.10808, (p_2=0.05074)$ $(\omega_o=0.06489), (\omega_1=1.00000), \omega_2=1.00000$	-4837.28	
	M7: β	0.1719	$p=0.25341, q=1.19992$	-4832.18	
	M8: β & ω	0.1818	$p_o=0.91794, (p_1=0.08206), p=0.37950,$ $q=2.99418, \omega=1.00000$	-4831.01	0.368
Mammals	M0: one-ratio	0.136	$\omega=0.13605$	-8622.57	
	M3: discrete	0.1721	$p_o=0.70711, p_1=0.25456, (p_2=0.03833)$ $\omega_o=0.03592, \omega_1=0.39246, \omega_2=1.22166$	-8389.95	<0.001
	M1a: neutral	0.2367	$p_o=0.81754, (p_1=0.18246)$ $(\omega_o=0.06633), (\omega_1=1.00000)$	-8432.03	>0.999
	M2a: selection	0.2367	$p_o=0.81754, p_1=0.15832, (p_2=0.02414)$ $(\omega_o=0.06633), (\omega_1=1.00000), \omega_2=1.00000$	-8432.03	
	M7: β	0.1694	$p=0.30991, q=1.48796$	-8396.46	
	M8: β & ω	0.1724	$p_o=0.96743, (p_1=0.03257), p=0.37459,$ $q=2.31162, \omega=1.26232$	-8392.03	<0.001

ω , dN/dS ratio; p , proportion of codons in each ω class; M0-M3: chi-square, $df:4$; M1a-M2a:chi-square, $df:2$; M7-M8: chi-square, $df:2$; dN/dS^* , ω average rate about all codons;

^c Parentheses indicate fixed parameters.

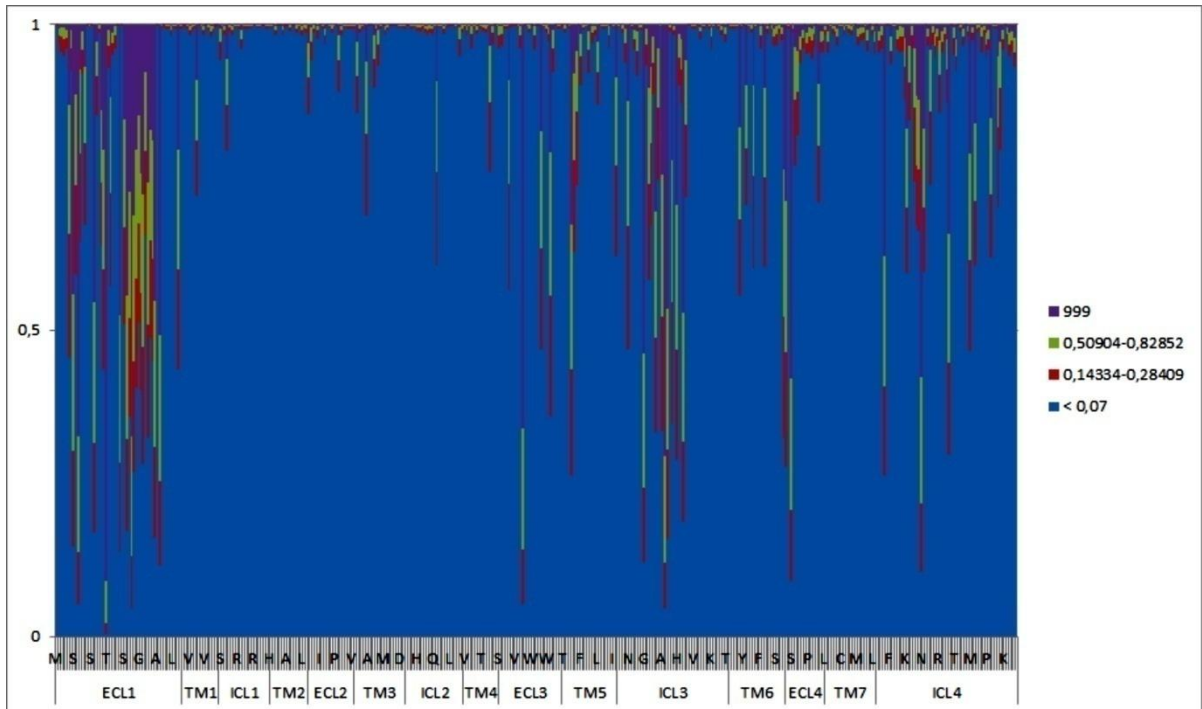


Fig. 2. Bayes Empirical Bayes of Model 8 for *AVPR1a* in domesticated animals. Probability of sites to be under each class of omega's value.

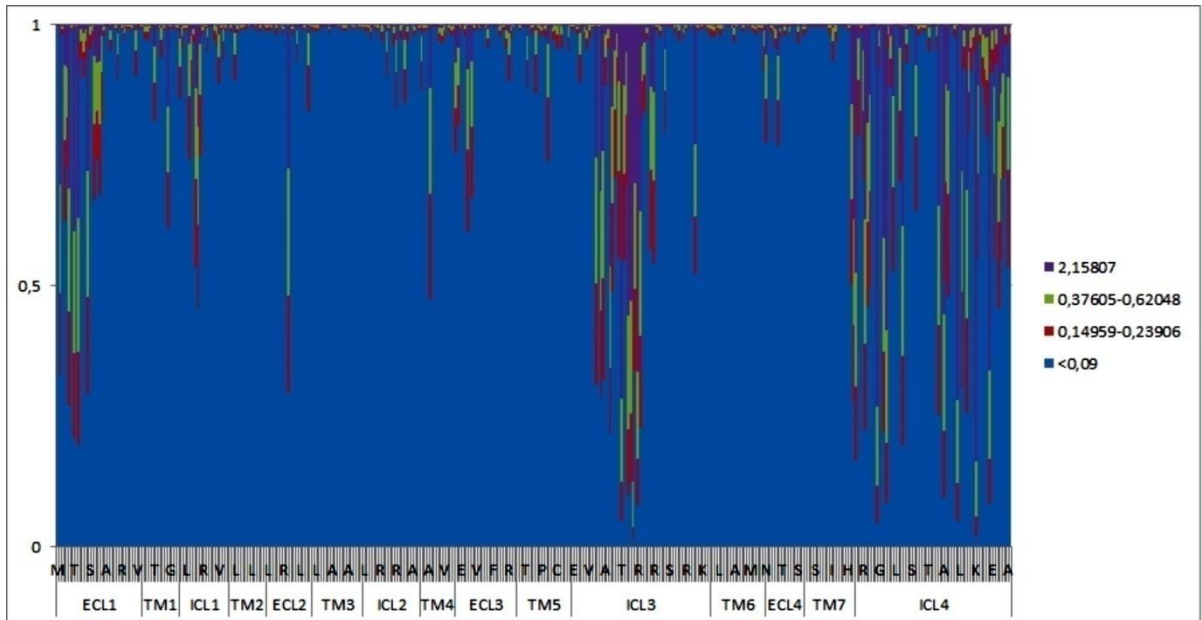


Fig. 3. Bayes Empirical Bayes of Model 8 for *AVPR1b* in domesticated animals. Probability of sites to be under each class of omega's value.

Table 3AVPR1a sites with higher probability of are with ω rate 999 for the Model 8.

Protein domain	Amino acid position	domesticated animals						
		<i>Cavia porcellus</i> GS ¹	<i>Bos taurus</i> GS ¹	<i>Ovis aries</i> GS ¹	<i>Sus scrofa</i> GS ¹	<i>Equus caballus</i> GS ¹	<i>Felis catus</i> GS ¹	<i>Canis familiaris</i> GS ¹
ECL1	10	Gly->Asp (94)	Gly->Glu (98)	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly->Pro (42)
	22	Ala->Thr (58)	Ala->Thr (58)	Ala->Asp (126)	Ala->Asp (126)	Ala	Ala->Leu (96)	Ala->Ser (99)
	33	Glu->Asp (45)	Glu	Glu->Gln (29)	Glu->Gln (29)	Glu->Lys (56)	Glu	Glu->Gly (98)
	45	Val	Val->Thr (69)	Val->Thr (69)	Val->Thr (69)	Val->Leu (32)	Val	Val->Ala (64)
ECL3	201	Tyr->Gln (99)	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr->Arg 77	Tyr->Asn (143)
ICL3	253	Ser	Ser->Gly (56)	Ser->Gly (56)	Ser->Gly (56)	Ser	Ser->Leu (145)	Ser->Leu (145)
	267	Gln->His (24)	Gln->His (24)	Gln->Tyr (99)	Gln->Tyr (99)	Gln->Arg (43)	Gln->His (24)	Gln->Pro (76)
ECL4	321	Ala->Val (64)	Ala->Ser (99)	Ala->Ser (99)	Ala->Ser (99)	Ala->His (86)	Ala->Val (64)	Ala->Val (64)
ICL4	377	Asp	Asp->Asn (23)	Asp->Gly (94)	Asp->Gly (94)	Asp	Asp	Asp

¹ Obtained considering the allele present in the elephant, the most basal species included in this analysis.

Table 4AVPR1b sites with higher probability of are with ω rate 2.1 for the Model 8.

Protein domain	Amino acid position	domesticated animals						
		<i>Cavia porcellus</i> GS ¹	<i>Bos taurus</i> GS ¹	<i>Ovis aries</i> GS ¹	<i>Sus scrofa</i> GS ¹	<i>Equus caballus</i> GS ¹	<i>Felis catus</i> GS ¹	<i>Canis familiaris</i> GS ¹
ICL3	247	Thr	Thr	Thr->Leu (92)	Thr	Thr->Asn (65)	Thr	Thr->Ala (58)
	250	Arg->Lys (26)	Arg	Arg->Gly (125)	Arg->Glu (54)	Arg	Arg	Arg
	251	Pro->Leu (98)	Pro	Pro->His (77)	Pro	Pro	Pro->Met (87)	Pro->Thr (38)
	252	Ser->Leu (145)	Ser	Ser->Leu (145)	Ser->Leu (145)	Ser->Ala (99)	Ser	Ser->Leu (145)
	254	Ser	Ser->Arg (110)	Ser	Ser->Leu (145)	Ser	Ser	Ser
ICL4	358	Glu->Arg (54)	Glu->Gly (98)	Glu->Arg (54)	Glu->Arg (54)	Glu->Gly (98)	Glu->Gly (98)	Glu->Try (152)
	364	Met->Leu (15)	Met	Met	Met->Val (21)	Met	Met->Pro (87)	Met->Ala (84)
	389	Thr->Asn (65)	Thr->Ala (58)	Thr->Ala (58)	Thr->Asn (65)	Thr	Thr->Ala (58)	Thr->Pro (38)
	395	Ser ²	Gly ²	Gly ²	Arg ²	Lys ²	Arg ²	Ser ²
	403	Glu->Ala (107)	Glu->Lys (56)	Glu->Arg (54)	Glu->Gln (29)	Glu->Gln (29)	Glu	Glu
	409	Leu	Leu->Ala (96)	Leu->Thr (92)	Leu->Ser (145)	Leu->Ser (145)	Leu->Ser (145)	Leu->Ser (145)

¹ Obtained considering the allele present in the elephant, the most basal species included in this analysis;

² Amino acid present in domesticated animals. Site of probable insertion on domesticated species or deletion on elephant lineage.

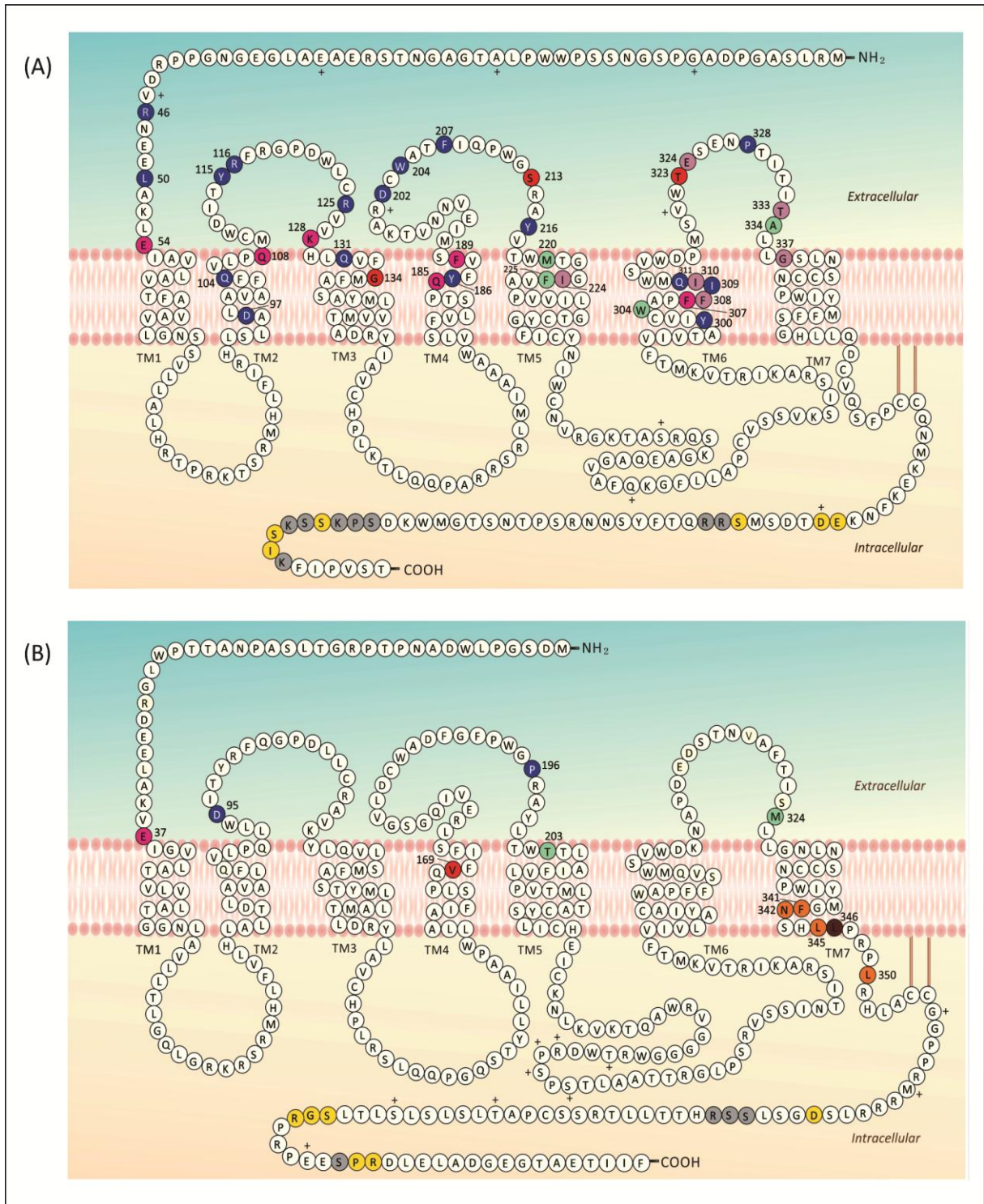


Fig. 4. Situation of important binding sites of AVPR1a (A) and AVPR1b (B) receptors in domesticated animals. Preserved amino acids important for agonist binding, antagonist binding, and both agonist and antagonist binding are colored in blue, green and pink respectively. Amino acids not preserved important for agonist binding are colored in red and antagonist binding are colored in purple. Sites from important motifs to interaction with phosphorylation pathways preserved and altered are colored in gray and yellow, respectively. Preserved sites from reticulum endoplasmic membrane motif are colored in orange, and not preserved in brown; + represents sites under positive selection. Figure adapted from (Koshimizu et al., 2012).

References

- Albert, F.W., Somel, M., Carneiro, M., Aximu-Petri, A., Halbwax., M., Thalmann, O., Blanco-Aguilar, J.A., Plyusnina, I.Z., Trut, L., Villafuerte, R., Ferrand, N., Kaiser, S., Jensen, P., Pääbo, S., 2012. A Comparison of Brain Gene Expression Levels in Domesticated and Wild Animals. *PLoS Genetics* 8, 1-16.
- Caldwell, H.K., Young, W.S., 2006. Oxytocin and vasopressin: genetics and behavioral implications. In: Lim, R. (Ed.), *Neuroactive Proteins and Peptides*. Springer, New York, pp. 573–607.
- Darwin, C., 1868. *The variation of animals and plants under domestication*, vols. I and II. London, UK: John Murray.
- Delport, W., Poon, A.F., Frost, S.D., Kosakovsky Pond, S.L. 2010. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*, v.26, 2455-2457.
- Driscoll, C.A., Macdonald, D.W., Brien, S.J.O., 2009. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 9971-9978.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Ferguson, D.R., 1969. Genetic distribution of vasopressins in the peccary (*Tayassu angulatus*) and warthog (*Phacochoerus aethiopicus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 12, 609-613.
- Finn, R.D., Clements J., Eddy, S.R., 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res.* 39, 29-37.
- Gimpl, G., Fahrenholz, F., 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81, 629-683.
- Grantham, R., 1974. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185, 862-864.
- Jordan, G.E., Piel, W.H., 2008. PhyloWidget: web-based visualizations for the tree of life. *Bioinformatics* 24, 1641-1642.
- Kalsbeek, A., van der Spek, R., Lei, J., Endert, E., Buijs, R.M., Fliers, E. 2012. Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349, 20-29.

- Keverne, E.B., Curley, J.P., 2004. Vasopressin, oxytocin and social behavior. *Neurobiology of behavior* 44, 777-783.
- Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M.J., Okayama, H., 1992. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356, 526-529.
- Koebach, 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, 197-204.
- Koshimizu, T., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., Tanoue, A., 2012. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol. Rev.* 92, 1813–1864.
- Künzl, C., Sachser, N., 2009. The behavioral endocrinology of domestication: A comparison between the domestic guinea pig (*Cavia aperea* f. *porcellus*) and its wild ancestor, the cavy (*Cavia aperea*). *Horm. Behav.* 55, 28-37.
- Larson, G., Burger, J., 2013. A population genetics view of animal domestication. *Trends Genet.* 29, 197-205.
- Lartillot, N., Lepage, T., Blanquart, S., 2009. PhyloBayes 3: a Bayesian software package for phylogenetic reconstruction and molecular dating. *Bioinformatics* 25, 2286-2288.
- Lee, A.G., Cool, D.R., Grunwald, W.C., Neal, J.D.E., Buckmaster, C.L., Michelle Y., Cheng, M.Y., Hyde, S.A., Lyons, D.M., Parker, K.J., 2011. A novel form of oxytocin in New World monkeys. *Biol. Lett.* 7, 584–587.
- Li, W.H., Wu, C.I., Luo, C.C., 1984. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *J. Mol. Evol.* 21, 58-71.
- Louis, A., Muffato, M., Crollius, H.R., 2012. Genomicus: five genome browsers for comparative genomics in eukaryota. *Nucleic Acids Res.* 40, 23-28.
- McCall, C., Singer, T., 2012. The animal and human neuroendocrinology of social cognition, motivation and behavior. *Nat. Neurosci.* 15, 681-688.
- Mota, N.R., Araujo-Jnr, E.V., Paixão-Côrtes, V.R., Bortolini, M.C., Bau, C.H., 2012. Linking dopamine neurotransmission and neurogenesis: The evolutionary history of the NTAD (NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2) gene cluster. *Genet. Mol. Biol.* 35, 912-918.
- Muráni, E., Ponsuksili, S., D'Eath, R.B., Turner, S.P., Kurt, E., Evans, G., Thölking, L., Klont, R., Foury, A., Mormède, P., Wimmers, K., 2010. Association of HPA

- axis-related genetic variation with stress reactivity and aggressive behavior in pigs. *BMC Genet.* 11:74. doi: 10.1186/1471-2156-11-74.
- Penn, O., Privman, E., Ashkenazy, H., Landan, G., Graur, D., Pupko, T., 2010. GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic Acids Res.* 38(Web Server Issue): W23-W28.
- Protas, M.E., Hersey, C., Kochanek, D., Zhou, Y., Wilkens, H., Jeffery, W.R., Zon, L.I., Borowsky, R., Tabin, C.J., 2006. Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nature Genetics* 38, 107 – 111.
- Puig, M., Caceres, M., Ruiz, A., 2004. Silencing of a gene adjacent to the breakpoint of a widespread *Drosophila* inversion by a transposon-induced antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9013-9018
- Rao, V.V., 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, 271-273.
- Rubin, C.J., Zody, M.C., Eriksson, J., Meadows, J.R., Sherwood, E., Webster, M.T., Jiang, L., Ingman, M., Sharpe, T., Ka, S., Hallböök, F., Besnier, F., Carlborg, O., Bed'hom, B., Tixier-Boichard, M., Jensen, P., Siegel, P., Lindblad-Toh, K., Andersson, L., 2010. Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication. *Nature* 464, 587-591.
- Schulz, A., Sangkuhl, K., Lennert, T., Wigger, M., Price, D.A., Nuuja, A., Gruters, A., Schultz, G., Schoneberg, T., 2002. Aminoglycoside pretreatment partially restores the function of truncated V(2) vasopressin receptors found in patients with nephrogenic diabetes insipidus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5247–5257.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Terenina, E., Babigumira, B.M., Mignon, G.L., Bazovkina, D., Rousseau, S., Salin, F., Bendixen, C., Mormede, P., 2013. Association study of molecular polymorphisms in candidate genes related to stress responses with production and meat quality traits in pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 44, 81–97.
- Trut, L., Oskina, I., Kharlamova, A., 2009. Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model. *Bioessays* 31, 349-360.

- Van de Peer, Y., Maere, S., Meyer, A., 2009. The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat. Rev. Genet.* 10, 725-732.
- van Kesteren, R.E., Geraerts, W.P., 1998. Molecular evolution of ligand-binding specificity in the vasopressin/oxytocin receptor family. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 15, 25-34.
- Wallis, M., 2012. Molecular evolution of the neurohypophysial hormone precursors in mammals: Comparative genomics reveals novel mammalian oxytocin and vasopressin analogues. *Gen. Comp. Endocrinol.* 179, 313-318.
- Wersinger, S.R., Caldwell, H., Christiansen, M. & Young, W. 2007. Disruption of the vasopressin 1b receptor gene impairs the attack component of aggressive behavior in mice. *Genes Brain Behav.* 6, 653–660.
- Yang, Z., 2007. PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput. Appl. Biosci.* 24, 1586-1591.
- Yamashita K, Kitano T., 2013. Molecular evolution of the oxytocin-oxytocin receptor system in eutherians. *Mol. Phylogenet. Evol.* 67, 520-528.
- Young, L.J., Flanagan-Cato, L.M., 2012. Editorial comment: Oxytocin, vasopressin and social behavior. *Horm. Behav.* 61, 227-229.
- Zingg, H.H., Laporte, S.A., 2003. The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 222-227.

Web references

- Ensembl BlastView, <<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>>, 05/02/2013.
- Ensembl Genome Browser, <<http://www.ensembl.org/index.html>>, 10/03/2013.
- GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=8496&database=8496>, 15/01/2013.
- Genomicus website v70.01, <<http://www.dyogen.ens.fr/genomicus-70.01/cgi-bin/search.pl>>, 05/02/2013.
- UCSC, <<http://genome.ucsc.edu/>>, 07/02/2013.

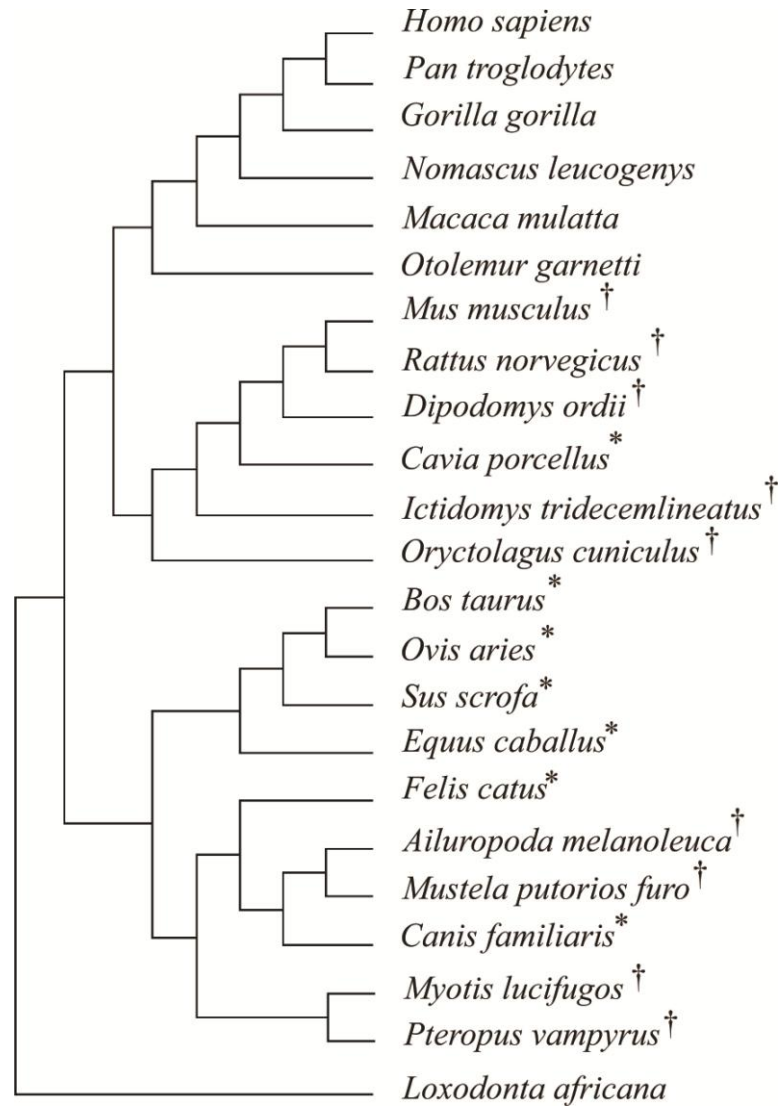


Fig. S1. Phylogenetic tree of mammals including in this study; * represent species of domesticated animals; † wildlife species.

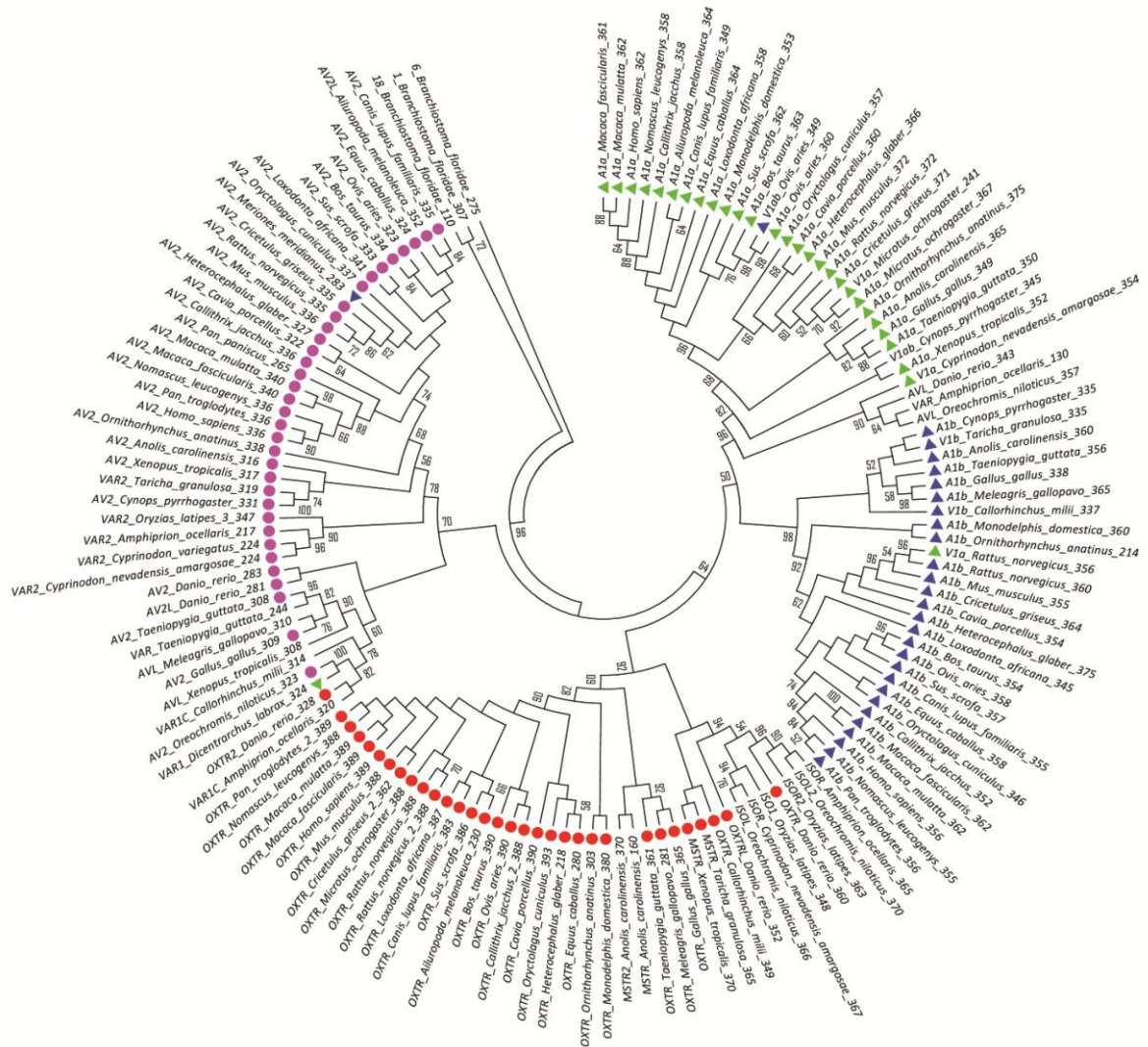


Fig. S2. Phylogenetic tree to the OXTR, AVPR1a, AVPR1b and AVPR2 receptors constructed by Maximum Likelihood method.

Table S1Estimated parameters under different codon substitution models for *OXTR*.

	Model	dN/dS^*	Estimated parameters ^c	ℓ	<i>P</i> -value
Domesticated animals	M0: one-ratio	0.0626	$\omega=0.06261$	-1859.03	
	M3: discrete	0.0902	$p_o=0.77324, p_1=0.19561, (p_2=0.03116)$ $\omega_o=0.00000, \omega_1=0.28165, \omega_2=1.12622$	-1796.71	<0.001
	M1a: neutral	0.1439	$p_o=0.86926, (p_1=0.13074)$ $(\omega_o=0.01509), (\omega_1=1.00000)$	-1806.04	>0.999
	M2a: selection	0.1439	$p_o=0.86926, p_1=0.13074, (p_2=0.00000)$ $(\omega_o=0.01509), (\omega_1=1.00000), \omega_2=15.66687$	-1806.04	
	M7: β	0.0887	$p=0.07844, q=0.77589$	-1797.54	
	M8: β & ω	0.092	$p_o=0.99571, (p_1=0.00429), p=0.08210,$ $q=0.88383, \omega = 2.64911$	-1797.48	>0.999
Wildlife	M0: one-ratio	0.0217	$\omega=0.02167$	-2790.6	
	M3: discrete	0.0254	$p_o=0.65207, p_1=0.24155, (p_2=0.10638)$ $\omega_o=0.00002, \omega_1=0.02571, \omega_2=0.18028$	-2760.09	<0.001
	M1a: neutral	0.0404	$p_o=0.97636, (p_1=0.02364)$ $(\omega_o=0.01716), (\omega_1=1.00000)$	-2780.05	>0.999
	M2a: selection	0.0404	$p_o=0.97636, p_1=0.02364, (p_2=0.00000)$ $(\omega_o=0.01716), (\omega_1=1.00000), \omega_2=12.52510$	-2780.05	
	M7: β	0.0254	$p=0.11508, q=3.72048$	-2760.11	
	M8: β & ω	0.0255	$p_o=0.99999, (p_1=0.00001), p=0.11508,$ $q=3.72103, \omega = 1.00000$	-2760.11	>0.999
Mammals	M0: one-ratio	0.0334	$\omega=0.03343$	-3023.16	
	M3: discrete	0.0439	$p_o=0.78880, p_1=0.14668, (p_2=0.06452)$ $\omega_o=0.00141, \omega_1=0.11512, \omega_2=0.40139$	-2894.47	<0.001
	M1a: neutral	0.0884	$p_o=0.92901, (p_1=0.07099)$ $(\omega_o=0.01880), (\omega_1=1.00000)$	-2952.57	>0.999
	M2a: selection	0.0885	$p_o=0.92901, p_1=0.07099, (p_2=0.00000)$ $(\omega_o=0.01880), (\omega_1=1.00000), \omega_2=99.84864$	-2952.57	
	M7: β	0.0471	$p=0.09381, q=1.66636$	-2895.6	
	M8: β & ω	0.0471	$p_o=0.99999, (p_1=0.00001), p=0.09381,$ $q=1.66645, \omega = 1.00000$	-2895.6	>0.999

ω , dN/dS ratio; p , proportion of codons in each ω class; M0-M3: chi-square, $df:4$; M1a-M2a:chi-square, $df:2$; M7-M8: chi-square, $df:2$;
 dN/dS^* , ω average rate about all codons;

^c Parentheses indicate fixed parameters.

Table S2Estimated parameters under different codon substitution models for *AVPR2*.

	Model	dN/dS^*	Estimated parameters ^c	ℓ	<i>P</i> -value
Domesticated animals	M0: one-ratio	0.0626	$\omega=0.06261$	-1859.03	
	M3: discrete	0.0902	$p_0=0.77324, p_1=0.19561, (p_2=0.03116)$ $\omega_0=0.00000, \omega_1=0.28165, \omega_2=1.12622$	-1796.71	<0.001
	M1a: neutral	0.1439	$p_0=0.86926, (p_1=0.13074)$ $(\omega_0=0.01509), (\omega_1=1.00000)$	-1806.04	>0.999
	M2a: selection	0.1439	$p_0=0.86926, p_1=0.13074, (p_2=0.00000)$ $(\omega_0=0.01509), (\omega_1=1.00000), \omega_2=15.66687$	-1806.04	
	M7: β	0.0887	$p=0.07844, q=0.77589$	-1797.54	
	M8: β & ω	0.092	$p_0=0.99571, (p_1=0.00429), p=0.08210,$ $q=0.88383, \omega =2.64911$	-1797.48	>0.999
Wildlife	M0: one-ratio	0.0217	$\omega=0.02167$	-2790.6	
	M3: discrete	0.0254	$p_0=0.65207, p_1=0.24155, (p_2=0.10638)$ $\omega_0=0.00002, \omega_1=0.02571, \omega_2=0.18028$	-2760.09	<0.001
	M1a: neutral	0.0404	$p_0=0.97636, (p_1=0.02364)$ $(\omega_0=0.01716), (\omega_1=1.00000)$	-2780.05	>0.999
	M2a: selection	0.0404	$p_0=0.97636, p_1=0.02364, (p_2=0.00000)$ $(\omega_0=0.01716), (\omega_1=1.00000), \omega_2=12.52510$	-2780.05	
	M7: β	0.0254	$p=0.11508, q=3.72048$	-2760.11	
	M8: β & ω	0.0255	$p_0=0.99999, (p_1=0.00001), p=0.11508,$ $q=3.72103, \omega =1.00000$	-2760.11	>0.999
Mammals	M0: one-ratio	0.0334	$\omega=0.03343$	-3023.16	
	M3: discrete	0.0439	$p_0=0.78880, p_1=0.14668, (p_2=0.06452)$ $\omega_0=0.00141, \omega_1=0.11512, \omega_2=0.40139$	-2894.47	<0.001
	M1a: neutral	0.0884	$p_0=0.92901, (p_1=0.07099)$ $(\omega_0=0.01880), (\omega_1=1.00000)$	-2952.57	>0.999
	M2a: selection	0.0885	$p_0=0.92901, p_1=0.07099, (p_2=0.00000)$ $(\omega_0=0.01880), (\omega_1=1.00000), \omega_2=99.84864$	-2952.57	
	M7: β	0.0471	$p=0.09381, q=1.66636$	-2895.6	
	M8: β & ω	0.0471	$p_0=0.99999, (p_1=0.00001), p=0.09381,$ $q=1.66645, \omega =1.00000$	-2895.6	>0.999

ω , dN/dS ratio; p , proportion of codons in each ω class; M0-M3: chi-square, $df:4$; M1a-M2a:chi-square, $df:2$; M7-M8: chi-square, $df:2$;

dN/dS^* , ω average rate about all codons;

^c Parentheses indicate fixed parameters.

CAPÍTULO II

Artigo científico: Variação e evolução molecular do gene do receptor da oxitocina em *Ovis aries*

Paré P, Paixão-Cortes V, Vargas-Pinilla P, Tovo-Rodrigues L; Salzano FM, Bortolini MC e Henkes LE

Em preparação (dados preliminares)

1 INTRODUÇÃO

A domesticação de plantas e animais, através da seleção artificial, instrumentalizou os humanos modernos a serem agentes de sua própria evolução. Pode-se dizer inclusive, que foi devido à domesticação, que bandos de caçadores coletores passaram a ter uma vida sedentária, surgindo com ela todo o processo civilizatório que hoje nos caracteriza.

Importantes espécies vinculadas à pecuária foram domesticadas na região do Crescente Fértil e adjacências, a cerca de 12.000 anos antes do presente. Dentre as espécies domesticadas neste período e nesta região estaria a *Ovis aries*, selecionada a partir de sua provável ancestral *Ovis orientalis* (DRISCOLL et al., 2009).

Até recentemente, no entanto, os ovinos dentre os animais da pecuária, eram os menos estudados do ponto de vista genético. Atualmente o consórcio internacional “*The International Sheep Genomics Sequencing Consortium*” (<http://www.sheephapmap.org/refgenome.php>) busca suprir essa lacuna, fornecendo dados sobre a variabilidade de várias raças da espécie *Ovis aries*. Alguns estudos, vinculados ao Consórcio, tem fornecido dados instigantes. KIJAS et al., (2009), por exemplo, mostraram que a estrutura genética de ovinos reflete sua domesticação e posterior formação em raças distintas. Especificamente, as populações de raças africanas e asiáticas agruparam-se separadamente das raças de origem europeia, amostradas na Austrália, Nova Zelândia, Europa e América do Norte. Além disso, os autores também demonstraram a presença de estratificação dentro de algumas raças de ovinos. Para finalizar, os autores salientam que a identificação de um subconjunto de SNPs capaz de alocar indivíduos em grandes agrupamentos demonstra que até mesmo um pequeno painel de marcadores genéticos pode ser adequado para aplicações práticas, tais como rastreabilidade. KIJAS et al. (2012), mais recentemente, avaliaram cerca de 40 mil SNPs em 74 raças de ovinos, incluindo a denominada “Crioula”, e detectaram sinais de seleção positiva, provavelmente fruto da seleção artificial, em regiões que contém genes com papel na pigmentação, tamanho do corpo, reprodução e produção de leite. Sinal claro da domesticação foi encontrado no gene *RXFP2*, relacionado com a remoção dos cornos.

Independente desses esforços, o conhecimento sobre o genoma de *Ovis aries*, bem como sobre variações dentro da espécie, continua bastante incompleto. O presente estudo pretende fornecer dados sobre sequências das regiões codificantes e adjacentes do gene do receptor da oxitocina (*OXTR*) em três raças ovinas: Crioula Lanada, Ile de France e Ideal. Este gene está localizado no cromossomo 19 nos ovinos, e é composto por 2 éxons codificantes. O produto deste gene, *OXTR*, é o único receptor da oxitocina (*OXT*), e media a atuação da mesma, seja como hormônio ou neurotransmissor, em diferentes órgãos e tecidos nos mamíferos. *OXTR* pertence à classe 1 da família dos receptores acoplados as proteínas G (GPCRs), e é composto por 4 domínios extracelulares, 4 domínios intracelulares, e 7 domínios transmembrana (BOCKAERT & PIN, 1999). A atuação de *OXTR* está bastante relacionada a fenótipos de interesse do presente artigo, tais como traços reprodutivos e cuidado com a prole, características fundamentais para práticas de manejo em animais de interesse econômico. Vale destacar ainda que variantes genéticas no sistema *OXT/OXTR* têm sido associadas com traços de produção, tais como a qualidade da carne, através de uma conexão com o estresse do animal no momento que antecede o abate (TERENINA et al., 2013).

Finalmente, é importante destacar que *OXT/OXTR* pertencem a uma rede de genes parálogos, cujos produtos atuam em diversas funções fisiológicas e de comportamento que podem ser bastante específicas, mas também podem se sobrepor, como é o caso da vasopressina (*AVP*) e de seus três receptores (*AVPR1a*, *AVPR1b* e *AVPR2*).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras de DNA e sequenciamento

As amostras de sangue da espécie *Ovis aries* foram obtidas através do rebanho de conservação da Universidade Federal do Pampa e Colaboradores para as raças: Crioula Lanada (N=35), Ile de France (N=6) e Ideal (N=5). O DNA foi extraído no Laboratório de Evolução Humana e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, utilizando o método adaptado de (LAHIRI & NURNBERGER, 1991). Foram amplificadas as regiões codificantes e adjacentes do gene *OXTR* da espécie *Ovis aries* utilizando três conjuntos de *primers* (Tabela 1), os quais foram

confeccionados tendo como referência o mRNA da ovelha (GenBank: HM856597.1) usando o software Fast-PCR (KALENDAR et al., 2011). O sucesso das amplificações foi verificado através de eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) e corante Brometo de Etídio. A verificação do gel segue por meio de um transluminador (Emissor de Ultravioleta). O sequenciamento foi realizado através do equipamento ABI3730XL, de acordo com condições descritas pelo fabricante. A verificação da qualidade das sequências e o alinhamento foi realizado no programa Códon Code Aligner (versão 4.0).

2.2 Análise de Dados

As sequências de *OXTR* dos ovinos estudados foram comparadas às sequências nucleotídicas dos animais filogeneticamente mais relacionados: vaca (*Bos taurus*), porco (*Sus scrofa*), golfinho (*Tursiops truncatus*) e cavalo (*Equus caballus*), tendo como referência o furão (*Mustela putorius furo*) que é um organismo filogeneticamente próximo aos animais acima citados, mas que pertence a outro ramo mais basal da filogenia. As sequências de *OXTR* foram alinhadas utilizando o programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). 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 à suas composições, polaridades e volumes moleculares. Li, (1984) classificou estes valores (Grantham Score) como: conservador (de 0 a 50), moderadamente conservador (de 51 a 100), moderadamente radical (de 101 a 150) ou radical (≥ 151).

2.2.1 Análise estatística

Para detectar desvios no padrão de evolução neutro foram utilizados os testes: Ka/Ks, McDonalds e Kreitman, Fu e Li's F^* , e HKA usando o programa DNAsp (ROZAS et al. 2003).

2.2.2 Predição de proteínas

O programa PONDR-VLXT (Predictor Of Naturally Disordered Regions; <http://pondr.com/pondr-tut2.html>; LI et al., 1999; ROMERO et al., 2001; ROMERO et

al., 1997) foi utilizado para estimar o grau de desordem das proteínas. A predição de sítios lineares de interação foi realizada através do programa ELM (The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins; <http://elm.eu.org/>; DINKEL et al., 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento foi realizado com sucesso para todos os conjuntos de *primers* confeccionados, cobrindo inteiramente os dois éxons de *OXTR* e também regiões adjacentes, não codificadoras. Foi obtido um total de 1644 pares de base (pb) para *OXTR* da espécie *Ovis aries*, em que 1173 (pb) correspondem a regiões codificantes e 471 (pb) as regiões não codificantes. Entre as mutações observadas 6 estão localizadas em regiões codificantes, sendo 3 não sinônimas, conforme mostra a sequência consenso para as raças estudadas (Figuras 1 e 2). Uma deleção de 9 nucleotídeos na região codificadora e uma substituição na região não codificante foram observadas nas raças Ile de France e Crioula Lanada, respectivamente. As frequências gênicas e alélicas para as mutações encontradas nas regiões codificantes de *OXTR* são mostradas na Tabela 2. É possível observar que todas variantes de aminoácidos estão localizadas na região intracelular 3 da proteína (ICL3), a qual é conhecida por ser importante para a interação com as proteínas G (ZINGG & LAPORTE, 2003).

É possível constatar ainda que todas as modificações detectadas em *Ovis aries* não estão fixadas, ou seja, compartilham-se como polimorfismos intra-raça-específicos. Considerando todas as mudanças encontradas em *Ovis aries*, e que foi possível calcular os valores da matriz de Grantham (comparando-se com o furão), constata-se que uma modificação é moderadamente radical (posição 243, Glu>Ala), outra moderadamente conservada (244Ala>Ser) e outra conservada (259Ala>Pro).

Embora haja variação entre as raças, a falta de significância em McDonalds e Kreitman ($p= 0.15647$), Fu e Li's F^* teste (intraespecífico, $p= 0.60126$; com outgroup, $p= 0.46806$) e em HKA ($p= 0.8134$) indica que as mudanças podem estar flutuando de maneira neutra.

Não obstante, os baixos valores de Ka/Ks dentro das raças indicam que a seleção purificadora também está atuando. Ou seja, somente alelos neutros estão passando ao crivo da seleção purificadora. Este padrão de conservação tanto nas

ovelhas Crioulas, que tradicionalmente estão menos sujeitas a uma seleção artificial rigorosa, quanto nas outras duas raças que são selecionadas para corte e lã, sugere que *OXTR* pode não ter sido cooptado no processo de domesticação em ovinos.

Contudo, mais estudos serão necessários para avaliar o real impacto das mudanças aqui descritas com características específicas de cada raça. As análises com as predições de proteínas revelaram dados instigantes nesse sentido. Conforme já mencionado todas as mutações encontradas estão localizadas na região ICL3 da proteína, que é importante para interação tanto com as proteínas G, quanto com outras vias de sinalização celular. Portanto, esse domínio foi investigado quanto a sua desordem, topologia e formação de possíveis sítios de interação. Os resultados indicam que as mutações encontradas no domínio ICL3 não modificam o grau de desordem dessa região, ou a topologia da proteína. Porém resultados interessantes foram observados quanto à formação de sítios de interação com outras proteínas. Na raça Ile de France as mutações observadas resultam na formação de um novo motivo de interação com a proteína GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*), uma quinase que regula o metabolismo corporal por fosforilação de glicogênio sintase (GS) e outros substratos. Os resultados sugerem que a deleção observada nessa raça, seguida pela substituição não sinônima 242Ala->Ser são determinantes para a formação desse motivo. As pesquisas envolvendo GSK3 ainda estão em fase inicial, mas já foi demonstrado que GSK3 regula o receptor de serotonina, aumentando o seu tempo de exposição na superfície celular, tornando-o mais disponível para interações (CHEN et al., 2009). Assim, a deleção teria um potencial efeito de introduzir um sítio adicional para fosforilação de *OXTR*. A implicação disso em nível fenotípico requer evidentemente mais investigação.

Vale destacar que é possível que genes parálogos ao receptor da oxitocina (*AVPR1a*, *AVPR1b*), possam estar envolvidos no processo de domesticação, de modo que o sistema evolua por rotas que não envolvam *OXTR*. De fato, temos achados evidências neste sentido (Paré et al., Capítulo I desta dissertação).



Figura 1 – Sequência consenso das regiões codificantes de *OXTR*. *; Indica os sítios em que há mutação.



Figura 2 – Variações intraespecíficas não sinônimas em *Ovis aries*, * indica as substituições não sinônimas.

Tabela 1 – Primers utilizados para a amplificação do gene *OXTR*.

Nome do Primer	Forward	Reverse	Tamanho do Fragmento (bp)
P1a	GCCGCGGTCATGGAGGGCGC	GACCGGCACAATGTAGACGGCGAG	580
P2	CAGGTGCACATCTTCTCGCTGC	AGAACAATCCACGAAGCCCGCAA	516
P3	CCTGCTGGGTCACTCATTGAGAACAG	ACCAAGAGCCAGACTGTCGCTG	897

Tabela 2 - Frequências genotípicas e alélicas para os sítios polimórficos das regiões codificantes de *OXTR*.

Gene <i>OXTR</i>	Mutações																															
	<i>E1 333†</i>		<i>E1 709-717†</i>		<i>E1 722†</i>		<i>E1 723†</i>		<i>E1 724†</i>		<i>E1 769†</i>		<i>E2 1128†</i>																			
	Freq. Genotípico	Freq. Alélica	Freq. Gen.	Freq. Alél.	Freq. Genotípico	Freq. Alélica	Freq. Genotípico	Freq. Alélica	Freq. Genotípico	Freq. Alélica	Freq. Genotípico	Freq. Alélica	Freq. Genotípico	Freq. Alélica																		
RAÇAS	CC	GC	GG	G	C	DELINS	DELINS	CC	AC	AA	A	C	CC	GC	GG	G	C	GG	GT	TT	G	T	CC	GC	GG	G	C	CC	CT	TT	T	C
CRIOULA LANADA N= (35)	0,05	0,11	0,82	0,88	0,12	0	0	0	0	1	1	-	0	0,03	0,97	0,99	0,01	1	0	0	1	-	0	0,1	0,9	0,95	0,05	0,67	0,26	0,07	0,2	0,8
ILE DE FRANCE N=(6)	0	0,33	0,67	0,83	0,17	0,1	0,08	0,1	0	0,9	0,83	0,17	0	0,33	0,67	0,83	0,17	0,5	0	0,5	0,5	0,5	0	0	1	1	-	1	0	0	-	1
IDEAL N= (5)	0	0	1	1	-	0	0	0	0	1	1	-	0	0	1	1	-	1	0	0	1	-	0	0	1	1	-	0,6	0,4	0	0,2	0,8

†; Posição na sequência do gene *OXTR*; E: éxon.

Tabela 3 - Comparação das mutações não sinônimas encontradas em *OXTR* na espécie *Ovis aries* com animais filogeneticamente mais relacionados.

Domínio da Proteína (codificado pelo)	Mutações em <i>OXTR</i>	Grantham Score	Domesticados							Ordem Perissodactyla
			Superordem Ungulata						Ordem Cetartiodactyla	
			Ordem Cetartiodactyla							
Aminoácido		Não domesticado	<i>Ovis aries</i>							
			<i>Tursiops truncatus</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Crioula Lanada</i> N=(35)	<i>Ile de France</i> N=(6)	<i>Ideal</i> N=(5)	<i>Sus scrofa</i>	<i>Equus caballus</i>	
Intracelular 3 (Éxon 1)	239-241 Ala-Ala-Ala->Del	n	0	0	0	0/1 (0.9/0.1)	0	-	-	
	239-241 Ala-Ala-Ala->Ala-Glu-Ala	n/107/n	-	-	-	-	-	1	-	
	239-241 Ala-Ala-Ala->Ala-Ala-Del	n	-	-	-	-	-	-	1	
	243 Glu->Ala	107	0	0	0	0/1 (0.7/0.3)	0	0	0	
	244 Ala->Ser	99	0	0	0	0/1 (0.7/0.3)	0	0	0	
	259 Ala->Pro	27	-	0	0/1 (0.8/0.2)	0	0	0	0	
	259 Ala->Gly	60	1	-	-	-	-	-	-	

O número "1" indica a presença de um alelo diferente daquele visto no furão, um animal filogeneticamente próximo, mas pertencente a um grupo externo e mais basal com relação aos animais aqui comparados, enquanto que "0" indica o alelo presente no furão; n; Não se aplica.

REFERÊNCIAS

BOCKAERT, J.; PIN, J.P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal*, v.18, n.7, p. 1723-1729, 1999.

CHEN, L.; SALINAS, G.D.; LI, X. Regulation of serotonin 1B receptor by glycogen synthase kinase-3. *Molecular pharmacology*, v.76, n.6, p. 1150-1161, 2009.

DINKEL, H.; MICHAEL, S.; WEATHERITT, R.J.; DAVEY, N.E.; VAN ROEY, K.; ALTENBERG, B.; TOEDT, G.; UYAR, B.; SEILER, M.; BUDD, A.; JÖDICKE, L.; DAMMERT, M.A.; SCHROETER, C.; HAMMER, M.; SCHMIDT, T.; JEHL, P.; MCGUIGAN, C.; DYMECKA, M.; CHICA, C.; LUCK, K.; VIA, A.; CHATRYAMONTRI, A.; HASLAM, N.; GREBNEV, G.; EDWARDS, R.J.; STEINMETZ, M.O.; MEISELBACH, H.; DIELLA, F.; GIBSON, T.J. ELM-the database of eukaryotic linear motifs. *Nucleic acids research*, v.40, p.242-251, 2012.

DRISCOLL, C.A.; MACDONALD, D.W.; BRIEN, S.J.O. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 106, 9971-9978, 2009.

HUFFMAN, B. In: Ultimate Ungulate. Disponível em:

<<http://www.ultimateungulate.com/index.html>> Acesso em 22/05/2013.

GRANTHAM, R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*, v.185, n. 4154, p. 862-864, 1974.

KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A.H. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*, v.98, n.2, p. 137-144, 2011.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.I.JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids research*, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LI, W.H.; WU, C.I.; LUO, C.C. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *Journal of molecular evolution*, v. 21, n. 1, p.58-71, 1984.

LI, X.; ROMERO, P.; RANI, M.; DUNKER, A.K.; Obradovic, Z. Predicting Protein Disorder for N-, C-, and Internal Regions. *Genome Information. Workshop on Genome Informatics*, v.10, p. 30-40, 1999.

ROMERO, P.; OBRADOVIC, Z.; LI, X.; GARNER, E.; BROWN, C.; DUNKER, A. K. Sequence complexity of disordered protein. *Proteins: structure, function and genetics*, v.48, p.38-48, 2001.

ROMERO, P.; OBRADOVIC, Z.; DUNKER, A. K. Sequence data analysis for long disordered regions prediction in the calcineurin family. *Genome informatics*, v.8, p.110-124, 1997.

ROZAS, J.; SANCHEZ-DELBARRIO, J.C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, v.19, n. 18, p. 2496-2497, 2003.

TAMURA, K.; PERTERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular biology and evolution*, v. 28, n.10, p. 2731-2739, 2011.

The International Sheep Genomics Sequencing Consortium. Disponível em <<http://www.sheephapmap.org/refgenome.php>> Acesso em: 20/05/2013.

TERENINA, E.; BABIGUMIRA, B.M.; MIGNON, G.L.; BAZOVKINA, D.; ROUSSEAU, S.; SALIN, F.; BENDIXEN, C.; MORMEDE, P. Association study of molecular polymorphisms in candidate genes related to stress responses with production and meat quality traits in pigs. *Domest. animal endocrinology*, v.44, n.2, p. 81–97, 2013.

ZINGG, H.H.; LAPORTE, A.S. The oxytocin receptor. Trends in endocrinology and metabolism, v. 14, n. 5, p. 222- 227, 2003.

4 CONCLUSÃO

Conforme já mencionado, a origem dos genes *OXT* e *AVP* ocorreu a partir de duplicações em *tandem* de um gene no ancestral comum dos vertebrados mandibulados (GWEE et al., 2009). Já a evolução molecular dos receptores (*OXTR*, *AVPR1a*, *AVPR1b* e *AVPR2*) é menos conhecida. Aqui nós propomos um cenário que supre essa lacuna. Através dos dados filogenéticos, de sintenia e vizinhança, sugerimos que o bloco sintênico no qual fazem parte *OXTR*, *AVPR1a*, *AVPR1b* e *AVPR2* emergiu com o ancestral comum dos vertebrados no primeiro evento de duplicação do genoma. Sendo assim, primeiramente surgiram dois genes: o ancestral de *AVPR1a* e *AVPR1b* e o ancestral de *OXTR* e *AVPR2*. Os quatro receptores observados hoje se originaram após o segundo evento de duplicação que ocorreu antes da emergência dos vertebrados. Note que, esse cenário completa o que foi proposto por Yamashita e Kitano, (2013) que não obteve uma clara resolução da evolução molecular desses receptores. Outro achado marcante de nosso estudo foi que os receptores estão sempre no mesmo cromossomo que os genes codificadores de proteínas de ativação Rho GTPase, as quais desempenham um importante papel na morfogênese neuronal e migração durante o desenvolvimento cerebral. Blocos de genes relacionados com funções cerebrais têm sido associados a aspectos envolvidos no surgimento de novidades adaptativas nos tetrápodes, como outro estudo de nosso grupo de pesquisa já demonstrou (MOTA et al., 2012). Funções específicas dos receptores podem, por sua vez, terem surgido na transição de vertebrados não-mandibulados para mandibulados, ajustando-se evolutivamente a duplicação em *tandem* de *OXT* e *AVP*.

Além disso, foram observadas sinais de seleção envolvendo o processo de domesticação, assim que, os genes *AVPR1a* e *AVPR1b* demonstraram estar sob seleção positiva nos animais domesticados. Embora outros genes já tenham sido associados à domesticação animal, envolvendo processos cerebrais (*SOX6*, *PROM1*; ALBERT et al., 2012), pela primeira vez são demonstradas evidências da cooptação dos genes *AVPR1a* e *AVPR1b*, e respectivamente seus produtos com forte atuação no comportamento e modulação do estresse via eixo-HPA, num contexto mais amplo, provavelmente envolvendo evolução convergente. O gene *OXTR*, por sua vez, está envolvido numa série de comportamentos sociais, além de desempenhar importantes funções fisiológicas, e, portanto, seria um forte candidato

a estar sob seleção positiva nos animais domesticados. Contudo, os resultados indicam que *OXTR*, assim como *AVPR2* são mais conservados. Nossos achados com o gene *OXTR* na espécie *Ovis aries*, indicaram que mesmo havendo variação, não há uma quebra no padrão de evolução neutro com sinal de seleção purificadora, reforçando a ideia que o sistema todo está evoluindo via os dois receptores de AVP, cuja origem filogenética é comum, *AVPR1a* e *AVPR1b*.

REFERÊNCIAS

- ACHER, R.; CHAUVET, J.; CHAUVET, M.T. Man and the chimaera. Selective versus neutral oxytocin evolution. *Advances in experimental medicine and biology*, v.395, p. 615-627, 1995.
- ANDERS, S. M. V.; GOLDEY, K. L.; KUO, P. X. The Steroid/Peptide Theory of Social Bonds: Integrating testosterone and peptide responses for classifying social behavioral contexts. *Psychoneuroendocrinology*, v. 36, n.9, p. 1265-1275, 2011.
- BARBERIS, C.; MOUILLAC, B.; DURROUX, T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *The Journal of Endocrinology*, v. 156, n.2, p. 223-229, 1998.
- BIRNBAUMER, M.; SEIBOLD, A.; GILBERT, S.; ISHIDO, M.; BARBERIS, C.; ANTARAMIAN, A.; BRABET, P.; ROSENTHAL, W. Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature*, v. 357, n. 6376, p. 333-335, 1992.
- BOISSERIE, J.R.; LIHOREAU, F.; BRUNET, M. The position of Hippopotamidae within Cetartiodactyla. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.102, n.5, p. 1537-1541, 2005.
- BOCKAERT, J.; PIN, J.P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal*, v.18, n.7, p. 1723-1729, 1999.
- BROWNSTEIN, M.J.; RUSSELL, J.T.; GAINER, H. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science*, v. 207, n. 4429, p. 373-378, 1980.
- CHESSA, B.; PEREIRA, F.; ARNAUD, F.; AMORIM, A.; GOYACHE, F.; MAINLAND, I.; KAO, R.R.; PEMBERTON, J.M.; BERALDI, D.; STEAR, M.J.; ALBERTI, A. PITTAU, M.; IANNUZZI, L.; BANABAZI, M.H.; KAZWALA, R.R.; ZHANG, Y.P.; ARRANZ, J.J.; ALI, B.A.; WANG, Z.; UZUN, M.; DIONE, M.M.; OLSAKER, I.; HOLM, L.E.; SAARMA, U.; AHMAD, S.; MARZANOV, N.; EYTHORS DOTTIR, E.; HOLLAND, M.J.; AJMONE-MARSAN, P.; BRUFORD, M.W.; KANTANEN, J.; SPENCER, T.E.; PALMARINI, M. Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. *Science*, v. 324, n. 5926, p. 532-536, 2009.
- CHRISTOFFELS, A.; KOH, E.G.L.; CHIA, J., BRENNER, S.; APARICIO, S.; VENKATESH, B. Fugu Genome Analysis Provides Evidence for a Whole-Genome Duplication Early During the Evolution of Ray-Finned Fishes. *Molecular biology evolution*, v. 21, n. 6, p. 1146-1151, 2004.
- CROCKFORD, C.; WITTIG, R.M.; LANGERGRABER, K.; ZIEGLER, T.E.; ZUBERBÜHLER, K.; DESCHNER, T. Urinary oxytocin and social bonding in related and unrelated wild chimpanzees. *Proceedings. biological science/Royal Society*, v. 280, n. 1755, doi: 10.1098/rspb.2012.2765, 2013.
- DALE, H.H. On some physiological actions of ergot. *The Journal of physiology*, v.34, n.3, 163-206, 1906.

DRISCOLL, C.A.; MACDONALD, D.W.; BRIEN, S.J.O. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 106, p. 9971-9978, 2009.

EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.N. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. *Archivos de Zootecnia*, v.51, p 39-52, 2002.

FERGUSON, D.R. Genetic distribution of vasopressins in the peccary (*Tayassu angulatus*) and warthog (*Phacochoerus aethiopicus*). *General and Comparative Endocrinology*, v.12, n.3, p. 609-613, 1969.

GABOR, C.S.; PHAN, A.; CLIPPERTON-ALLEN, A.E.; KAVALIERS, M., CHOLERIS, E. Interplay of Oxytocin, Vasopressin, and Sex Hormones in the Regulation of Social Recognition. *Behavioral Neuroscience*, v. 126, n. 1, p. 97-109. 2012.

GIMPL, G., FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*, v. 81, n. 2, p.629-683, 2001.

GONÇALVES, A.L.; MOREIRA, G.R.P.; FREITAS, T.R.O.; HEPP, D.; PASSOS, T.D.; WEIMER, T.A. Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal population differentiation in Brazilian Creole sheep. *Animal Genetics*, v. 41, n.3, p. 308-310, 2010.

GRUBER, C.W.; MUTTENTHALER, M. Discovery of defense- and neuropeptides in social ants by genome-mining. *PloS one*, v.7, n.3, doi: 10.1371/journal.pone.0032559, 2012.

GWEE, P.C.; TAY, B.H.; BRENNER, S.; VENKATESH, B. Characterization of the neurohypophysial hormone gene loci in elephant shark and the Japanese lamprey: origin of the vertebrate neurohypophysial hormone genes. *BMC evolutionary biology*, v. 47, n. 9, p. 1471-2148, 2009.

HENKES, L.E.; WEIMER, T.A.; FRANCO, M.H.L.P.; MORAES, J.C.F. Genetic characterization of the Crioula Lanada sheep from southern Brazil. *Revista Brasileira de Genética*, v. 16, n. 2, p.449-455, 1993.

HIENDLEDER, S.; MAINS, K.; PLANTE, Y.; LEWALSKI, H. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. *The Journal of heredity*, v. 89, n.2, p. 113-120, 1998.

HIGASHIDA, H.; YOKOYAMA, S.; KIKUCHI, M.; MUNESUE, T. CD38 and its role in oxytocin secretion and social behavior. *Hormones and Behavior*, v.61, n.3, p. 351-358, 2012.

HOYLE, C.H. Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Regulatory peptides*, v. 73, n.1, p.1-33, 1998.

HUFFMAN, B. In: Ultimate Ungulate. Disponível em:
<<http://www.ultimateungulate.com/index.html>> Acesso em 22/05/2013.

INOUE, T.; KIMURA, T.; AZUMA, C.; INAZAWA, J.; TAKEMURA, M.; KIKUCHI, T.; KUBOTA, Y.; OGITA, K.; SAJI, F. Structural organization of the human oxytocin receptor gene. *Journal of biological chemistry*, v. 269, n. 51, p. 32451-32456, 1994.

INSEL, T.R.; YOUNG, L.J. The neurobiology of attachment. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, n.2, p.129-136, 2001.

IVELL, R.; RICHTER, D. The gene for the hypothalamic peptide hormone oxytocin is highly expressed in the bovine corpus luteum: biosynthesis, structure and sequence analysis. *The EMBO Journal*, v.3, n.10, p. 2351-1354, 1984.

KENDRICK, K.M.; DA COSTA, A.P.; BROAD, K.D.; OHKURA, S.; GUEVARA, R.; LEVY, F.; KEVERNE, E.B. Neural control of maternal behaviour and olfactory recognition of offspring. *Brains research bulletin*, v. 44, n.4, p. 383-395, 1997.

KIJAS, J.W.; LENSTRA, J.A.; HAYES, B.; BOITARD, S.; PORTO NETO, L.R.; SAN CRISTOBAL, M.; SERVIN, B.; MCCULLOCH, R.; WHAN, V.; GIETZEN, K.; PAIVA, S.; BARENDSE, W.; CIANI, E.; RAADSMA, H.; MCEWAN, J.; DALRYMPLE, B.; INTERNATIONAL SHEEP GENOMICS CONSORTIUM MEMBERS. Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *PloS Biology*, v. 2, n. 10, doi: 10.1371/journal.pbio.1001258, 2012.

KIJAS, J.W.; TOWNLEY, D.; DALRYMPLE, B.P.; HEATON, M.P.; MADDOX, J.F.; MCGRATH, A.; WILSON, P.; INGERSOLL, R.G.; MCCULLOCH, R.; MCWILLIAM, S.; TANG, D.; MCEWAN, J.; COCKETT, N.; ODDY, V.H.; NICHOLAS, F.W.; RAADSMA, H.; International Sheep Genomics Consortium. A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. *PLoS ONE*, v.4, n.3, doi:10.1371/journal.pone.0004668, 2009.

KOEHBACH, J.; STOCKNER, T.; BERGMAYR, C.; MUTTENTHALER, M.; GRUBER, C.W. Insights into the molecular evolution of oxytocin receptor ligand binding. *Biochemical society transactions*, v. 41, n.1, p.197-204, 2013.

KOSHIMIZU, T.; NAKAMURA, K.; EGASHIRA, N.; HIROYAMA, M.; NONOGUCHI, H.; TANOUE, A. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiological Reviews*, v. 92, n. 4, p. 1813–1864, 2012.

LEE, H.J.; MACBETH, A.H.; PAGANI, J.H.; YOUNG, W.S. Oxytocin: the great facilitator of life. *Progress in neurobiology*, v. 88, n. 2, p.127-151, 2009.

LEE, A.G.; COOL, D.R.; GRUNWALD, W.C.; NEAL, J.D.E.; BUCKMASTER, C.L.; MICHELLE, Y.; CHENG, M.Y.; HYDE, S.A.; LYONS, D.M.; PARKER, K.J. A novel form of oxytocin in New World monkeys. *Biology Letters*, v. 7, n.4, p. 584–587, 2011.

LOLAIT, S.J.; O'CARROLL, A.M.; MCBRIDE, O.W.; KONIG, M.; MOREL, A.; BROWNSTEIN, M.J. Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and

possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature*, v. 357, n. 6376, p. 336-339, 1992.

MCCALL, C.; SINGER, T. The animal and human neuroendocrinology of social cognition, motivation and behavior. *Nature Neuroscience*, v. 15, n.5, p. 681-688. 2012.

MCMANUS, C.; PAIVA, S.R.; ARAUJO, R.O. Genetics and breeding of sheep in Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 236-246, 2010.

MONTANO, D.B.; FISCHER, V.; POLI, C.H.E.C.; GIORDANO, C., LEÃO, C.V.; PEGORARO, E.J. Temperamento de ovinos da raça Crioula criados em campo nativo no Estado do Rio Grande do Sul. 44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2007.

MORAES, J.C.F. O Emprego da Inseminação Artificial nas Ovelhas. 25 Circular Técnica, 2002.

SILVA, C.M.; MCMANUS, C.; SERENO, J.R.; CASTRO, S.; FIORAVANTI, M.C.; LOPES, F.B.V.C.; SEIXAS, L. Crioula Lanada. *Informação Genético Sanitária da Pecuária Brasileira*, p. 6, 2010.

SKOGLUND, P.; GOTHERSTROM, A.; JAKOBSSON, M. Estimation of population divergence times from non-overlapping genomic sequences: examples from dogs and wolves. *Molecular biology and evolution*, v. 28, n.4, p. 1505-1517, 2011.

STOOP, R. Neuromodulation by Oxytocin and Vasopressin. *Neuron*, v. 76, n. 1, p. 142-159, 2012.

The International Sheep Genomics Sequencing Consortium. Disponível em <<http://www.sheepmap.org/refgenome.php>> Acesso em: 20/05/2013.

TRUT, L.; OSKINA, I.; KHARLAMOVA, A. Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model. *Bioessays*, v. 31, n.3, p. 349-360, 2009.

VAN DE PEER, Y.; MAERE, S.; MEYER, A. The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nature Reviews. Genetics*, v. 10, n. 10, p. 725-732, 2009.

VAZ, C.M.S.L.; MOREIRA, G.R.P.; CAON, J.E.M.A. O registro de uma raça: da ovelha crioula à homologação da Raça Ovina Crioula. Disponível em: <<http://www.ovinoscrioulos.com.br/raca.htm>> Acesso em 04/10/2011.

VAZ, C.M.S.L. Morfologia e aptidão da ovelha crioula lanada. Embrapa Pecuária Sul, Bagé.

VIANA, J.G.A.; SILVEIRA, V.C.P. Cadeia produtiva da ovinocultura no Rio Grande do Sul: um estudo descritivo. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, 2009.

WALLIS, M. Molecular evolution of the neurohypophysial hormone precursors in mammals: Comparative genomics reveals novel mammalian oxytocin and vasopressin analogues. *General and comparative endocrinology*, v. 179, n. 2, p. 313-318, 2012.

YAMASHITA, K.; KITANO, T. Molecular evolution of the oxytocin-oxytocin receptor system in eutherians. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 67, n. 2, p. 520-528, 2013.

YOUNG, L.; ALEXANDER, B. *The Chemistry Between Us: Love, Sex, and the Science of Attraction*. London, England, Penguin Books, p. 310, 2012.

YOUNG, L.J.; FLANAGAN-CATO, L.M. Oxytocin, vasopressin and social behavior. *Hormones and Behavior*, v. 61, n.3, p. 227-229, 2012.

ZEDER, M.A. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 105, n. 33, p.11597-11604, 2008.

ZINGG, H.H.; LAPORTE, A.S. The oxytocin receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 14, n. 5, p. 222- 227,