

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**VARIAÇÕES NOS GENES *HTR2A* E *HTR2B* E SUAS CONTRIBUIÇÕES PARA
TRAÇOS FENOTÍPICOS TÁXON-ESPECÍFICOS**

Leandro Silva Nunes

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cátira Bortolini

Porto Alegre, abril de 2018

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

As pesquisas, realizadas no Laboratório de Evolução Humana e Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O aluno recebeu bolsa de estudos concedida pela CAPES.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Maria Cátira Bortolini pela oportunidade de realizar esta pesquisa e por todo auxílio que me prestou durante todo percurso do mestrado;

A Vanessa Rodrigues Paixão Côrtes por ter me instruindo nos momentos mais difíceis deste trabalho e me ajudado a recomeçar quando necessário;

A Vinicius Sortica por toda ajuda com revisões e sugestões sem as quais este trabalho não teria sido realizado;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Evolução Humana e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Bibiana Fam, Gabrielle Rosa Silva, Guillermo Reales, Lucas Viscardi, Pedro Vargas Pinilla, Tiago Ferraz da Silva e Vanessa Jacovas pelo companheirismo, pelos bons momentos de discussão científica e pela ajuda para desvendar softwares;

A CAPES pela bolsa concedida e apoio a novos pesquisadores;

A minha amiga Patrícia Mattei por me resgatar quando as coisas se complicavam, pela amizade sincera, pelas conversas divertidas e sérias;

Aos meus pais, Valdemar e Rosinara, pelo apoio constante, pela dedicação, pelo carinho e por me ajudarem nos momentos mais difíceis.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 A classe Mammalia: considerações gerais.....	8
1.2 O hormônio Serotonina.....	9
1.3 Os Receptores da Serotonina.....	12
1.3.1 Receptores HTR2.....	14
1.3.1.1 HTR2A.....	15
1.3.1.2 HTR2B.....	16
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivos.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Sequências e alinhamentos.....	19
3.2 Análises Evolutivas.....	24
3.3 Associação Fenotípica.....	25
4 RESULTADOS.....	27
5 DISCUSSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AMPC – Adenosina Monofosfato cíclico

DAG – Diacilglicerol

ECL2 – Loop extracelular 2

ECL3 – Loop extracelular 3

GPCRs – Receptores acoplados a proteína G

HTR1 – Receptor de serotonina 1

HTR2 – Receptor de serotonina 2

HTR3 – Receptor de serotonina 3

HTR4 – Receptor de serotonina 4

HTR5 – Receptor de serotonina 5

HTR6 – Receptor de serotonina 6

HTR7 – Receptor de serotonina 7

iP3 – Inositol Trifosfato

SLC6A4 – *solute carrier 6 member 4*

TM2 – Transmembrana 2

TM4 – Transmembrana 4

TPH1 – Triptofano hidroxilase 1

TPH2 – Triptofano hidroxilase 2

RESUMO

A serotonina é um neurotransmissor que regula diversos aspectos fisiológicos e comportamentais nos mamíferos. Sua sinalização ocorre mediante ligação com seus receptores. *HTR2A* e *HTR2B* são genes codificando receptores de serotonina que estão implicados com vários traços comportamentais dos mamíferos: agressividade, impulsividade, afiliação, desinibição, cooperação e várias doenças neuropsiquiátricas. O objetivo do presente estudo é determinar variações espécie- ou grupo-específicas dos genes *HTR2A* e *HTR2B* em espécies de mamíferos cujos genomas estão disponíveis bem como, avaliar se as variações encontradas são táxon-específicas e se as mesmas estariam correlacionadas a comportamentos e outros traços táxon-específicos. Além disso, objetivou-se determinar os padrões evolutivos das regiões codificadoras destes genes. Foram realizadas análises evolutivas das sequências das regiões codificadoras dos genes *HTR2A* e *HTR2B* de 90 espécies de mamíferos disponíveis nos bancos de dados Genbank e Ensembl usando pacote Codeml do software PAML version 4.9. Foi compilado um conjunto de traços fenotípicos a partir de bancos de dados e realizadas análises de correlação entre as variantes genéticas e os traços fenotípicos usando um script de matriz de correlações implementado em R. Nossas análises determinaram que *HTR2A* encontra-se sob seleção purificadora, admitindo que alguns sítios estejam evoluindo com relaxamento da pressão evolutiva, enquanto *HTR2B* está sob seleção positiva. Este padrão evolutivo pode refletir tanto a amplitude de fenótipos para os quais os receptores de serotonina estão envolvidos quanto às diferenças estruturais e funcionais dos domínios. Foram encontradas muitas variações táxon-específicas que estavam associadas a múltiplos traços fenotípicos e encontravam-se principalmente nas regiões N-terminal e C-terminal dos dois genes. Das variações encontradas somente aquelas nos sítios 62, 64, 447 e 457 de *HTR2A* e sítio 7 de *HTR2B* foram significativas após correção de Bonferroni para número de filhotes. A predominância de variações táxon-específicas associadas a fenótipos nestes domínios terminais que se encontram com relaxamento da pressão evolutiva pode indicar que tais alterações estão ligadas a aquisição de novas funções para proteína sem alterar sua função conservada.

ABSTRACT

Serotonin is a neurotransmitter that regulates various physiological and behavioral aspects in mammals, and its signaling occurs through binding to its receptors. *HTR2A* and *HTR2B* are genes that encode serotonin receptors implicated in various mammalian behavioral traits: aggressiveness, impulsivity, affiliation, disinhibition, co-operation, and various neuropsychiatric disorders. The aim of present study is to determine species- or group-specific variations of *HTR2A* and *HTR2B* genes in mammalian species whose genomes are available as well to assess if the variations found are taxon-specific and whether they would be correlated to behaviors and other taxon-specific traits. In addition, determine the evolutionary patterns of the coding regions of these genes. Evolutionary analyzes of the sequences of the coding regions of the *HTR2A* and *HTR2B* genes from 90 mammalian species available in the Genbank and Ensembl databases using the Codeml package of the PAML version 4.9 software were performed. We compiled a set of phenotypic traits from databases and performed correlation analyzes between genetic variants and phenotypic traits using a correlation matrix script implemented in R. Our analyzes have determined that *HTR2A* is undergoing purifying selection admitting that some sites are evolving with relaxation of evolutionary pressure while *HTR2B* is under positive selection. This evolutionary pattern could reflect both the range of phenotypes to which serotonin receptors are involved and the structural and functional differences of the domains. Many taxon-specific variations were found that were associated with multiple phenotypic traits and were found mainly in the N-terminal and C-terminal regions of the two genes; only those at sites 62, 64, 447 and 457 of *HTR2A* and site 7 of *HTR2B* were significant after Bonferroni correction for number of pups. The predominance of taxon-specific variations associated with phenotypes in these terminal domains that are undergoing evolutionary pressure relaxation could indicate that this changes are linked to the acquisition of new functions for protein without altering its conserved function.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A classe Mammalia: considerações gerais

Os mamíferos surgiram há 225 milhões de anos, no Triássico, a partir dos Cynodontia. Os cinodontes eram uma linhagem de répteis sinapsídeos com locomoção, maxila e dentes semelhantes aos mamíferos, e que eram provavelmente endotérmicos (Hunt et al. 2014). Porém os mamíferos só começaram a diversificar há cerca de 100 milhões de anos. Por volta de 66 milhões de anos, os mamíferos começaram a ocupar os nichos disponíveis após o desaparecimento dos dinossauros, dando início a uma nova onda de radiação adaptativa (Figura 1) (Springer et al., 2003; Bininda-Emonds et al., 2007; Zhe-Xi Luo 2007).

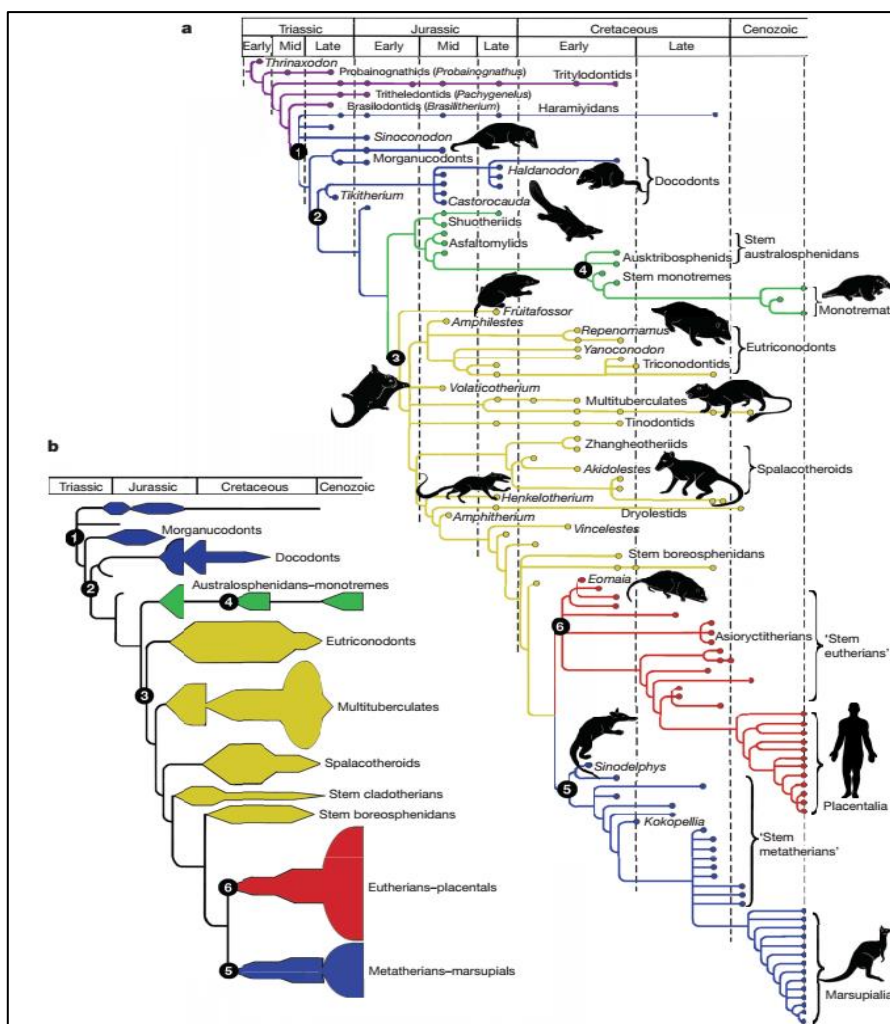


Figura 1 Filogenia e diversificação dos grupos de mamíferos do mesozoico (Zhe-Xi Luo 2007)

Os mamíferos caracterizam-se principalmente pela presença de três traços que não são encontradas em outros animais: (1) ouvido médio formado pelos ossículos martelo, bigorna e estribo; (2) pelos; e (3) glândulas mamárias. Os ossículos do ouvido médio são derivados dos ossos da mandíbula dos ancestrais dos mamíferos e tem a função de transmitir as vibrações das ondas sonoras ao tímpano no ouvido médio. Os pelos estão presentes em todos os mamíferos em pelo menos uma das fases do seu desenvolvimento, e possuem diferentes funções como: isolamento térmico, padrão de cores para camuflagem, advertência e outras formas de sinalização nas relações intra e entre grupos (costa prateada dos gorilas machos, por exemplo), bem como auxílio aos sentidos como o tato. As mamas são glândulas sudoríparas modificadas responsáveis pela produção de leite nas fêmeas para a nutrição da prole recém-nascida (Rowe, 1988; Klima and Maier, 1990; Vaughan, et al., 2000).

Outra característica marcante em mamíferos é a presença do neocórtex que está associado com aumento da função cognitiva. O neocórtex apresenta tamanho e formas diferentes conforme a ordem, sendo notável, seu aumento nos Primatas, principalmente em humanos (Lui et al., 2011).

Os mamíferos são cosmopolitas e evoluíram para sobreviver em praticamente todos os ambientes terrestres e aquáticos do planeta. Podem viver em diferentes climas, como: desertos, florestas tropicais e o pólo ártico. Dentro dessa classe de animais algumas espécies apresentam adaptações para voar como os morcegos, para viver em ambientes aquáticos como baleias e golfinhos e para se locomover e viver em árvores como diversos primatas (Reichholf, 1990; Nowak, 1991; Vaughan, et al., 2000).

1.2 O hormônio Serotonina

A 5-hidroxitriptamina (5-HT), mais conhecida como serotonina, é um neurotransmissor derivado do aminoácido triptofano que regula diferentes aspectos fisiológicos dos vertebrados (Welsh 1968; Garattini & Valzelli 1968; Nichols & Nichols 2008; El-Merahbi et al., 2015; Ruble et al., 2016).

Esse neurotransmissor foi descoberto e descrito independentemente por dois laboratórios. No ano de 1938, em Roma, Vittorio Erspamer isolou pela primeira vez a endolamina, denominada enteroamina, a partir de células do trato gastrointestinal

(Erspamer & Asero, 1952). Em meados de 1948, uma substância vasoconstritora foi isolada do sangue por Maurice Rapport, Arda Green, e Irvine Page na “Cleveland Clinic” (Rapport et al., 1947, 1948a, 1948b). Essa substância foi denominada serotonina (do latim “serum”, de onde foi encontrada e do grego “tonic”, por seu efeito constritor dos vasos sanguíneos). Posteriormente, em 1953, a serotonina foi descrita em extratos do cérebro (Twarog & Page, 1953). Erspamer foi responsável por descrever o núcleo de endol na enteramina e posteriormente Rappor determinou a estrutura da serotonina como conhecemos sendo 5-hidroxitriptamina (Figura 2) (Rapport, 1949).

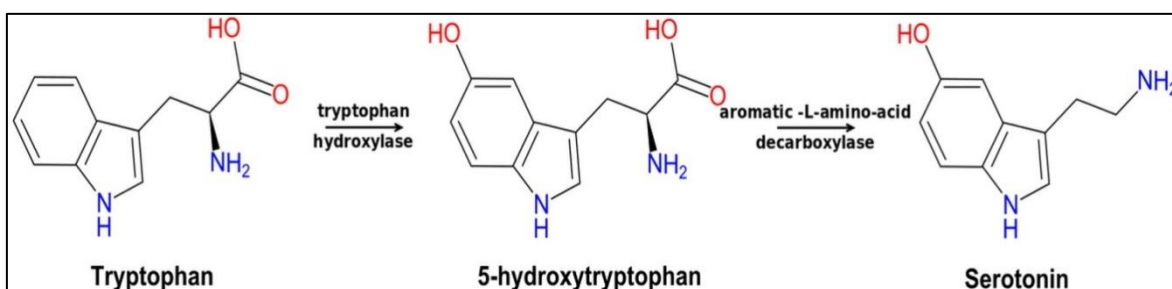


Figura 2 Estrutura química da serotonina (Martins et al., 2010)

A serotonina é encontrada em diferentes organismos como fungos, plantas, invertebrados e vertebrados (Srinivasan et al., 2008; Kang et al., 2009; Curran & Chalasani 2012). Nos vertebrados, ela é encontrada e sintetizada no cérebro e nos tecidos periféricos de forma diferenciada por não ultrapassar a barreira hematoencefálica. A sua síntese é realizada pela ação das enzimas expressas pelos genes da triptofano hidroxilase 1 e 2 (TPH1 e TPH2), que se encontram nos tecidos periféricos e no cérebro, respectivamente (Berger et al., 2009) (Figura 3).

A porção de serotonina sintetizada no cérebro representa aproximadamente cinco por cento (5%) desse composto no organismo (Berger et al., 2009) e o restante é produzida nos órgãos periféricos, nas células enterocromafins do trato gastrointestinal, células pancreáticas do tipo β , adipócitos e osteoclastos. Aproximadamente dois por cento (2%) da serotonina encontrada no sangue atua diretamente como hormônio (Kim et al., 2010; Paulmann et al., 2009; Stunes et al., 2011; Chabbi-Achengli et al., 2012) possuindo grande importância na sinalização hormonal, agregação plaquetária, contração dos músculos lisos, processos inflamatórios, vasoconstrição e dilatação (El-Merahbi et al., 2015; Ruble et al., 2016).

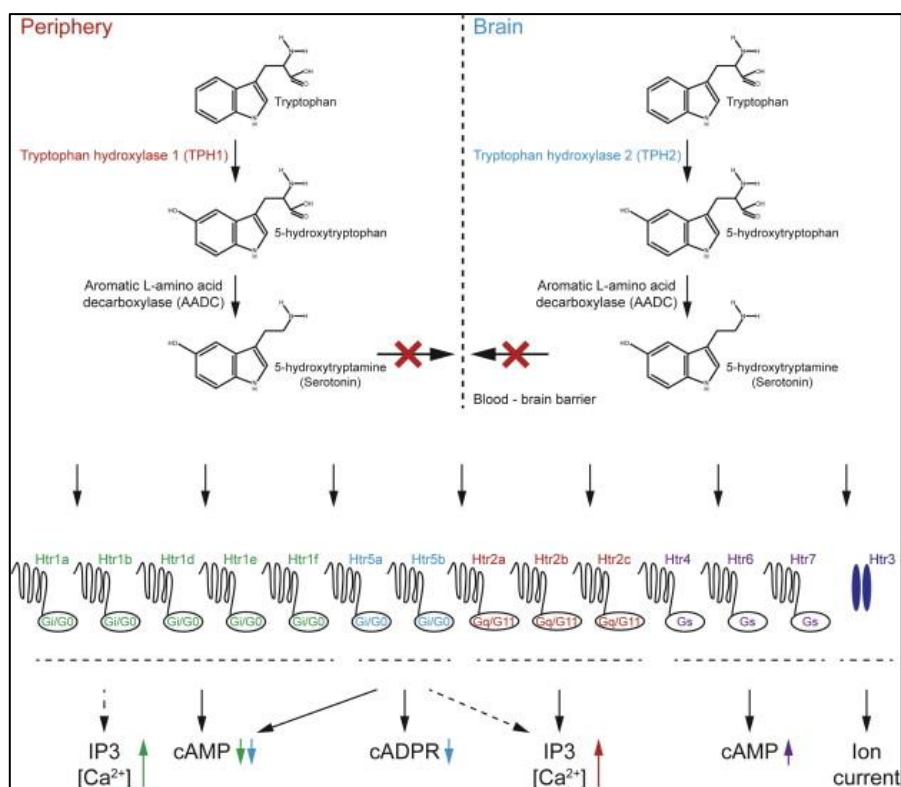


Figura 3 Síntese e sinalização da serotonina no cérebro e nos órgãos periféricos (modificado de El-Merahbi et al., 2015).

Como neurotransmissor, a serotonina é responsável pela regulação de diversos aspectos fisiológicos como a termorregulação, a respiração, o apetite, a homeostase da glicose, o sono, e a dor. Entretanto, esse neurotransmissor também modula funções cerebrais complexas, como a cognição e o comportamento emocional (Štrac et al., 2016). A ampla distribuição de neurônios serotoninérgicos permite a modulação coordenada de redes neurais localizadas em regiões distantes do cérebro, o que é necessário para maioria das funções cognitivas. No hipocampo o sistema serotoninérgico está relacionado com os processos de memória, navegação espacial, tomada de decisões e relações sociais, enquanto no córtex pré-frontal a serotonina está relacionada à memória de trabalho, atenção, tomada de decisão e aprendizado reverso (Robbins 2000; Harvey 2003; Clark et al., 2004; Buzsáki & Moser 2013; Rubin et al., 2014; Glikmann-Johnston et al., 2015; Spencer & Deneris 2017).

Alterações no sistema serotoninérgico foram relacionadas a diferentes transtornos comportamentais e doenças neurodegenerativas como transtorno bipolar (Lasky-Su et al.

2005), ansiedade-depressão (Sen et al. 2004), transtorno de personalidade (Savitz and Ramesar 2004), esquizofrenia (Abdolmaleky et al.2004) e doença de Alzheimer (Holmes et al. 1998).

1.3 Os Receptores da Serotonina

A sinalização da serotonina ocorre mediante sua ligação a pelo menos um dos seus quatorze receptores descritos (El-Merahbi et al., 2015). Os receptores de serotonina se dividem em sete classes (HTR1, HTR2, HTR3, HTR4, HTR5, HTR6 E HTR7), e somente a classe HTR3 é formada por receptores do tipo canal de cálcio acoplado a ligantes. Todos os outros receptores de serotonina pertencem a superfamília dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs). A serotonina se liga as diferentes formas dessa proteína para iniciar cascatas de sinalização específicas de acordo com a sua função (Noda, et al., 2004; Berger et al., 2009).

Os receptores da serotonina GPCRs iniciam as três cascatas canônicas de sinalização via $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ e $G\alpha_s$ (Nichols and Nichols 2008). Os receptores das classes HTR1 e HTR5 acoplam a $G\alpha_{i/o}$ inibindo a adenilil ciclase e diminuindo o AMPc intracelular (Bockaert et al., 1987; Lin et al., 2002). Os receptores da classe HTR2 acoplam a $G\alpha_{q/11}$ ativando a fosfolipase C produzindo inositol Trifosfato (iP3) e diacilglicerol (DAG) levando ao aumento de cálcio intracelular (Roth et al., 1984; Roth et al., 1998). Os receptores acoplados a $G\alpha_s$ incluem as classes de HTR4, HTR6 E HTR7, podem ligar positivamente a adenilil ciclase elevando o AMPc sendo demonstrado no hipocampo de cobaias (*Cavia porcellus*) (Bockaert et al., 1990). Entretanto, a ligação de serotonina via esses receptores também pode resultar no aumento de cálcio em miócitos atriais em humanos (Ouadid et al., 1992, Ponimaskin et al., 2002) (Figuras 3 e 4 e Tabela 1).

Adicionalmente os GPCRs também estão relacionados a uma sinalização não canônica através do recrutamento das arrestinas, fundamentais no mecanismo de dessensibilização dos GPCRs com grande importância clínica na tolerância a tratamentos farmacológicos (Freedman and Lefkowitz, 1996, Violin et al.,2014).

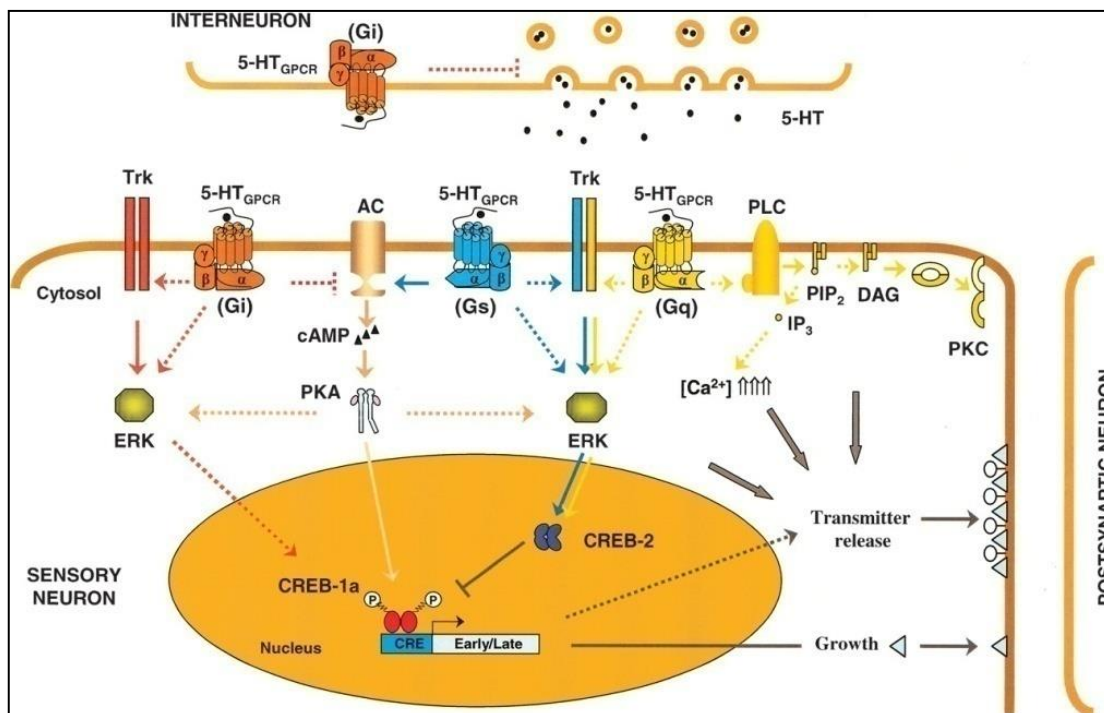


Figura 4 Representação esquemática das funções putativas da modulação neuronal via receptores 5-HT em modelo animal (*Aplysia californica*). Após a estimulação, interneurônios serotoninérgicos liberam serotonina (5-HT) que se liga aos receptores de serotonina (5-HT_{GPCR}) nas células a jusante como os neurônios sensoriais. O efeito final da 5-HT vai depender do tipo de receptor 5-HT e das moléculas sinalizadoras a jusante expressas dentro das diferentes células. A ligação da 5-HT a um receptor acoplado a proteína G_s estimula a enzima adenilil ciclase (AC; via rosa). A ativação desta enzima aumenta a concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que induz a ativação da proteína quinase A (PKA). A proteína PKA ativada pode fosforilar e modificar várias proteínas-alvo. PKA pode, por exemplo, recrutar a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) que se transloca para o núcleo onde fosforila proteínas de ligação a elementos de resposta a AMPc (CREBs). A fosforilação por ERK da isoforma repressora CREB-2 remove sua inibição em CREB-1a, enquanto a fosforilação de CREB-1a induz a transcrição de genes precoces/tardios contendo elementos de resposta ao AMPc. A transcrição destes genes pode levar ao crescimento de novas conexões sinápticas e potencialmente a liberação de neurotransmissores. O receptor acoplado a proteína G_s também pode ativar EKR (via azul) por meio da transativação de receptores de tirosina quinases (Trk) ou pela ativação direta da cascata de ERK. Para diminuir a liberação de 5-HT dos interneurônios, receptores acoplados a proteína G_i nos próprios interneurônios podem inibir a liberação de serotonina. Quando expressos na superfície de neurônios sensoriais, os receptores acoplados a proteína G_i podem inibir a ativação da adenilil ciclase e diminuir a cascata (via vermelha). Receptores acoplados a proteína G_i podem também ativar a via ERK por transativação de Trk ou ativação direta de ERK. A serotonina também pode se ligar aos receptores acoplados a proteína G_q que ativam a fosfolipase C (PLC; via bege). A enzima PLC ativada produz diacilglicerol (DAG) e inositol Trifosfato (IP₃) pela clivagem de fosfatidil inositol (PIP₂). Enquanto IP₃ se liga a um receptor no retículo endoplasmático para liberar cálcio (Ca²⁺) das reservas internas, o DAG permanece na membrana, onde ativa a proteína quinase C (PKC). Os receptores acoplados a proteína G_q também podem melhorar a ativação da via ERK, por transativação de Trk ou diretamente (Barbas et al. 2003).

Tabela 1 Receptores de serotonina e mecanismos de ação

Receptor	Estrutura	Sistema de sinalização	Sistema de transdução
HTR1A	GPCR	G $\alpha_{i/0}$	↓ AMPc
HTR1B	GPCR	G $\alpha_{i/0}$	↓ AMPc
HTR1D	GPCR	G $\alpha_{i/0}$	↓ AMPc
HTR1E	GPCR	G $\alpha_{i/0}$	↓ AMPc
HTR1F	GPCR	G $\alpha_{i/0}$	↓ AMPc
HTR2A	GPCR	G $\alpha_{q/11}$	↑ PLC
HTR2B	GPCR	G $\alpha_{q/11}$	↑ PLC
HTR2C	GPCR	G $\alpha_{q/11}$	↑ PLC
HTR3A		Canal iônico	Condutância iônica (K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺)
HTR3B		Canal iônico	Condutância iônica (K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺)
HTR3C		Canal iônico	Condutância iônica (K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺)
HTR3D		Canal iônico	Condutância iônica (K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺)
HTR3E		Canal iônico	Condutância iônica (K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺)
HTR4	GPCR	G α_s	↑ AMPc
HTR5A	GPCR	G $\alpha_{i/0}$	↓ AMPc
HTR6	GPCR	G α_s	↑ AMPc
HTR7	GPCR	G α_s	↑ AMPc

O foco da presente Dissertação são os genes *HTR2A* e *HTR2B* de modo que abaixo, mais detalhes sobre os mesmos, seus produtos, variabilidade e função serão descritos.

1.3.1 Receptores HTR2

Os receptores HTR2A, HTR2B e HTR2C possuem aproximadamente 50% de identidade nas suas sequências de aminoácidos, e demonstram similaridades nas suas estruturas moleculares, farmacológicas e nos sinais de transdução. HTR2A e HTR2C são sintetizados amplamente no cérebro, enquanto a expressão de HTR2B é restrita a poucas regiões do cérebro, como cerebelo, septo lateral, hipotálamo dorsal, hipocampo e amígdala medial (Duxon et al., 1997; Masson et al., 2012).

1.3.1.1 HTR2A

O HTR2A é uma proteína de 471 aminoácidos com sete domínios transmembranas, sendo transcrito em humanos pelo gene *HTR2A* que está localizado no cromossomo 13q14-q21 e que possui quatro exons que abrangem mais de 65kB (Ruble et al., 2016). O gene *HTR2A* é expresso em diferentes tecidos como cérebro, plaquetas, sistema cardiovascular e fibroblastos (Dürk et al., 2005). A expressão de *HTR2A* no cérebro tem implicado este gene no mecanismo de ação de alucinógenos e em doenças mentais como esquizofrenia e depressão (Nichols, 2004; Meltzer & Roth, 2013).

Diferentes estudos demonstraram que os polimorfismos rs6313 (102T/C), rs6311 (-1438A/G) e rs6314 (His452Tyr ou 1354C/T) de *HTR2A* estão relacionados com a variação na expressão dessa proteína (Serreti et al., 2007; Ruble et al., 2016). Em estudos farmacogenéticos esses polimorfismos apresentam efeito na variação da resposta de medicamentos antipsicóticos e antidepressivos (Arranz et al 1995, 1998, 2000; Yu et al., 2001; lane et al., 2002; Höfer et al., 2016). Em humanos, esses polimorfismos são associados a sintomas e suscetibilidade das desordens de humor, transtornos alimentares, esquizofrenia, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade, ansiedade, suicídio e doença de Alzheimer (Norton 2005; Roth, 2006; Serretti et al 2007; Jin et al., 2013; Zhao et al., 2014; Lacerda-Pinheiro et al 2014; Sinopoli et al., 2017).

Polimorfismos no gene *HTR2A* também estão associados a traços do comportamento em humanos. Banlaki et al. (2015) demonstraram que o alelo T do SNP rs7322347 localizado no intron 2 do gene *HTR2A* está associado com traços de agressividade em indivíduos sem histórico de transtornos psiquiátricos da Hungria. Esse polimorfismo possui um desequilíbrio de ligação com o polimorfismo rs6314, já relacionado à expressão dessa proteína (Ruble et al., 2016).

Haplótipos dos genes *HTR2A* em conjunto com o gene *SLC6A4* (solute carrier 6 member 4; anteriormente denominado 5-HTT), estão associados com o comportamento de cooperação em modelos de jogos econômicos. Nesses jogos, indivíduos portadores do haplótipo HH1 (alelos rs6311G e rs6313C) do gene *HTR2A* apresentaram um comportamento de maior contribuição se existe punição para quem não faz a cooperação. Da mesma forma, esses indivíduos apresentam maior estresse ao participarem de tais jogos (Schroeder et al., 2013).

Outro estudo avaliando interações sociais em um grupo de americanos com ancestralidade asiática demonstrou que homens portadores do alelo -1438G (rs6311) apresentaram um maior sucesso em um exercício de encontro rápido (*speed-dating*) (Wu et al., 2016). Da mesma forma esse alelo tem sido associado com a afiliação social entre jovens do sexo masculino, estando relacionado com a popularidade de indivíduos por comportamentos de transgressão de regras e agressividade (Burt 2008, Burt 2009; Dijkstra et al., 2013). Esse polimorfismo também está associado com o comportamento de busca por novidades (Nakamura et al., 2010; Saiz et al., 2010).

O polimorfismo rs6313 está associado a modulação do comportamento afetivo em adultos de acordo com o grau de cuidado materno. Indivíduos homocigotos TT para esse polimorfismo são mais influenciados pelo cuidado materno comparados com os outros genótipos. Um maior cuidado materno está relacionado a uma maior dependência de recompensa e maior facilidade em relacionamentos afetivos, enquanto que, um menor cuidado materno está relacionado aos comportamentos inversos nesses indivíduos (Salo et al., 2011). Esse polimorfismo está associado com a evitação de danos considerando o ambiente de cuidado materno superprotetor em uma população japonesa e o perfil socioeconômico dos pais em uma população finlandesa (Nakamura et al., 2010; Jokela et al., 2007). Em uma amostra de alcoolistas, os homocigotos para o alelo C desse polimorfismo apresentam em um maior comportamento de impulsividade (Jakubczyk et al., 2012).

Os polimorfismos rs9534511, rs6314, rs2770296 e rs927544 estão associados a diferentes características comportamentais. O alelo do G do SNP rs9534511 do HTR2A está relacionado ao comportamento de maior desinibição social em adolescentes americanos de origem mexicana (Archer et al., 2014). Já, homocigotos para o alelo G do polimorfismo rs6314 apresentam maiores índices de retraimento social (Rubin et al., 2013). Os polimorfismos rs2770296 e rs927544 estão associados a procura por novidade e extravagância em uma população saudável da Alemanha (Heck et al., 2009).

1.3.1.2 HTR2B

O HTR2B é uma proteína de 481 aminoácidos com sete domínios transmembranas, sendo transcrito em humanos pelo gene *HTR2B* que está localizado no cromossomo

2q36.3-q37.1 e possui três exons (Le Coniat et al., 1996). O HTR2B é expresso no fígado, rins, estômago, intestinos, pulmões e tecidos cardiovasculares, com uma limitada expressão no cérebro (Bonhaus et al., 1995; Nichols & Nichols, 2008). O receptor HTR2B desempenha um importante papel no desenvolvimento embrionário e na respiração (Choi et al., 1997; Nebigil et al., 2000; Nebigil et al., 2001; Tadros et al., 2007). Este receptor é também implicado em diferentes distúrbios neurológicos como esquizofrenia, autismo, enxaqueca e depressão (Kim et al., 2000; Corominas et al., 2010; Hervás et al., 2014; Pitychoutis et al., 2015; Nautiyal and Hen 2017).

O HTR2B está associado ao comportamento de impulsividade e agressividade em animais e em humanos. Camundongos com esse gene deletado (*Htr2b*^{-/-}) apresentam comportamentos de hiperatividade e déficit de inibição a resposta ao susto, interação social, memória e atenção e aumento de impulsividade e agressividade (Pitychoutis et al., 2015; Delprato et al., 2018). Mutações no gene *HTR2B* estão associadas ao comportamento agressivo em porcos (Chu et al., 2017) e em peixe-zebra (*Danio rerio*) (Theodoridi et al., 2017).

Em humanos, Bevilacqua et al. (2010) descreveram em um grupo de finlandeses com tendências a violência e impulsividade uma mutação de parada prematura em *HTR2B*. O alelo HTR2B Q20* oriundo desta mutação foi associado ao comportamento violento e impulsivo associado ao consumo de álcool, e também as tentativas de suicídio. Os indivíduos portadores desse alelo possuem uma baixa expressão do receptor HTR2B e apresentam um aumento no comportamento agressivo contra si mesmos e outros, um aumento da prática de atividades ilícitas, um aumento no abuso de substâncias ilícitas, um aumento na ocorrência de suicídios e depressão especialmente após o uso de álcool (Bevilacqua & Goldman, 2013; Tikkanen et al., 2015). Outra variação encontrada no exon 2 do gene *HTR2B* (542A>G, Gln11) foi associada com a vulnerabilidade ao abuso de drogas em uma população caucasiana dos Estados Unidos (Lin et al., 2004).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A serotonina possui ampla distribuição nos seres vivos e um importante papel na regulação desses organismos, seja atuando como um hormônio ou como um neurotransmissor (Garattini e Valzelli 1965; Erspamer 1966, Welsh 1968). Nos mamíferos, a serotonina e seus receptores são importantes na regulação do funcionamento adequado de múltiplos órgãos e na regulação de praticamente todas as funções cerebrais (Berger et al., 2009; El-Merahbi et al., 2015). Nessa classe animal, a função serotoninérgica elevada está associada a níveis maiores de socialização, habilidades sociais, liderança e/ou dominância social (Higley et al. 1996; Edwards & Kravitz 1997). Em humanos o aumento da serotonina é associado ao aumento da dominância em homens e mulheres, a diminuição da impaciência ou sarcasmo, maior altruísmo e cooperação (Moskowitz et al. 2001; Tse & Bond 2002).

Devido ao papel marcante da serotonina em vários aspectos comportamentais e neuropsiquiátricos é provável que alterações dentro do sistema serotoninérgico possam estar relacionadas à variabilidade comportamental de diferentes espécies de mamíferos. Os receptores de serotonina *HTR2A* e *HTR2B* possuem um importante papel na regulação do sistema nervoso por esse neurotransmissor estando relacionados a diferentes comportamentos nos mamíferos, como: impulsividade, agressividade, afiliação, desinibição e cooperação. Estudos de evolução molecular nos genes *HTR2A* e *HTR2B* podem ajudar a elucidar o papel do sistema serotoninérgico na variabilidade do padrão de comportamento dentro da classe Mammalia. Dessa forma, o presente trabalho possui os objetivos descritos abaixo:

2.1 Objetivos:

- a) Determinar variações espécie- ou grupo-específicas dos genes *HTR2A* e *HTR2B* em espécies de mamíferos cujos genomas estão disponíveis;
- b) Determinar os padrões evolutivos das regiões codificadoras dos genes *HTR2A* e *HTR2B*;
- c) Avaliar se as variações encontradas são táxon-específicas e se as mesmas estariam correlacionadas a comportamentos e outros traços táxon-específicos.

REFERÊNCIAS

- Abdolmaleky HM, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT (2004) Meta-analysis of association between the T102C polymorphism of the 5HT2a receptor gene and schizophrenia. *Schizophr Res.* 67(1):53-62.
- Agaba M, Ishengoma E, Miller WC, McGrath BC, Hudson CN, Bedoya Reina OC, ... Cavener DR (2016) Giraffe genome sequence reveals clues to its unique morphology and physiology. *Nature Communications* 7(May 2016):11519.
- Andrés AM, de Hemptinne C, Bertranpetit J (2007) Heterogeneous rate of protein evolution in serotonin genes. *Mol Biol Evol.* 24(12):2707-15.
- Archer NP, Wilkinson AV, Ranjit N, Wang J, Zhao H, Swann AC, Shete S (2014) Genetic, psychosocial, and demographic factors associated with social disinhibition in Mexican-origin youth. *Brain Behav.* 4(4):521-30.
- Arranz M, Collier D, Sodhi M, Ball D, Roberts G, Price J, Sham P, Kerwin R (1995) Association between clozapine response and allelic variation in 5-HT2A receptor gene. *Lancet.* 346(8970):281-2.
- Arranz MJ, Munro J, Sham P, Kirov G, Murray RM, Collier DA, Kerwin RW (1998) Meta-analysis of studies on genetic variation in 5-HT2A receptors and clozapine response. *Schizophr Res.* 32(2):93-9.
- Arranz MJ, Bolonna AA, Munro J, Curtis CJ, Collier DA, Kerwin RW (2000) The serotonin transporter and clozapine response. *Mol Psychiatry.* 5(2):124-5.
- Banlaki Z, Elek Z, Nanasi T, Szekely A, Nemoda Z, Sasvari-Szekely M & Ronai Z (2015) Polymorphism in the serotonin receptor 2a (HTR2A) gene as possible predisposal factor for aggressive traits. *PLoS ONE* 10(2):1–18.
- Barbas D, DesGroseillers L, Castellucci VF, Carew TJ, Marinesco S (2003) Multiple serotonergic mechanisms contributing to sensitization in aplysia: evidence of diverse serotonin receptor subtypes. *Learn Mem.* 10(5):373-86.

Belmer A, Doly S, Setola V, Banas SM, Moutkine I, Boutourlinsky K, Kenakin T, Maroteaux L (2014) Role of the N-terminal region in G protein-coupled receptor functions: negative modulation revealed by 5-HT_{2B} receptor polymorphisms. *Mol Pharmacol.* 85(1):127-38.

Berger M, Gray JA and Roth BL (2009) The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* 60:355–366.

Bevilacqua L, Doly S, Kaprio J, Yuan Q, Tikkanen R, Paunio T,... & Belmer A (2010) A population-specific HTR_{2B} stop codon predisposes to severe impulsivity. *Nature* 468(7327):1061-1066.

Bevilacqua L, Goldman D (2013) Genetics of impulsive behaviour. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 368(1615):20120380.

Bininda-Emonds OR, Cardillo M, Jones KE, MacPhee RD, Beck RM, Grenyer R, Price SA, Vos RA, Gittleman JL, Purvis A (2007) The delayed rise of present-day mammals. *Nature* 446(7135):507-12

Bockaert J, Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, Cory RN (1987) Piperazine derivatives including the putative anxiolytic drugs, buspirone and ipsapirone, are agonists at 5-HT_{1A} receptors negatively coupled with adenylate cyclase in hippocampal neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 335(5):588-92.

Bockaert J, Sebben M, Dumuis A (1990) Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine₄(5-HT₄) receptors positively coupled to adenylate cyclase in adult guinea pig hippocampal membranes: effect of substituted benzamide derivatives. *Mol Pharmacol.* 37(3):408-11.

Bonhaus DW, Bach C, DeSouza A, Salazar FH, Matsuoka BD, Zuppan P, Chan HW, Eglen RM (1995) The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine_{2B} (5-HT_{2B}) receptor gene products: comparison with 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Br J Pharmacol.* 115(4):622-8.

Burt SA, Mikolajewski AJ (2008) Preliminary evidence that specific candidate genes are associated with adolescent-onset antisocial behavior. *Aggress Behav.* 34(4):437-45.

- Burt A (2009) A mechanistic explanation of popularity: genes, rule breaking, and evocative gene-environment correlations. *J Pers Soc Psychol.* 96(4):783-94.
- Buzsáki G, Moser EI (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system, *Nat. Neurosci.* 16:130-138.
- Chabbi-Achengli Y, Coudert AE, Callebert J, Geoffroy V, Cote F, Collet C and de Vernejoul MC (2012) Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:2567–2572.
- Choi DS, Ward SJ, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L (1997) 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development* 124(9):1745-55.
- Chu Q, Liang T, Fu L, Li H, Zhou B (2017) Behavioural genetic differences between Chinese and European pigs. *J Genet.* 96(4):707-715.
- Clark L, Cools R, Robbins TW (2004) The neuropsychology of ventral prefrontal cortex: decision-making and reversal learning, *Brain Cogn.* 55:41-53.
- Corominas R, Sobrido MJ, Ribasés M, Cuenca-León E, Blanco-Arias P, Narberhaus B, Roig M, Leira R, López-González J, Macaya A, Cormand B (2010) Association study of the serotonergic system in migraine in the Spanish population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 153B(1):177-84.
- Curran KP and Chalasani SH (2012) Serotonin circuits and anxiety: what can invertebrates teach us? *Invert. Neurosci.* 12:81–92.
- Delprato A, Bonheur B, Algéo MP, Murillo A, Dhawan E, Lu L, Williams RW, Crusio WE (2018) A QTL on chromosome 1 modulates inter-male aggression in mice. *Genes Brain Behav.*
- Dewkar GK, Peddi S, Mosier PD, Roth BL, Westkaemper RB (2008) Methoxy-substituted 9-aminomethyl-9,10-dihydroanthracene (AMDA) derivatives exhibit differential binding affinities at the 5-HT_{2A} receptor. *Bioorg Med Chem Lett.* 18(19):5268-71.

Dijkstra JK, Lindenberg S, Zijlstra L, Bouma E, Veenstra R (2013) The secret ingredient for social success of young males: a functional polymorphism in the 5HT2A serotonin receptor gene. *PLoS One* 8(2):e54821.

Dürk TI, Panther E, Müller T, Sorichter S, Ferrari D, Pizzirani C, Di Virgilio F, Myrtek D, Norgauer J, Idzko M (2005) 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. *Int Immunol.* 17(5):599-606. Epub 2005 Mar 31.

Duxon MS, Kennett GA, Lightowler S, Blackburn TP, Fone KC (1997) Activation of 5-HT2B receptors in the medial amygdala causes anxiolysis in the social interaction test in the rat. *Neuropharmacology* 36(4-5):601-8.

Edwards DH, Kravitz EA (1997) Serotonin, social status and aggression. *Curr Opin Neurobiol.* 7(6):812-9.

El-Merahbi R, Löffler M, Mayer A & Sumara G (2015) The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS letters* 589(15):1728-1734.

Erspamer V, Asero B (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169(4306):800-1.

Erspamer V, Roseghini M, Endean R, Anastasi A (1996) Biogenic amines and active polypeptides in the skin of Australian amphibians. *Nature* 212(5058):204.

Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res.* 51:319-51; discussion 352-3.

Glikmann-Johnston Y, Saling MM, Reutens DC, Stout JC (2015) Hippocampal 5-HT1A receptor and spatial learning and memory, *Front. Pharmacol.* 6:289.

Harvey JA (2003) Role of the serotonin 5-HT2A receptor in learning, *Learn. Mem.* 10:355-362.

Heck A, Lieb R, Ellgas A, Pfister H, Lucae S, Roeske D, Pütz B, Müller-Myhsok B, Uhr M, Holsboer F, Ising M (2009) Investigation of 17 candidate genes for personality traits confirms effects of the HTR2A gene on novelty seeking. *Genes Brain Behav.* 8(4):464-72.

Hervás A, Toma C, Romarís P, Ribasés M, Salgado M, Bayes M, Balmaña N, Cormand B, Maristany M, Guijarro S, Arranz MJ (2014) The involvement of serotonin polymorphisms in autistic spectrum symptomatology. *Psychiatr Genet.* 24(4):158-63.

Higley JD, King ST Jr, Hasert MF, Champoux M, Suomi SJ, Linnoila M (1996) Stability of interindividual differences in serotonin function and its relationship to severe aggression and competent social behavior in rhesus macaque females. *Neuropsychopharmacology* 14(1):67-76.

Höfer P, Schosser A, Calati R, Serretti A, Massat I, Kocabas NA, Konstantinidis A, Mendlewicz J, Souery D, Zohar J, Juven-Wetzler A, Montgomery S, Kasper S (2016) The impact of serotonin receptor 1A and 2A gene polymorphisms and interactions on suicide attempt and suicide risk in depressed patients with insufficient response to treatment--a European multicentre study. *Int Clin Psychopharmacol.*

Holmes C, Arranz MJ, Powell JF, Collier DA, Lovestone S (1998) 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor polymorphisms and psychopathology in late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 7(9):1507-9.

Hu Y, Wu Q, Ma S, Ma T, Shan L, Wang X, ... Wei F (2017) Comparative genomics reveals convergent evolution between the bamboo-eating giant and red pandas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201613870.

Hunt DM, Hankins MW, Collin SP, & Marshall NJ (Eds.) (2014) *Evolution of visual and non-visual pigments (Vol. 4)*. Springer.

Jakubczyk A, Wrzosek M, Lukaszewicz J, Sadowska-Mazuryk J, Matsumoto H, Sliwerska E, Glass J, Burmeister M, Brower KJ, Wojnar M (2012) The CC genotype in HTR2A T102C polymorphism is associated with behavioral impulsivity in alcohol-dependent patients. *J Psychiatr Res.* 46(1):44-9.

Jin C, Xu W, Yuan J, Wang G, Cheng Z (2013) Meta-analysis of association between the -1438A/G (rs6311) polymorphism of the serotonin 2A receptor gene and major depressive disorder. *Neurol Res.* 35(1):7-14.

- Jokela M, Lehtimäki T, Keltikangas-Järvinen L (2007) The serotonin receptor 2A gene moderates the influence of parental socioeconomic status on adulthood harm avoidance. *Behav Genet.* 37(4):567-74.
- Jones KE, Bielby J, Cardillo M, Fritz SA, O'Dell J, Orme CDL, ... & Connolly C (2009) PanTHERIA: a species-level database of life history, ecology, and geography of extant and recently extinct mammals. *Ecology* 90(9):2648-2648.
- Kang K, Park S, Kim YS, Lee S and Back K (2009) Biosynthesis and biotechnological production of serotonin derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83:27–34.
- Kearse A, Moir M, Wilson R, Stones-Havas A, Cheung S, Sturrock M, Buxton S, Cooper S, Markowitz A, Duran S, Thierer C, Ashton T, Mentjies B & Drummond P (2012) “Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data,” *Bioinformatics* 28(12):1647–1649.
- Kim SJ, Veenstra-VanderWeele J, Hanna GL, Gonen D, Leventhal BL, Cook EH Jr (2000) Mutation screening of human 5-HT(2B)receptor gene in early-onset obsessive-compulsive disorder. *Mol Cell Probes* 14(1):47-52.
- Kim H et al. (2010) Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat. Med.* 16:804–808.
- Klima M, Maier W (1990) Body Structure. In: Grzimek B, ed. *Grzimek's Encyclopedia of Mammals*, Vol. 1, 1 Edition. New York: Mcgraw-Hill, pp. 58-84.
- Lacerda-Pinheiro SF, Pinheiro Junior RF, Pereira de Lima MA, Lima da Silva CG, Vieira dos Santos Mdo S, Teixeira Júnior AG, Lima de Oliveira PN, Ribeiro KD, Rolim-Neto ML, Bianco BA (2014) Are there depression and anxiety genetic markers and mutations? A systematic review. *J Affect Disord.* 168:387-98. doi: 10.1016/j.jad.2014.07.016.
- Lane HY, Chang YC, Chiu CC, Chen ML, Hsieh MH, Chang WH (2002) Association of risperidone treatment response with a polymorphism in the 5-HT(2A) receptor gene. *Am J Psychiatry* 159(9):1593-5.

- Lasky-Su JA, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT (2005) Meta-analysis of the association between two polymorphisms in the serotonin transporter gene and affective disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*
- Le Coniat M, Choi DS, Maroteaux L, Launay JM, Berger R (1996) The 5-HT_{2B} receptor gene maps to 2q36.3-2q37.1. *Genomics* 32(1):172-3.
- Lin SL, Setya S, Johnson-Farley NN, Cowen DS (2002) Differential coupling of 5-HT(1) receptors to G proteins of the G(i) family. *Br J Pharmacol.* 136(7):1072-8.
- Lin Z, Walther D, Yu XY, Drgon T, Uhl GR (2004) The human serotonin receptor 2B: coding region polymorphisms and association with vulnerability to illegal drug abuse. *Pharmacogenetics* 14(12):805-11.
- Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR (2011) Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 146(1):18-36.
- Lukas D & Clutton-Brock TH (2013) The evolution of social monogamy in mammals. *Science* 341(6145):526-530.
- Luo ZX (2007) Transformation and diversification in early mammal evolution. *Nature* 450(7172):1011-9.
- Martins ACCL, Silva TM, Gloria MBA (2010) Simultaneous determination of serotonin precursors - tryptophan and 5-hidroxytryptophan - in coffee. *Quím. Nova* 33(2).
- Masson J, Emerit MB, Hamon M, Darmon M (2012) Serotonergic signaling: multiple effectors and pleiotropic effects. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 1:685–713.
- Meltzer HY & Roth BL (2013) Lorcaserin and pimavanserin: Emerging selectivity of serotonin receptor subtype-targeted drugs. *Journal of Clinical Investigation* 123(12):4986–4991.
- Montgomery SH, Mundy NI, Barton RA (2014) ASPM and mammalian brain evolution: a case study in the difficulty in making macroevolutionary inferences about gene-phenotype associations. *Proc Biol Sci.* 281(1778):20131743.

Moskowitz DS, Pinard G, Zuroff DC, Annable L, Young SN (2001) The effect of tryptophan on social interaction in everyday life: a placebo-controlled study. *Neuropsychopharmacology* 25(2):277-89.

Myers P, Espinosa R, Parr CS, Jones T, Hammond GS & Dewey TA (2006) The animal diversity web. Accessed October, 12(2006), 2.

Nakamura Y, Ito Y, Aleksic B, Kushima I, Yasui-Furukori N, Inada T, Ono Y, Ozaki N (2010) Influence of HTR2A polymorphisms and parental rearing on personality traits in healthy Japanese subjects. *J Hum Genet.* 55(12):838-41.

Nautiyal KM, Hen R (2017) Serotonin receptors in depression: from A to B. *F1000Res* 6:123. doi: 10.12688/f1000research.9736.1. eCollection 2017.

Nebigil CG, Choi DS, Dierich A, Hickel P, Le Meur M, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L (2000) Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(17):9508-13.

Nebigil CG, Etienne N, Schaerlinger B, Hickel P, Launay JM, Maroteaux L (2001) Developmentally regulated serotonin 5-HT_{2B} receptors. *Int J Dev Neurosci.* 19(4):365-72.

Nichols DE (2004) Hallucinogens. *Pharmacology & therapeutics* 101(2):131-181.

Nichols DE & Nichols CD (2008) Serotonin receptors. *Chemical Reviews* 108(5):1614–1641.

Noda M, Higashida H, Aoki S and Wada K (2004) Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Mol. Neurobiol.* 29:31–39.

Norton N, Owen MJ (2005) HTR2A: association and expression studies in neuropsychiatric genetics. *Ann Med.* 37(2):121-9.

Nowak R (1991) *Walker's Mammals of the World*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.

Ouadid H, Seguin J, Dumuis A, Bockaert J, Nargeot J (1992) Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine₄ receptors. *Mol Pharmacol.* 41(2):346-51.

Paulmann N et al. (2009) Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol.* 7, e1000229.

Pianka, ER (1970). On r and K selection. *The American Naturalist* 104(940): 592-597.

Pitychoutis PM, Belmer A, Moutkine I, Adrien J, Maroteaux L (2015) Mice Lacking the Serotonin Htr2B Receptor Gene Present an Antipsychotic-Sensitive Schizophrenic-Like Phenotype. *Neuropsychopharmacology* 40(12):2764-73.

Ponimaskin EG, Heine M, Joubert L, Sebben M, Bickmeyer U, Richter DW, Dumuis A (2002) The 5-hydroxytryptamine(4a) receptor is palmitoylated at two different sites, and acylation is critically involved in regulation of receptor constitutive activity. *J Biol Chem.* 277(4):2534-46.

Rapport MM, Green AA, Page IH (1947) Purification of the substance which is responsible for the vasoconstrictor activity of serum. *Fed Proc.* 6(1 Pt 2):184

Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Crystalline Serotonin. *Science* 108(2804):329-30.

Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem.* 176(3):1243-51.

Rapport MM (1949) Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J Biol Chem.* 180(3):961-9.

Reichholf J (1990) Control of the Environment. In: Grzimek B, ed. *Grzimek's Encyclopedia of Mammals*, Vol. 1, 1st Edition. New York: McGraw-Hill, pp. 107-119.

Robbins TW (2000) From arousal to cognition: the integrative position of the prefrontal cortex, *Prog. Brain Res.* 126:469-483.

Roth BL, Chuang DM (1987) Multiple mechanisms of serotonergic signal transduction. *Life Sci.* 41(9):1051-64.

Roth BL, Berry SA, Kroeze WK, Willins DL, Kristiansen K (1998) Serotonin 5-HT_{2A} receptors: molecular biology and mechanisms of regulation. *Crit Rev Neurobiol.* 12(4):319-38.

- Rowe T (1988) Definition, diagnosis, and origin of Mammalia. *Journal of Vertebrate Paleontology* 8(3):241-264.
- Rubin DH, Althoff RR, Ehli EA, Davies GE, Rettew DC, Crehan ET, Walkup JT, Hudziak JJ (2013) Candidate gene associations with withdrawn behavior. *J Child Psychol Psychiatry* 54(12):1337-45.
- Rubin RD, Watson PD, Duff MC, Cohen NJ (2014) The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior, *Front. Hum. Neurosci.* 8:742.
- Ruble CL, Smith RM, Calley J, Munsie L, Airey DC, Gao Y, ... Nisenbaum LK (2016) Genomic structure and expression of the human serotonin 2A receptor gene (HTR2A) locus: identification of novel HTR2A and antisense (HTR2A-AS1) exons. *BMC Genetics* 17(1):16.
- Salo J, Jokela M, Lehtimäki T, Keltikangas-Järvinen L (2011) Serotonin receptor 2A gene moderates the effect of childhood maternal nurturance on adulthood social attachment. *Genes Brain Behav.* 10(7):702-9.
- Savitz JB, Ramesar RS (2004) Genetic variants implicated in personality: a review of the more promising candidates. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 131B(1):20-32
- Schroeder KB, McElreath R, Nettle D (2013) Variants at serotonin transporter and 2A receptor genes predict cooperative behavior differentially according to presence of punishment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(10):3955-60.
- Sela I, Ashkenazy H, Katoh K & Pupko T (2015) GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic acids research* 43(W1):W7-W14.
- Sen S, Burmeister M, Ghosh D (2004) Meta-analysis of the association between a serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) and anxiety-related personality traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 127B(1):85-9.
- Serretti A, Drago A, De Ronchi D (2007) HTR2A gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. *Curr Med Chem.* 14(19):2053-69.

- Sinopoli VM, Burton CL, Kronenberg S, Arnold PD (2017) A review of the role of serotonin system genes in obsessive-compulsive disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 80:372-381.
- Spencer WC, Deneris ES (2017) Regulatory Mechanisms Controlling Maturation of Serotonin Neuron Identity and Function. *Front Cell Neurosci.* 11:215.
- Springer MS, Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ (2003) Placental mammal diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(3):1056-61.
- Srinivasan S, Sadegh L, Elle IC, Christensen AG, Faergeman NJ and Ashrafi K (2008) Serotonin regulates *C. elegans* fat and feeding through independent molecular mechanisms. *Cell Metab.* 7:533–544.
- Stunes AK, Reseland JE, Hauso O, Kidd M, Tommeras K, Waldum HL, Syversen U and Gustafsson BI (2011) Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation. *Diabetes Obes. Metab.* 13:551–558.
- Švob Štrac D, Pivac N, Mück-Šeler D (2016) The serotonergic system and cognitive function. *Transl Neurosci.* 7(1):35-49.
- Tadros SF, D'Souza M, Zettel ML, Zhu X, Lynch-Erhardt M, Frisina RD (2007) Serotonin 2B receptor: upregulated with age and hearing loss in mouse auditory system. *Neurobiol Aging.* 28(7):1112-23.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S and Tamura KS (2013) “MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0,” *Mol. Biol. Evol.* 30(12):2725–2729.
- Theodoridi A, Tsalafouta A, Pavlidis M (2017) Acute Exposure to Fluoxetine Alters Aggressive Behavior of Zebrafish and Expression of Genes Involved in Serotonergic System Regulation. *Front Neurosci.* 11:223.
- Tikkanen R, Tiihonen J, Rautiainen MR, Paunio T, Bevilacqua L, Panarsky R, Goldman D, Virkkunen M (2015) Impulsive alcohol-related risk-behavior and emotional dysregulation among individuals with a serotonin 2B receptor stop codon. *Transl Psychiatry* 5:e681.

- Tse WS, Bond AJ (2002) Serotonergic intervention affects both social dominance and affiliative behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 161(3):324-30.
- Twarog BM, Page IH (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol.* 175(1):157-61.
- Valzelli L, Garattini S (1968) Behavioral changes and 5-hydroxytryptamine turnover in animals. *Adv Pharmacol.* 6(Pt B):249-60.
- Vaughan T, Ryan J, Czaplewski N (2000) *Mammalogy*, 4th Edition. Toronto: Brooks Cole
- Violin JD, Crombie AL, Soergel DG, Lark MW (2014) Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends Pharmacol Sci.* 35(7):308-16.
- Welsh JH (1968) Distribution of serotonin in the nervous system of various animal species. *Adv Pharmacol.* 6(Pt A):171-88.
- Westkaemper RB & Roth BL (2006) Structure and Function Reveal Insights in the Pharmacology of 5-HT Receptor Subtypes. In: Roth BL, ed. *The serotonin receptors : from molecular pharmacology to human therapeutics*. New Jersey: Humana Press, pp. 39-54.
- Wu K, Chen C, Moyzis RK, Greenberger E, Yu Z (2016) Gender Interacts with Opioid Receptor Polymorphism A118G and Serotonin Receptor Polymorphism -1438 A/G on Speed-Dating Success. *Hum Nat.* 27(3):244-60.
- Yang Z (2007) PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular biology and evolution* 24(8):1586-1591.
- Yu YW, Tsai SJ, Yang KH, Lin CH, Chen MC, Hong CJ (2001) Evidence for an association between polymorphism in the serotonin-2A receptor variant (102T/C) and increment of N100 amplitude in schizophrenics treated with clozapine. *Neuropsychobiology* 43(2):79-82.
- Zhao X, Sun L, Sun YH, Ren C, Chen J, Wu ZQ, Jiang YH, Lv XL (2014) Association of HTR2A T102C and A-1438G polymorphisms with susceptibility to major depressive disorder: a meta-analysis. *Neurol Sci.* 35(12):1857-66.