



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Evolução molecular dos genes de receptores de serotonina em humanos e outros primatas

Daniela Ambros Quinsani

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Evolução molecular nos genes de receptores de serotonina em humanos e outros primatas

Daniela Ambros Quinsani

Orientador: Prof^o Dr. Nelson J. Rosa Fagundes

Co-orientadora: Dra. Vanessa R. Paixão-Côrtes

Trabalho de Conclusão de curso
como requisito parcial para
obtenção do grau de bacharela
em Ciências Biológicas.

Porto Alegre

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Nelson por ter me aceitado como orientanda, à Vanessa pela paciência e tempo dedicados a mim, é impressionante o quanto se pode aprender em tão pouco tempo. E à grande amiga Fernanda Onzi por revisar este trabalho.

RESUMO

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é um composto sintetizado a partir do triptofano, um aminoácido essencial, tanto no sistema nervoso central quanto em regiões periféricas. Além de exercer muitas funções fisiológicas, como a regulação das contrações do sistema gastrointestinal, a serotonina regula processos comportamentais e neurofisiológicos como: senso de humor, raiva, agressão, apetite, memória, entre outros. Por estar relacionada com doenças, e existirem muitos medicamentos eficazes envolvendo o sistema serotoninérgico, os genes de receptores da serotonina são um bom alvo de estudo. Foram realizados testes de evolução molecular nos genes receptores da serotonina em 10 espécies diferentes de primatas, incluindo o homem. As sequências foram obtidas no Ensembl. O Software CODEML do programa PAMLX foi utilizado os modelos do Nsites testando M1a (neutro), M2a (seleção) e M7(beta), M8 (beta& ω). Esses modelos permitem calcular taxas de substituição sinônimas por não-sinônimas (dN/dS ou ω). Enquanto a seleção purificadora é a força principal atuante nos genes receptores de serotonina acopladas a proteína G um cenário diferente é encontrado na família 5-HTR3, onde observamos um relaxamento funcional e sinais de seleção positiva em receptores específicos. Esta diferença pode estar associada a maneira que estes receptores atuam funcionalmente, já que os receptores 5-HTR3 funcionam por canal iônico, enquanto os das outras famílias funcionam acoplados a proteína G.

Palavras-chave: receptores de serotonina, primatas, evolução molecular, seleção positiva, HTR3A, HTR3D, HTR3E.

ABSTRACT

Serotonin (5-hydroxytryptamine , 5-HT) is a compound synthesized from tryptophan, an essential amino acid, in both central nervous system and peripheral regions. Besides performing many physiological functions, such as regulation of contractions of the gastrointestinal system, serotonin regulates behavioral and neurophysiological processes such as sense of humor, anger, aggression, appetite, memory, among others. Because 5-HT levels are associated with diseases, and there are many effective drugs involving the serotonergic system, the serotonin receptor gene could be a good study target. We perform molecular evolution tests in serotonin receptor genes on 10 different primates' species, including man. We obtain the sequences on Ensembl database. The CODEML software of PAMLX program was applied with the NsSites models testing the M1a (neutral) versus M2a (Positive selection), and the M7 (beta) versus M8 (beta& ω). These models allow us to calculate synonymous by non-synonymous substitution rates (dN/dS or ω). While the positive selection is the principal acting force on G-coupled serotonin receptors protein genes, another scenario is found for 5-HTR3 family receptors, where we see a functional relaxation and signals of positive selection in specific receptors. This difference may be associated with the way they work, as 5-HTR3 receptors work as ion channel, while the others work coupled to the G-protein.

Keywords: serotonin receptors, molecular evolution, primates, positive selection, HTR3A, HTR3D, HTR3E.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

GPCR - G protein-coupled receptor – proteína acoplada a proteína G

5-HT - Serotonina

HTR1A – 5-HT1A, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A

HTR1B – 5-HT1B, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B

HTR1D -5-HT1D, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D

HTR1E – 5-HT1E, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1E

HTR1F – 5-HT1F, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1F

HTR5A – 5-HT5A, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A

HTR4 – 5-HT4, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4

HTR6 – 5-HT6, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6

HTR7 – 5-HT7, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7

HTR2A – 5-HT2A, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A

HTR2B – 5-HT2B, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B

HTR2C – 5-HT2C, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C

HTR3A – 5-HT3A, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A

HTR3B – 5-HT3B, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3B

HTR3C – 5-HT3C, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3C

HTR3D – 5-HT3D, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3D

HTR3E – 5-HT3E, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3E

ISRS - inibidores seletivos da recaptação da serotonina

SUMÁRIO

1.Introdução	08
1. A serotonina.....	08
1.2 Os receptores de Serotonina.....	09
1.3 Primatas e evolução molecular.....	11
2.Objetivos.....	13
2.1 Ojetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3.Materiais e métodos.....	14
3.1 Obtenção das sequências.....	15
3.2 Alinhamento das sequências.....	15
3.3 Análise de dados.....	16
4.Resultados.....	17
5.Discussão.....	26
6.Conclusão.....	29
7.Referências.....	30

1 INTRODUÇÃO

1.2 A Serotonina

A serotonina é uma molécula sinalizadora com longa história evolutiva, estando presente em uma grande variedade de organismos: desde em plantas, seres unicelulares até em humanos. Ela é sintetizada a partir de um aminoácido essencial, o triptofano, e sua síntese ocorre em duas etapas. Primeiro, ocorre hidroxilação pela ação da enzima triptofano hidroxilase, e, depois, a remoção do grupo carboxila através da enzima L-aminoácido decarboxilase, resultando em 5-hidroxitriptamina (5-HT), uma monoamina, composto orgânico que contém Nitrogênio (Figura 1) (Azmitia, 2007; Mohammad-zadeh *et. al.*, 2008; Nichols & Nichols, 2008).

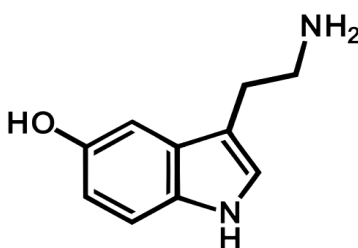


Figura 1. Representação plana da molécula de serotonina.

A serotonina pode ser encontrada em diversos tecidos e exercer muitas funções. Seu papel mais conhecido é o de neurotransmissor, tendo relação com funções comportamentais como ansiedade, medo, saciedade, memória agressividade, humor. Mas, além disso, essa monoamina é encontrada no trato digestivo, nas plaquetas, nos rins, e ainda em outros órgãos. Funções cardiovasculares, respiração, movimentos intestinais, ciclo circadiano, regulação endócrina são algumas das funções fisiológicas influenciadas pela serotonina (Berger *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 1998; Nichols&Nichols, 2008).

Por estar relacionada com essa grande variedade de comportamentos e funções foram descritas várias doenças mediadas pela serotonina: depressão, obesidade, transtorno obsessivo-compulsivo, fobia social. Essas doenças vêm sendo tratadas com sucesso através de medicamentos que agem no sistema serotoninérgico, chamados inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS) (Murphy, 1998). No sistema nervoso central, os neurônios pré-sinápticos produzem as moléculas de serotonina e as liberam para serem captadas por receptores em neurônios pós-sinápticos, é assim que ocorre a sinalização (Mohammad-zadeh, 2008). As drogas ISRS, através da

inibição da recaptação de serotonina, aumentariam a quantidade disponível na fenda pré-sináptica para se ligarem aos receptores pós-sinápticos (figura 2). Assim, os receptores podem desencadear as reações na célula e exercer normalmente suas funções.

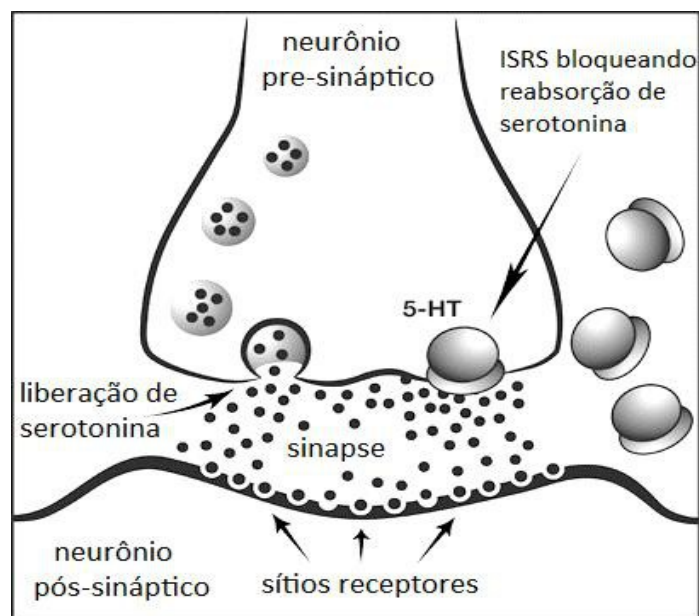


Figura 2. Mecanismo de medicamentos ISRS (modificado de toxipedia.org).

O sistema serotoninérgico se mantém conservado na evolução devido ao seu papel em funções fundamentais para sobrevivência como alimentação, reprodução e homeostase. (Nichols & Nichols, 2008; Turlejski, 1996). Justamente por ser uma das mais antigas moléculas sinalizadoras e estar relacionada a tantas funções, inclusive que podem causar doenças que atingem o homem moderno, os receptores de serotonina são um bom alvo de estudo.

1.3 Os Receptores de Serotonina

Existem 17 diferentes receptores de serotonina que podem ser divididos em 7 famílias: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇ (detalhes na tabela 1). Com exceção dos receptores da família 5-HT₃, todos os outros são GPCRs, receptores acoplados às proteínas G. Eles se localizam na membrana citoplásmica da célula e funcionam captando sinais extracelulares e provocando reações no seu interior. Uma maneira simples de agrupá-los, conforme Nichols (2008), é de acordo com os seus sistemas de sinalização primários, em que os receptores se ligam a diferentes tipos de proteína G ou formando um canal iônico (tabela 2).

Tabela 1. Caracterização dos genes desses receptores em *Homo sapiens*.

Genes	Crom.	Gene (pb)	Prot. (aa)	Exons
HTR1A	5	2,152	422	1
HTR1B	6	1,543	390	1
HTR1D	1	4,230	377	1
HTR1E	6	79,378	365	2
HTR1F	3	11,194	366	1
HTR5A	7	15,426	357	2
HTR4	5	226,204	428	8
HTR6	1	14,276	440	3
HTR7	10	117,097	479	4
HTR2A	13	65,485	471	3
HTR2B	2	16,889	481	4
HTR2C	X	326,074	458	6
HTR3A	11	15,433	516	8
HTR3B	11	141,889	441	9
HTR3C	3	7,627	447	9
HTR3D	3	7,826	454	8
HTR3E	3	9,932	482	7

Crom.= cromossomo, Prot.=proteína. Retirado de genecards e uniprot.

Tabela 2. Receptores de serotonina de acordo com seu sistema de sinalização primário.

Sistema de sinalização primário	Receptores					
G α i/o	HTR1A	HTR1B	HTR1D	HTR1E	HTR1F	HTR5A
G α q/11	HTR2A	HTR2B	HTR2			
G α s	HTR4	HTR6	HTR7*			
Canal iônico	HTR3A	HTR3B	HTR3C	HTR3D	HTR3E	

* outros autores consideram que HTR7 pode ligar-se diretamente a adenilato ciclase (Bard, et al. ,1993)

Os receptores do primeiro grupo, 5-HT₁ e 5-HT₅, inibem a adenilato ciclase e diminuem a produção de AMP cíclico, um mensageiro intracelular que pode ser encontrado em todas as células. Os receptores 5-HT₂, que se acoplam a proteínas do tipo G α q/11, aumentam a inositol trifosfatase e o diacilglicerol resultando em liberação intracelular de Ca²⁺. Os receptores que se acoplam à proteína G α s aumentam a atividade do AMPc. E por fim, os receptores da família 5-HT₃ funcionam como canal iônico, resultando em rápida despolarização da membrana plasmática (Hoyer *et al.*,1994; Mohammad-zadeh *et al.*, 2008; Nichols & Nichols, 2008; Murphy *et al.*, 1998). Os

principais cátions transportados são Na^+ e K^+ , mas eles também são permeáveis a Ca^{2+} (Lummis, 2012).

Já foram descritas diferentes funções fisiológicas para cada um desses receptores, por exemplo, o receptor HTR2A é importante para um normal funcionamento do cérebro. O HTR2B é importante durante o desenvolvimento, estando envolvido na formação do coração e do cérebro. O HTR1A é o que mais parece estar relacionado à depressão e à ansiedade, enquanto que o HTR1B tem função de vasodilatação no cérebro e encontrou-se relação com a agressividade. O HTR1E tem papel na memória. O ciclo circadiano, o humor e funções cognitivas parecem estar sob controle do HTR5A (Berger *et al.*, 2009; Nichols&Nichols, 2008). Já os receptores HTR3 regulam motilidade, secreção e os movimentos peristálticos no sistema nervoso entérico (Lummis, 2012). Portanto, cada receptor é importante executando diferentes funções que se complementam.

1.3 Primatas e evolução molecular

O grupo dos primatas, contendo mais de 600 espécies, incluindo a humana, apresenta como principal característica o polegar opositor. Em geral, os primatas têm hábitos arborícolas e sociais, e vivem na região entre os trópicos. Eles podem ser divididos em dois grandes grupos: Strepsirhini e Haplorrhini. No primeiro grupo, encontram-se os Lemuriformes e Lorisiformes. Já o segundo grupo, divide-se em Platyrrhini, os primatas do novo mundo, e Catarrhini, que inclui os primatas do velho mundo, gibões e os homínídeos (Enard&Pääbo, 2004; Perelman *et al.*, 2011; Vargas-Pinilla, 2014).

Sabe-se que os primatas são muito parecidos e têm alto grau de similaridade genética. Por exemplo, em um estudo que analisou a similaridade genética entre 12 genes ligados ao comportamento reprodutivo em alguns primatas, a similaridade genética entre *Hominoidea* (*Homonidea* e gibões) foi sempre maior que 97% (Vieira, 2012). Mesmo havendo grande similaridade genética, o comportamento e a dieta desses animais pode variar bastante (tabela 3). Esses são fatores que podem estar relacionados as funções vistas anteriormente pois viver em grandes grupos pode tornar mais complexas as interações sociais e os hábitos de vida. Comportamentos indicadores de ansiedade já foram relatados em várias espécies animais além de nós. Nos primatas não-humanos, que em geral, também são muito sociáveis, existem trabalhos descrevendo sintomas de ansiedade e depressão. Em chimpanzés, gorilas, macaco rhesus e saguis, um dos principais comportamentos indicadores de ansiedade é coçar-se com muita frequência (Botero *et al.*, 2013; Carder&Semple, 2008; Barros *et al.*, 2004; Ferdowsian *et al.*, 2011; Maestripieri *et al.*, 1993). Esses estudos mostram que animais podem apresentar ansiedade por motivos bem diferentes, como presença de perigo (predador), relações sociais e traumas, assim como ocorre na nossa espécie.

Tabela 3. Características quanto aos hábitos de vida das espécies estudadas.

Espécie	Hábito	Tam. do grupo (n° de indivíduos)	Sistema de acasalamento	Dieta primária
<i>Homo sapiens</i>	Diurno	Social (muitos)	Todos	Onívoro
<i>Pan troglodytes</i>	Diurno	Social (05-100)	Poliginandria	Onívoro
<i>Gorilla gorilla</i>	Diurno	Social (05-15)	Poliginia	Herbívoro
<i>Nomascus leucogenys</i>	Diurno	Familiar (02-05)	Monogamia	Herbívoro
<i>Macaca mulatta</i>	Diurno	Social (20-200)	Poliginandria	Onívoro
<i>Callithrix jacchus</i>	Diurno	Social (02-13)	Poliandria	Herbívoro
<i>Tarsius syrichta</i>	Noturno	Social (02)	Monogamia	Insetívoro
<i>Microcebus murinus</i>	Noturno	Solitários	Poliginia	Insetívoro
<i>Otolemur garnettii</i>	Noturno	Solitários	Poliginandria	Onívoro

Retirado de Myres *et al.*, 2014.

Aproveitando o nosso grau de similaridade, podemos investigar a história da evolução molecular de genes que podem ajudar a entender melhor certos males que nos afligem. Os primatas não-humanos oferecem oportunidades únicas para estudar os efeitos de genes, ambientes e sua interação, sobre a fisiologia e comportamento complexo (Bennett *et. al.*, 2004). Normalmente, os genes que tenham sido submetidos a seleção positiva durante a evolução da espécie são indicativos de adaptações funcionais que conduzem diferenças entre as espécies (Vamathevan *et.al.*, 2008). Porém, segundo Vasseur e Quintana-Murci (2013), existem cada vez mais evidências sugerindo que doenças da sociedade moderna, como obesidade, podem ser um subproduto de adaptações do passado para pressões seletivas e hábitos de vida diferentes. Como sugerido por Scott Price (2013), a ansiedade poderia ajudar um indivíduo a evitar situações perigosas, mas hoje, os muitos estímulos de perigo e violência passados pelos meios de comunicação podem estar gerando problemas. Assim, eventos de seleção do passado podem ter favorecido variantes que não trazem mais vantagens e tornam-se prejudiciais a nossa sociedade. É possível que em algum momento os genes receptores de serotonina tenham sido alvo de seleção positiva.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para aumentar o conhecimento sobre a evolução molecular dos genes receptores de serotonina.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Verificar se existe seleção positiva nos genes de receptores de serotonina;
- 2) Avaliar a relação entre o mecanismo de ação dos diferentes tipos de receptores de serotonina e o sinal de seleção natural encontrado para esses genes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das sequências

As sequências das regiões codificadoras dos genes que codificam os receptores de serotonina (5-HT) foram retiradas do banco de dados disponível no Ensembl (Flieck; *et al.*, 2014). A partir da sequência de referência humana, foi feita uma busca para obter-se os respectivos genes ortólogos em outros primatas. Foram obtidas sequências de um total de 10 espécies de primatas, estando incluída ao menos uma espécie de cada um dos principais clados, conforme a árvore filogenética (Figura 3). Quando mais de uma isoforma estava disponível no banco de dados, deu-se preferência as sequências mais longas e registradas no CCDS (The Consensus Coding DNA Sequence Project).

3.2 Alinhamento das sequências

O alinhamento das sequências foi realizado pelo programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), através do algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Os alinhamentos também foram checados visualmente.

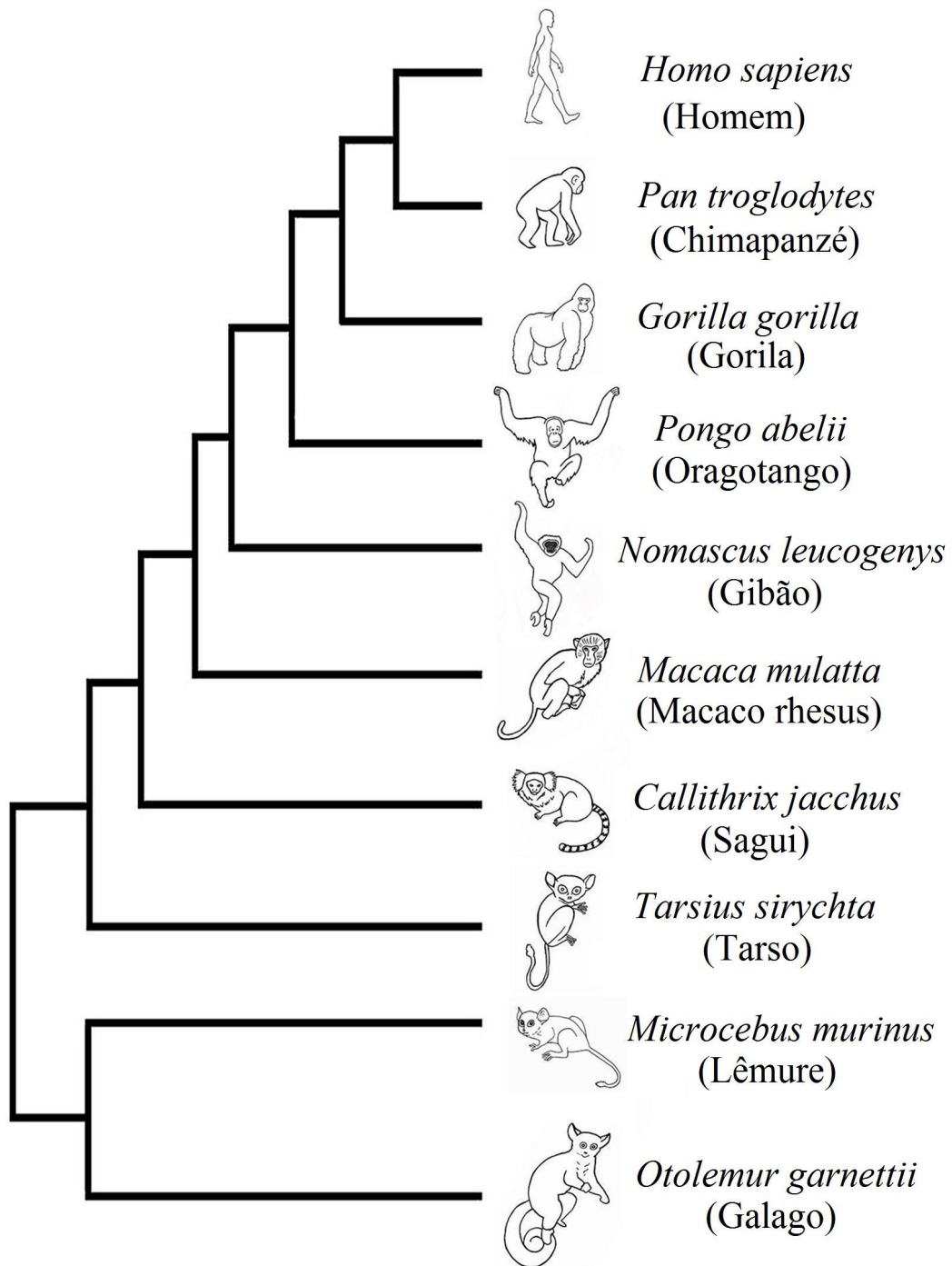


Figura 3. Árvore filogenética (segundo Tree of Life Web Project) das espécies de primatas analisados.

3.3 Análise de dados

Para os testes de evolução molecular baseados em taxas de substituições, foi utilizada a interface gráfica do pacote de programas do PAML, o PAML X (Xu & Yang, 2013). O programa CODEML foi utilizado na abordagem Nssites nos modelos M1a (neutro), M2a (seleção positiva) e M7(beta), M8(beta& ω). Esses modelos permitem calcular taxas de substituição sinônimas por não-sinônimas (dN/dS ou ω), em que valores de ω menores que 1 indicam seleção purificadora, iguais a um, denotam neutralidade e maiores que um, seleção positiva. Todos os testes foram feitos com um mínimo de 5 espécies conforme o recomendado. Foi feito o teste de razão de verossimilhança (LRT) para verificar a significância estatística entre os modelos, utilizando-se 2 graus de liberdade e valores de $p < 0,05$.

Nos sítios com indicação de seleção positiva, as mudanças nos aminoácidos foram classificadas conforme o Grantham score (Grantham, 1974), onde valores entre 0-50 significam mudanças conservadoras, entre 51-100, moderadamente conservadoras, entre 101-150, moderadamente radicais e maiores de 151, radicais (Li, et al., 1985). A região da proteína conforme sua localização na célula (intracelular, transmembrana ou extracelular) onde o sítio se encontra foi obtida nas plataformas Nextprot e Uniprot.

4 RESULTADOS

Os genes HTR4 e HTR7 foram descartados da análise pois o alinhamento das sequências apresentava muitas falhas e muitas regiões não homólogas, possivelmente porque haviam disponíveis isoformas diferentes para cada primata no banco de dados. Nos genes das famílias 5-HT1, 5-HT2, 5-HT5, 5-HT6, quando os modelos de substituição são comparados (M1a – M2a e M7 e M8), os que melhor se adaptam aos dados são os modelos neutros (M1a e M7). A taxa média de substituições sinônimas e não-sinônimas para estes receptores é um valor inferior a um, sinalizando que a principal força agindo é, como esperado, seleção purificadora (tabela 4).

Na família de receptores 5-HT3, 3 dos 5 tipos apresentaram pelo menos 1 sítio com forte indício para seleção positiva. Nessa família, o número de sítios sob seleção purificadora foi menor, variando de 50 a 83%, e, o valor médio de ω (dN/dS) foi em geral maior do que nas outras famílias, indicando um relaxamento da seleção purificadora. O menor número de sítios sob seleção purificadora foi encontrado em HTR3B, onde o melhor modelo foi o neutro (M1a e M7). Esse gene apresentou metade de seus sítios sob seleção purificadora e metade sob evolução neutra (tabela 4).

O modelo de seleção positiva (M8) foi o mais adequado aos dados de HTR3C, porém os sítios são significativos somente na análise NEB (Naive Empirical Bayes). Com a análise mais robusta (Bayes Empirical Bayes), o resultado perdeu significância, sendo que dois sítios apresentaram mais de 90% de chance de estar sob seleção positiva. Os sítios 345-Arg e 402-Pro tiveram respectivamente suas probabilidades reduzidas de 95,3% para 94,5% e 92,9% para 92,2%. Em HTR3A, o melhor modelo também foi o M8 (seleção positiva). Neste gene, apenas um sítio apresentou probabilidade significativa de estar sob seleção positiva, o Cys-454, com 95,3% (na análise BEB) (figura 5). Em HTR3D, com 5 espécies analisadas, o melhor modelo foi o M2a (seleção). Foram detectados 14 sítios (em BEB) sob seleção positiva num total de 438 sítios analisados: Gln-151, Ser-155, Ala-156, Ser-157, Ala-158, Asn-159, Trp-160, Ser-167, Met-168, Asp-169, Arg-170, Ala-171, Leu-297 e Ala-298 (figura 6). Para o gene HTR3E o melhor modelo foi o M2a (seleção) onde foram analisados 1395 sítios em 8 espécies e 4 deles (em BEB) apresentaram seleção positiva: Arg-24, Thr-31, His-32 e Ser-446 (figura 7).

As mudanças de aminoácidos nos sítios com indícios de seleção positiva, em sua maioria não foram radicais, sendo que 50% foram moderadamente conservadoras, 21,4% conservadoras, 14,3% moderadamente radicais e 14,3% radicais (tabela 5). Com os genes analisados separadamente, nota-se que HTR3A, que possui somente um sítio com sinal de seleção positiva, apresentou neste sítio mais mudanças radicais que os demais, sendo que 75% das suas mudanças foram desse tipo (tabela 6). Apesar de dois sítios de HTR3D apresentarem somente mudanças

radicais, elas totalizaram apenas 11% das mudanças em todos os seus sítios (tabela 6). Em HTR3E, essa proporção cai para 6%. Nesses últimos genes, predominaram as mudanças moderadamente conservadoras (tabela 6).

Quanto a localização desses sítios, os resultados foram variados. Enquanto que todos os sítios de HTR3D localizam-se na parte extracelular, o único sítio de HTR3A, Cys-454, localiza-se na região intracelular. O mesmo ocorre para Ser- 446 de HTR3E. Já os seus sítios Arg-24, Thr-31 e His-32 estão na região do peptídeo sinal (responsável por sintetizar proteínas pra uso externo), pois na forma canônica da proteína esses sítios encontram-se nessa região.

Tabela 4. Resultados obtidos nos testes evolutivos.

Receptor	Modelo	dN/ dS	Parâmetros	LnL	Valor p
HTR1A	M1a: neutro	0.1137	$p_0=0.93167$ $p_1=0.06833$ $\omega_0=0.04875$ $\omega_1=1.00000$	-3247.298271	>0,99
	M2a: seleção	0.1137	$p_0=0.93167$ $p_1=0.04230$ $p_2=0.02603$ $\omega_0=0.04875$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=1.00000$	-3247.298271	
	M7: beta	0.0927	$p=0.24297$ $q=2.25833$	-3244.378703	>0,99
	M8: beta& ω	0.0927	$q=2.25867$ $\omega=1.00000$	-3244.378872	
HTR1B	M1a: neutro	0.1193	$p_0=0.90707$ $p_1=0.09293$ $\omega_0=0.02907$ $\omega_1=1.00000$	-2622.566986	>0,99
	M2a: seleção	0.1193	$p_0=0.90707$ $p_1=0.04719$ $p_2=0.04574$ $\omega_0=0.02907$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=1.00000$	-2622.566986	
	M7: beta	0.1079	$p=0.08556$ $q=0.69412$	-2622.182486	0,84
	M8: beta& ω	0.1126	$q=1.03776$ $\omega=2.08440$	-2622.009231	
HTR1D	M1a: neutro	0.0860	$p_0=0.95190$ $p_1=0.04810$ $\omega_0=0.03978$ $\omega_1=1.00000$	-2784.410156	>0,99
	M2a: seleção	0.0860	$p_0=0.95190$ $p_1=0.04810$ $p_2=0.00000$ $\omega_0=0.03978$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=16.08867$	-2784.410156	
	M7: beta	0.0718	$p=0.20189$ $q=2.43703$	-2782.625753	>0,99
	M8: beta& ω	0.0718	$q=2.43748$ $\omega=1.00000$	-2782.625929	
HTR1E	M1a: neutro	0.0609	$p_0=0.99999$ $p_1=0.00001$ $\omega_0=0.06092$ $\omega_1=1.00000$	-1788.752594	>0,99
	M2a: seleção	0.0609	$p_0=1.00000$ $p_1=0.00000$ $p_2=0.00000$ $\omega_0=0.06093$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=1.00000$	-1788.752456	
	M7: beta	0.0611	$p=6.47563$ $q=99.00000$	-1788.762288	>0,99
	M8: beta& ω	0.0611	$q=99.00000$ $\omega=1.00000$	-1788.762425	
HTR1F	M1a: neutro	0.1181	$p_0=0.91147$ $p_1=0.08853$ $\omega_0=0.03239$ $\omega_1=1.00000$	-3631.550827	>0,99
	M2a: seleção	0.1181	$p_0=0.91147$ $p_1=0.00659$ $p_2=0.08194$ $\omega_0=0.03239$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=1.00000$	-3631.550827	
	M7: beta	0.0892	$p=0.74847$ $q=7.40109$	-3624.395289	0,19
	M8: beta& ω	0.0954	$q=11.39727$ $\omega=1.60672$	-3622.762642	
HTR5A	M1a: neutro	0.1242	$p_0=0.90685$ $p_1=0.09315$ $\omega_0=0.03426$ $\omega_1=1.00000$	-2902.880828	>0,99
	M2a: seleção	0.1242	$p_0=0.90685$ $p_1=0.02494$ $p_2=0.06822$ $\omega_0=0.03426$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=1.00000$	-2902.880828	
	M7: beta	0.0968	$p=0.13957$ $q=1.24314$	-2899.261300	0,27
	M8: beta& ω	0.1112	$q=1.76373$ $\omega=3.27807$	-2897.961713	
HTR2A	M1a: neutro	0.0985	$p_0=0.91624$ $p_1=0.08376$ $\omega_0=0.01611$ $\omega_1=1.00000$	-2972.118671	>0,99
	M2a: seleção	0.0985	$p_0=0.91624$ $p_1=0.00319$ $p_2=0.08058$ $\omega_0=0.01611$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=1.00000$	-2972.118671	
	M7: beta	0.0932	$p=0.03939$ $q=0.39160$	-2971.915163	0,94
	M8: beta& ω	0.0945	$q=0.36040$ $\omega=1.00000$	-2971.862954	
HTR2B	M1a: neutro	0.2130	$p_0=0.80050$ $p_1=0.19950$ $\omega_0=0.01684$ $\omega_1=1.00000$	-3212.049639	>0,99
	M2a: seleção	0.2130	$p_0=0.80050$ $p_1=0.12462$ $p_2=0.07488$ $\omega_0=0.01684$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=1.00000$	-3212.049639	
	M7: beta	0.2015	$p=0.05191$ $q=0.20591$	-3211.821879	0,95
	M8: beta& ω	0.2075	$q=0.14538$ $\omega=1.00000$	-3211.774647	
HTR2C	M1a: neutro	0.1308	$p_0=0.89486$ $p_1=0.10514$ $\omega_0=0.02869$ $\omega_1=1.00000$	-3016.361056	>0,99
	M2a: seleção	0.1308	$p_0=0.89486$ $p_1=0.05012$ $p_2=0.05502$ $\omega_0=0.02869$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=1.00000$	-3016.361056	
	M7: beta	0.1230	$p=0.07098$ $q=0.50596$	-3016.072092	0,98
	M8: beta& ω	0.1239	$q=0.63614$ $\omega=1.00000$	-3016.054031	

Tabela 4. Continuação.

Receptor	Modelo	dN/ dS	Parâmetros	LnL	Valor p
HTR6	M1a: neutro	0.0802	$p_0=0.95332$ $p_1=0.04668$ $\omega_0=0.03520$ $\omega_1=1.00000$	-2556.293291	>0,99
	M2a: seleção	0.0802	$p_0=0.95332$ $p_1=0.02330$ $p_2=0.02339$ $\omega_0=0.03520$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=1.00000$	-2556.293291	
	M7: beta	0.0767	$p=0.10055$ $q=1.13266$	-2556.285751	0,91
	M8: beta& ω	0.0785	$q=3.17160$ $\omega=1.14641$	-2556.200447	
HTR3A	M1a: neutro	0.2320	$p_0=0.83406$ $p_1=0.16594$ $\omega_0=0.07924$ $\omega_1=1.00000$	-4677.163332	0,045
	M2a: seleção	0.2622	$p_0=0.83477$ $p_1=0.16152$ $p_2=0.00371$ $\omega_0=0.08137$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=8.84052$	-4674.077018	
	M7: beta	0.2103	$p=0.25078$ $q=0.93405$	-4676.230000	0,0066
	M8: beta& ω	0.2444	$q=1.29256$ $\omega=5.48164$	-4671.216571	
HTR3B	M1a: neutro	0.5354	$p_0=0.50258$ $p_1=0.49742$ $\omega_0=0.07562$ $\omega_1=1.00000$	-4791.911187	0,53
	M2a: seleção	0.5646	$p_0=0.49780$ $p_1=0.49561$ $p_2=0.00659$ $\omega_0=0.07590$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=4.72604$	-4791.285686	
	M7: beta	0.5218	$p=0.15711$ $q=0.14401$	-4791.934470	0,77
	M8: beta& ω	0.5490	$q=0.17289$ $\omega=3.89607$	-4791.018819	
HTR3C	M1a: neutro	0.3249	$p_0=0.73198$ $p_1=0.26802$ $\omega_0=0.07776$ $\omega_1=1.00000$	-4275.748302	0,038
	M2a: seleção	0.3942	$p_0=0.74582$ $p_1=0.22701$ $p_2=0.02716$ $\omega_0=0.08968$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=3.69387$	-4272.495022	
	M7:beta	0.3194	$p=0.18016$ $q=0.38397$	-4278.600715	0,0015
	M8: beta& ω	0.3847	$q=0.97613$ $\omega=2.94636$	-4272.148267	
HTR3D	M1a: neutro	0.4025	$p_0=0.57515$ $p_1=0.42485$ $\omega_0=0.07349$ $\omega_1=1.00000$	-1908.181376	< 0,0001
	M2a: seleção	2.18860	$p_0=0.52290$ $p_1=0.34292$ $p_2=0.13418$ $\omega_0=0.17317$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=32.40232$	-1874.779355	
	M7: beta	0.4261	$p=0.02782$ $q=0.03618$	-1909.589953	< 0,0001
	M8: beta& ω	2.18030	$q=0.37549$ $\omega=20.45820$	-1874.803271	
HTR3E	M1a: neutro	0.4432	$p_0=0.62875$ $p_1=0.37125$ $\omega_0=0.11442$ $\omega_1=1.00000$	-5317.205800	< 0,0001
	M2a: seleção	0.7011	$p_0=0.60112$ $p_1=0.35745$ $p_2=0.04144$ $\omega_0=0.13051$ $\omega_1=1.00000$ $\omega_2=6.40086$	-5303.059464	
	M7: beta	0.4150	$p=0.49771$ $q=0.70098$	-5318.818203	< 0,0001
	M8: beta& ω	0.6168	$q=1.46404$ $\omega=4.72176$	-5295.814106	

dN/dS= razão da taxa de substituições não-sinônimas por sinônimas, ω . p= proporção de códons em cada classe de ω . Valor p= probabilidade do teste de razão de verossimilhança (LRT) na comparação dos modelos M1a, M2a e M7, M8, graus de liberdade = 2.

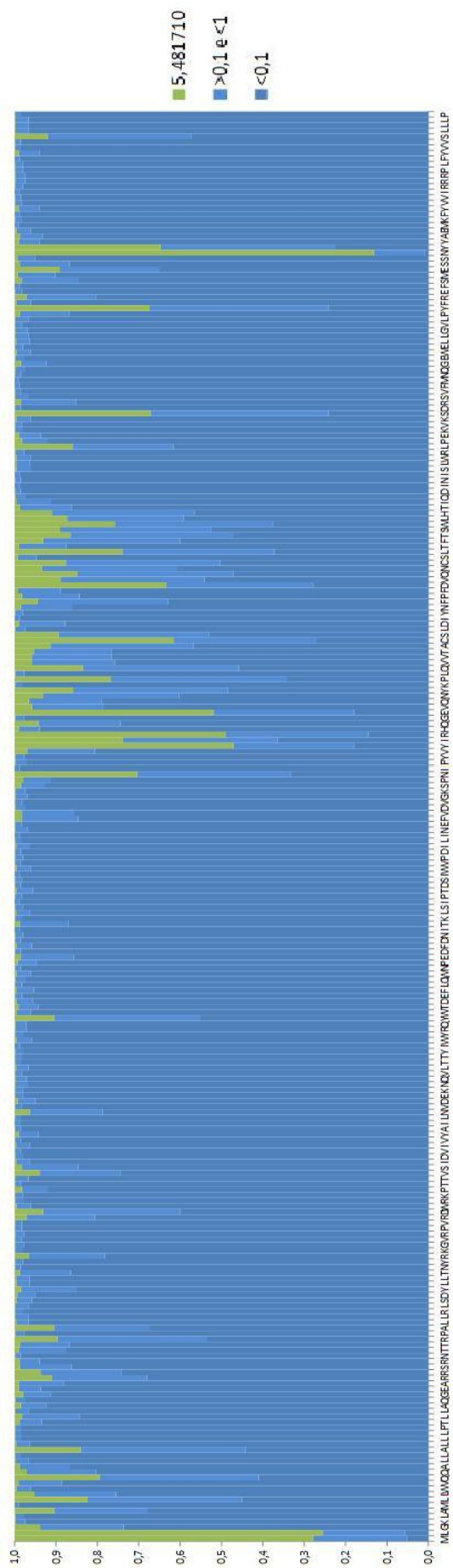


Figura 4. Probabilidades para cada sítio na sequência humana do gene HTR3A de estarem sob seleção: purificadora (azul), neutra (azul claro) e positiva (verde). Sítios com gaps na sequência humana foram removidos.

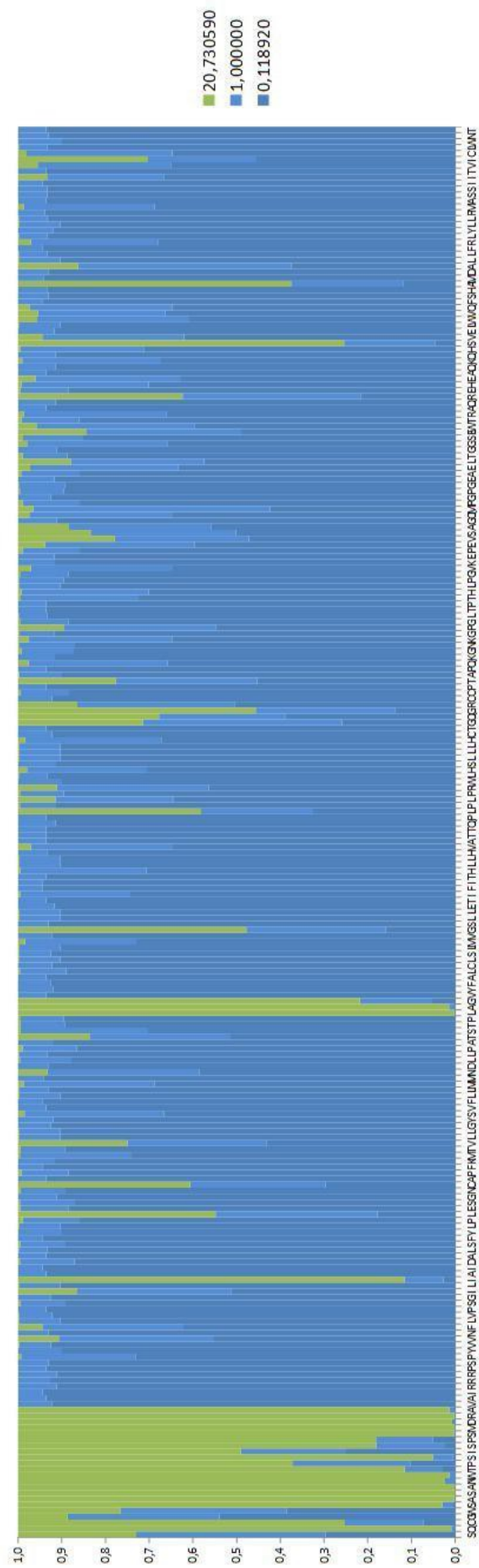


Figura 5. Probabilidades para cada sítio na sequência humana do gene HTR3D de estarem sob seleção purificadora (azul), neutra (azul claro) e positiva (verde). Sítios não presentes nas sequências de todas as espécies foram removidos.

Tabela 5. Mudanças dos aminoácidos em cada um dos sítios com indícios de seleção positiva.

Espécies / sítios	HTR3D														HTR3E				
	HTR3A	151(GS)	155(GS)	156(GS)	157(GS)	158(GS)	159(GS)	160(GS)	167(GS)	168(GS)	169(GS)	170(GS)	171(GS)	297(GS)	298(GS)	24(GS)	31(GS)	32(GS)	446(GS)
<i>Homo sapiens</i>	Cys	Gln	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Trp	Ser	Met	Asp	Arg	Ala	Leu	Ala	Arg	Thr	His	Ser
<i>Pan troglodytes</i>	Cys	Glu (29)	Phe (155)	His (86)	Gly (56)	Leu (96)	Gly (80)	Phe (40)	Gln (68)	Asp (160)	Ser (65)	His (29)	Leu (96)	His (99)	Pro (27)	Arg	Thr	His	Ser
<i>Gorilla gorilla</i>	Cys	Gln	Ser	Ser (99)	Ser	Ala	Asn	Trp	Ser	Met	Asn (23)	Arg	Ala	Leu	Ala	ND	ND	ND	ND
<i>Pongo abelii</i>	Cys	Gln	Ser	Ser (99)	Ser	Val (64)	Ser (46)	Trp	Ser	Met	Asn (23)	Arg	Ala	His (99)	Pro (27)	Arg	Thr	His	Ser
<i>Nomascus leucogenys</i>	Cys	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Arg	Thr	His	Ser
<i>Macaca mulatta</i>	Arg (180)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Leu (102)	Ser (58)	Glu (40)	Ala (99)
<i>Callithrix jacchus</i>	Ser (112)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Phe (97)	Cys (149)	Leu (99)	Leu (145)
<i>Tarsius silychta</i>	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Trp (101)	Met (81)	Gly (98)	Asn (46)
<i>Microcebus murinus</i>	Arg (180)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Thr (71)	Ser (58)	Cys (174)	Arg (110)
<i>Otolemur garnettii</i>	Thr (169)	Ile (109)	Phe (155)	Glu (107)	Glu (80)	Leu (96)	Thr (65)	Phe (40)	Val (124)	Asp (160)	Ser (65)	Met (91)	Leu (96)	His (99)	Ile (94)	ND	ND	ND	ND

GS= Grantham score, NA= não analisada, ND= não disponível no banco de dados.

Tabela 6. Quantidade de mudanças conservadoras (GS 0-50), moderadamente conservadoras (51-100), moderadamente radicais (GS 101-150) e radicais (GS>151) em cada um dos sítios com indícios de seleção positiva.

Genes	GS 0-50	GS 51-100	GS 101-150	GS >151
HTR3A	0	0	25%	75%
HTR3D	25%	56%	8%	11%
HTR3E	13,0%	50,0%	31,0%	6,0%

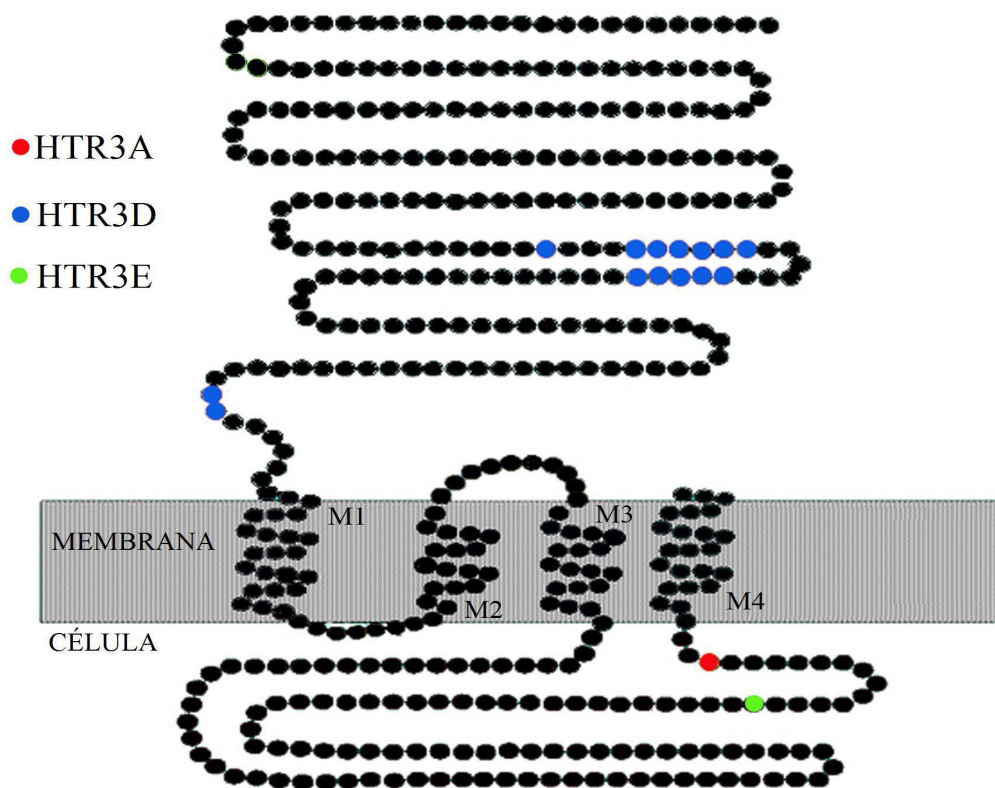


Figura 7. Possíveis locais onde os sítios sob seleção positiva estão localizados em um modelo de proteína do tipo 5-HT3. Os sítios Arg-24, Thr-31 e His-32 de HTR3E não estão representados pois suas possíveis localizações são na região do peptídeo sinal (modificado de cys-loop.org).

5 DISCUSSÃO

Devido à grande semelhança genética no grupo dos primatas, não é o esperado encontrar muitos sítios sob seleção positiva, o que está de acordo com nossos resultados: a seleção purificadora é predominante na evolução dos genes receptores de serotonina. Todos os genes da famílias 5-HT1, 5-HT2, 5-HT5, 5-HT6 apresentaram mais de 80% dos sítios sob seleção purificadora (tabela 4). A maioria deles apresentou mais de 90% de seus sítios com seleção purificados, porém alguns se destacaram: HTR1E apresentou 99,9% de seus sítios sob seleção purificadora, com valor de $\omega=0,06$, e HTR2B teve 20% de sítios denotando neutralidade, o que indica relaxamento da da seleção purificadora.

Mas, apesar da maioria dos genes não apresentar seleção positiva, podemos considerar, como colocado por Marques-Bonet e outros autores (p. 360, 2009) que:

Os atributos únicos da ordem dos primatas, e mais especificamente a do humano, pode ser explicado ou como consequência de mudanças de aminoácidos fundamentais das sequências codificantes de um subconjunto de genes críticos, ou como resultado de mudanças dramáticas na forma como os genes são regulados tanto temporal e espacialmente.

Além disso, já foram indetificados muitos genes que passaram por seleção positiva em humanos (Vallender&Lahn, 2004), inclusive nos genes do sistema da oxitocina (Vargas-Pinilla, 2014). Outros estudos ainda descobriram que a linhagem do chimpanzé tem mais genes sob seleção positiva que as outras linhagens (Vamathevan *et.al.*, 2008). Portanto, também não é nula a possibilidade de se detectar seleção positiva em primatas.

O fato de os receptores da família 5-HT3A, onde observamos um relaxamento funcional e sinais de seleção positiva, atuarem de modo diverso dos demais pode indicar que existe uma relação desse resultado com a função e o modo de funcionamento desses receptores. Os receptores 5-HT3 são do tipo Cys loop, ou seja, neurotransmissores formados de canais iônicos que atravessam a membrana. Eles são formados por um grande domínio extracelular, uma região transmembranda formada por 4 α -hélices (M1, M2, M3 e M4) ligadas entre si por alças intra e extracelulares (Thompson et al., 2010) (figura 7). Nessas proteínas, a parte extracelular é responsável pela formação do sítio de ligação, a região transmembranda permite que os íons atravessem e o domínio intracelular faz a modulação do receptor, tendo influência na condutividade iônica (Lummis, 2012).

Os genes que pertencem a essa família funcionam formando pentâmeros, onde cada um

deles (HTR3A, HTR3B, HTR3C, HTR3D e HTR3E) pode formar uma subunidade, porém, para estruturar um receptor funcional é necessário ao menos uma subunidade 5-HT₃A (Barnes, 2009; Lummis, 2012; Nielser, 2008). Infelizmente, ainda sabe-se pouco sobre as subunidades 5-HT₃C, 5-HT₃D e 5-HT₃E, pois, além de terem sido identificados recentemente, muitos estudos são feitos em roedores, e essas subunidades não são encontradas nesses mamíferos (Karnovsky et al., 2003).

Além da subunidade 5-HT₃A ser obrigatória para formação de um receptor funcional, só ela é capaz de formar receptores homo-oligoméricos. É possível que seja devido a sua importância que tenha ocorrido seleção positiva em apenas um dos sítios. Além disso, dentro da família, HTR3A apresentou o maior número de sítios sob seleção purificadora, 83% (tabela 4). As mudanças, segundo o Grantham score, foram consideradas radicais, porém recente estudo mostrou que a substituição de uma cisteína por uma treonina ou serina em um sítio de HTR3A não acarretava mudança de função (Wu, *et al.*, 2010). É possível que a arginina, que ocorre em *Callithrix jacchus* e *Microcebus murinus*, também mantenha a função da proteína, porém este aminoácido tem carga positiva e os demais neutros. Existe ainda outro aspecto entre eles que chama a atenção: a cisteína, presente nos primatas antropomorfos, é um aminoácido natural, ou seja, sintetizado no fígado, já a arginina, a treonina e a serina são aminoácidos essenciais, que devem ser adquiridos pela dieta. Talvez, seja mais vantajoso, manter esse sítio, que pode ser importante para o funcionamento normal de HTR3A, com aminoácidos naturais do que com aminoácidos essenciais.

Quanto aos demais receptores sob seleção positiva, sabe-se que são predominantemente expressos no trato gastrointestinal e podem ser moduladores da função da serotonina nesses órgãos (Lummis, 2012 ; Nielser, 2008). Como ainda não se tem uma imagem dessas proteínas, os estudos são feitos por modelos de homologia (Barnes *et al.*, 2009) e não se pode ter certeza sobre a localização desses sítios e o quanto eles são importantes para normal funcionamento do receptor. O gene HTR3D teve seus sítios com seleção positiva localizados na região extracelular, que interage com a serotonina, porém, os resíduos considerados importantes para a formação do sítio de ligação foram verificados apenas no gene HTR3A. Em HTR3A, o aminoácido Trp-183 forma a ligação cation- π com a amina primária da 5-HT (Barnes *et al.*, 2009; Lummis, 2012). Quando HTR3D e HTR3A são alinhados, os sítios sob seleção positiva, Trp-160 e Ser-167, estão próximos do sítio Trp-183 de HTR3A. O triptofano foi substituído por fenilalanina em duas espécies e ambos resíduos são neutros e importantes para a síntese de serotonina (Young, 1983). Já a Serina foi substituída por Glutamina e Valina, mudanças consideradas moderadamente conservadora e moderadamente radical, porém os três aminoácidos são neutros.

É interessante notar que em 5HTR3A e 5HTR3E os primatas antropomorfos, da superfamília *Hominoidea*, apresentaram o mesmo aminoácido. Enquanto que em 5HTR3D, isso não ocorre

(tabela 5). Mas não se pode fazer qualquer relação com os genes e sítios com seleção positiva e os diferentes hábitos de vida dos primatas (tabela 3). Provavelmente, essas mudanças de resíduos provocam alterações sutis. Como os receptores da família 5-HT₃ formam pentâmeros, seria interessante estudar a sua coevolução e verificar qual subunidade tem mais influência sobre as outras, ajudando a esclarecer melhor os mecanismos desses genes. Além disso, mutações nos nesses receptores estão associadas a doenças já citadas, como depressão, e também, síndrome do intestino irritável e anorexia (Niesler, 2011). E ainda, medicamentos envolvendo essa família de receptores também são usados no tratamento de enjoos em pacientes em quimio ou radioterapia (Gregory&Ettinger, 1998; Hesketh, 2000; Lummis, 2012; Niesler *et al.*, 2008) confirmando o quanto é importante aprofundar e seguir estudos com esses genes.

Um fato relevante para estas análises, é que muitos genes apresentam mais de uma isoforma no banco de dados. Embora tenhamos adotado uma abordagem conservadora onde a isoforma com o tamanho mais semelhante a isoforma canônica humana foi empregada nas análises, nem sempre as isoformas eram muito semelhantes e quando isso ocorria, a espécie com a isoforma muito diferente das demais não era considerada. Isso também levou as análises a terem um número de espécies ainda menor. Ainda que tenhamos usado o número mínimo recomendado, o pequena quantidade de espécies analisadas pode ter sido um fator limitante.

Uma proposta interessante para o estudo seria fazer a análise BranchSite, que permite variação dos valores de ω também entre as linhagens, para verificar se a seleção positiva está ocorrendo em um ramo específico da genealogia dos primatas. Além disso poderia-se incluir sequências do homem de Neandertal e outros primatas para enriquecer as análises e fazer os alinhamentos pelo guidance, que permite retirar da análise sítios em que o alinhamento não é confiável.

6 CONCLUSÃO

Com esse estudo foi visto que a seleção purificadora predomina na região codificadoras dos genes receptores de serotonina que atuam acoplados com a proteína G, mas também foi detectada seleção positiva na família 5-HTR3. Sabe-se que esses receptores tem relação com muitas funções e comportamentos complexos mas alguns dos genes com seleção positiva ainda foram pouco estudados, principalmente quanto ao seu papel funcional, sendo ainda difícil explicar porque esses genes podem estar sob seleção positiva, mas abrindo perspectivas para novos estudos.

7 REFERÊNCIAS

AZMITIA, E.C.; Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity, and homeostasis. *Int Rev Neurobiol*, v. 77, p.31-56, 2007.

BARD, J. A., ZGOMBICK, J., ADHAM, N., VAYSSE, P., BRANCHEK, T., & WEINSHANK, R. L. Cloning of a novel human serotonin receptor(5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem*, v. 268, issue of Nov 5, p.23422–23426, 1993.

BARNES N.M., HALES T.G., LUMMIS S.C., PETERS J.A. The 5-HT₃ receptor-the relationship between structure and function. *Neuropharmacology*, v.56, n.1, p.273-84, 2009.

BARROS M., DE SOUZA SILVA M.A., HUSTON J.P., TOMAZ C. Multibehavioral analysis of fear and anxiety before, during, and after experimentally induced predatory stress in *Callithrix penicillata*. *Pharmacol Biochem Behav*, v.78 n.2, p.357-67, 2004.

BENNETT A.J., LESCH K.P., HEILS A., LONG J.C., LORENZ J., SHOAF S.E., CHAMPOUX M., SUOMI S.J., LINNOILA M.V., HIHLEY J.D. Early experience and serotonin transporter gene variation interact to influence primate CNS function. *Molecular Psychiatry*, v.7, p.118–122, 2002.

BERGER M., GRAY J.A., ROTH B.L. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med*, v.60, p.355-66, 2009.

BOTERO M., MACDONALD S.E., MILLER R.S. Anxiety-related behavior of orphan chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) at Gombe National Park, Tanzania. *Primates*, v.54, n.1, p.21-26, 2013.

CARDER G., SEMPLE S. Visitor effects on anxiety in two captive groups of western lowland gorillas. *Applied Animal Behaviour Science*, v.15, n. 3, p.211-220, 31 December 2008.

EDGAR R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* v. 32, n.5, p.1792–1797, 2004.

ENARD W., PÄÄBO S. Comparative primate genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* v.5,

p.351-78, 2004.

FERDOWSIAN H.R., DURHAM, D.L., KIMWELE, C., KRANENDONK, G., OTALI, E., AKUGIZIBWE T; MULCAHY JB; AJAROVA L; JOHNSON CM. Signs of mood and anxiety disorders in chimpanzees. *PLoS ONE* v.6,n. 6, e19855, 2011. Disponível em: <http://plosone.org>. Acesso em: 15 mai. 2014.

FLIECK P., AHMED I., AMODE M.R., BARRELL D., BEAL K., *et al.*, Ensembl 2014 *Nucleic Acids Research*, v.42, Database issue:D749-D755, 2014.

GRANTHAM R. Amino Acid Difference Formula to Help Explain Protein Evolution. *Science*, v. 185, n.4154, p. 862-864, 1974.

GREGORY E.R., ETTINGER D.S. 5-HT₃ Receptor Antagonists for the Prevention of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting. *Drugs*, v.55, n.2, p 173-189, 1998.

HESKETH P.J. Clinical Science Review: Comparative Review of 5-HT₃ Receptor Antagonists in the Treatment of Acute Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting. *Cancer Investigation*, v. 18, n.2, p. 163-173, 2000.

HOYER D., CLARKE D.E., FOZARD J.R., HARTIG P.R., MARTIN G.R., MYLECHARANE E.J., SAXENA P.R., HUMPHREY P.P. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.*, v.46, p.157–203, 1994.

KARNOVSKY A.M, GOTOW L.F., MCKINLEY D.D., PIECHAN J.L., *et al.* A cluster of novel serotonin receptor 3-like genes on human chromosome 3. *Gene*, v.319, p.137-148, 2003.

LI W.H., MACBETH A.H., PAGANI J.H., YOUNG W.S. A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol Biol Evol*, v.2, n.2, p.150-174, 1985.

LUMMIS S.C. 5-HT₃ receptors. *J Biol Chem.* v.287, n.48, p.40239-45, nov 23, 2012.

MAESTRIPIERI D. Maternal Anxiety in Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). *Ethology*, v.95,p. 32–

42, 1993.

MOHAMMAD-ZADEH L.F., MOSES L., GWALTNEY-BRANT S.M. Serotonin: a review. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, v.31, p.187-199, 2008.

MURPHY D.L., ANDREWS A.M., WICHEMS C.H., et al. Brain Serotonin Neurotransmission: An Overview and Update With an Emphasis on Serotonin Subsystem Heterogeneity, Multiple Receptors, Interactions With Other Neurotransmitter Systems, and Consequent Implications for Understanding the Actions of Serotonergic Drugs. *J Clin Psychiatry*, v.59, n.15, p.4–12, 1998.

MYERS P., ESPINOSA R., PARR C.S., JONES T., HAMMOND G.S., DEWEY T.A. The Animal Diversity Web, 2014. Disponível em: <http://animaldiversity.org>.

NICHOLS D.E., NICHOLS C.D. Serotonin Receptors. *Chem. Rev.*,v.108, p.1614-1641, 2008.

NIELSER B., KAPPELLER J., HAMMER C., RAPPOLD G. Serotonin type 3 receptor genes: HTR3A, B, C, D, E. *Pharmacogenomics*, v.9, n.5, p.501-4, 2008.

PERELMAN P., JOHNSON E., ROOS C., SEUÁNEZ H., HORVATH J.E., et al. A molecular phylogeny of living primates. *PloS Genet*, v.7, n.3, e1001342, 2011.

PRICE J.S. An evolutionary perspective on anxiety and anxiety disorders. Em: Dr. Federico Durbano (Ed.), *New Insights into Anxiety Disorder*; 2013, ISBN 978-953-51-1053-8, InTech. Disponível em: <http://intechopen.com>.

TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

Thompson A.J, Lester H.A. e Lummis S.C. The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 43, p. 449-499, 2010.

TURLEJSKI K. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiol. Exp.*, v.56, p.619-636, 1996.

TREE OF LIFE WEB PROJECT. Primates. Lemurs, tarsiers, monkeys, apes, and humans, versão 1, 1999. Em: The Tree of Life Web Project. Disponível em: <http://tolweb.org/>.

VALLENDER E.J., LAHN B.T. Positive Selection on human genome. *Human Molecular Genetics*, v.13, n. 2, p.245-254, 2004.

VAMATHEVAN J.J., HASAN S., EMES R.D., AMRINE-MADSEN H., RAJAGOPALAN D., TOPP S.D., *et. al.* The role of positive selection in determining the molecular cause of species differences in disease. *BMC Evol Bio*, v. 8, 2008. DOI:10.1186/1471-2148-8-273. Disponível em: <http://biomedcentral.com>.

VARGAS-PINILLA P. A evolução molecular do sistema da oxitocina em primatas. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

VASSEUR E., QUINTANA-MURCI L. The impact of natural selection on health and disease: uses of the population genetics approach in humans. *Evol Appl.*, v.6, n.4, p.596-607, June, 2013.

VIEIRA C.M., A evolução molecular da rede gênica da oxitocina em primatas e outros vertebrados. 2012. 61f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

XU B., YANG Z. PAMLX: a graphical user interface for PAML. *Mol Biol Evol.*, v.30, p.2723-2724, 2013.

WU D.F., OTHMAN N.A., SHARP D., MAHENDRA A., DEEB T.Z., HALES T.G. A conserved cysteine residue in the third transmembrane domain is essential for homomeric 5-HT₃ receptor function. *J Physiol.* v. 588, n.4, p.603-616. Feb 15, 2010.

Recursos da Internet

<http://cys-loop.org/>

<http://www.ensembl.org/>

<http://www.genecards.org/>

<http://nextprot.org>

<http://tolweb.org/>

<http://toxipedia.org/>

<http://www.uniprot.org/>