

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

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
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
<b>2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivos.....	18
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 Sequências e alinhamentos.....	19
3.2 Análises Evolutivas.....	24
3.3 Associação Fenotípica.....	25
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

## 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).

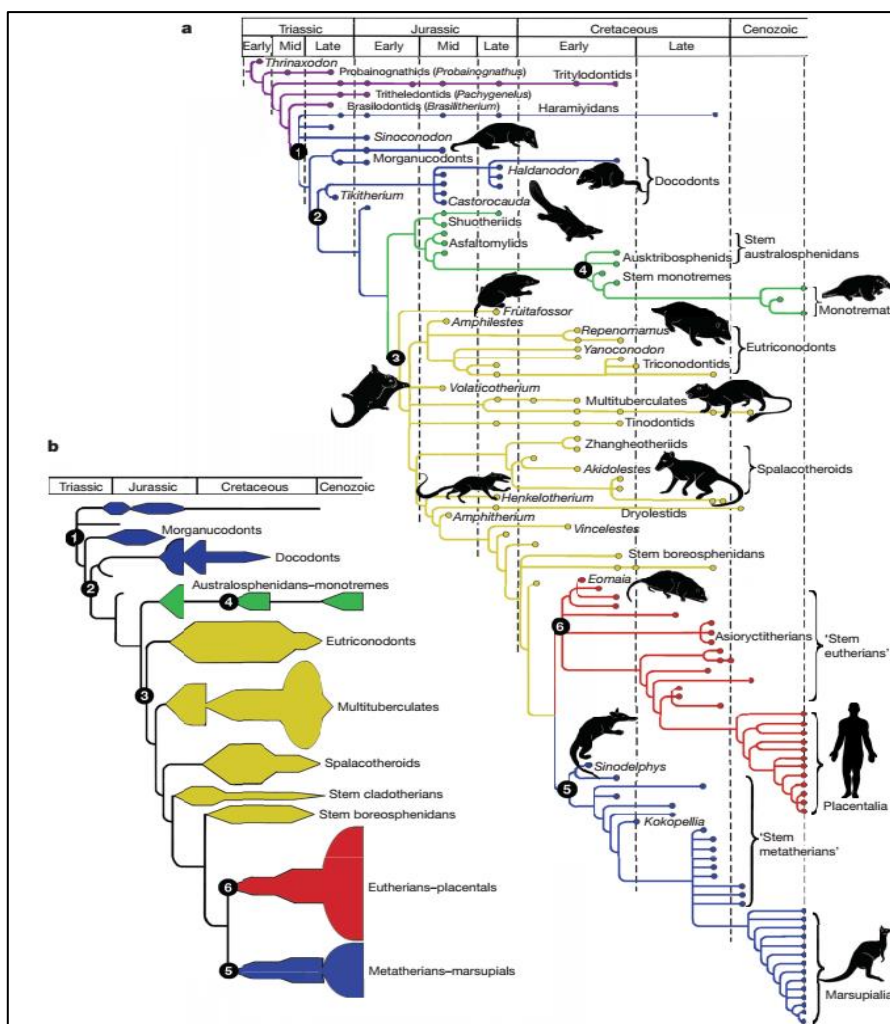


Figura 1 Filogenia e diversificação dos grupos de mamíferos do mesozoico (Zhe-Xi Luo 2007)



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).

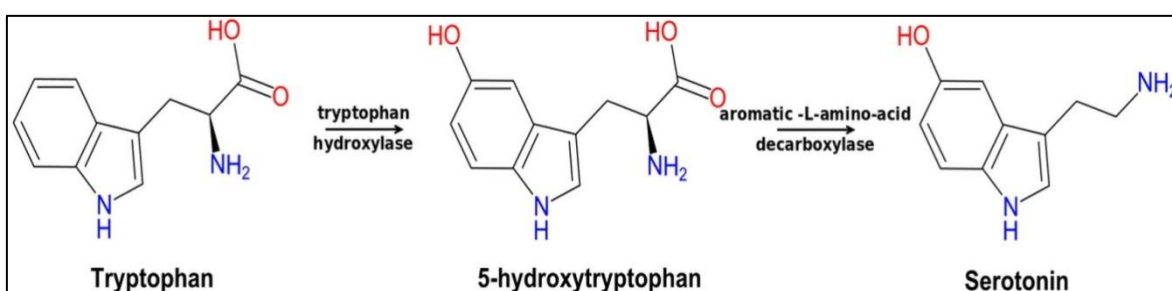
Os mamíferos são cosmopolitas e evoluíram para sobreviver em praticamente todos os ambientes terrestres e aquáticos do planeta. Podem viver em diferentes climas, como: desertos, florestas tropicais e o pólo ártico. Dentro dessa classe de animais algumas espécies apresentam adaptações para voar como os 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

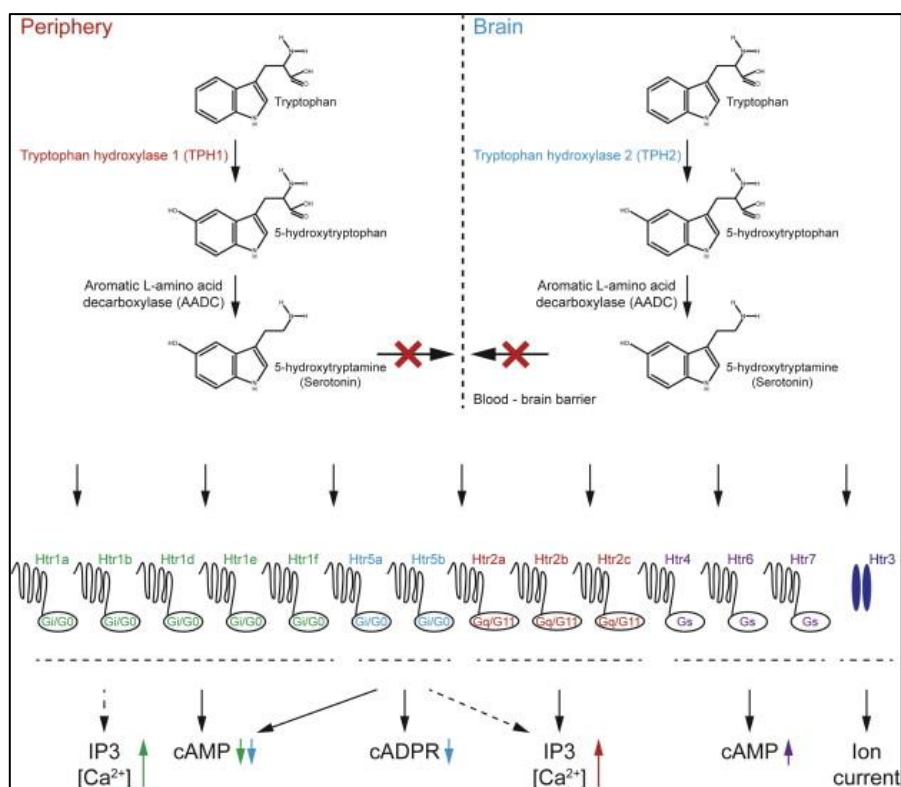
(Erspamer & Asero, 1952). Em meados de 1948, uma substância vasoconstritora foi isolada do sangue por Maurice Rapport, Arda Green, e Irvine Page na “Cleveland Clinic” (Rapport et al., 1947, 1948a, 1948b). Essa substância foi denominada serotonina (do latim “serum”, de onde foi encontrada e do grego “tonic”, 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  $\beta$ , 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.

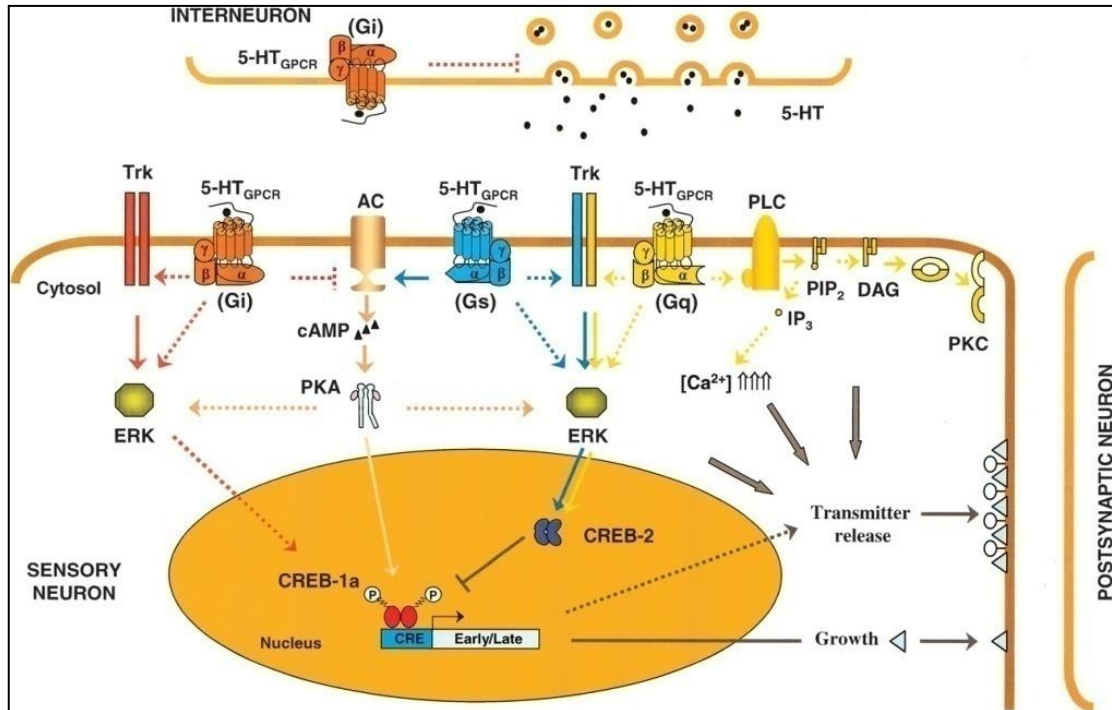
2005), ansiedade-depressão (Sen et al. 2004), transtorno de personalidade (Savitz and Ramesar 2004), esquizofrenia (Abdolmaleky et al.2004) e doença de Alzheimer (Holmes et al. 1998).

### 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 ( $5\text{-HT}_{\text{GPCR}}$ ) 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  $G\alpha_s$  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  $G\alpha_s$  também pode ativar ERK (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  $G\alpha_i$  nos próprios interneurônios podem inibir a liberação de serotonina. Quando expressos na superfície de neurônios sensoriais, os receptores acoplados a proteína  $G\alpha_i$  podem inibir a ativação da adenilil ciclase e diminuir a cascata (via vermelha). Receptores acoplados a proteína  $G\alpha_i$  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  $G\alpha_q$  que ativam a fosfolipase C (PLC; via bege). A enzima PLC ativada produz diacilglicerol (DAG) e inositol Trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) pela clivagem de fosfatidil inositol ( $\text{PIP}_2$ ). Enquanto  $\text{IP}_3$  se liga a um receptor no retículo endoplasmático para liberar cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) das reservas internas, o DAG permanece na membrana, onde ativa a proteína quinase C (PKC). Os receptores acoplados a proteína  $G\alpha_q$  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 <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )
HTR3B		Canal iônico	Condutância iônica (K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )
HTR3C		Canal iônico	Condutância iônica (K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )
HTR3D		Canal iônico	Condutância iônica (K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )
HTR3E		Canal iônico	Condutância iônica (K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )
HTR4	GPCR	G $\alpha_s$	↑ AMPc
HTR5A	GPCR	G $\alpha_{i/0}$	↓ AMPc
HTR6	GPCR	G $\alpha_s$	↑ AMPc
HTR7	GPCR	G $\alpha_s$	↑ 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 homozigotos 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 homozigotos 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, homozigotos 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*<sup>-/-</sup>) 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.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Sequências e alinhamentos

No estudo, foram utilizadas as sequências das regiões codificadoras dos genes *HTR2A* e *HTR2B* de mamíferos recuperadas dos bancos de dados Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Ensembl (<http://www.ensembl.org>) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Lista de espécies e códigos de acesso para banco de dados

Species	<i>HTR2A</i>	<i>HTR2B</i>
<i>Acinonyx_jubatus</i>	XM_015068908	XM_015087695
<i>Ailuropoda_melanoleuca</i>	XM_002914977	XM_019797731
<i>Aotus_nancymaae</i>	XM_012465157	XM_012434129
<i>Balaenoptera_acutorostrata_scammoni</i>	XM_007186840	XM_007184706
<i>Bison_bison_bison</i>	XM_010854645	XM_010836972
<i>Bos_indicus</i>	NM_001001157	NM_001205448
<i>Bos_mutus</i>	XM_019971259	XM_019978472
<i>Bos_taurus</i>	XM_005896741	XM_005887033
<i>Bubalus_bubalis</i>	XM_006072566	XM_006050127
<i>Callithrix_jacchus</i>	XM_017971527	XM_002749883
<i>Camelus_dromedarius</i>	XM_010980835	XM_010985651
<i>Capra_hircus</i>	XM_005687443	XM_005676671
<i>Cavia_porcellus</i>	XM_003477480	NM_001172962
<i>Cebus_capucinus_imitator</i>	XM_017535967	XM_017529045
<i>Ceratotherium_simum_simum</i>	XM_004433653	XM_004427671
<i>Cercocebus_atys</i>	XM_012064326	XM_012072604
<i>Chinchilla_lanigera</i>	XM_005387547	XM_005395400
<i>Chlorocebus_sabaeus</i>	XM_007960372	XM_007966608
<i>Chrysochloris_asiatica</i>	XM_006837636	XM_006866737
<i>Colobus_angolensis_palliatus</i>	XM_011939759	XM_011951984
<i>Condylura_cristata</i>	XM_004680258	XM_004674205
<i>Cricetulus_griseus</i>	NM_001246728	XM_007626075
<i>Dasyopus_novemcinctus</i>	XM_004472872	XM_004451412
<i>Dipodomys_ordii</i>	XM_013036627	XM_013010593
<i>Echinops_telfairi</i>	XM_004714061	XM_004701671
<i>Elephantulus_edwardii</i>	XM_006887805	XM_006893481
<i>Eptesicus_fuscus</i>	XM_008152051	XM_008160205
<i>Equus_asinus</i>	XM_014838913	XM_014836055
<i>Equus_caballus</i>	XM_014732013	XM_001498084
<i>Equus_przewalskii</i>	XM_008524892	XM_008530051
<i>Erinaceus_europaeus</i>	XM_007521214	XM_007519416

<i>Felis_catus</i>	XM_003980393	XM_003991248
<i>Fukomys_damarensis</i>	XM_010637007	XM_010608095
<i>Gorilla_gorilla_gorilla</i>	XM_004054487	XM_004033342
<i>Heterocephalus_glaber</i>	XM_004844194	XM_004868046
<i>Hipposideros_armiger</i>	XM_019630380	XM_019629867
<i>Homo_sapiens</i>	NM_000621	NM_000867
<i>Ictidomys_tridecemlineatus</i>	XM_005330191	XM_005326441
<i>Jaculus_jaculus</i>	XM_004665876	XM_004662949
<i>Lipotes_vexillifer</i>	XM_007466444	XM_007462739
<i>Loxodonta_africana</i>	XM_003412616	XM_003417917
<i>Macaca_fascicularis</i>	XM_005585828	XM_005574572
<i>Macaca_mulatta</i>	XM_015120877	XM_015111331
<i>Macaca_nemestrina</i>	XM_011756551	XM_011728174
<i>Mandrillus_leucophaeus</i>	XM_011973622	XM_011998078
<i>Manis_javanica</i>	XM_017665258	XM_017679754
<i>Marmota_marmota_marmota</i>	XM_015484026	XM_015481535
<i>Mesocricetus_auratus</i>	XM_013114000	XM_005082535
<i>Microtus_ochrogaster</i>	XM_005355612	XM_005361766
<i>Miniopterus_natalensis</i>	XM_016199505	XM_016204680
<i>Monodelphis_domestica</i>	ENSMODG00000011274	ENSMODG00000010720
<i>Mus_musculus</i>	NM_172812	XM_006529145
<i>Mustela_putorius_furo</i>	XM_004759184	XM_004773454
<i>Myotis_brandtii</i>	XM_005861390	XM_005882969
<i>Myotis_davidii</i>	XM_006774191	XM_006760412
<i>Myotis_lucifugus</i>	XM_006083596	XM_014463637
<i>Nannospalax_galili</i>	XM_008824371	XM_008838065
<i>Octodon_degus</i>	XM_004633082	XM_004637306
<i>Odobenus_rosmarus_divergens</i>	XM_004412221	XM_004396037
<i>Orcinus_orca</i>	XM_004274591	XM_004262604
<i>Ornithorhynchus_anatinus</i>	ENSOANG00000015564	ENSOANG00000009328
<i>Orycteropus_afer_afer</i>	XM_007946366	XM_007942029
<i>Oryctolagus_cuniculus</i>	XM_008273798	XM_017343191
<i>Otolemur_garnettii</i>	XM_003803358	XM_003784872
<i>Ovis_aries</i>	XM_004012066	XM_012148490
<i>Pan_paniscus</i>	XM_003811414	XM_003821860
<i>Pan_troglodytes</i>	XM_000522752	XM_001144172
<i>Panthera_pardus</i>	XM_019447561	XM_019445610
<i>Panthera_tigris_altaica</i>	XM_007085398	XM_007082955
<i>Pantholops_hodgsonii</i>	XM_005964487	XM_005979092
<i>Peromyscus_maniculatus_bairdii</i>	XM_016006895	XM_016002726
<i>Physeter_catodon</i>	XM_007102517	XM_007107995
<i>Pongo_abelii</i>	NM_001133446	XM_009238216
<i>Propithecus_coquereli</i>	XM_012643830	XM_012652202

<i>Pteropus_alecto</i>	XM_006916436	XM_006906639
<i>Pteropus_vampyrus</i>	XM_011372026	XM_011381037
<i>Rattus_norvegicus</i>	NM_017254	XM_017596306
<i>Rhinolophus_sinicus</i>	XM_019748070	XM_019739783
<i>Rhinopithecus_bieti</i>	XM_017862063	XM_017886360
<i>Rhinopithecus_roxellana</i>	XM_010358103	XM_010362000
<i>Rousettus_aegyptiacus</i>	XM_016129335	XM_016134693
<i>Saimiri_boliviensis_boliviensis</i>	XM_010330057	XM_010341154
<i>Sarcophilus_harrisii</i>	XM_012545294	XM_003770261
<i>Sorex_araneus</i>	XM_004604572	XM_004610809
<i>Sus_scrofa</i>	XM_013980517	XM_005672269
<i>Tarsius_syrichta</i>	XM_008052751	XM_008055065
<i>Trichechus_manatus_latirostris</i>	XM_004376585	XM_004389505
<i>Tupaia_chinensis</i>	XM_006140646	XM_006171119
<i>Tursiops_truncatus</i>	XM_019936576	XM_019923523
<i>Ursus_maritimus</i>	XM_008706848	XM_008690354

As sequências de 90 espécies de mamíferos utilizadas no estudo representam dezoito ordens mamalianas, e abrangem todas as três grandes linhagens dessa classe: Monotremados (mamíferos mais basais que ainda põem ovos), Marsupiais (mamíferos onde os neonatos prematuros se desenvolvem no marsúpio, uma bolsa externa no abdômen da mãe) e Placentários (mamíferos que possuem placenta, responsável por alimentar o feto durante o desenvolvimento que ocorre dentro do útero) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Classificação das espécies

Subclasse	Infraclasse	Magnordens	Superordens	Ordens	Espécies
Theria	Placentalia	Atlantogenata	Afrotheria	Afrosoricida	<i>Chrysochloris_asiatica</i> <i>Echinops_telfairi</i>
				Macroscelidea	<i>Elephantulus_edwardii</i>
				Proboscidea	<i>Loxodonta_africana</i>
				Sirenia	<i>Trichechus_manatus</i>
				Tubulidentata	<i>Orycteropus_afer_afer</i>
		Xenarthra	Cingulata	<i>Dasypus_novemcinctus</i>	
		Boreoeutheria	Euarchontoglires	Lagomorpha	<i>Oryctolagus_cuniculus</i>
				Primates	<i>Aotus_nancymae</i>
					<i>Callithrix_jacchus</i>
					<i>Cebus_capucinus_imitator</i>
<i>Cercocebus_atys</i>					
<i>Chlorocebus_sabaeus</i> <i>Colobus_angolensis</i>					

				<i>Gorilla_gorilla</i> <i>Homo_sapiens</i> <i>Macaca_fascicularis</i> <i>Macaca_mulatta</i> <i>Macaca_nemestrina</i> <i>Mandrillus_leucophaeus</i> <i>Otolemur_garnettii</i> <i>Pan_paniscus</i> <i>Pan_troglodytes</i> <i>Pongo_abelii</i> <i>Propithecus_coquereli</i> <i>Rhinopithecus_bieti</i> <i>Rhinopithecus_roxellana</i> <i>Saimiri_boliviensis</i> <i>Tarsius_syrichtha</i>
				<hr/> <i>Cavia_porcellus</i> <i>Chinchilla_lanigera</i> <i>Cricetulus_griseus</i> <i>Dipodomys_ordii</i> <i>Fukomys_damarensis</i> <i>Heterocephalus_glaber</i> <i>Ictidomys_tridecemlineatus</i> <i>Jaculus_jaculus</i> <b>Rodentia</b> <i>Marmota_marmota_marmota</i> <i>Mesocricetus_auratus</i> <i>Microtus_ochrogaster</i> <i>Mus_musculus</i> <i>Nannospalax_galili</i> <i>Octodon_degus</i> <i>Peromyscus_maniculatus_bairdii</i> <i>Rattus_norvegicus</i>
				<hr/> <b>Scandentia</b> <i>Tupaia_chinensis</i>
			<b>Laurasiatheria</b>	<hr/> <i>Acinonyx_jubatus</i> <i>Ailuropoda_melanoleuca</i> <i>Felis_catus</i> <b>Carnivora</b> <i>Mustela_putorius_furo</i> <i>Odobenus_rosmarus</i> <i>Panthera_pardus</i> <i>Panthera_tigris</i> <i>Ursus_maritimus</i>
				<hr/> <b>Cetartiodactyla</b> <i>Balaenoptera_acutorostrata</i> <i>Bison_bison_bison</i> <i>Bos_indicus</i>

				<i>Bos_mutus</i> <i>Bos_taurus</i> <i>Bubalus_bubalis</i> <i>Camelus_dromedarius</i> <i>Capra_hircus</i> <i>Lipotes_vexillifer</i> <i>Orcinus_orca</i> <i>Ovis_aries</i> <i>Pantholops_hodgsonii</i> <i>Physeter_catodon</i> <i>Sus_scrofa</i> <i>Tursiops_truncatus</i>
			Chiroptera	<i>Eptesicus_fuscus</i> <i>Hipposideros_armiger</i> <i>Miniopterus_natalensis</i> <i>Myotis_brandtii</i> <i>Myotis_davidii</i> <i>Myotis_lucifugus</i> <i>Pteropus_alecto</i> <i>Pteropus_vampyrus</i> <i>Rhinolophus_sinicus</i> <i>Rousettus_aegyptiacus</i>
			Eulipotyphla	<i>Condylura_cristata</i> <i>Erinaceus_europaeus</i> <i>Sorex_araneus</i>
			Perissodactyla	<i>Ceratotherium_simum_simum</i> <i>Equus_asinus</i> <i>Equus_caballus</i> <i>Equus_przewalskii</i>
			Pholidota	<i>Manis_javanica</i>
	Marsupialia	Ameridelphia	Didelphimorphia	<i>Monodelphis_domestica</i>
		Australidelphia	Dasyuromorphia	<i>Sarcophilus_harrisii</i>
Prototheria		Australosphenida	Monotremata	<i>Ornithorhynchus_anatinus</i>

As sequências foram exportadas em formato FASTA, e alinhamentos múltiplos foram realizados no servidor Guidance2 utilizando o algoritmo MAFFT versão 7 (Sela et al., 2015). Os alinhamentos foram visualizados e editados manualmente utilizando os programas MEGA versão 6.0 (Tamura et al., 2013) e Geneious R 8.1 (Kearse et al., 2012).





realizada através de um teste de razão de verossimilhança (LRT) para inferir o melhor modelo entre M1a e M2a. O M1a é um modelo neutro que permite duas categorias de classes  $\omega$  ( $\omega_0 < 1$  e  $\omega_1 = 1$ ), sendo comparado com modelo alternativo M2a que permite três categorias, as duas anteriores com adição de uma categoria com  $\omega > 1$ .

### 3.3 Associação Fenotípica

Compilamos uma lista de 20 traços fenotípicos morfológicos e comportamentais para realizar análises de associação com as mutações encontradas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Traços fenotípicos morfológicos e comportamentais usados nas análises de associação

<b>Traços fenotípicos</b>
Estrutura social
Sistema de acasalamento
Cuidado paterno
Infanticídio pelo macho
Sexo dominante
Sexo migrante
Tamanho do grupo social
Dieta
Caçador
Média do número de filhotes
Razão entre período de gestação e tempo de vida
Razão entre intervalos entre partos e período de gestação
Razão entre período de desmame e tempo de vida
Razão da maturidade sexual entre fêmeas e machos
Razão do comprimento entre machos e fêmeas
Razão do tamanho corporal entre machos e fêmeas
Razão do tamanho cerebral entre machos e fêmeas
Ciclo de atividade
Habitat
Tipo principal de locomoção

Os dados foram obtidos a partir de bancos disponibilizados online; como “Animal Diversity” (Myers et al., 2006; The Animal Diversity Web <http://animaldiversity.org>) e

“AnAge” (AnAge: The Animal Ageing and Longevity Database <http://genomics.senescence.info/species>) bem como banco de dados PanTHERIA (Jones et al., 2009); e também de tabelas compiladas por outros autores (Lukas & Clutton-Brock 2013). Esses bancos de dados utilizados oferecem dados padronizados para os traços fenotípicos estudados para as diferentes espécies de mamíferos. Foi utilizado um script de matriz de correlações implementado em R com testes de Fisher e Kruskal-Wallis para analisar a correlação entre as variantes genéticas e os traços fenotípicos de interesse (pacote *superwise* v0.1 do *R Core Team*, 2017). O teste de Fisher foi aplicado para comparar os traços qualitativos e o teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar duas ou mais populações quanto à tendência central dos dados. A correção de Bonferroni foi usada para corrigir o valor de  $\alpha$  (nível de significância global) pelo número de testes realizados.

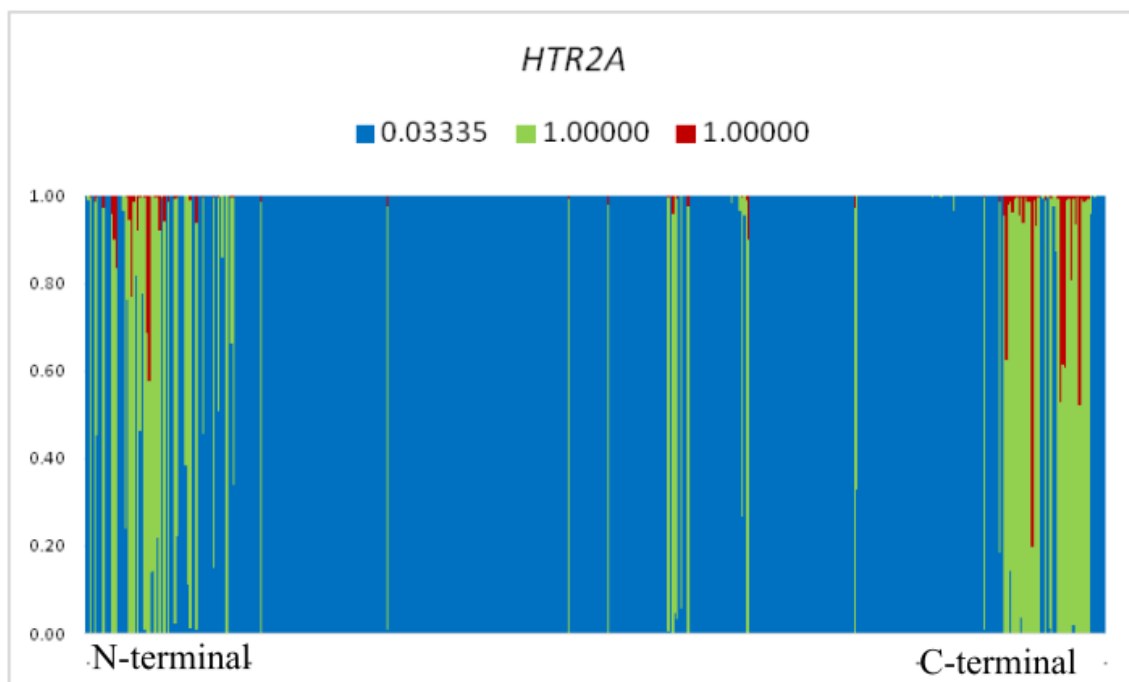
Nas análises de associação utilizamos as classificações de táxons para simplificar a discussão dos resultados. Desse modo, o uso dos táxons como Rodentia e Primatas, por exemplo, estão refletindo os resultados observados somente para as espécies que pertencem a esses táxons dentre as 90 amostradas. Os resultados foram baseados nas análises realizadas nas espécies amostradas em nosso estudo e não generalizam necessariamente a vasta diversidade dentro das ordens mamalianas.

## 4 RESULTADOS

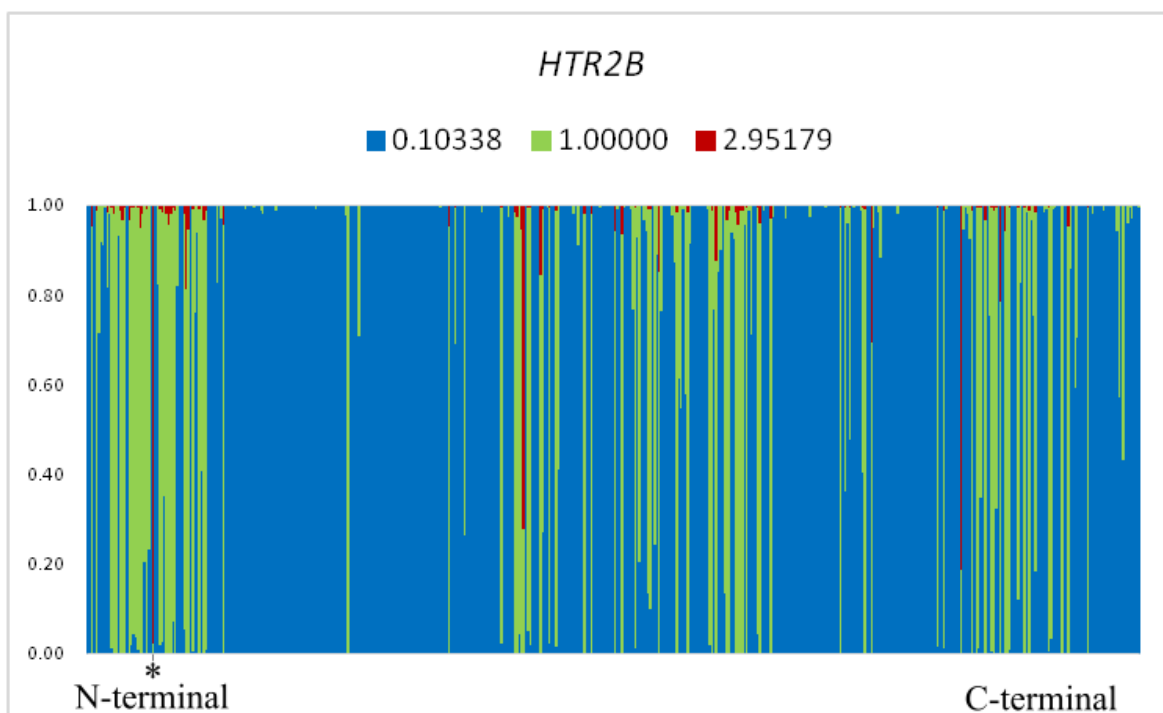
As análises realizadas demonstraram que o gene *HTR2A* encontra-se sob seleção purificadora nos mamíferos ( $p = 1$ ; Tabela 5). O modelo M1a explica a evolução molecular deste gene com dN/dS médio igual a 0.22. A maioria dos sítios encontra-se sob seleção purificadora ( $\cong 81\%$  com  $\omega = 0.033$ ; Tabela 5), entretanto alguns sítios estão evoluindo sob neutralidade ou com relaxamento da pressão evolutiva, principalmente nas regiões N-terminal e C-terminal (Figura 6). De outro modo, o gene *HTR2B* está sob seleção positiva na análise de evolução molecular. Sendo que o modelo M2a com dN/dS médio igual a 0.35 é o melhor modelo para explicá-la. Neste gene, 73.5% dos sítios encontram-se sob seleção purificadora, enquanto 26.2% encontram-se sob neutralidade e 0.3% sob seleção positiva (Tabela 5). Este resultado é confirmado pela análise do teste Bayes Empirical Bayes (BEB) do modelo M2a onde o sítio 31 apresenta mais de 95% de probabilidade de estar sob seleção positiva. Este receptor também apresenta relaxamento da pressão evolutiva nas regiões N-terminal e C-terminal (Figura 7).

**Tabela 5.** Parâmetros estimados para modelos de substituição de códons para *HTR2A* e *HTR2B*

Gene	Modelo	Parâmetros Estimados	$\ell$	Valor $p$		
<i>HTR2A</i>	M1a vs M2a	M1a	$p_0 = 0.807$ $p_1 = 0.193$ $\omega_0 = 0.033$ $\omega_1 = 1.000$	-20485.725	1	
		M2a	$p_0 = 0.807$ $p_1 = 0.163$ $p_2 = 0.029$ $\omega_0 = 0.033$ $\omega_1 = 1.000$ $\omega_2 = 1.000$	-20485.725		
	<i>HTR2B</i>	M1a vs M2a	M1a	$p_0 = 0.736$ $p_1 = 0.263$ $\omega_0 = 0.103$ $\omega_1 = 1.000$	-22669.160	0.019
			M2a	$p_0 = 0.734$ $p_1 = 0.262$ $p_2 = 0.003$ $\omega_0 = 0.103$ $\omega_1 = 1.000$ $\omega_2 = 2.951$	-22665.232	

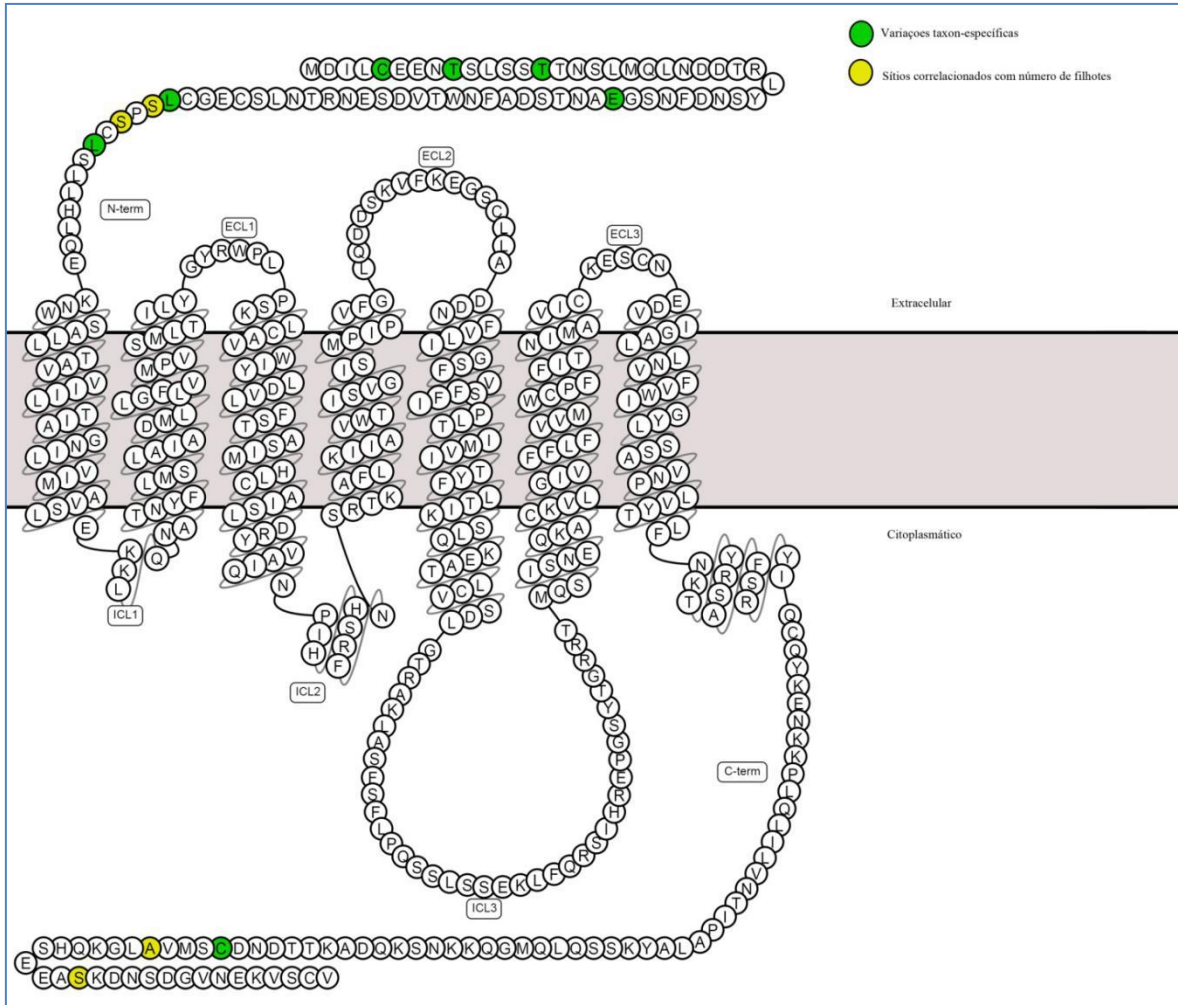


**Figura 6.** Probabilidades para cada sítio na sequência do gene *HTR2A* de estarem sob seleção: purificadora (azul), neutra (verde) e positiva (vermelho)



**Figura 7.** Probabilidades para cada sítio na sequência do gene *HTR2B* de estarem sob seleção: purificadora (azul), neutra (verde) e positiva (vermelho). (\*) indica o sítio 31 com mais de 95% de probabilidade de estar sob seleção positiva.

O receptor HTR2A apresenta alguns sítios com alterações táxon-específicas, principalmente no nível taxonômico de ordem (Figura 8; Tabela 6). Na ordem Carnivora são observadas variações nos resíduos Cys5Phe e Thr9Ala que compõem a região N-terminal desse receptor. Da mesma forma, na ordem Perissodactyla ocorrem mudanças nos resíduos 14 e 36, também na região N-terminal. Estes resíduos apresentam variações dentro das outras ordens, mas as quatro espécies de Perissodactyla apresentam as variantes Thr14 e Asp36. Em Eulipotyphla, o sítio 61 foi alterado para histidina nas três espécies analisadas. Na maioria das espécies da ordem Rodentia analisadas neste estudo, ocorre às variantes Pro62 e Thr64 e a variante Cys457 na região C-terminal. Em Primatas Haplorhine e Perissodactyla, encontra-se a variante Leu66. Enquanto a maioria das ordens placentárias possui a variante Cys443 na região C-terminal, os carnívoros carregam a variante Tyr443.



**Figura 8.** Snakeplot do receptor HTR2A. Representação bidimensional do receptor HTR2A humano destacando resíduos aminoácidos com variações táxon-específicas (em verde) e correlacionados com número de filhotes (em amarelo).

**Tabela 6.** Alterações táxon-específicas de HTR2A

Clado	Ordens	Espécies	Nº de filhotes	5	9	14	36	61	62	64	66	443	447	457
Afrotheria	Afrosoricida	<i>Chrysochloris_asiatica</i>	2	C	A	S	E	P	S	P	Y	C	A	S
		<i>Echinops_telfairi</i>	6	C	V	P	D	L	S	P	Y	C	A	P
	Macroscelidea	<i>Elephantulus_edwardii</i>	1.8	C	A	A	E	L	S	S	L	C	A	S
	Proboscidea	<i>Loxodonta_africana</i>	1	C	A	T	E	L	S	P	Y	C	A	S
	Sirenia	<i>Trichechus_manatus</i>	1	C	T	T	E	L	S	P	Y	C	A	S
Tubulidentata	<i>Orycteropus_afer_afer</i>	1	C	A	T	E	L	S	P	Y	C	P	S	
Xenarthra	Cingulata	<i>Dasyus_novemcinctus</i>	4	W	T	T	E	L	S	P	Y	R	A	A
Euarchontoglires	Lagomorpha	<i>Oryctolagus_cuniculus</i>	5	C	T	-	E	L	S	P	F	C	A	S
	Primates	<i>Aotus_nancymae</i>	1	C	T	A	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Callithrix_jacchus</i>	2	C	T	A	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Cebus_capucinus_imitator</i>	1	C	T	A	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Cercocebus_atys</i>	1	C	T	T	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Chlorocebus_sabaeus</i>	1	C	T	T	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Colobus_angolensis</i>	1	C	T	T	E	F	S	S	L	C	A	S
		<i>Gorilla_gorilla</i>	1	C	T	T	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Homo_sapiens</i>	1	C	T	T	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Macaca_fascicularis</i>	1	C	T	T	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Macaca_mulatta</i>	1	C	T	T	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Macaca_nemestrina</i>	1	C	T	T	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Mandrillus_leucophaeus</i>	1	C	T	T	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Otolemur_garnettii</i>	1	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	S
		<i>Pan_paniscus</i>	1	C	T	T	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Pan_troglodytes</i>	1	C	T	T	E	L	S	S	L	C	A	S
		<i>Pongo_abelii</i>	1	C	T	T	E	L	S	S	L	C	A	S
<i>Propithecus_coquereli</i>	1	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	S		

		<i>Rhinopithecus_bieti</i>	?	C	T	T	E	F	S	S	L	C	A	S	
		<i>Rhinopithecus_roxellana</i>	1	C	T	T	E	F	S	S	L	C	A	S	
		<i>Saimiri_boliviensis</i>	1	C	T	A	E	L	S	S	L	C	A	S	
		<i>Tarsius_syrichtha</i>	1.01	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	S	
	Rodentia		<i>Cavia_porcellus</i>	3	C	T	T	E	L	P	T	F	C	S	C
			<i>Chinchilla_lanigera</i>	2	C	T	T	E	L	S	T	F	C	S	C
			<i>Cricetulus_griseus</i>	?	C	T	I	D	L	P	T	L	C	T	C
			<i>Dipodomys_ordii</i>	3	C	T	T	E	L	P	S	F	C	A	C
			<i>Fukomys_damarensis</i>	3	G	S	T	E	L	P	T	F	C	S	C
			<i>Heterocephalus_glaber</i>	7	C	T	T	E	L	P	T	F	C	S	C
			<i>Ictidomys_tridecemlineatus</i>	7	C	S	T	E	L	P	T	F	C	A	G
			<i>Jaculus_jaculus</i>	3	R	V	I	E	L	P	T	F	C	T	C
			<i>Marmota_marmota_marmota</i>	4	C	S	T	E	L	P	T	F	C	A	C
			<i>Mesocricetus_auratus</i>	9	C	T	I	D	L	P	T	L	C	T	C
			<i>Microtus_ochrogaster</i>	3.8	C	T	I	D	L	P	T	L	C	T	C
			<i>Mus_musculus</i>	6	C	I	I	D	L	P	T	L	C	T	C
		<i>Nannospalax_galili</i>	?	C	T	V	E	L	P	T	L	C	T	C	
		<i>Octodon_degus</i>	6	C	T	T	E	L	S	T	F	C	S	C	
		<i>Peromyscus_maniculatus_bairdii</i>	5	C	T	I	D	L	P	T	L	C	T	C	
	<i>Rattus_norvegicus</i>	9	C	I	I	D	L	P	T	L	C	T	C		
	Scandentia		<i>Tupaia_chinensis</i>	2.5	C	N	I	E	L	S	P	V	C	A	S
Laurasiatheria	Carnivora	<i>Acinonyx_jubatus</i>	2.6	F	A	T	E	L	S	P	F	Y	A	P	
		<i>Ailuropoda_melanoleuca</i>	1	F	A	T	E	L	S	P	F	Y	A	P	
		<i>Felis_catus</i>	5	F	A	T	E	L	S	P	F	Y	A	P	
		<i>Mustela_putorius_furo</i>	8	F	A	T	E	L	S	P	S	Y	A	P	
		<i>Odobenus_rosmarus</i>	1	F	A	T	E	L	S	P	F	Y	A	P	
		<i>Panthera_pardus</i>	2	F	A	T	E	L	S	P	F	Y	A	P	
		<i>Panthera_tigris</i>	2.5	F	A	T	E	L	S	P	F	Y	A	P	

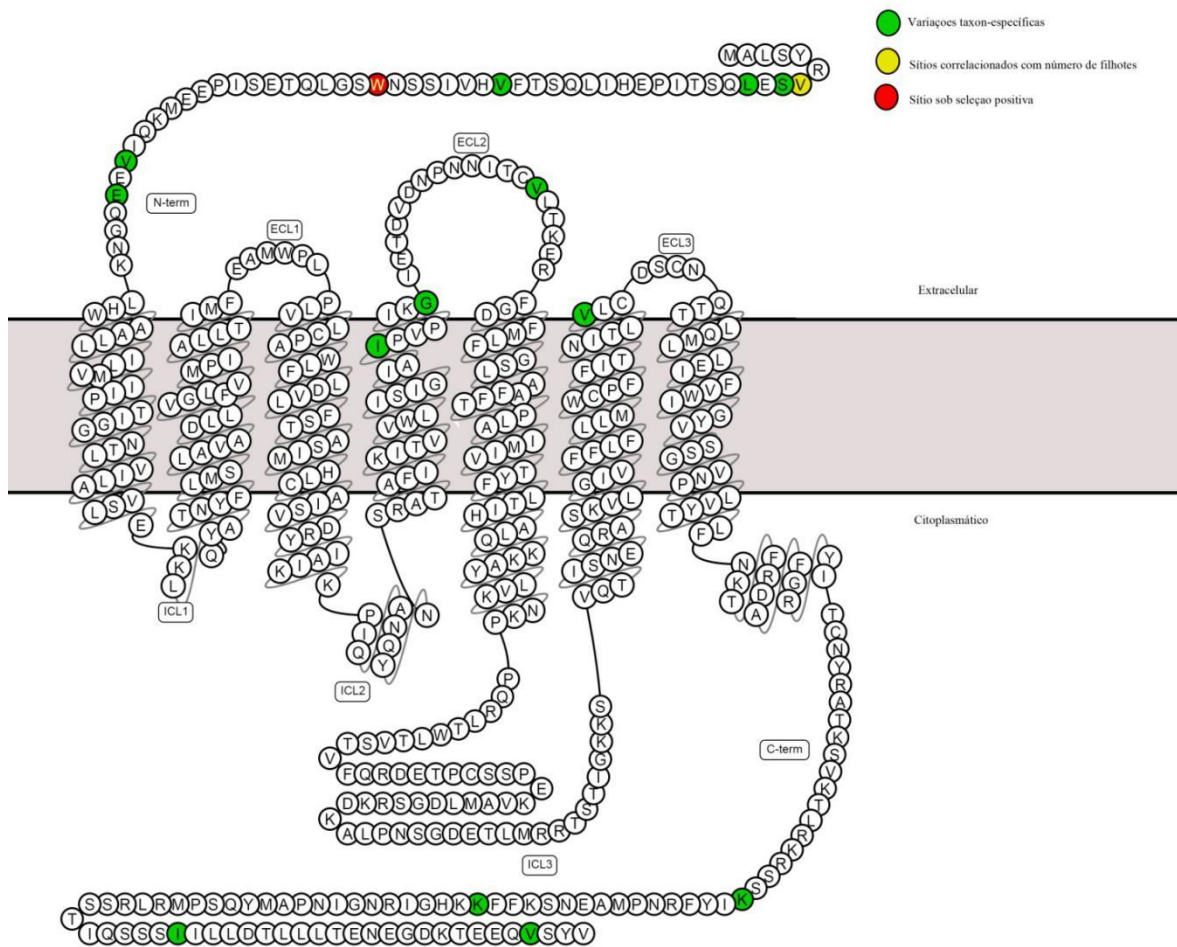


		<i>Ursus_maritimus</i>	2	F	A	T	E	L	S	P	F	Y	A	P
Cetartiodactyla		<i>Balaenoptera_acutorostrata</i>	1	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Bison_bison_bison</i>	1	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Bos_indicus</i>	?	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Bos_mutus</i>	?	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Bos_taurus</i>	1	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Bubalus_bubalis</i>	1.375	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Camelus_dromedarius</i>	1	C	T	A	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Capra_hircus</i>	1.5	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Lipotes_vexillifer</i>	1	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Orcinus_orca</i>	1	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Ovis_aries</i>	1.58	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Pantholops_hodgsonii</i>	1	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Physeter_catodon</i>	1	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Sus_scrofa</i>	7	C	T	P	E	L	S	P	F	C	A	P
	<i>Tursiops_truncatus</i>	1	C	T	T	E	L	S	P	F	C	A	P	
Chiroptera		<i>Eptesicus_fuscus</i>	2	C	T	S	E	L	S	P	F	C	P	P
		<i>Hipposideros_armiger</i>	1	C	T	S	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Miniopterus_natalensis</i>	1	C	T	S	E	L	S	P	F	C	P	P
		<i>Myotis_brandtii</i>	?	C	T	S	E	L	S	P	F	C	P	P
		<i>Myotis_davidii</i>	?	C	T	S	E	L	S	P	F	C	P	P
		<i>Myotis_lucifugus</i>	1	C	T	S	E	L	S	P	F	C	P	P
		<i>Pteropus_alecto</i>	1.2	C	I	S	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Pteropus_vampyrus</i>	1	C	I	S	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Rhinolophus_sinicus</i>	1	C	T	S	E	L	S	P	F	C	A	P
		<i>Rousettus_aegyptiacus</i>	1	C	I	S	E	L	S	P	F	C	A	P
Eulipotyphla		<i>Condylura_cristata</i>	5	C	T	M	E	H	S	P	F	C	T	P
		<i>Erinaceus_europaeus</i>	1.9	C	T	P	E	H	S	P	F	C	T	P

		<i>Sorex_araneus</i>	6	C	T	S	E	H	S	P	F	C	T	P
	Perissodactyla	<i>Ceratotherium_simum_simum</i>	1	C	T	T	D	L	S	P	L	C	A	P
		<i>Equus_asinus</i>	1	C	T	T	D	L	S	P	L	C	A	P
		<i>Equus_caballus</i>	1	C	T	T	D	L	S	P	L	C	A	P
		<i>Equus_przewalskii</i>	1	C	T	T	D	L	S	P	L	C	A	P
	Pholidota	<i>Manis_javanica</i>	1	C	T	M	E	L	S	P	F	C	A	P
Marsupialia	Didelphimorphia	<i>Monodelphis_domestica</i>	9	V	S	T	E	L	A	P	Y	Y	D	P
	Dasyuromorphia	<i>Sarcophilus_harrisii</i>	2.5	V	S	T	E	L	A	P	Y	Y	D	P
Prototheria	Monotremata	<i>Ornithorhynchus_anatinus</i>	2	C	S	T	E	L	T	P	N	N	S	S

Entre os sítios com relaxamento da pressão evolutiva no receptor HTR2B, o sítio 24 na região N-terminal apresenta poucas variações entre as 90 espécies, mas todos os Primatas Haplorhine analisados apresentam uma valina na posição 24 (Asp24Val; Figura 9; Tabela 7). Também na região N-terminal os sítios 47 e 49 estão deletados em Marsupiais, enquanto em Carnivora ocorre a variante Gln49. Na região ECL2, ocorrem várias alterações táxon-específicas como Ala208 em Afrotheria, Val208 em Primatas e Carnivora, e Gly208 em Cetartiodactyla. A região C-terminal apresentou a variante Asn414 na maioria das espécies em Laurasiatheria, e também um sítio com várias modificações táxon-específicas incluindo Lys429 em Primatas, Ile429 em Chiroptera, e Val429 em Marsupiais. Esta região também abrigou as variantes Leu458 em Perissodactyla e Thr458 em Marsupiais.

Alguns dos sítios com seleção purificadora também apresentam alterações táxon-específicas. Na região N-terminal, as variantes Val7 em Primatas Haplorhine e Met7 em Rodentia e Eulipotyphla. A variante Phe8 ocorre na maioria da ordem Cetartiodactyla, enquanto Ser8 ocorre na maioria das outras espécies de mamíferos do estudo. Nos Primatas Haplorhine ocorre a inserção de um resíduo de leucina no sítio 10 da proteína HTR2B. Dentro de TM4, o sítio 188 apresenta na maioria dos mamíferos o resíduo isoleucina, entretanto a maioria das espécies da ordem Chiroptera apresenta a variação Val188. O sítio 194 dentro de ECL2 está conservado nos mamíferos com o resíduo glicina, com exceção da ordem Perissodactyla que apresenta o resíduo alanina. Em ECL3, a maioria das ordens de mamíferos apresenta o sítio 348 com resíduo valina, enquanto a variante Ala348 ocorre na ordem Rodentia. Na região C-terminal, o resíduo valina em 478 que ocorre na maioria dos mamíferos é substituído por Ile478 em Cetartiodactyla.



**Figura 9.** Snakeplot do receptor HTR2B. Representação bidimensional do receptor HTR2B humano destacando resíduos aminoácidos com variações táxon-específicas (em verde), correlacionados com número de filhotes (em amarelo) e o sítio sob seleção positiva (em vermelho).

Tabela 7. Alterações táxon-específicas de HTR2B

Clado	Ordens	Espécies	Nº de filhos	7	8	10	24	31	47	49	188	194	208	348	414	429	458	478
Afrotheria	Afrosoricida	<i>Chrysochloris_asiatica</i>	2	M	S	-	E	G	G	E	I	G	A	V	K	M	V	V
		<i>Echinops_telfairi</i>	6	M	S	-	E	Q	A	D	I	G	A	V	K	M	A	V
	Macroscelidea	<i>Elephantulus_edwardii</i>	1.8	M	S	-	D	W	G	E	I	G	A	A	K	V	V	V
	Proboscidea	<i>Loxodonta_africana</i>	1	M	S	-	D	Q	G	E	I	G	A	V	K	T	V	V
	Sirenia	<i>Trichechus_manatus</i>	1	-	S	-	D	G	G	E	I	G	A	V	K	M	V	V
	Tubulidentata	<i>Orycteropus_afer_afer</i>	1	M	S	-	D	W	G	E	I	G	A	V	K	M	V	V
Xenarthra	Cingulata	<i>Dasybus_novemcinctus</i>	4	M	S	-	D	R	D	E	I	G	V	V	T	M	V	V
Euarchontoglires	Lagomorpha	<i>Oryctolagus_cuniculus</i>	5	M	S	-	N	Q	I	E	I	G	E	V	N	M	I	V
	Primates	<i>Aotus_nancymae</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Callithrix_jacchus</i>	2	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Cebus_capucinus_imitator</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	G
		<i>Cercocebus_atys</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Chlorocebus_sabaeus</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	A	V	K	K	I	V
		<i>Colobus_angolensis</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	A	K	K	I	V
		<i>Gorilla_gorilla</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Homo_sapiens</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Macaca_fascicularis</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Macaca_mulatta</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Macaca_nemestrina</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Mandrillus_leucophaeus</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Otolemur_garnettii</i>	1	M	S	-	D	R	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Pan_paniscus</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Pan_troglodytes</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Pongo_abelii</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V
		<i>Propithecus_coquereli</i>	1	M	S	-	D	R	V	E	I	G	M	V	K	M	I	V

		<i>Rhinopithecus_bieti</i>	?	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	I	
		<i>Rhinopithecus_roxellana</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	I	
		<i>Saimiri_boliviensis</i>	1	V	S	L	V	W	V	E	I	G	V	V	K	K	I	V	
		<i>Tarsius_syrrichta</i>	1.01	T	S	-	D	Q	V	E	I	G	V	V	K	T	I	V	
	Rodentia		<i>Cavia_porcellus</i>	3	M	S	-	G	W	F	E	I	G	A	A	K	M	I	V
			<i>Chinchilla_lanigera</i>	2	M	S	-	H	W	V	E	I	G	A	A	K	T	V	V
			<i>Cricetulus_griseus</i>	?	M	S	-	D	R	A	E	I	G	E	A	T	T	I	V
			<i>Dipodomys_ordii</i>	3	M	S	-	D	Q	G	E	I	G	E	A	K	M	I	V
			<i>Fukomys_damarensis</i>	3	M	S	-	D	W	V	G	I	G	E	A	K	T	V	A
			<i>Heterocephalus_glaber</i>	7	M	S	-	D	W	V	E	I	G	E	A	K	T	I	A
			<i>Ictidomys_tridecemlineatus</i>	7	M	S	-	D	Q	V	E	I	G	E	A	K	M	I	V
			<i>Jaculus_jaculus</i>	3	M	S	-	G	Q	A	-	I	G	E	A	K	M	I	V
			<i>Marmota_marmota_marmota</i>	4	M	S	-	D	Q	V	E	I	G	E	A	K	M	I	V
			<i>Mesocricetus_auratus</i>	9	M	S	-	D	H	A	E	I	G	E	A	T	T	I	V
			<i>Microtus_ochrogaster</i>	3.8	M	S	-	D	H	A	E	I	G	A	A	S	T	I	V
			<i>Mus_musculus</i>	6	M	S	-	D	R	V	G	I	G	E	A	T	T	I	V
		<i>Nannospalax_galili</i>	?	M	S	-	D	W	I	E	I	G	A	A	K	T	L	V	
		<i>Octodon_degus</i>	6	M	S	-	D	W	V	E	I	G	A	A	K	M	I	V	
	<i>Peromyscus_maniculatus_bairdii</i>	5	M	S	-	D	H	A	D	I	G	E	A	T	T	I	V		
	<i>Rattus_norvegicus</i>	9	M	S	-	D	R	A	N	I	G	E	A	T	T	I	V		
	Scandentia																		
		<i>Tupaia_chinensis</i>	2.5	-	S	-	D	W	V	E	I	G	A	V	K	M	I	V	
Laurasiatheria	Carnivora	<i>Acinonyx_jubatus</i>	2.6	I	S	-	D	W	G	Q	I	G	V	V	N	M	I	V	
		<i>Ailuropoda_melanoleuca</i>	1	I	S	-	H	W	G	Q	I	G	V	V	N	M	I	V	
		<i>Felis_catus</i>	5	I	S	-	D	W	G	Q	I	G	V	V	N	M	I	V	
		<i>Mustela_putorius_furo</i>	8	I	S	-	H	W	G	Q	I	G	V	V	N	M	I	V	
		<i>Odobenus_rosmarus</i>	1	I	S	-	H	W	G	Q	I	G	V	V	N	M	I	V	
		<i>Panthera_pardus</i>	2	I	S	-	D	W	G	Q	I	G	V	V	N	M	I	V	

	<i>Panthera_tigris</i>	2.5	I	S	-	D	W	G	Q	I	G	V	V	N	M	I	V
	<i>Ursus_maritimus</i>	2	I	S	-	H	W	G	Q	I	G	V	V	N	M	I	V
Cetartiodactyla	<i>Balaenoptera_acutorostrata</i>	1	I	F	-	D	W	V	E	V	G	G	A	N	M	I	I
	<i>Bison_bison_bison</i>	1	I	F	-	D	W	G	E	L	G	G	V	N	M	I	I
	<i>Bos_indicus</i>	?	I	F	-	D	W	G	E	L	G	G	V	N	M	I	I
	<i>Bos_mutus</i>	?	I	F	-	D	W	G	E	L	G	G	V	N	M	I	I
	<i>Bos_taurus</i>	1	I	F	-	D	W	G	E	L	G	G	V	N	M	I	I
	<i>Bubalus_bubalis</i>	1.375	I	F	-	D	W	G	E	L	G	G	V	N	M	I	I
	<i>Camelus_dromedarius</i>	1	K	S	-	D	W	G	E	I	G	G	V	N	M	V	I
	<i>Capra_hircus</i>	1.5	I	F	-	D	W	G	E	L	G	V	V	N	M	I	I
	<i>Lipotes_vexillifer</i>	1	I	F	-	D	W	V	E	I	G	G	A	N	M	I	I
	<i>Orcinus_orca</i>	1	I	F	-	D	W	V	E	I	G	G	A	N	M	I	I
	<i>Ovis_aries</i>	1.58	I	F	-	D	W	G	E	L	G	G	V	N	M	I	I
	<i>Pantholops_hodgsonii</i>	1	I	F	-	D	W	G	E	L	G	G	V	N	M	I	I
	<i>Physeter_catodon</i>	1	I	F	-	D	W	V	E	I	G	G	A	N	M	I	I
	<i>Sus_scrofa</i>	7	I	F	-	H	W	G	E	I	G	G	V	N	M	V	I
	<i>Tursiops_truncatus</i>	1	I	F	?	D	W	V	E	I	G	G	A	N	M	I	I
Chiroptera	<i>Eptesicus_fuscus</i>	2	T	S	-	D	W	G	Q	V	G	E	V	N	I	I	V
	<i>Hipposideros_armiger</i>	1	I	S	-	D	W	G	E	V	G	V	V	N	I	I	V
	<i>Miniopterus_natalensis</i>	1	I	S	-	D	W	G	E	V	G	E	V	N	I	I	V
	<i>Myotis_brandtii</i>	?	T	S	-	D	W	G	E	V	G	E	V	N	I	I	V
	<i>Myotis_davidii</i>	?	T	S	-	D	W	G	E	V	G	E	V	S	I	I	V
	<i>Myotis_lucifugus</i>	1	T	S	-	D	W	G	E	V	G	E	V	N	I	I	V
	<i>Pteropus_alecto</i>	1.2	V	S	-	D	W	G	E	V	G	G	V	N	I	I	V
	<i>Pteropus_vampyrus</i>	1	V	S	-	D	W	G	E	V	G	G	V	N	I	I	V
	<i>Rhinolophus_sinicus</i>	1	I	S	-	D	W	G	E	V	G	G	V	N	I	I	V
	<i>Rousettus_aegyptiacus</i>	1	I	S	-	D	W	G	E	L	G	G	V	N	I	I	V
Eulipotyphla	<i>Condylura_cristata</i>	5	M	S	-	D	G	G	E	I	G	V	V	N	M	I	V

		<i>Erinaceus_europaeus</i>	1.9	M	S	-	D	W	-	E	I	G	I	V	S	K	I	V
		<i>Sorex_araneus</i>	6	M	S	-	D	W	G	E	T	G	R	A	N	M	I	V
	Perissodactyla	<i>Ceratotherium_simum_simum</i>	1	I	S	-	D	W	G	E	I	G	G	V	N	M	L	V
		<i>Equus_asinus</i>	1	I	Y	-	D	W	G	E	I	A	G	V	N	M	L	V
		<i>Equus_caballus</i>	1	I	Y	-	D	W	G	E	I	A	G	V	N	M	L	V
		<i>Equus_przewalskii</i>	1	I	Y	-	D	W	G	E	I	A	G	V	N	M	L	V
Pholidota	<i>Manis_javanica</i>	1	I	S	-	D	W	G	E	I	G	G	V	S	M	I	V	
Marsupialia	Didelphimorphia	<i>Monodelphis_domestica</i>	9	L	C	-	D	G	-	-	I	G	V	A	K	V	T	V
	Dasyuromorphia	<i>Sarcophilus_harrisii</i>	2.5	L	L	-	D	G	-	-	I	G	V	A	K	V	T	I
Prototheria	Monotremata	<i>Ornithorhynchus_anatinus</i>	2	I	S	-	A	G	F	E	I	G	V	V	R	M	A	V



Os testes de associação encontraram 138 sítios de HTR2A associados a pelo menos uma das características fenotípicas. Os traços com maior número de sítios associados foram ciclo de atividade com 70 sítios, razão entre período de gestação e tempo de vida com 49 sítios, média do número de filhotes com 48 sítios e dieta com 42 sítios. Dos 138 sítios com associação, nove (9) estavam associados com pelo menos sete (7) características fenotípicas. Estes sítios estavam distribuídos nas regiões N-terminal e C-terminal do receptor. Após a correção de Bonferroni para múltiplos testes apenas os sítios 62, 64, 447 e 457 associados com o número de filhotes permaneceu significativo ( $p < 0,001$ ; Tabela 8).

HTR2B possui 210 sítios associados a alguma das características fenotípicas. Alguns traços apresentaram associação com vários sítios. O número de filhotes foi associado a 98 sítios, a dieta com 89 sítios e o ciclo de atividade com 87 sítios. Dos 210 sítios associados, dezessete (17) estão associados com pelo menos sete (7) características fenotípicas. Somente o sítio 7 permaneceu significativo após a correção de Bonferroni ( $p < 0,001$ ), sendo associado com número de filhotes (Tabela 8).

**Tabela 8.** Testes de associação entre os fenótipos e variantes de HTR2A e HTR2B.

Fenótipos	HTR2A				HTR2B
	62	Sítio de variação			Sítio de variação
		64	447	457	7
Estrutura social	ns	ns	ns	ns	$p < 0,05$
Sistema de acasalamento	ns	$p < 0,05$	ns	ns	ns
Cuidado paterno	ns	$p < 0,05$	ns	$p < 0,05$	ns
Infanticídio pelo macho	ns	ns	ns	ns	ns
Sexo dominante	ns	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Tamanho do grupo social	ns	$p < 0,05$	ns	ns	ns
Dieta	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Caçador	ns	ns	ns	ns	ns
Número de filhotes	$p < 0,001^*$	$p < 0,001^*$	$p < 0,001^*$	$p < 0,001^*$	$p < 0,001^*$
Gestação/tempo de vida	$p < 0,05$	ns	ns	ns	ns
Partos/gestação	ns	ns	ns	ns	ns
Desmame/tempo de vida	ns	$p < 0,05$	$p < 0,05$	ns	ns
Maturidade sexual fêmeas/machos	ns	ns	ns	ns	ns
Tamanho corporal machos/fêmeas	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Tamanho cerebral machos/fêmeas	Ns	ns	ns	ns	ns
Ciclo de atividade	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	ns	$p < 0,05$
Habitat	ns	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Tipo principal de locomoção	ns	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

\*Valores  $p$  com correção de Bonferroni. ns = Não estatisticamente significativo.

## 5 DISCUSSÃO

Os mamíferos iniciaram sua diversificação há 100 milhões de anos e, posteriormente ocuparam os nichos disponíveis após o desaparecimento dos dinossauros. Isso deu início a uma nova onda de radiação adaptativa (Bininda-Emonds et al., 2007). A ocupação destes novos nichos acarretou em uma alta variação morfológica e comportamental. Estudos recentes têm demonstrado a importância da mudança das taxas evolutivas de diferentes genes para variação fenotípica nos táxons mamalianos (Montgomery & Mundy, 2014; Agaba et al., 2016; Hu et al., 2017). Do mesmo modo, os genes dos receptores de serotonina têm evoluído sob diferentes taxas evolutivas (Andrés et al., 2007).

Nossas análises revelaram que enquanto o gene *HTR2A* encontra-se sob seleção purificadora, mas admitindo que alguns sítios estejam evoluindo com relaxamento da pressão evolutiva, o gene *HTR2B* está sob seleção positiva. Este padrão evolutivo provavelmente reflete o amplo espectro de funções mediadas por estes receptores. A serotonina está envolvida na regulação de mecanismos básicos como funções cardíacas, gastrointestinais e do desenvolvimento que possuem conservação de sua função e vias funcionais através de espécies altamente divergentes. Mas a serotonina também está envolvida em funções como comportamento e aprendizagem que são largamente variáveis entre as espécies (Andrés et al., 2007).

Além disso, ambos os genes *HTR2A* e *HTR2B* possuem relaxamento da pressão evolutiva principalmente nas regiões N-terminal e C-terminal, enquanto as regiões transmembranas estão geralmente sob seleção purificadora. Esta heterogeneidade de evolução dentro do gene pode refletir as diferenças estruturais e funcionais dos domínios. As regiões transmembranas estão sob forte restrição para mudanças em sua sequência, de aminoácidos, estrutura e função, e por isso é esperado que evoluam sob seleção purificadora estrita. Os domínios globulares e terminais têm alta flexibilidade estrutural e um grande conjunto de possíveis aminoácidos e, portanto, tem um maior relaxamento na restrição de sua sequência.

Estudos têm revelado que deleções ou polimorfismos no segmento N-terminal de *HTR2A* não afetam a função do receptor (Dewkar et al., 2008). Esta tolerância a modificações no segmento N-terminal pode justificar a maior variabilidade encontrada

nesta região nos dois genes aqui estudados. A região ECL2 de HTR2B apresenta alguns sítios com relaxamento da pressão evolutiva, sendo que o sítio 208 apresenta alterações táxon-específicas. Este domínio parece estar envolvido com a seletividade ao ligante e portanto, as variações aqui encontradas, principalmente aquelas táxon-específicas poderiam representar alterações funcionais. As 90 espécies estudadas de mamíferos apresentam o domínio TM2 da proteína HTR2A totalmente conservada. Esta maior restrição pode ser devido a menor tolerância da região para mutações. Por exemplo, as mutações nos resíduos de TM2 têm abolido a afinidade com agonistas ou a acoplagem com a proteína G (Westkaemper & Roth, 2006).

Dos polimorfismos encontrados no receptor HTR2A, observados em estudos com humanos, muitos estiveram associados com traços fenotípicos sem a correção de Bonferroni e foram também táxon-específicos podendo explicar fenótipos compartilhados por espécies dentro de um mesmo táxon. A variante Ala9 encontrada nos carnívoros foi associada a algumas de suas características fenotípicas como sua estrutura social solitária, o que neste caso se torna altamente correlacionado ao tamanho do grupo social, outra característica também associada com a variante. Outros dois aspectos de vida dos carnívoros são sua dieta e o hábito de caçador que também são correlacionados. Carnívoros também têm mais de um filhote por ninhada, o que também foi associada a variante Ala9. O tamanho do grupo social, dieta carnívora e hábito de caçador também foram associados com a variante Tyr443 encontrada nesta ordem.

As variantes Thr14 e Asp36 em *Perissodactyla* foram associadas a diferentes características. Thr14 está associada com a estrutura social poligâmica deste grupo e com uma ninhada de apenas um filhote. Ambas as variantes também são associadas com ausência de dimorfismo sexual do tamanho corporal.

Os roedores apresentam as mutações Pro62, Thr64 e Cys457 que estão associadas com a dieta herbívora e ausência de dimorfismo sexual do tamanho corporal da maioria das espécies aqui estudadas. O sítio 64 teve o maior número de associações, com destaques para alguns traços comportamentais como sistema de acasalamento não monogâmico e ausência de cuidado paterno. Além disso, estes três sítios permaneceram significativos após a correção de Bonferroni para o número de filhotes por ninhada que geralmente é maior que um, chegando a nove filhotes por ninhada em ratos (*Rattus norvegicus*).

A variante Leu66 foi encontrada em dois táxons distintos Primatas Haplorhine e Perissodactyla. Em Primatas, esta variante foi associada com tamanho do grupo social relativamente grande neste táxon. A associação com dieta não parece clara, pois, enquanto Perissodactyla são herbívoros, os Primatas estão divididos em dois grupos quanto ao hábito alimentar: herbívoros e onívoros.

O sítio 447 foi associado com a dieta, o dimorfismo sexual quanto ao tamanho corporal, o ciclo de atividade, o habitat e o tipo de locomoção. Este sítio geralmente conservado (resíduo alanina) nos mamíferos apresenta mutações em algumas espécies da ordem Chiroptera, e alta variabilidade entre os roedores. Na análise molecular este sítio apresentou relaxamento da pressão evolutiva, o que pode sugerir que esteja evoluindo para aumentar a diversidade fenotípica dentro destas ordens. Além disso, este sítio também permaneceu significativo após a correção de Bonferroni para o número de filhotes por ninhada. Os sítios 462 e 463 que estão sob relaxamento da pressão evolutiva foram associados a oito traços fenotípicos. Muitos dos traços são compartilhados entre os dois sítios. Mesmo com muitas variações ao longo dos mamíferos, estes sítios apresentam certas variantes táxon-específicas como Asp462 e Gly463.

Para o receptor HTR2B, o sítio 7 foi associado com número de filhotes mesmo após a correção de Bonferroni. A variante Val7 foi encontrada nos Primatas Haplorhine enquanto Rodentia e Eulipotyphla apresentam Met7. Os Primatas geralmente apresentam ninhadas com apenas um filhote, enquanto Rodentia e Eulipotyphla apresentam ninhadas maiores. Cabe ressaltar que embora estudos tenham revelado que as deleções na região N-terminal não afetem a função dos receptores, algumas mutações podem alterar a dinâmica da ligação da serotonina em HTR2B. Por exemplo, os polimorfismos Arg6Gly e Glu42Gly no HTR2B humano levam ao aumento na afinidade do receptor pelo ligante e dessensibilização do receptor (Belmer et al., 2013). É predito que o segmento N-terminal atue como um modulador negativo para interação ligante-receptor, e estes resíduos mencionados acima sejam importantes para esta modulação. Curiosamente, as espécies *Chrysochloris asiatica* e *Echinops telfairi* apresentam a mesma mutação Glu42Gly em HTR2B, podendo indicar que nestas espécies também ocorra alteração na modulação desse receptor.

Os Primatas Haplorhine possuem a inserção de um resíduo de leucina no sítio 10 e a variante Val24 que estão associados com a dieta, número de filhotes, razão entre o

desmame e o tempo de vida, dimorfismo sexual quanto ao tamanho corporal, ciclo de atividade, habitat e tipo de locomoção. A inserção no sítio 10, única de Primatas, está relacionada à estrutura social sendo que os Primatas aqui estudados apresentam em sua maioria uma estrutura com muitos machos e muitas fêmeas.

As variantes Phe28, Gly47 e Gln49 encontradas em Carnívora foram associadas juntas com a dieta carnívora e o número de filhotes. O tamanho do grupo social foi associado com as variantes Phe28 e Gln49 considerando que esses animais possuem hábitos solitários. Da mesma forma em Marsupiais, que também apresentam estrutura social solitária os sítios 47 e 49 estão deletados em Marsupiais.

Os Perissodactyla apresentam a variante Arg36 que está associada com dieta, número de filhotes e estrutura social. Este táxon possui dieta herbívora e um filhote por ninhada, ele também apresenta uma estrutura social com um macho e muitas fêmeas, ou seja, são poligâmicos. O fenótipo poligâmico também foi associado às variantes Gly194 e Leu458 nesta ordem. Entretanto os marsupiais que possuem hábitos solitários apresentam a variante Thr458.

A variante Ile188 encontrada na ordem Chiroptera foi associada com ciclo de atividade, sendo que as espécies de morcegos possuem um ciclo de atividade noturno.

O sítio 208 que apresentou diversas variantes táxon-específicas foi associado com a estrutura social, o hábito de caçador, o número de filhotes, a razão entre gestação e o tempo de vida, o dimorfismo sexual no tamanho corporal e o tipo de locomoção. A variante Ala208 é encontrada em Afrotheria, mas este táxon apresenta variação nos fenótipos associados. A variante Val208, encontrada em Primatas e Carnívora, se torna discrepante quanto aos tipos de fenótipos. Enquanto Primatas tem normalmente um filhote por ninhada, carnívoros apresentam mais de um. Primatas têm uma estrutura social bastante diversificada, mas a maioria das espécies aqui estudadas tem muitos machos e muitas fêmeas, enquanto carnívoros são geralmente solitários. Um fenótipo similar encontrado entre as duas ordens portadoras da variante Val208 é o dimorfismo sexual. Em ambos os táxons, geralmente o macho se apresenta maior que a fêmea. Em Cetartiodactyla, a variante Gly208 está associada ao traço do tamanho da ninhada, com geralmente apenas um filhote. Os roedores apresentam a variante Ala348 associada com o número de filhotes e o dimorfismo sexual. Esta ordem geralmente tem ninhadas grandes e a ausência de dimorfismo sexual.

O sítio 414 apresentou associação com dieta, número de filhotes, ciclo de atividade, habitat e tipo de locomoção. A variante Asn414 encontrada neste sítio na maioria das espécies em Laurasiatheria parece não estar envolvida com estes traços, dada a grande variação fenotípica encontrada neste táxon. O sítio 429 que apresentou várias modificações táxon-específicas, também foi um dos que teve maior número de associações, como cuidado paterno, sexo dominante, tamanho do grupo social, dieta, número de filhotes, razão entre desmame e tempo de vida, dimorfismo sexual no tamanho corporal, ciclo de atividade, habitat e tipo de locomoção. A variante Lys429 em Primatas pode estar relacionada aos grupos sociais grandes e ninhadas pequenas deste táxon, enquanto Marsupiais apresentam Val429 e não tem grupos sociais, mas apresentam ninhadas grandes. Chiroptera por sua vez, tem Ile429 e podem apresentar grupos sociais com centenas a milhares de indivíduos. Cetartiodactyla possuem grupos sociais grandes o que pode estar associado com a presença da variante Ile478 nesta ordem.

Dentre as espécies que apresentam variantes em HTR2A e HTR2B e associações com fenótipos, existe um grande contraste entre espécies com grandes ninhadas (Rodentia), e pequenas ninhadas (Perissodactyla, Cetartiodactyla e Primatas). Este contraste comportamental se ajusta bem a teoria ecológica da seleção r e seleção K. Nesta teoria, a estratégia r consiste em direcionar os recursos disponíveis para reprodução, com a menor quantidade possível em cada filhote e produzir o maior número possível de progênes. Esta estratégia predomina em ambientes instáveis ou imprevisíveis, onde a mudança ambiental contínua diminui os efeitos de densidade e competição. Enquanto a estratégia K consiste em canalizar os recursos disponíveis para a manutenção e a produção de alguns descendentes extremamente adequados. A estratégia K predomina em ambientes saturados de organismos onde a competição se torna mais intensa (Pianka, 1970).

As espécies de roedores aqui estudadas, além dos grandes tamanhos de ninhada, também apresentam tempos de gestação relativamente curtos (em torno de um mês de gestação em sua maioria), desmame em cerca de um mês e alguns dias e pequeno tamanho corporal. Estes traços fenotípicos os caracterizam como espécies r-estrategistas, ou seja, favorecem a alta fecundidade (grandes ninhadas) enquanto disponibilizam pouca energia para os filhotes (gestação e desmame curtos). No outro extremo deste continuum de estratégias ecológicas estão os Perissodactyla com gestações mais longas (em torno de 12 meses), os Cetartiodactyla que variam em seus tempos de gestação de 4 meses (em

espécies com ninhadas maiores) a até 15 meses (em espécies com um único filhote) e os Primatas (entre 5 a 9 meses de gestação). Além disso, estas ordens apresentam grande tamanho corporal e expectativas de vida mais longas. Também é notável em algumas espécies destas ordens o longo tempo de desmame que pode ultrapassar 1 ano como em humanos, equinos e algumas baleias. Estas características os definem como K-estrategistas, ou seja, favorecem menor fecundidade (pequenas ninhadas) enquanto disponibilizam mais energia para o filhote (gestação e desmame mais longos).

Nossos resultados demonstraram que os genes *HTR2A* e *HTR2B* sofrem diferentes taxas evolutivas, e que os diferentes domínios dentro dessas proteínas estão sob pressões evolutivas distintas. Estas diferenças podem refletir tanto a amplitude de fenótipos para os quais os receptores de serotonina estão envolvidos quanto às diferenças estruturais e funcionais dos domínios. Além disso, sugerimos que certas variantes estão associadas a fenótipos específicos, com destaque para tamanho da ninhada. Foram observados em nosso estudo, um relaxamento da pressão evolutiva nas regiões N-terminal e C-terminal e diferentes variantes táxon-específicas associadas ao tamanho da ninhada. Podemos inferir que tais alterações podem estar ligadas a aquisição de novas funções para proteína sem alterar sua função conservada. Isso ilustra a própria dualidade de funções destes receptores, de mecanismos fisiológicos básicos conservados a fenótipos comportamentais largamente variáveis.

Este trabalho fornece informações inéditas sobre a evolução molecular dos genes *HTR2A* e *HTR2B* em um grande número de espécies distribuídas ao longo da maioria das ordens de mamíferos e, faz refletir sobre a contribuição de algumas dessas variantes táxon-específicas para fenótipos comportamentais mamalianos.

Finalmente, nossos resultados fornecem uma base para investigações futuras sobre comportamento dos mamíferos. Novas análises da evolução molecular táxon-específica usando modelos Branch-Sites para as ordens que apresentaram modificações associadas a diferentes fenótipos em conjunto com análises para averiguar como as variantes encontradas afetam a função dessas proteínas poderão adicionar novos elementos para a melhor compreensão do papel da modulação do sistema serotoninérgico no comportamento dos mamíferos. Além disso, vale destacar que somente estudos funcionais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* poderão indicar se os achados aqui apresentados representam uma



associação causal entre um determinado repertório genético táxon-específico e fenótipos táxon-específicos relacionados aos dois receptores sob investigação.

## 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-HT<sub>2A</sub> 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-HT<sub>2A</sub> 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 (HTR<sub>2A</sub>) 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<sub>2B</sub> 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<sub>2B</sub> 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<sub>1A</sub> 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-hydroxytryptamine<sub>4</sub>(5-HT<sub>4</sub>) 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<sub>2B</sub> (5-HT<sub>2B</sub>) receptor gene products: comparison with 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> 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<sub>2B</sub> 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<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> 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<sub>2B</sub> 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<sub>2B</sub> 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-hydroxytryptamine<sub>4</sub> 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<sub>2A</sub> 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.