

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUIZ CARLOS DE OLIVEIRA JÚNIOR

EFEITOS DO CITALOPRAM SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA
EM *Drosophila melanogaster*

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O48e
2017 Oliveira Júnior, Luiz Carlos de, 1979
 Efeitos do citalopram sobre a expressão gênica em *Drosophila melanogaster* / Luiz Carlos de Oliveira Júnior. - 2017.
 72 p. : il.

Orientador: Carlos Ueira Vieira.
Coorientador: Matheus de Souza Gomes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. *Drosophila melanogaster* - Teses. 3. Serotonina - Teses. 4. Medicamentos - Administração - Teses. I. Vieira, Carlos Ueira, 1981-. II. Gomes, Matheus de Souza. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

LUIZ CARLOS DE OLIVEIRA JÚNIOR

EFEITOS DO CITALOPRAM SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA
EM *Drosophila melanogaster*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof.Dr. Carlos Ueira Vieira

Coorientador: Prof.Dr. Matheus de Souza Gomes

UBERLÂNDIA

2017

À minha família.

Agradecimentos

Ao meu amigo e orientador, Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira, pelo exemplo e orientação. Obrigado por compartilhar comigo sonhos e decepções, esperanças e desesperanças científicas... e por não me deixar desistir. Quem sabe, sabe! E o Carlos sabe!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes, pela orientação e ensinamentos; por ter me apresentando essa encantadora área que é a bioinformática.

À minha querida esposa Naiana, pelo apoio e paciência, e pela falta de paciência, cada coisa na hora certa; por me mandar conversar com o Carlos cada vez que eu quis desistir. Amor, amor, amor...

Ao meu querido filho Lucas por ter me lembrado o tempo todo, mesmo quando eu precisava muito estudar, que o mais importante não era o doutorado mas ser seu pai. Obrigado também por ter me ajudado no laboratório e me incentivado ("Papai, genética é demais!")

À Prof^a.Dr^a. Ana Maria Bonetti, pelo seu cuidado maternal, pelo incentivo, carinho e pela cobrança. Ela sabe que eu fui sim no laboratório! Tenho fotos para provar! Com ela inclusive.

À toda turma do Laboratório de Genética pelos momentos de amizade e pelo apoio nos experimentos.

Aos meus queridos alunos, que me instigam a aprender mais e buscar novos desafios.

Aos meus alunos/amigos da Liga Acadêmica de Inovação em Saúde, pela energia e animação, pela fome de aprender e fazer o novo; por abraçar com empolgação cada ideia maluca que saiu dos nossos "torós de ideia".

Isso motiva e não deixa perder a esperança de que esse mundo tem sim solução.

À minha *Alma Mater*, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, por me nutrir em conhecimento e me incentivar na busca por novos desafios, indo “aonde nenhum psiquiatra jamais esteve!”

Ao Mistério...

Por não se revelar...

Por manter-me na dúvida...

Por dar-me uma busca...

Por dar-me sentido...

Por esconder-se no imenso e complexo Universo, com tantos mundos em tantas galáxias, tão misteriosas quanto ele...

Por esconder-se nas minúsculas e complexas células com suas moléculas e intrincadas funções, tão misteriosas quanto ele...

Por esconder-se no grande e no pequeno e assim se revelar...

Por ser O Mistério...

“Não percam a coragem. Vivam no sereno ambiente dos laboratórios e das bibliotecas. No fim da vida, que vocês possam dizer: ‘Fiz o que pude’”.

Louis Pasteur, 1892

Ou seja,

“Stay hungry, stay foolish!”

Steve Jobs, 2005

Resumo

Os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) são os psicofármacos mais utilizados para o tratamento de transtornos do humor e ansiedade. Evidências indicam que eles possuem diversos efeitos biológicos além da ação sobre a serotonina. Utilizando sequenciamento de nova geração de RNA (RNA-seq), foram investigados os efeitos de diferentes doses de citalopram sobre expressão gênica em *Drosophila melanogaster*. Foram avaliados por análise *in silico* os genes diferencialmente expressos, as prováveis vias metabólicas nas quais participam, as redes de interação entre eles e os miRNAs com seus alvos preditos. Foram observadas alterações de genes de vias importantes relacionadas à processos inflamatórios, apoptose, autofagia, neurodesenvolvimento e neurodegeneração. Desta forma, o efeito do citalopram, tem um perfil anti-inflamatório, anti-apoptótico, contribuindo para mecanismos ligados a redução da neurodegeneração, diferenciação e manutenção do tecido neural.

Abstract

The selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are the most commonly used psychotropic drugs for the treatment of mood and anxiety disorders. Evidence indicates that they have several biological effects besides action on serotonin. Using Next Generation Sequencing of RNA (RNA-seq), we investigated the effects of different doses of citalopram on gene expression in *Drosophila melanogaster*. The differentially expressed genes, the probable metabolic pathways in which they participate, and the interaction networks were evaluated by bioinformatic tools. Alterations in genes of important pathways related to inflammatory response, apoptosis, autophagy, neurodevelopment and neurodegeneration were observed. The effect of citalopram was anti-inflammatory, anti-apoptotic, contributing to mechanisms linked to the reduction of neurodegeneration, differentiation and maintenance of neural tissue.

Sumário

1 - Introdução	10
1.1 – Antidepressivos e a neurobiologia da depressão	10
1.2 – Transcriptômica e a biologia de sistemas	13
1.3 - <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo animal na pesquisa em saúde	16
2 - Objetivos	18
3 – Material e Métodos	19
3.1 – Drosophila e tratamento	19
3.2 – Isolamento do RNA mensageiro e construção das bibliotecas	19
3.3 – Sequenciamento de Nova Geração	20
3.4 – Análise <i>in silico</i>	20
4 – Resultados	22
4.1 – Sequenciamento de Nova Geração de RNA	22
4.2 – Análise de mRNA	23
4.3 – Avaliação funcional dos genes	27
4.4 – Análise de precursores de miRNA	35
4.5 – Genes mitocondriais	38
4.6 – Genes ortólogos	39
5 – Discussão	41
5.1 – RNA-seq e genes diferencialmente expressos	41
5.2 – Proteínas ribossomais	43
5.3 – Vias de sinalização	44
5.4 – Precursores de miRNA	48
5.5 – Genes mitocondriais	51
5.6 – Visão sistêmica da ação do Citalopram	54
6 – Conclusão	57
7 - Bibliografia	58
8 - Anexo	

1. Introdução

1.1. Antidepressivos e a neurobiologia da depressão

A década 50 do século passado pode receber o nome de “década de ouro” da história da psicofarmacologia. Neste período surgem os primeiros tratamentos farmacológicos científicos para os transtornos mentais e nasce a própria disciplina da psicofarmacologia. Os primeiros antidepressivos a surgir foram a iproniazida e a imipramina. A primeira foi sintetizada a partir das hidrazinas descobertas por Fisher em 1870 e inicialmente utilizadas para tratar a tuberculose. A imipramina surge a partir da criação dos tricíclicos por Bernthsen em 1883 na *Badische Anilin und Soda Fabrik*, BASF, na Alemanha. Surgem depois o antipsicótico clorpromazina em 1952, e o benzodiazepínico clordiazepóxido, em 1960 (LOPEZ-MUNOZ; ALAMO, 2009).

A ação dessas duas drogas, produzindo o aumento de neurotransmissores pela inibição da MAO ou da receptação de serotonina e noradrenalina, com melhora da depressão conduziu ao desenvolvimento da hipótese monoaminérgica dos transtornos afetivos. Por décadas esse será o paradigma para o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos dos transtornos mentais, não só para os transtornos de humor mas também para a ansiedade e as psicoses. De acordo com essa hipótese, a depleção dos neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina na fenda sináptica explicaria a maior parte dos sintomas da depressão. (SCHILDKRAUT, 1965).

Seguindo essa hipótese, na década de 1980 surge uma nova classe de medicamentos antidepressivos, os inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS) que rapidamente se tornam os fármacos mais utilizados para o tratamento da depressão. Atualmente seis ISRS são comercializados: fluoxetina, sertralina, paroxetina, fluvoxamina, citalopram e escitalopram. Embora apresentem algumas diferenças individuais quanto à sua capacidade de interagir com receptores de serotonina, histamina, acetilcolina e inibir a recaptção de dopamina e noradrenalina, o mecanismo terapêutico básico dessa classe de medicamentos é a inibição da recaptção de serotonina com

aumento da sua disponibilidade na sinapse (HIEMKE; HÄRTTER, 2000; STAHL, 1998).

Entretanto os ISRS e outros antidepressivos, apesar de provocarem um aumento agudo dos níveis de neurotransmissores, somente produzem uma resposta terapêutica após várias semanas de uso. Esse intervalo sugere que outras modificações deveriam ser responsáveis pelos efeitos comportamentais desses medicamentos (WONG; LICINIO, 2001).

Hipóteses alternativas para a etiologia da depressão e o efeito terapêutico das medicações foram desenvolvidas nos anos seguintes para tentar explicar esse intervalo entre o aumento agudo dos neurotransmissores e a melhora. Uma outra hipótese, a hipótese molecular, propõe que os efeitos dos antidepressivos se deveriam a modificações em sistemas de sinalização intracelular, ativados pelos neurotransmissores, que alterariam a expressão de genes ligados a plasticidade neural e resiliência celular (CASTRÉN, 2005).

O cérebro não é apenas um produtor de neurotransmissores e suas variações não resumem a riqueza da atividade cerebral e mental como pode fazer pensar ideias como a hipótese monoaminérgica dos transtornos mentais. Muito menos os neurônios observados de forma isolada tem essa capacidade mesmo quando consideramos a hipótese molecular. O funcionamento cerebral, como compreendido hoje, é o resultado da atividade de uma intrincada rede de células, não apenas neurônios, que interagem e se comunicam para dar origem ao comportamento. Da “doutrina do neurônio”, formulada a partir dos trabalhos iniciais de Cajal e Sherrington, passamos “doutrina das redes celulares” das quais participam os neurônios, astrócitos e outras células da micróglia (YUSTE, 2015).

Isso se confirma à medida que reconhecemos cada vez mais a participação dos astrócitos no funcionamento das redes cerebrais (SEIFERT; SCHILLING; STEINHÄUSER, 2006). Os astrócitos podem influenciar diretamente os neurônios. Em *Drosophila melanogaster* a alteração da expressão de canais de cálcio dos astrócitos influenciou o funcionamento dos neurônios com mudanças comportamentais (YATES, 2016). Eles podem também liberar neurotransmissores influenciando a transmissão sináptica neural, o ciclo circadiano e a barreira hematoencefálica (ABBOTT;

RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006; HAMILTON; ATTWELL, 2010; WHALLEY, 2017). Os astrócitos são também alvo dos antidepressivos, que alteram suas vias de sinalização, e estão envolvidos tanto na neurobiologia dos transtornos do humor quanto na resposta ao tratamento (CZÉH; DI BENEDETTO, 2013; SANACORA; BANASR, 2013).

Nesse outro paradigma, nossa visão do funcionamento dos antidepressivos e da fisiopatologia dos transtornos mentais também tem sido reavaliado. Um exemplo é o reconhecido envolvimento das neurotrofinas, moléculas que influenciam a plasticidade sináptica e manutenção das redes neurais, com a resposta aos antidepressivos (BJÖRKHOLM; MONTEGGIA, 2016; SANTARELLI, 2003).

O Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), uma das mais importantes neurotrofinas, tem sido relacionada tanto com o desenvolvimento como com a melhora da depressão (GROVES, 2007). Em modelos animais o estresse de vários tipos provoca alterações nos níveis de neurotrofinas, em especial de BDNF. Em camundongos foi demonstrado que estresse por isolamento provocou redução de BDNF, fator de crescimento de nervos (NGF) e neurotrofina-3, com repercussão sobre o aprendizado (UEYAMA et al., 1997). Em ratos a privação de cuidados maternos ao nascimento produziu redução de BDNF nas crias e posteriormente, na vida adulta, redução dos níveis dessa neurotrofina quando submetidos a testes de estresse provocado (ROCERI et al., 2004). Mesmo o isolamento social agudo produziu modificações na expressão gênica, com redução do RNA mensageiro, do BDNF em camundongos (PIZARRO et al., 2004). A administração de antidepressivos em animais mostrou que eles são capazes de produzir aumento em níveis de neurotrofinas (DE FOUBERT et al., 2004; DIAS et al., 2003; KHUNDAKAR; ZETTERSTRÖM, 2006).

Em humanos efeitos semelhantes são encontrados mostrando a redução de BDNF em vários transtornos mentais como depressão e esquizofrenia (ANGELUCCI; BRENÈ; MATHÉ, 2005). Além da redução do BDNF em pacientes com depressão (KAREGE et al., 2002), observa-se que polimorfismos no gene desta neurotrofina (em especial o polimorfismo val66met), se associam a menor volume hipocampal, para-hipocampal e da amígdala, regiões associadas à regulação do humor e correspondente risco

aumentado de depressão (MONTAG et al., 2009; OZAN et al., 2010). Os níveis de BDNF são inclusive avaliados como marcador para resposta ao tratamento (POLYAKOVA et al., 2015).

Além da relação com fatores ligados às plasticidade, como as neurotrofinas, aumenta o corpo de evidências do envolvimento de outros sistemas. Fatores inflamatórios parecem ter importante relação com a depressão, sendo demonstrada a alteração de fatores inflamatórios em pacientes deprimidos e a relação de genes ligados a resposta imune com os transtornos de humor (BUFALINO et al., 2013; DANTZER et al., 2008; STEWART et al., 2009). A inflamação, com participação da micróglia, teria uma relação mais estreita com a depressão o que explicaria a associação de condições inflamatórias, como a obesidade, com os transtornos depressivos (LUPPINO et al., 2010; MCNALLY; BHAGWAGAR; HANNESTAD, 2008).

A investigação de outros fatores além dos níveis de neurotransmissores, abandonando a hipótese monoaminérgica, tem reforçado a ideia de que a depressão não é um transtorno da química cerebral apenas, mas uma doença de envolvimento sistêmico. E os antidepressivos portanto teriam efeitos além da neurotransmissão, inclusive anti-inflamatórios (TYNAN et al., 2012).

1.2. Transcriptômica e a Biologia de Sistemas

Com o fim do Projeto Genoma Humano ficou claro a complexidade do material genético em nossas células. Apenas uma pequena parte do genoma é formado por genes codificadores de proteínas. Essa maior parte restante, longe de ser considerada não funcional ou “lixo genético”, é formada por genes codificadores de RNA ribossomal, RNA transportador, miRNAs, elementos genéticos móveis e outros elementos regulatórios com grande importância no funcionamento celular e evolução (PALAZZO; LEE, 2015).

Para compreender melhor a importância de todos os elementos do genoma para o funcionamento celular, e dar sentido para essas informações nas mais diversas condições de interesse na biologia e medicina, é preciso observar a dinâmica da expressão gênica. Esse é o campo de estudo da

transcriptômica. Seu objetivo é estudar e catalogar o conjunto do RNA transcrito pela célula, grupo de células ou organismos, em circunstâncias específicas ou após intervenções. Permite compreender o papel e a relação de genes e elementos regulatórios no desenvolvimento dos organismos vivos e das doenças, estudando a resposta a tratamentos e outros fatores externos (BURGESS, 2015; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

O efeito das drogas e intervenções utilizadas em tratamentos podem ser investigados de forma mais abrangente com o apoio da transcriptômica tanto em modelos animais quanto em pacientes. Utilizando *microarray* demonstrou-se que o escitalopram revertia alterações de expressão gênica no hipocampo de ratos produzidas por estresse (BENATTI et al., 2014). Em seres humanos essa mesma metodologia mostrou alterações de expressão dos genes *MMP28* e *KXD1* no plasma de pacientes tratados com nortriptilina (HODGSON et al., 2016).

O sequenciamento de nova geração de RNA (RNA-seq) é uma tecnologia jovem, ainda em desenvolvimento, que utiliza os sequenciadores de nova geração para estudar o transcriptoma de forma qualitativa, as sequências de bases nitrogenadas que formam os transcritos, e quantitativa mostrando também a mudança nos níveis de transcrição (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). A diferença com outras tecnologias disponíveis até o momento, como os *microarrays*, é a possibilidade de sequenciamento em grandes proporções de elementos desconhecidos, identificando variantes de genes e miRNAs. Nos estudos com *microarrays* fica-se limitado ao estudo dos genes incluídos na plataforma, ou seja, previamente conhecidos (RUSSO; ZEGAR; GIORDANO, 2003).

Essa tecnologia permite estudos dinâmicos e inéditos, que não seriam possíveis ou viáveis com tecnologias anteriores. É possível estudar por exemplo a mudança de expressão gênica produzida pela interação de dois organismos vivos, como parasita e hospedeiro (WESTERMANN; GORSKI; VOGEL, 2012). Outra utilidade é o estudo da expressão gênica de células únicas. A extração do material genético com micropipetas de células únicas possibilita o estudo de estágios evolutivos de células tumorais, comportamento de células tronco e da diferenciação celular além de

comparar a expressão gênica entre tipos celulares diferentes que formam um órgão (GAWAD; KOH; QUAKE, 2016).

As metodologias de sequenciamento de nova geração (SNG) oferecem formas mais rápidas, precisas e de menor custo para sequenciamento que a primeira geração baseada no sequenciamento Sanger. Existem várias plataformas diferentes disponíveis que podem utilizar pirosequenciamento, sequenciamento por ligação de sondas, por término reversível com PCR em pontes e sequenciamento com detecção de prótons (METZKER, 2010). Uma nova geração de sequenciadores apresenta também a possibilidade de sequenciamento utilizando plataformas baseadas em nanoporos (BRANTON et al., 2008). São diferentes tecnologias com o mesmo objetivos de “ler” rapidamente a sequência de bases nitrogenadas que compõem uma grande amostra de DNA de interesse, e não apenas genes específicos pré-determinados.

Na medicina, o sequenciamento de nova geração já começa a permitir estudos em medicina personalizada e de precisão com maior facilidade que com os métodos convencionais. Existe potencial a ser explorado tanto no campo do diagnóstico quanto na determinação do tratamento mais adequado (ASHLEY, 2016). Tratamentos podem ser preferidos ou evitados com base na informação genética. A sinvastatina, um dos medicamentos mais prescritos para dislipidemias, deveria ser utilizado em doses baixas ou não utilizado em portadores de algumas variantes do gene *SLCO1B1* (OSHIRO et al., 2010). Outros exemplos são o tratamento com varfarina, um anticoagulante, que sofre influência de variantes no gene *VKORC1* (OWEN et al., 2010), e com o tamoxifeno, para câncer de mama, metabolizado por várias enzimas da família citocromo P450 (SALADORES et al., 2015).

Junto com tecnologias como o SNG e outras metodologias, capazes de gerar grandes quantidades de dados sobre o funcionamento dos organismos vivos sob vários aspectos, surge uma nova disciplina nas ciências biológicas: a Biologia de Sistemas. Essa abordagem volta seu olhar não para genes e proteínas individuais mas para a estrutura e dinâmica dos sistemas orgânicos em que estão inseridos. Genes, proteínas, fatores de transcrição, miRNAs e estímulos externos ambientais inclusive, como toxinas e outras moléculas, são vistas em suas conexões (KITANO, 2002). Essa é

uma abordagem que beneficia muito a investigação na área da saúde por ser integrada e capaz de lidar com os múltiplos fatores envolvidos no processo de saúde, doença, no conhecimento da função e disfunção de sistemas orgânicos (WEST, 2012).

Uma das grandes limitações para o uso na prática clínica, à medida que o custo do sequenciamento for reduzido, será a interpretação, organização e tradução das informações em conhecimento útil (DESAI; JERE, 2012; LOHMANN; KLEIN, 2014). Além da imensa quantidade de informações geradas pelo sequenciamento é necessário identificar os genes e as variantes comparando com o genoma de referência, avaliar o papel funcional de cada transcrito e sua interação com outros transcritos (CAPRIOTTI et al., 2012). Uma ferramenta importante nessa tarefa é a bioinformática (LINDBLOM; ROBINSON, 2011). A complexidade desses dados exige a manipulação de grande quantidade de informação, manipulação de bases de dados, análises estatísticas e geração de imagens em computadores, planejamento de experimentos e simulações (YOU, 2004). A bioinformática deve logo se tornar um campo essencial para a medicina (FERNALD et al., 2011).

1.3. *Drosophila melanogaster* como modelo animal na pesquisa em saúde

A história da *Drosophila melanogaster* como modelo na pesquisa biomédica começa em 1901, na Universidade de Columbia, com Thomas Hunt Morgan. Utilizando a mosca de fruta, Morgan definiu o papel dos cromossomos na hereditariedade resgatando e refinando o modelo proposto por Mendel, o que lhe valeu o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1933 (KOHLE, 1994). Vários outros ganhadores do prêmio Nobel também trabalharam com este modelo nas pesquisas que foram responsáveis por sua premiação como Muller em 1946, Lewis, Nusslein-Volhard e Wieschaus em 1995 (PASINI; BERTOLOTTO; FASANO, 2010).

A mosca de fruta tornou-se o modelo animal mais estudado na biologia e uma ferramenta de estudo essencial para a genética. Dela foi o primeiro genoma de um animal complexo a ser totalmente sequenciado (ADAMS et al., 2000). As pesquisas comparando o genoma da *Drosophila*

melanogaster com o genoma humano mostram que 77% dos genes envolvidos em doenças humanas tem homólogos na mosca de fruta. Em domínios conservados a semelhança pode chegar a 90% (REITER et al., 2001).

A mosca de fruta é um modelo prático, de baixo custo de manutenção, podendo ser criada em pequenos frascos com meio de cultura de simples preparo ao qual podem ser adicionadas substâncias que se deseje testar. Seu ciclo de vida é curto, durando cerca de 28 dias. Isso permite estudos durante o desenvolvimento embrionário, a idade adulta e envelhecimento (JENNINGS, 2011).

Seu genoma compacto e simples, com apenas quatro cromossomos, permitiu o desenvolvimento de modelos transgênicos de doenças humanas com genes candidatos expressos em regiões específicas se necessário (HALES et al., 2015). Para doenças neurodegenerativas, por exemplo, existem milhares de linhagens transgênicas disponíveis. Utilizando o sistema de expressão Gal4/UAS, um ativador de transcrição de leveduras, genes humanos podem ser expressos no cérebro da drosófila de forma precisa (JACKSON, 2008; JENETT et al., 2012).

Drosófilas podem ser usadas para estudar Doença de Alzheimer (PRÜßING; VOIGT; SCHULZ, 2013), invasão por tumores metastáticos (MILES; DYSON; WALKER, 2011), infecções gastrointestinais (MISTRY; KOUNATIDIS; LIGOXYGAKIS, 2016), Doença de Gaucher (KINGHORN et al., 2016) e até lesão cerebral traumática (KATZENBERGER et al., 2013). A mosca de fruta também é um interessante modelo para o desenvolvimento e estudo de novas drogas (PANDEY; NICHOLS, 2011).

2. Objetivos

O objetivo deste estudo foi conhecer a nível funcional as alterações de expressão gênica induzidas pelos ISRS. Utilizando um modelo animal de fácil manutenção e com genoma simples e bem conhecido, a mosca *Drosophila melanogaster*. Este estudo realizou um ensaio de tratamento crônico (21 dias) com citalopram, o mais seletivo dos ISRS, e o sequenciamento de nova geração para obter o transcriptoma a partir de cabeças das moscas.

Os objetivos secundários do estudo foram:

- 1 - avaliar o uso da tecnologia de RNA-seq na compreensão dos mecanismos de ação de drogas.
- 2 - avaliar o uso da *Drosophila melanogaster* como modelo de estudo dos mecanismos de ação de drogas utilizando ferramentas de bioinformática para identificar genes ortólogos em humanos que são modulados pelo medicamento.
- 3 – identificar genes ortólogos modulados pelos ISRS relacionados a doenças humanas, especialmente transtornos de humor.
- 4 - compreender as alterações de expressão de miRNAs induzidas pelos ISRS.
- 5 - identificar vias metabólicas influenciadas pela ação dos ISRS.
- 6 – avaliar mudanças na expressão gênica em diferentes doses da droga.

3. Material e Método

3.1. *Drosophila* e tratamento

Moscas de fruta (*Drosophila melanogaster*), da linhagem selvagem Canton-S, foram mantidas a 25°C em ciclo claro/escuro de 12h:12h e criadas em meio padrão de farinha de milho.

Para o tratamento moscas foram coletadas entre os dias 0 e 5 após a eclosão. Elas foram mantidas em tubos plásticos com aproximadamente 50 moscas com meio instantâneo enriquecido (75% de mistura comercial para preparo de purê de batata, 15 % extrato de levedura, 9,3% de glicose, 0.7% de metilparabeno). Foram utilizados 3 tubos para cada grupo do experimento.

O grupo controle foi constituído por moscas tratadas com água (solvente do meio). Os dois outros grupo foram cultivados em meio ao qual foi adicionado bromidrato de citalopram em uma concentração de 1,25mM e 5,0 mM. O meio foi trocado a cada 3 dias para manter a exposição à droga.

Foi realizado tratamento crônico por 21 dias. Após esse período as moscas foram anestesiadas colocando o tubo em gelo ou na geladeira. As cabeças foram coletadas, no período da tarde, utilizando pinças e imediatamente congeladas em tubos plásticos *RNAse-free* mantidos em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas a -80C até o processamento.

3.2. Isolamento do RNA mensageiro e preparação das bibliotecas

As cabeças das moscas ainda congeladas foram trituradas em nitrogênio líquido. A extração e o isolamento de mRNA do conjunto de cabeças foram realizadas utilizando o kit Dynabeads mRNA Direct (Life Technologies) seguindo as orientações do fabricante. Uma alíquota do

mRNA de cada biblioteca foi quantificada por fluorimetria utilizando o fluorímetro Qubit (Thermofisher).

Três Bibliotecas de cDNA para cada grupo amostral foram preparadas a partir do mRNA extraído utilizando o kit Ion Total RNA-seq v2 (Life Technologies). O cDNA obtido por reação de transcrição reversa foi amplificado e ligado a *barcodes* conforme recomendações do fabricante.

3.3. Sequenciamento de Nova Geração

Para o sequenciamento das bibliotecas foi utilizado o chip Ion PI (Life Technologies) preparado e carregado de forma automatizada no sistema Ion Chef (Life Technologies). A corrida de sequenciamento foi realizada no sequenciador Ion Proton (Life Technologies) utilizando kit Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit . Todos esses procedimentos seguiram as orientações do fabricante.

3.4. Análise *in silico*

A análise inicial dos dados brutos provenientes do sequenciamento foi realizada no software residente do sistema do sequenciador Ion Proton, Torrent Suite. Os arquivos do tipo BAM foram exportados e analisados no software *CLC Genomics Workbench* (version 9.5.3). No *CLC* foi utilizado o teste *EDGE* (*empirical analysis of diferencial gene expression*) para encontrar os genes diferencialmente expressos nas amostras ($q < 0.05$). O *EDGE* implementa um teste estatístico similar ao “teste exato de Fisher” desenvolvido para comparação de dois grupos onde várias característica são avaliadas simultaneamente mas com poucas réplicas por amostra (ROBINSON; SMYTH, 2008) . Esses genes foram então associados a vias metabólicas conhecidas disponíveis na *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>). Uma análise de interação entre esses genes foi realizada utilizando a ferramenta *STRING* versão 10.0 (<http://string-db.org>) com o objetivo de avaliar o grau de associação funcional entre eles.

Entre os genes diferencialmente transcritos uma análise conjunta foi realizada para aqueles genes de precursores de miRNAs. Para a predição dos alvos dos miRNAs foi utilizado o aplicativo Targetscan fly (http://www.targetscan.org/fly_12/). Para a predição da influência dos miRNAs em vias metabólicas da KEGG foi utilizado o software DIANA-mirPath v.3 (disponível em: <http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr>) (VLACHOS et al., 2015) O software DIANA-MR-microT foi utilizado para a predição de alvos de miRNAs que não tivessem alvos no Targetscan (RECZKO et al., 2012).

A busca de genes mitocondriais entre os diferencialmente transcritos foi realizada na base de dados MitoDrome (<http://mitodrome.ba.itb.cnr.it>). Os genes humanos ortólogos relacionados a transtornos mentais ou traços comportamentais em humanos foram identificados utilizando a base DIOPT-DIST (<http://www.flyrnai.org/diopt-dist>).

As etapas do fluxo de trabalho do sequenciamento do Sistema Ion é mostrada na Figura 1.

Figura 1 – Fluxo de trabalho do sequenciamento utilizando o Sistema Ion (Life Technologies).



4. Resultados

4.1. Sequenciamento de Nova Geração de RNA

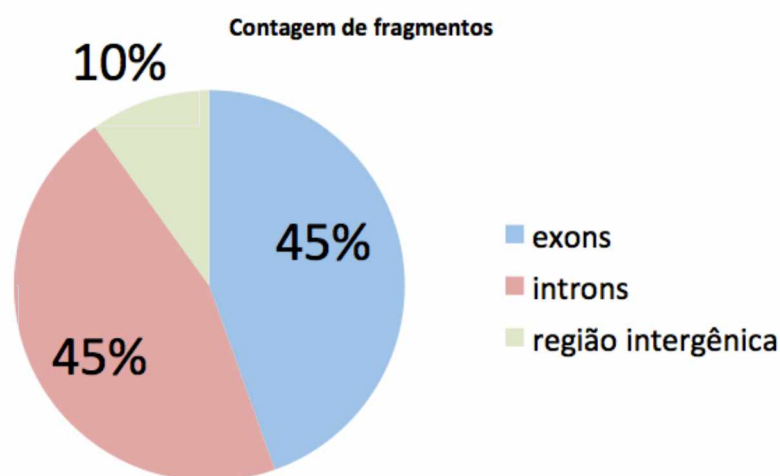
O sequenciamento das nove bibliotecas de RNA mensageiro produziu 22.270.047 fragmentos distribuídos conforme a tabela 1. Do total dos fragmentos, 70,17% foram únicos e somente esses foram alinhados com o genoma de referência.

Tabela 1 – Número de *reads* produzidos pelo sequenciamento por biblioteca.

Biblioteca (grupo amostral)	Número de fragmentos
1 (controle)	1.227.397
2 (controle)	2.585.522
3 (controle)	3.647.712
4 (1,25 mM)	339.051
5 (1,25 mM)	3.359.134
6 (1,25 mM)	2.629.625
7 (5,0mM)	3.657.432
8 (5,0 mM)	2.809.849
9 (5,0 mM)	2.014.325
Total	22.270.047

O alinhamento dos fragmentos únicos com o genoma de referencia de *Drosophila melanogaster* identificou 31.646 transcritos e 17.490 genes. Éxons e íntrons representam a maior parte dos fragmentos transcritos (Figura 2).

Fig. 2 – Contagem de fragmentos únicos alinhados ao genoma de referência de *Drosophila melanogaster* distribuído por origem.



Utilizando o teste EDGE foram encontrados 667 genes diferencialmente transcritos nos grupos comparados ($q < 0,05$). Desses, 594 são codificadores de RNA mensageiro (mRNA). Os demais são genes não codificadores, RNA ribossomal, transportador, microRNAs, ou genes mitocondriais que foram analisados à parte.

4.2. Análise de mRNA

Quando comparados os dois grupos experimentais (1,25 mM e 5,0 mM) com o controle, 238 genes codificadores de proteínas tiveram mudança nos valores de transcrição. A tabela 2 mostra o número total de genes codificadores diferencialmente transcritos nos grupos experimentais em relação ao controle. São indicados também o número de genes com transcrição diferencial positiva e negativa em cada grupo. Observa-se que um maior número de genes teve sua transcrição aumentada do que diminuída com o tratamento. A lista completa de genes diferencialmente transcritos é apresentada no Anexo 1.

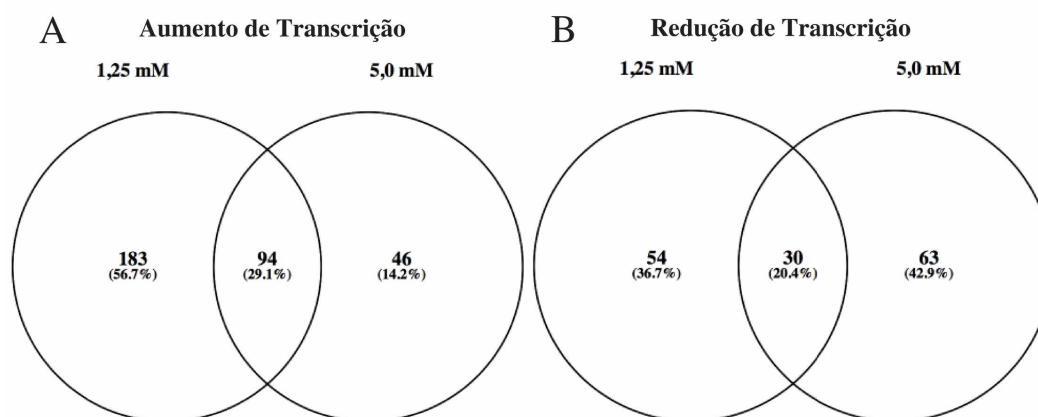
Tabela 2 – Genes codificadores de proteínas diferencialmente transcritos nos grupos experimentais

Grupos experimental de (dose de citalopram)	Genes diferencialmente transcritos *	Genes com transcrição aumentada*	Genes com transcrição diminuída*
1,25 mM	361	277	84
5,0 mM	233	139	94

* em relação ao controle (p<0,05)

A figura 2 mostra o número de genes codificadores de mRNA com transcrição aumentada e diminuída em cada tratamento em relação ao controle. A taxa de transcrição de alguns deles foi afetada pelos dois tratamentos de forma estatisticamente significativa.

Figura 3 – Número de genes codificadores diferencialmente transcritos em cada tratamento.



O diagrama de Venn mostra o número de genes com transcrição aumentada (A) e diminuída (B) para cada tratamento com citalopram e aqueles compartilhados pelos dois grupos, ou seja, aqueles que tiveram aumento ou redução da transcrição nas duas doses testadas.

Apenas dois genes apresentaram um comportamento divergente entre as doses: o gene *AttC*, que teve sua transcrição diminuída de forma significativa com o tratamento com 1,25 mM e aumentada com 5,0 mM, e o gene *CG16978*, codificador de uma proteína não caracterizada, que teve sua transcrição aumentada com 1,25 mM e diminuída com 5,0 mM. As figuras 4, 5, 6 e 7 mostram o comportamento da transcrição de alguns dos genes codificadores nos diversos grupos experimentais. Neles podemos perceber que o aumento de dose parece acentuar a tendência de queda ou elevação da transcrição dos genes.

Figura 4 – Genes diferencialmente transcritos entre controle e tratamento com 1,25mM de citalopram, com aumento de transcrição.

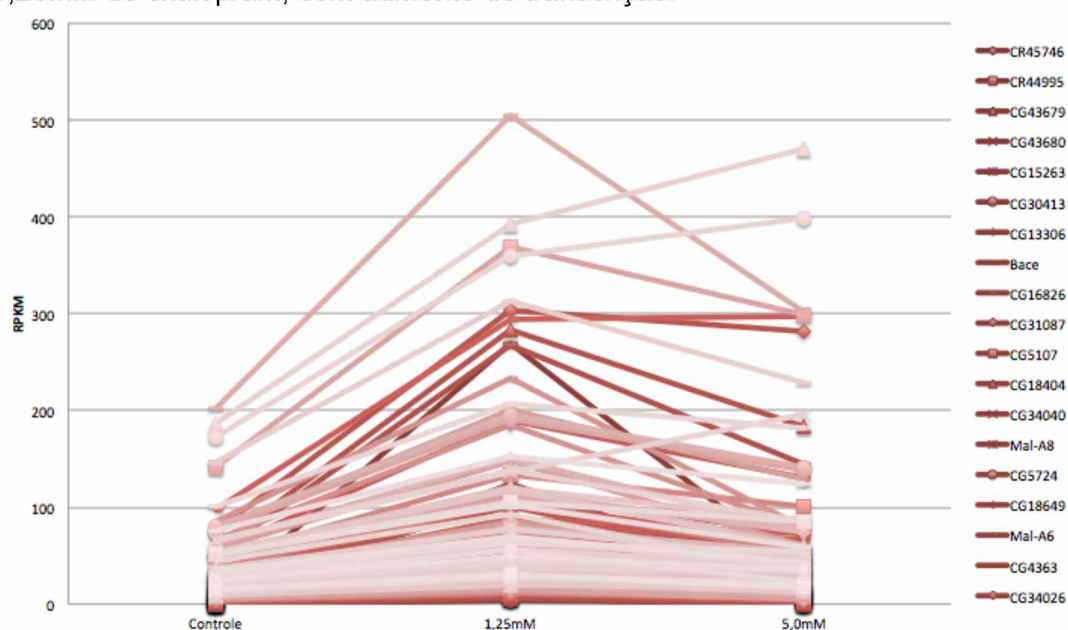


Figura 5 – Genes diferencialmente transcritos entre controle e tratamento com 1,25mM de citalopram, com redução de transcrição.

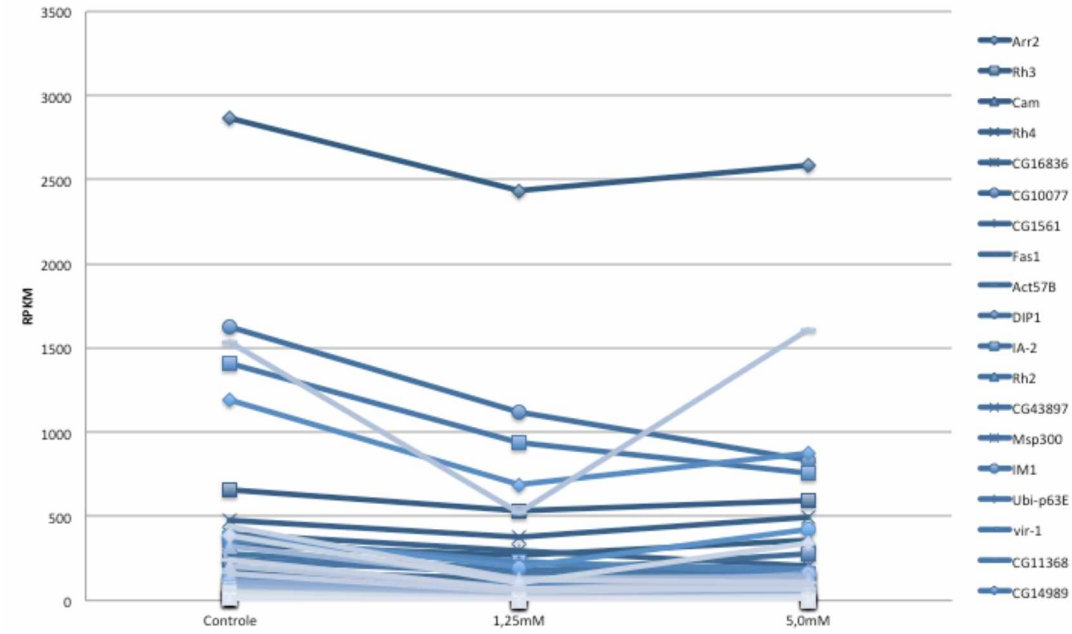


Figura 6 – Genes diferencialmente transcritos entre controle e tratamento com 5,0 mM de citalopram, com aumento de transcrição.

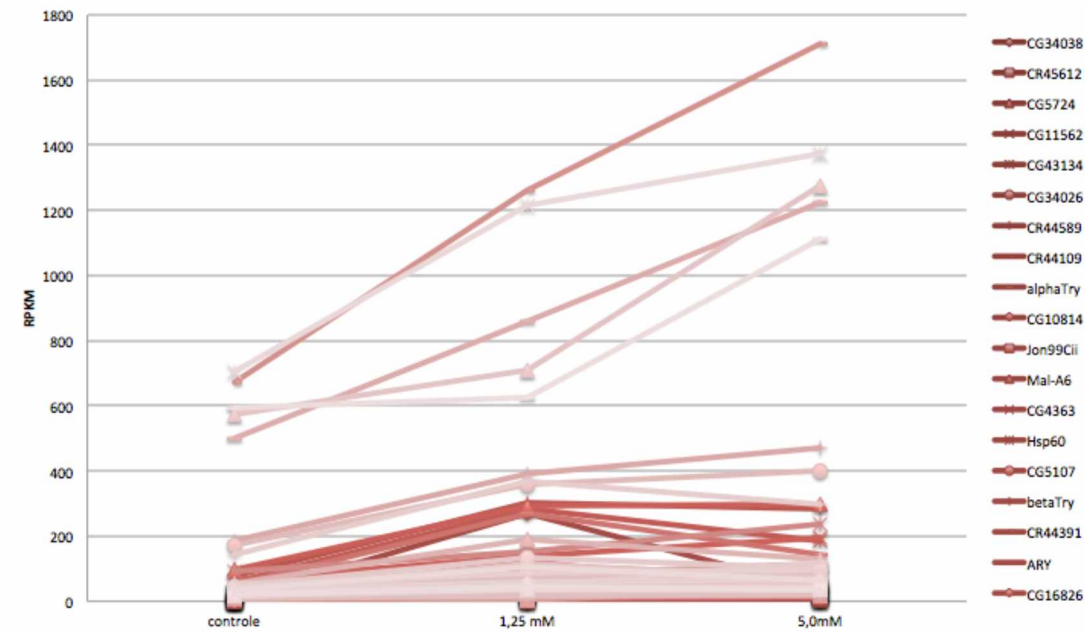
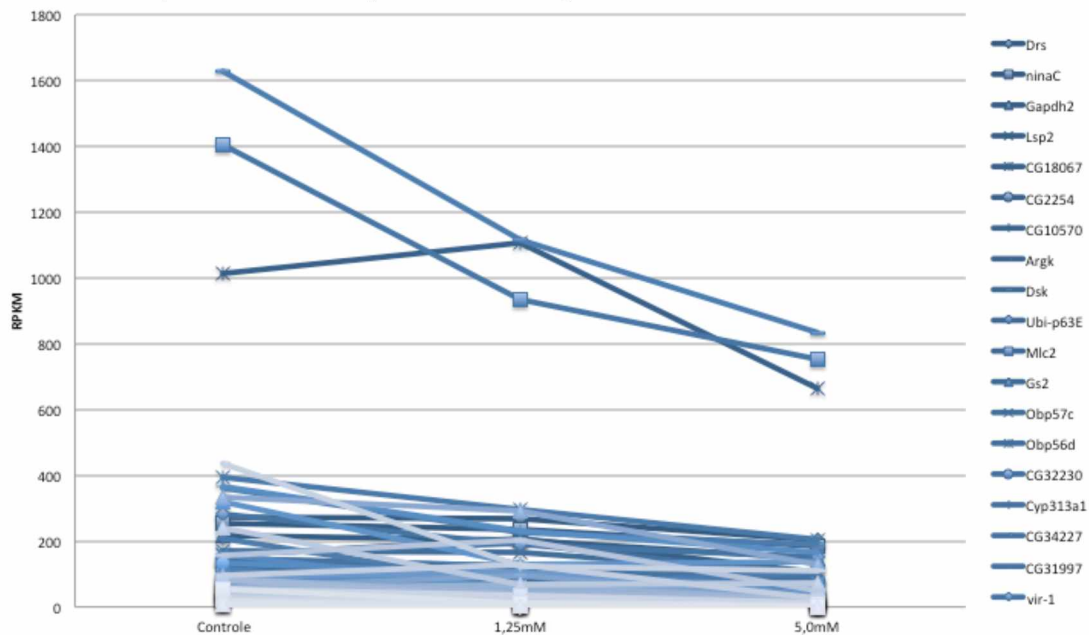


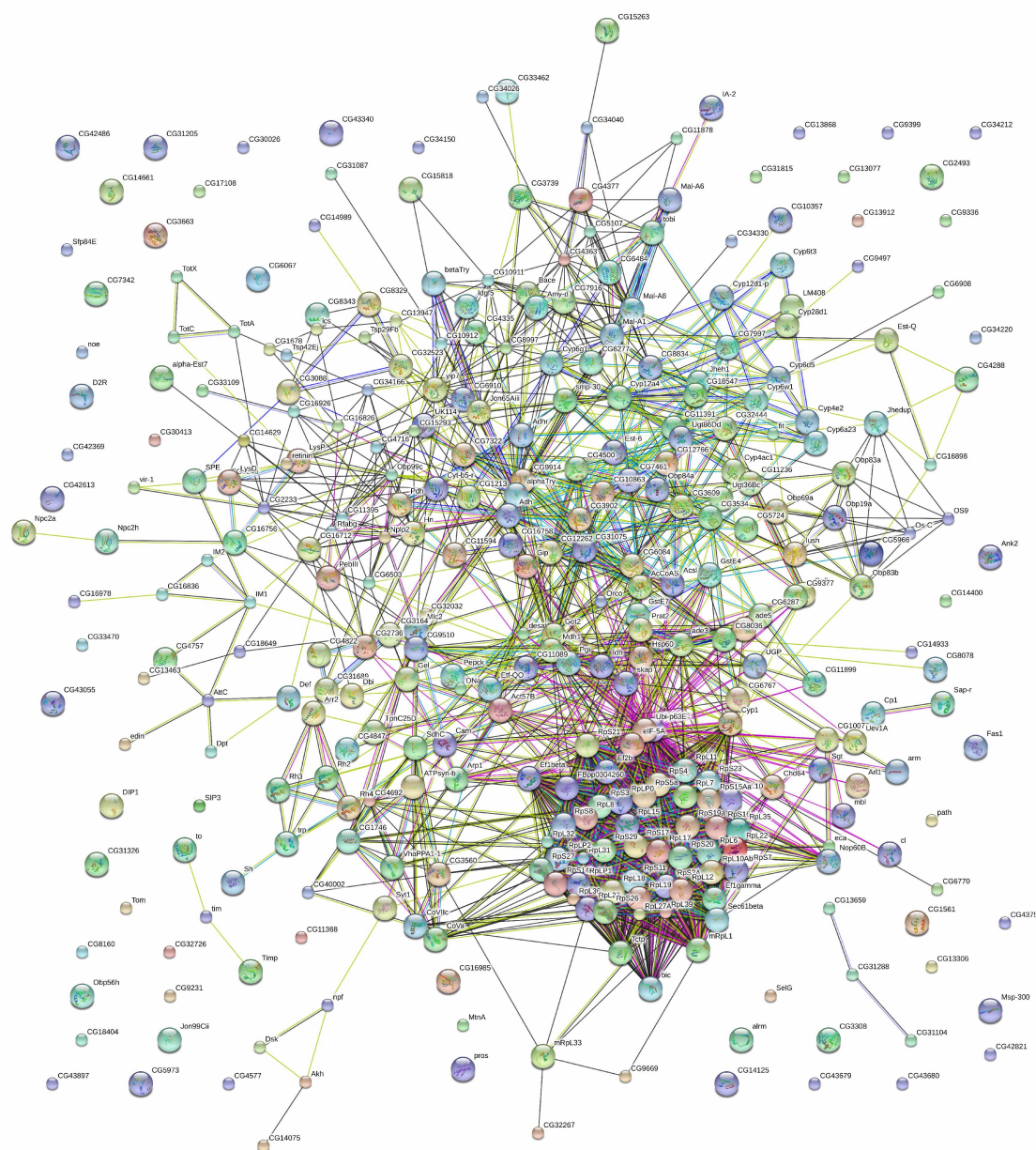
Figura 7 – Genes diferencialmente transcritos entre controle e tratamento com 5,0 mM de citalopram, com redução de transcrição.



4.3. Avaliação funcional dos genes

Utilizando a ferramenta STRING foram construídas redes de interação proteína-proteína para as proteínas codificadas pelos genes diferencialmente transcritos para cada grupo de tratamento. Foram incluídas nessas redes as interações de co-expressão, co-ocorrência, resultados de experimentos, fusão gênica, de alta confiança (escore de interação 0.9). As redes geradas apresentam mais interações que o esperado para redes aleatórias com o mesmo número de nodos, mostrando que existe uma relação funcional ou de co-expressão entre os genes diferencialmente transcritos. Uma rede aleatória com 338 genes, como a rede construída a partir dos genes diferencialmente transcritos no grupo exposto a 1,25mM de citalopram, geraria 777 interações (figura 7). No caso do experimento foram obtidas 2260 interações com uma média de 13,4 interações por nodo. No caso do tratamento com 5,0 mM de citalopram a rede é composta por 222 nodos e 865 interações (média de 7,79 interações por nodo) , enquanto o esperado para a rede aleatória seria de 294 ligações (figura 8).

Figura 8 – Rede de interação proteína-proteína gerada a partir dos genes diferencialmente transcritos no tratamento com 1,25mM de citalopram, utilizando a ferramenta STRING.



A análise funcional dos genes codificadores de RNA mensageiro diferencialmente transcritos realizada através de busca na KEGG mostrou que a maior parte desses genes está presente em vias ligadas ao processamento de informação gênica e com o metabolismo geral, tanto no grupo tratado com 1,25 mM de citalopram quanto no grupo tratado com 5,0 mM dessa medicação (fig. 9 e 10). Isso se reflete nas redes de interação proteína-proteína (fig. 7 e 8) com a formação de um concentrado de interações representando as ligações entre as proteínas das vias de processamento de informação gênica.

Figura 9 – Número de genes com aumento e com redução de transcrição distribuídos por categoria de vias metabólicas do KEGG com o uso de 1,25mM de citalopram.

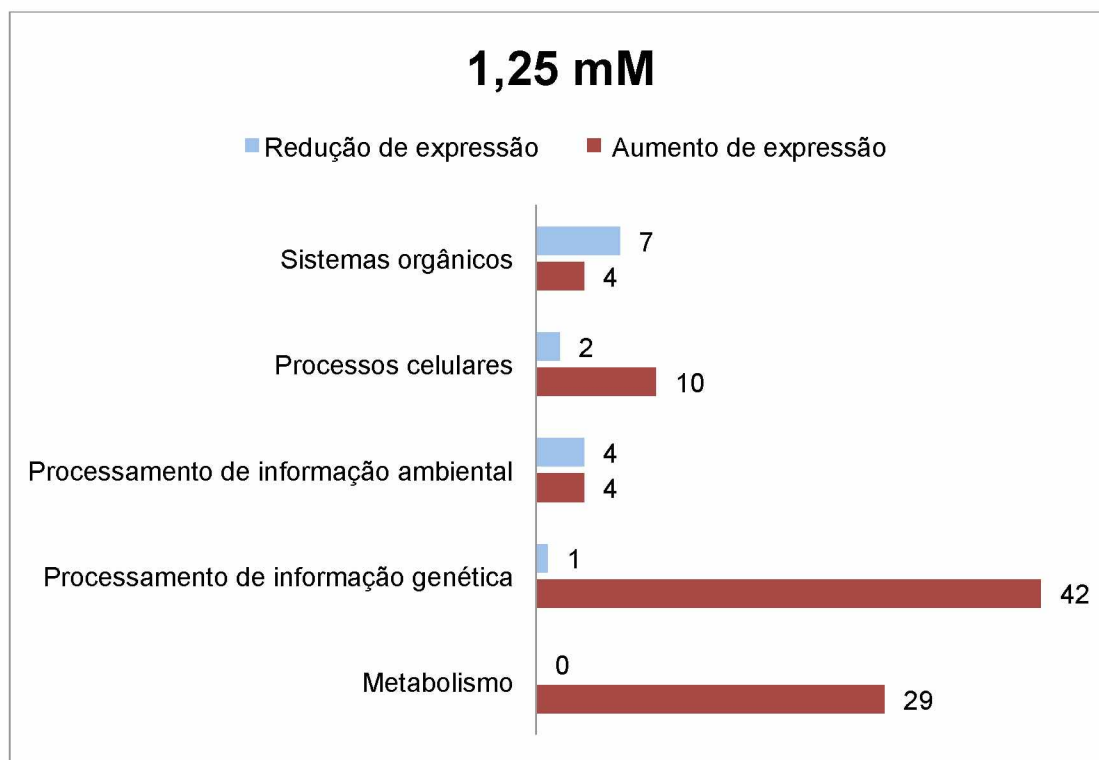
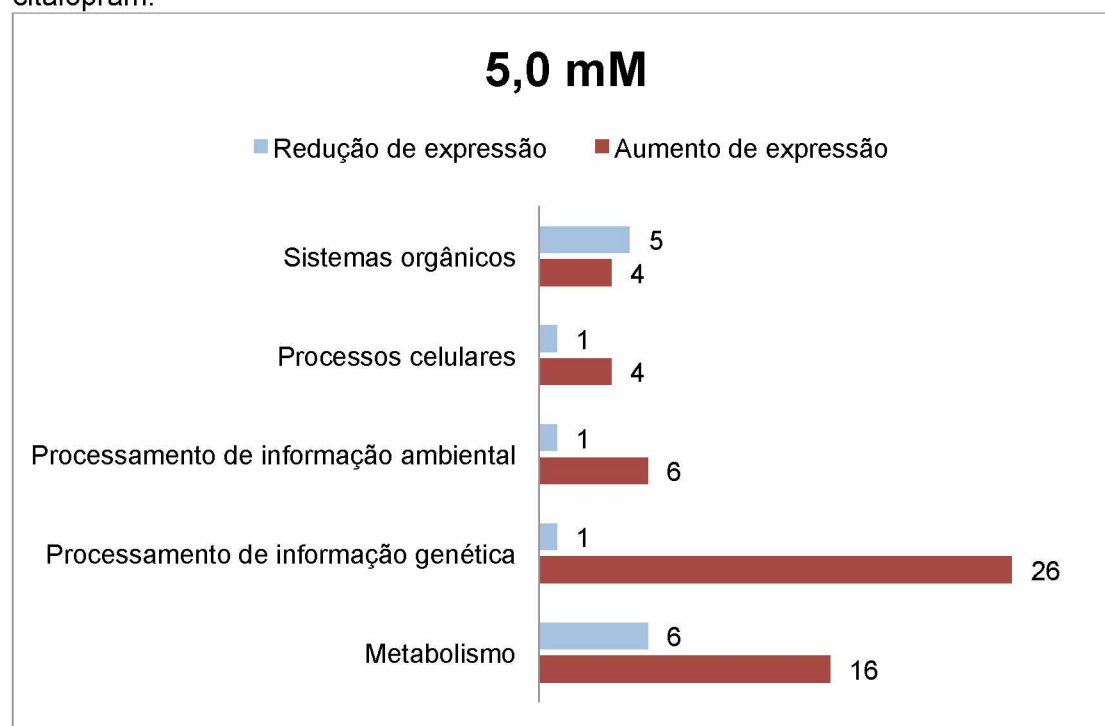


Figura 10 – Número de genes com aumento e com redução de transcrição distribuídos por categoria de vias metabólicas da KEGG com o uso de 5,0 mM de citalopram.



Na KEGG a seção “processamento de informação genética” engloba as vias ligadas a transcrição, tradução, conformação e degradação de proteínas, replicação e reparo de DNA. A maior parte dos genes com mudança de transcrição no experimento, catalogados nessa seção, são codificadores para proteínas ribossomais, que mostraram aumento nas duas doses estudadas (quadro 1).

Quadro 1 – Genes codificadores de proteínas ribossomais.

Subunidade Ribossomal	Proteína Ribossomal
Subunidade grande (L)	<i>RpL4, RpL6, RpL7, RpL8, RpL10, RpL10ab, RpL11, RpL12, RpL15, RpL17, RpL18, RpL19, RpL22, RpL24, RpL27, RpL27a, RpL31, RpL32, RpL35, RpL36, RpL39, RpLP0, RpLP1, RpLP2</i>
Subunidade pequena (S)	<i>RpS3, RpS3A, RpS4, RpS5a, RpS8, RpS11, RpS14b, RpS15A, RpS16, RpS17, RpS19a, RpS20, RpS21, RpS23, RpS26, RpS27, RpS29</i>

Na seção “metabolismo” estão incluídas as vias bioquímicas de metabolismo de carboidratos, lipídios, aminoácidos, nucleotídeos, cofatores e vitaminas, degradação de xenobióticos e metabolismo energético e de drogas. Essas vias foram aquelas com o segundo maior número de genes representados. Esses, em sua maioria, também tiveram sua transcrição aumentada.

Um menor número de genes modulados está catalogado em vias classificadas pela enciclopédia sob o verbete “processamento de informação ambiental”, “processos celulares” e “sistemas orgânicos”. As vias de processamento de informação ambiental incluem o transporte através de membrana, as vias de transdução de sinal e as moléculas de sinalização e interação como as moléculas de adesão, interação de citocinas, ligantes neuroativos e matriz extracelular com seus receptores. Sob o nome processos celulares a KEGG classifica as vias de catabolismo (endocitose, autofagia e fagocitose, por exemplo), crescimento e morte celular, formação de comunidades celulares (adesão e junção entre células) e motilidade. Em sistemas orgânicos estarão as vias ligadas a sistema imunológico, endócrino, sensorial e nervoso, desenvolvimento, envelhecimento e adaptação ao ambiente.

Para essas vias os genes diferencialmente transcritos identificados são apresentados na Quadro 2. Nela também são indicadas as alterações de transcrição encontradas.

Quadro 2 – Genes representados nas vias de processamento de informação ambiental, processos celulares, sinalização e sistemas orgânicos (KEGG).

Categorias do KEGG	Via	Genes
Processamento de informação ambiental	Via de sinalização Wnt	<i>arm</i> (↑), <i>Rac1</i> (↑),
	Via de sinalização FoxO	<i>Pepck</i> (↑),
	Via de sinalização da MAPK	<i>pros</i> (↓) , <i>14-3-3zeta</i> (↑), <i>Rac1</i> (↑), <i>hid</i> (↑),
	Via de sinalização Hippo	<i>14-3-3zeta</i> (↑), <i>Act57b</i> (↓),
	Via de sinalização do Fosfatidil inositol	<i>Cam</i> (↓)
	Via de sinalização mTor	<i>Rheb</i> (↓)
	Interação receptor – ligante neuroativo	<i>AlphaTry</i> (↑), <i>betaTry</i> (↑), <i>Dop2R</i> (↓)
Processos celulares	Fagossomos	<i>Cp1</i> (↑), <i>Sec61 beta</i> (↑), <i>VhaPPA1-1</i> (↑), <i>Act57B</i> , <i>Rac1</i>
	Lisossomos	<i>Bace</i> (↑), <i>Cp1</i> (↑), <i>DNase II</i> (↑), <i>Npc2h</i> (↑), <i>Sap-r</i> (↑), <i>VhaPPA1-1</i> , <i>Npc2a</i> (↓),
	Peroxisomos	<i>AcsI</i> (↑), <i>Idh</i> (↑)
	Autofagia	<i>Bace</i> (↑), <i>Cp1</i> (↑),
	Apoptose	<i>Bic</i> (↑), <i>hid</i> (↑)
Sistemas orgânicos	Via de sinalização Toll e Imd	<i>SPE</i> (↑), <i>Uev1A</i> (↑), <i>Ank2</i> (↓), <i>Def</i> (↓), <i>IM1</i> (↓), <i>IM2</i> (↓), <i>CecA1</i> (↑), <i>Drs</i> (↓)
	Foto-transdução	<i>Trp</i> (↑), <i>Act57b</i> (↓), <i>Arr2</i> (↓), <i>Cam</i> (↓), <i>ninaC</i> (↓)
	Ritmo circadiano	<i>Tim</i> (↑)
	Via de sinalização AGE-RAGE	<i>Rac1</i> (↑)

(↑) aumento da transcrição; (↓) redução da transcrição

A via com maior número de genes com transcrição modificada em relação ao controle é a via de sinalização Toll e Imd. Nessa via sofreram aumento de transcrição os genes *SPE* , *Uev1a*, *CecA1* e redução de *Def*, *IM1* e *IM2*, *Drs* e *Ank2* (Figura 11).

TOLL AND IMD SIGNALING PATHWAY

TOLL signaling pathway

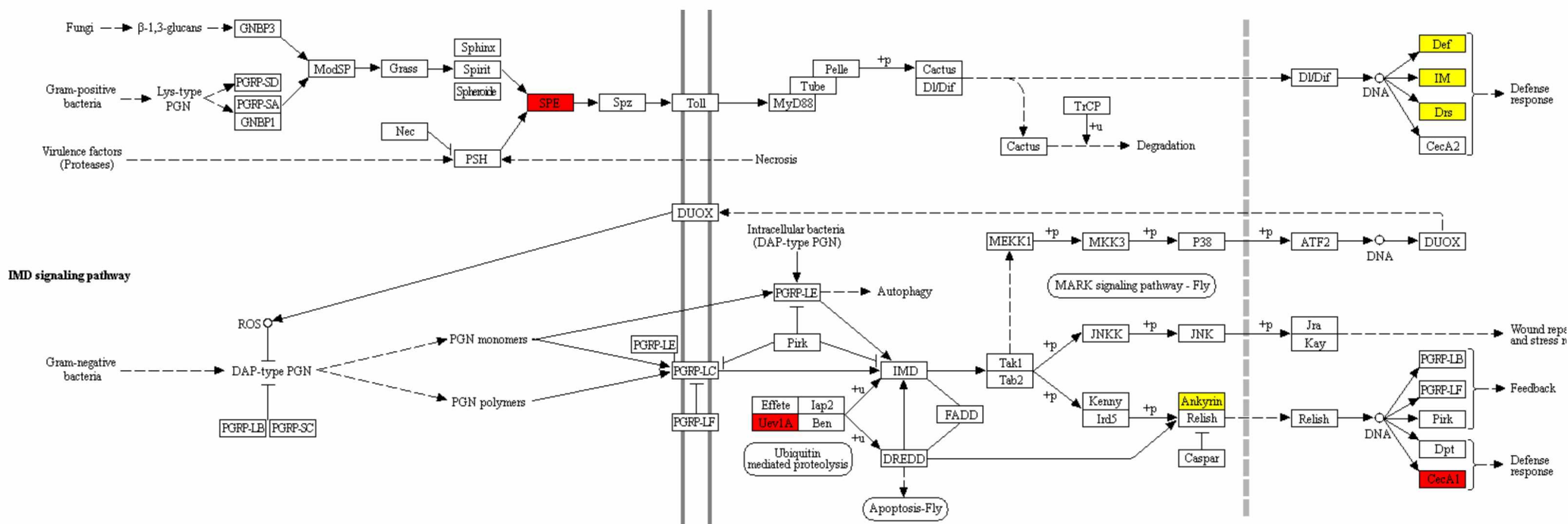
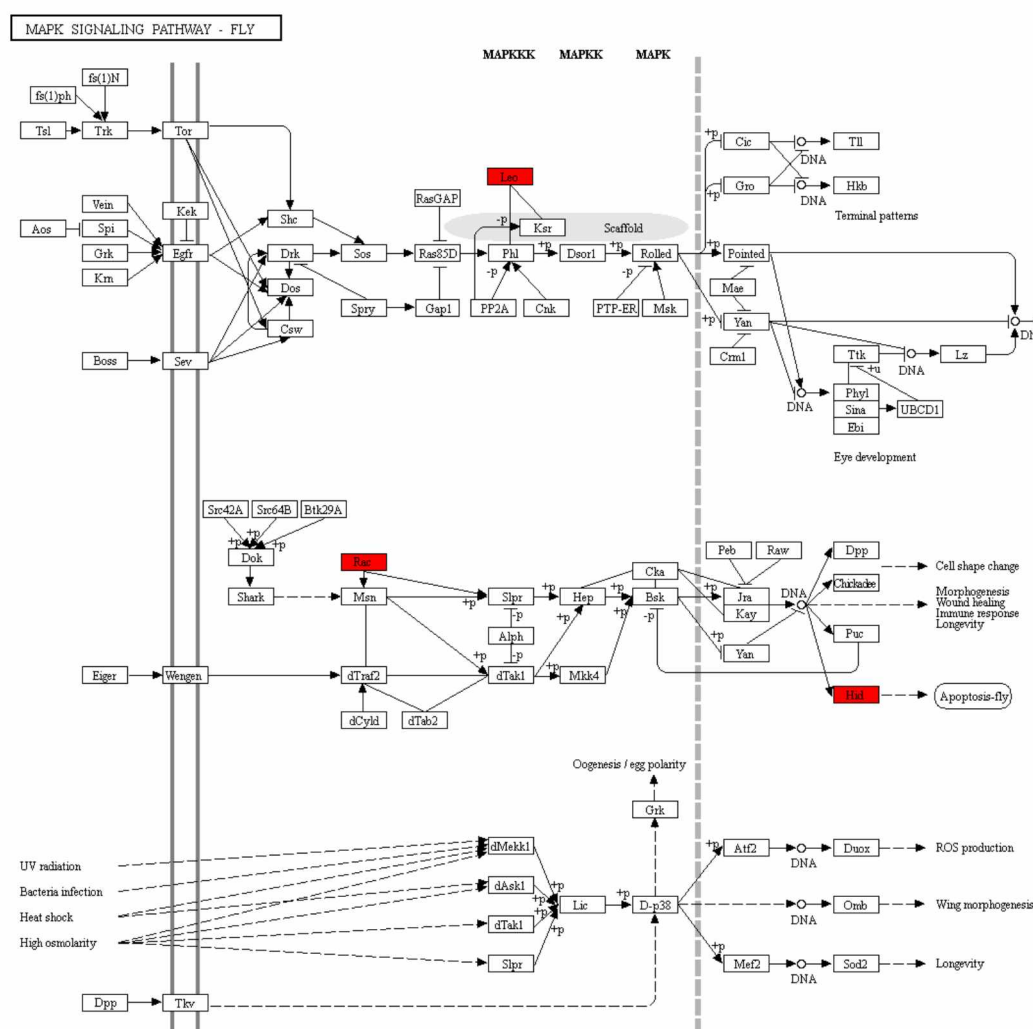


Fig. 11 - Via de sinalização Toll-IMD. Os genes com aumento de expressão são mostrados em vermelho e aqueles com redução de expressão em amarelo. FONTE: KEGG

Os genes da via de sinalização MAPK, *14-3-3zeta* e *Rac1*, tiveram aumento de transcrição enquanto o gene *pros* teve redução (Figura 12). Entre os genes da vida de interação com ligantes neuro-ativos ocorreu redução do *Dop2R*, do receptor de Dopamina, e aumento de *alfaTry* e *betaTry*.

Figura 12 – Via de sinalização MAPK



Via de sinalização MAPK mostrando os genes com aumento de expressão em vermelho e os genes com redução de expressão em amarelo. Fonte: KEGG

4.4. Análise de precursores de miRNA

A análise dos dados detectou a sequência de 255 precursores de miRNAs no alinhamento com o genoma de referência. A biblioteca de RNA foi construída apenas com RNA com calda poli-A. Por isso algumas formas mais estáveis de precursores de miRNA são detectadas no sequenciamento. O CLC utiliza na análise os dados do miRBase que apresenta as formas maduras do miRNA anotadas no precursor. Apesar de serem todos precursores elas podem aparecer com a denominação da forma madura 3' ou 5' por que essa foi a parte da sequência do transcrito que foi alinhada com o precursor.

A aplicação do teste EDGE para análise de transcrição diferencial mostra que o tratamento com citalopram modificou a transcrição de 12 precursores de miRNAs com diferença estatística ($p < 0,05$) como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2 –Precursores de miRNAs diferencialmente transcritos em relação ao controle após 3 semanas de tratamento com 1,25 e 5mM de citalopram.

Pri-miRNA	Grupo experimental	p-valor	FC
dme-mir-1	Controle x 1,25mM	0,008962505	-9,17
dme-mir-14	Controle x 1,25mM	0,015253041	5,46
dme-mir-31a	Controle x 1,25mM	0,027119053	-51,65
dme-mir-34-5p	1,25 x 5mM	0,031815408	2,07
dme-mir-124-3p	1,25 x 5mM	0,019351026	21,98
dme-mir-276a-3p	1,25 x 5mM	0,012763735	2,54
dme-mir-276a-5p	1,25 x 5mM	0,016965119	2,68
dme-mir-317	1,25 x 5mM	0,017780005	3,48
dme-mir-956	Controle x 1,25mM	0,00061533	96,25
dme-mir-957	Controle x 1,25mM	0,022279859	-5,99
dme-mir-4956	1,25 x 5mM	0,021762757	-3,04
dme-let-7-5p	1,25 x 5mM	0,011064552	-3,38

No grupo tratado com 1,25 mM de citalopram, 5 miRNAs tiveram sua transcrição alterada, sendo que dois apresentaram aumento (dme-mir-14 e dme-mir-956) e três com redução (dme-mir-1, dme-mir-31a e dme-mir-957).

Os miRNAs dme-mir-956 e dme-mir-31a apresentaram as maiores mudanças de transcrição no grupo tratado em relação ao controle com um *fold change* de 96,25 e -51,65, respectivamente. Comparando-se os grupo tratados com 1,25 e 5mM houve alteração de transcrição de 5 precursores de miRNAs, todos com aumento da transcrição (dme-mir-34, dme-mir-124, dme-mir-276a-3p, dme-mir-276a-5p e dme-mir-317). O aumento de transcrição mais significativo foi do dme-mir-124 (*fold change* 21,98). Os miRNAs dme-let-7 e dme-mir-4956 foram diferencialmente transcritos no grupo tratado com 5mM em comparação ao controle.

A análise de predição de alvos desses miRNAs usando Targetscanfly identificou uma lista de 796 genes que podem ser regulados por eles. Não foi encontrada nenhuma anotação de alvo relativo ao dme-mir-4956 no Targetscanfly. A predição de seus alvos a partir da sequência no DIANA-MR-microT sugeriu 8 possíveis alvos com *escore* > 0,9: tinc, CG14960, CG5807, CG33061, CG4483, alpha-Est9, Tcp e rictor. Devido ao grande número de genes optou-se nessa análise pelo estudo das vias metabólicas reguladas pelos miRNAs.

A avaliação das vias metabólicas anotadas na KEGG através do DIANA-mirPath v.3 mostrou que vários desses miRNAs regulam vias comuns. As vias de receptores de interação com a matriz extracelular e da O-glicosilação são as vias reguladas por mais miRNAs diferencialmente transcritos (Quadro 3).

Quadro 3 – Vias metabólicas reguladas pelos miRNAs diferencialmente transcritos (KEGG) preditas pelo DIANA-mirPath.

	dme-mir-1	dme-mir-14	dme-mir-31a	dme-mir-34	dme-mir-124-3p	dme-mir-276a-3p	dme-mir-276a-5p	dme-mir-317	dme-mir-956	dme-mir-957	Dme-mir-4956	Dme-let-7-5p
dme00130 - Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis									x			
Dme00260 - Glycine, serine and threonine metabolism												x
dme00310 - Lysine degradation										x		
dme00512 - Mucin type O-glycan biosynthesis	x	x	x		x					x		
dme00520 - Amino sugar and nucleotide sugar metabolism				x								
dme00531 - Glycosaminoglycan degradation								x				
dme00532 - Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate						x						
Dme00534 - Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin												x
dme00562 - Inositol phosphate metabolism										x		
dme00563 - Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis									x			
dme00564 - Glycerophospholipid metabolism									x			
dme00565 - Ether lipid metabolism								x	x		x	
dme00601 - Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series						x						
dme00603 - Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series								x				
dme00760 - Nicotinate and nicotinamide metabolism						x						
dme00920 - Sulfur metabolism								x				
dme00980 - Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450					x			x				
dme00981 - Insect hormone biosynthesis		x						x				
dme01040 - Biosynthesis of unsaturated fatty acids									x	x		
Dme02010 - ABC transporters											x	
Dme03013 - RNA transport								x				
Dme03040 - Spliceosome											x	
dme04013 - MAPK signaling pathway										x		
dme04070 - Phosphatidylinositol signaling system									x	x		
dme04080 - Neuroactive ligand-receptor interaction				x		x			x			
dme04144 - Endocytosis									x			
dme04145 - phagosome	x											
dme04310 - Wnt signaling pathway				x					x			
dme04320 - Dorso-ventral axis formation										x		x
dme04330 - Notch signaling pathway		x							x			
dme04341 - Hedgehog signaling pathway				x					x			
dme04350 - TGF-beta signaling pathway							x					
dme04391 - Hippo signaling pathway					x				x	x		
dme04512 - ECM-receptor interaction			x	x	x				x	x		
dme04711 - Circadian rhythm								x			x	
dme04745 - Phototransduction							x		x	x		

4.5. Genes Mitocondriais

O alinhamento dos transcritos também permitiu identificar alteração da transcrição de genes ligados a função mitocondrial. Dos genes diferencialmente transcritos 29 são genes mitocondriais. Desses, 26 tiveram aumento de transcrição nos grupos experimentais quando comparados com o controle sem tratamento e 3 tiveram redução da transcrição (*CG4692*, *ATPsyn-b*, *CG32230*). Os RNA transportadores representam 8 dos genes transcritos (*mt:tRNA:E*, *mt:tRNA:D*, *mt:tRNA:S:AGY*, *mt:tRNA:A*, *mt:tRNA:K*, *mt:tRNA:R*, *mt:tRNA:P* e *mt:tRNA:L:UUR*). Quatro subunidades da NADH-ubiquinona oxidoreductase (*mt:N2*, *mt:N4*, *mt:N5* e *mt:N6*) e quatro do citocromo c oxidase também tiveram aumento de transcrição (*mt:Col*, *mt:Coll* e *mt:Colll*, *CoVA*). Os genes *CG12262*, *CG7461* e *CG3902* codificam proteínas com função predita de acetil-CoA desidrogenase; os genes *CG4692* e *CG1746* codificam subunidades da ATP-sintase. Ainda tiveram significativo aumento de transcrição os genes *Hsp60*, que codifica uma proteína de choque térmico, e *Nmdmc*, que tem como produto uma enzima envolvida no metabolismo de folato.

Também foram identificados transcritos de 3 genes codificadores de proteínas ribossomais mitocondriais: *mRpL33*, *mRpS7*, com redução de expressão, e *mRpL1* com aumento de expressão.

4.6. Genes Ortólogos

Utilizando a base de dados DIOPT-DIST foram encontrados 79 genes diferencialmente expressos cujos ortólogos humanos estão envolvidos em transtornos mentais ou traços de comportamento de interesse clínico (Quadro 4).

As proteínas codificadas por esses genes estão, de acordo com busca na KEGG, envolvidas em processos semelhantes aos seus ortólogos em drosófila.

Quadro 4 – Genes ortólogos de genes humanos associados a transtornos mentais ou traços comportamentais. (Continua)

Gene	Ortólogo humano	Traço/Transtorno
14-3-3zeta	YWHAZ	TDAH e TC
AcCoAS	ACSM1	Esquizofrenia
AcsI	ACSL4	Retardo Mental
alpha-Est7	NLGN1, NLGN3, NLGN4X	Asperger, Depressão e Esquizofrenia
Ank2	ANK3	Autismo, TDAH, THB, esquizofrenia, Depressão
Argk	CKB	Esquizofrenia
arm	CTNNB1	Retardo mental
Arp1	ACTB	Habilidade da mão
ARY	AKR1D1	THB
CAH2	CA14	Esquizofrenia
Cam	CALML4	Depressão
CaMKI	CAMK1D	Anorexia
CG10077	DDX21	Depressão
CG10126	PSKH1	Esquizofrenia
CG10357	LIPC	Esquizofrenia e Alzheimer
CG10863	AKR1D1	THB
CG11236	DAO	Esquizofrenia
CG12116	SPR	Distonia
CG1213	SLC2A12	Esquizofrenia
CG12766	AKR1D1	THB
CG13077	CYB561D1	Depressão
CG13833	HSD17B13	Bulemia
CG2254	HSD17B11	Bulemia
CG31075	ALDH2	Sensibilidade aguda ao álcool
CG3164	ABCG1	Transtorno alimentar no THB
CG31689	ABCG1	Transtorno alimentar no THB
CG3739	PRSS16	Esquizofrenia
CG4335	TMLHE	Autismo
CG4500	ACSL6	Alzheimer
CG4757	NLGN1, NLGN3, NLGN4X	Síndrome de Asperger, Depressão e Esquizofrenia
CG4822	ABCG1	Transtorno alimentar no THB
CG4847	CTSH	THB
CG5724	UGT1A9	TDAH
CG5966	PNLIP	Raiva
CG6084	AKR1D1	THB
CG6277	LIPC	Esquizofrenia e Alzheimer
CG6484	SLC2A12, SLC2A13	Insônia, Esquizofrenia
CG7997	NAGA	Esquizofrenia
CG8343	MRC1	Comportamento agressivo em crianças
CG9399	MPC2	Esquizofrenia
CG9701	GBA3	TOC e Síndrome de Tourette
CG9769	EIF3F	Depressão

Cp1	CTSH	THB
Cyp313a1	CYP26B1	Esquizofrenia
DIP1	STAU1	Raiva
Dop2R	DRD2	Esquizofrenia
Ef1alpha48D	EEF1A2	Retardo Mental, encefalopatia epilética
Est-6	NLGN1, NLGN3, NLGN4X	Síndrome de Asperger, Depressão e Esquizofrenia
Est-Q	NLGN1, NLGN3, NLGN4X	Síndrome de Asperger, Depressão e Esquizofrenia
Fas1	POSTN	TOC e Síndrome de Tourette
Gbs-70E	PPP1R3B	Alzheimer
Hsp60	HSPD1	Esquizofrenia
IA-2	PTPRN2	THB, esquizofrenia
Idgf5	CHI3L1	Esquizofrenia
Jhedup	NLGN1, NLGN3, NLGN4X	Síndrome de Asperger, Depressão e Esquizofrenia
Jheh1	EPHX2	Esquizofrenia
Lk6	MKNK1	Esquizofrenia
mb1	MBNL2	risco para alcoolismo
mRpL33	MRPL33	Esquizofrenia
Msp300	SYNE1	THB
nAChRalpha7	CHRNA3	Esquizofrenia, Dependência de Nicotina
ninaC	MYO10, MYO15A	Esquizofrenia, Depressão
Nmdmc	MTHFD1L	Alzheimer
Npc2a	NPC2	Doença de Niemann-pick
Npc2h	NPC3	Doença de Niemann-pick
Rac1	RND1	THB
Rfabg	APOB	THB, T.Compulsão alimentar
Rheb	RRAS2	Alzheimer
RpL10	RPL10	Autismo
RpL18	RPL18	THB
RpS29	RPS29	TEPT
tobi	MGAM	Anorexia
TpnC25D	CALML4	Depressão
trp	TRPC4	TOC e Síndrome de Tourette
Tsp29Fb	TSPAN18	Esquizofrenia
Ugt35b	UGT1A9	TDAH
Ugt36Bc	UGT1A10	TDAH
Ugt86Dd	UGT1A11	TDAH
Yp1	LIPC	Esquizofrenia e Alzheimer

TDAH – transtorno de déficit de atenção e hiperatividade; THB – Transtorno de Humor Bipolar; TEPT – Transtorno de Estresse Pós-traumático; TOC – Transtorno Obsessivo Compulsivo

5. Discussão

5.1. RNA-seq e genes diferencialmente expressos

A realização de estudos de transcriptoma utilizando a metodologia de RNA-seq com sequenciamento de nova geração permite a análise dos elementos funcionais do genoma em ação durante processos de desenvolvimento, fisiológicos ou durante intervenções várias. Isso leva a um novo patamar na compreensão da dinâmica da expressão gênica e uma visão global de seu comportamento em diversas situações ou condições de interesse.

Nesse estudo o sequenciamento de nova geração foi a metodologia escolhida para observar as mudanças de expressão gênica ocorridas durante um tratamento crônico de 21 dias com citalopram, um antidepressivo representante da classe dos ISRS. Através de experimentos anteriormente publicados, já era conhecido que esses medicamentos teriam outras ações além do simples aumento da disponibilidade de serotonina e outros neurotransmissores nas vias neuronais de interesse para o tratamento dos transtornos de humor e ansiedade. Mas até o momento não havia disponível a descrição de uma visão ampla de sua ação na transcrição gênica geral, de quais vias metabólicas e processos orgânicos são afetados por essas drogas e de como são relacionados. Também não era conhecida a influência da dose da medicação sobre a transcrição desses genes.

A mosca de fruta, *Drosophila melanogaster*, foi escolhida como modelo pela facilidade de manipulação e manutenção, genoma conhecido e simples mas com semelhança significativa com o genoma humano. Muitos dos elementos do genoma da mosca de fruta são bem conservados no genoma humano permitindo a geração de hipóteses por comparação das vias metabólicas.

5.2. Proteínas ribossomais

A análise *in silico* dos genes diferencialmente transcritos, nas vias metabólicas em que participam, mostra um aumento de genes codificadores de proteínas ribossomais. Essas proteínas são componentes dos ribossomos, o complexo de ribonucleoproteínas responsável pela síntese de polipeptídeos. Nas células eucariotas são encontradas 79 diferentes proteínas ribossomais que tem poucos resíduos de aminoácidos comuns entre elas (DE LA CRUZ; KARBSTEIN; WOOLFORD, 2015). As proteínas ribossomais são altamente conservadas entre os seres vivos sendo que 34 delas estão presentes em todos os domínios de seres vivos (KOROBENIKOVA; GARBER; GONGADZE, 2012).

Nos neurônios, o crescimento e manutenção dos dendritos, essencial para a plasticidade sináptica, exige intensa síntese de proteínas e o recrutamento de ribossomos. Problemas na formação dos ribossomos levam a redução da conectividade neuronal, um dos elementos dos processos neurodegenerativos (SLOMNICKI et al., 2016). De fato um estudo avaliando função dos ribossomos no cérebro de pacientes portadores de transtorno cognitivo leve e Doença de Alzheimer mostrou que a disfunção dos ribossomos, com impacto sobre a síntese proteica, é um evento precoce nessas condições (DING, 2005).

A formação de conexões sinápticas aberrantes também é um fenômeno presente no autismo. Mutações na proteína RPL10, uma proteína altamente conservada nos animais, foi associada a alguns casos de autismo juntamente com mutações da neuroliginas (NLG3 e NLG4), o que resulta em redução da ramificação dendrítica dos neurônios piramidais do córtex de autistas (KLAUCK et al., 2006).

Utilizando camundongos com sintomas de ansiedade e depressão induzidos por estresse crônico observou-se redução da expressão de proteínas ribossomais no hipocampo. Entre os genes com redução de expressão naquele estudo estão a *rpl7* e *rpl39* que tiveram aumento de expressão com o uso de citalopram, além de *rpl36a*, *rps27a* e *rp4x* (SMAGIN

et al., 2016). Em células olfatórias de pacientes com esquizofrenia também foi observada redução da síntese de rpl27a e rpl32 (ENGLISH et al., 2015).

Além de sua função na constituição dos ribossomos, as proteínas ribossomais tem outras chamadas de funções extra-ribossomais (ZHOU et al., 2015). As proteínas ribossomais podem ter função importante na auto-avaliação da célula. Defeitos na formação dos ribossomos podem atrasar o ciclo celular ou iniciar apoptose (WARNER; MCINTOSH, 2009).

Outra função extra-ribossomal já descrita para as proteínas ribossomais é o reparo de DNA. A proteína S3, que teve aumento de expressão neste estudo, demonstrou ser capaz de reparar danos induzidos pelo estresse oxidativo, radiação ionizante e mitomicina no DNA de moscas de fruta (KELLEY et al., 2001; YACOUN et al., 1996). Em humanos também já foram encontradas evidências de que ela possa ter a mesma função por interagir com enzimas que fazem reparo de dano por estresse oxidativo por excisão de bases (HEGDE; WANG; DEUTSCH, 2004). Em modelo murino para Doença de Parkinson, a proteína S3 protegeu neurônios dopaminérgicos de danos por espécies reativas de oxigênio (AHN et al., 2013).

5.3. Vias de sinalização

Várias vias de sinalização importantes para o controle do desenvolvimento, sistema imune e resposta ao estresse tiveram genes com nível de transcrição modificado pelo tratamento com citalopram.

Uma das vias com maior número de representantes com expressão modificada pelo tratamento com citalopram foi a via de sinalização Toll-I μ md. A via Toll é essencial para a resposta imune inata de insetos e está evolutivamente muito bem conservada entre os vertebrados com uma grande variedade de receptores tipo-Toll (TLR). Além de sua função na defesa contra hospedeiros essa via está envolvida no desenvolvimento embrionário e pós-embrionário determinando o padrão dorso-ventral (LEULIER; LEMAITRE, 2008). Os TLR são também expressos no cérebro e regulam

processos ligados a plasticidade e desenvolvimento dos neurônios (OKUN; GRIFFIOEN; MATTSON, 2011).

Diversas evidências tem apontado a importância da via Toll em processos neurodegenerativos. A drosomicina, peptídeo antimicrobiano codificado pelo gene *Drs* (que com expressão reduzida em nosso experimento) está aumentada em modelo de doença neurodegenerativa semelhante à Doença de Huntington, Esclerose lateral amiotrófica e Demência Fronto-temporal. Nesse modelo o processo de autofagia parece funcionar como um regulador negativo dessa resposta inflamatória mediada por Toll reduzindo a sua toxicidade (SAMARAWEERA et al., 2013).

Em depressão é reconhecido a ocorrência de um processo inflamatório mediado por TLR e desencadeado por estresse (CHENG et al., 2016). Em pacientes deprimidos os níveis de TLR4 em células mononucleares está aumentado e sua redução ocorre após tratamento com os ISRS fluoxetina e citalopram (CHENG et al., 2016; HUNG et al., 2016). O TNFAIP3, um regulador negativo da via Toll é um potencial marcador de resposta ao tratamento (HUNG et al., 2017). A fluoxetina e o citalopram já mostraram efeitos anti-inflamatórios mesmo em modelo de Artrite reumatoide reduzindo a atividade de TLR4 e os níveis de citocinas (SACRE et al., 2010).

A via de sinalização MAPK, também afetada pelo tratamento com citalopram, é uma das mais conservadas nos eucariotos. Em todos os microorganismos multicelulares a organização básica da via MAPK é constante (SHILO, 2014). Essa via participa de processos ligados a mitose, metabolismo, motilidade, apoptose e diferenciação celular respondendo a citocinas, hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento e outros estímulos como estresse celular (CARGNELLO; ROUX, 2011; WIDMANN et al., 1999).

Um dos mais interessantes papéis da via MAPK é nos processos de consolidação da memória, tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Os componentes dessa via são altamente expressos em regiões relacionadas à formação e consolidação da memória. Sua importância estaria na sua capacidade de integrar sinais e amplificar a resposta através de sua cascata molecular ativando a expressão gênica necessária para

plasticidade sináptica e formação da memória de longa duração (IMPEY; OBRIETAN; STORM, 1999).

Um exemplo desse seu envolvimento é a formação da memória olfatória em drosófila. A proteína 14-3-3zeta, codificada pelo gene *leo*, participa da via de sinalização MAPK e Hippo, e é altamente expressa no Corpo de Cogumelo de *D.melanogaster*, região responsável pelo aprendizado e memória. A mutação com redução de expressão deste gene reduz significativamente a formação de memória olfativa (SKOULAKIS; DAVIS, 1996).

O gene *pros* ou *prospero*, com redução da expressão pelo citalopram, também é um componente da via MAPK. Ele é um fator de transcrição envolvido na diferenciação celular no sistema nervoso de *D.melanogaster*. É expresso em subgrupos de neuroblastos, precursores de neurônios sensoriais e da glia (DOE et al., 1991). A proteína Prospero interfere no destino das células tronco: na sua presença são ativados genes de diferenciação terminal para neuroblastos enquanto que na sua ausência elas apresentam marcadores de auto-renovação, se proliferam e não se diferenciam (CHOKSI et al., 2006).

A via Wnt também está relacionada a processos ligados a neuroplasticidade, desenvolvimento e diferenciação celular. Durante o desenvolvimento embrionário atua na determinação do destino celular, polaridade e migração celular. Especificamente no sistema nervoso regula a conectividade neuronal pelo remodelamento de axônios e dendritos, e a formação de sinapses. No adulto ela mantém sua atuação em mecanismos ligados ao desenvolvimento de circuitos neuronais e plasticidade (CIANI; SALINAS, 2005). Foi demonstrado, pelo estudo da junção neuromuscular em drosófilas, que a atividade de Wnt ocorre tanto na porção pré quanto pós-sináptica em resposta a atividade neural (ATAMAN et al., 2008).

O mecanismo pela qual a via Wnt atua nesse cenário está relacionado a sua capacidade de modular a dinâmica dos microtúbulos e adesão celular através das cateninas (PACKARD; MATHEW; BUDNIK, 2003). As beta-cateninas, como a proteína Armadillo codificada pelo gene *arm*, formam no núcleo um fator de transcrição que ativa genes ligados a organização do citoesqueleto dos neurônios (LOUREIRO; PEIFER, 1998).

Na ausência da sinalização Wnt, armadillo é fosforilada pela proteína GSK3 β e não exerce sua função (CIANI; SALINAS, 2005; PACKARD; MATHEW; BUDNIK, 2003). Outro fator capaz de reduzir a ação da via Wnt e impactar a plasticidade sináptica e a memória é o peptídeo β -amilóide, relacionado à Doença de Alzheimer. Esse peptídeo ativa a Dkk1 que antagoniza a via Wnt levando a perda de sinapses. A ativação de Wnt foi capaz de reverter, em camundongos, esse efeito e restaurar os mecanismos de plasticidade (MARZO et al., 2016; PURRO; GALLI; SALINAS, 2014).

Na via de sinalização mTor observamos redução significativa da transcrição do gene *Rheb* que codifica uma proteína ligante de GTP. A Rheb é um ativador dessa via de sinalização.

A via de sinalização mTor tem uma atuação complexa no metabolismo e homeostase dos organismos vivos. Ela funciona como um integrador de diversos estímulos ambientais e extra-celulares (da disponibilidade de nutrientes a fatores de crescimento celular), e de várias funções vitais, como síntese proteica, autofagia, metabolismo energético, transcrição e síntese de lipídeos (LIPTON; SAHIN, 2014; TAKEI; NAWA, 2014).

No desenvolvimento neural a ativação de mTor por Rheb leva a formação e prolongamento axonal (LI; WERNER; PÜSCHEL, 2008). Sua capacidade de induzir a sinaptogênese no córtex pré-frontal está relacionada à rápida resposta antidepressiva da quetamina que produz ativação da mTor pelo aumento de Rheb (DWYER; DUMAN, 2013; HARRAZ et al., 2016).

Apesar desse efeito sobre a formação de sinapses, sua inibição pode ser benéfica e fazer da mTor uma possível alvo terapêutico na Doença de Alzheimer e lesões medulares. Em diversos modelos animais a inibição de mTor produziu aumento de sobrevivência e já foi demonstrado que ela é uma das formas de indução de toxicidade pelo peptídeo β A na demência de Alzheimer (CACCAMO et al., 2011).

Nas lesões medulares astrócitos tendem a assumir uma forma reativa, migrar para o local da lesão e conduzir a formação de uma cicatriz glial que tem efeito negativo sobre a regeneração axonal. Essa ativação de astrócitos é induzida pela ativação de mTor com aumento de Rheb. Portanto, sua inibição pode ter um efeito terapêutico limitando a reatividade e

criando um ambiente mais favorável para a recuperação axonal (CODELUPPI et al., 2009).

Aparecendo como elemento de várias vias de sinalização, a Rac1 tem um curioso papel no desenvolvimento neuronal e na resposta ao estresse. Em drosófilas foi demonstrado que a proteínas Rac1 e Rac2 controlam moléculas ligadas à organização do citoesqueleto (HAKEDA-SUZUKI et al., 2002) e atuam no crescimento axonal em neurônios do Corpo de cogumelo (NG et al., 2002). Em roedores submetidos a estresse crônico e pacientes deprimidos ocorre redução de expressão e se relaciona aos sintomas depressivos, isolamento social e modificações sinápticas induzidas pelo estresse. O aumento da expressão de Rac1 no Núcleo Accumbens de camundongos reverteu os sintomas depressivos e as modificações histológicas (GOLDEN et al., 2013).

Entretanto foi demonstrado na mosca de fruta que o aumento de expressão de Rac1 acelera a perda de memória relacionada a condicionamento aversivo olfativo. O mecanismo de esquecimento das memórias mediado por Rac1 parece ser ativo e independente dos mecanismos de formação das memórias (SHUAI et al., 2010).

O processo de esquecimento pode ser interessante em alguns transtornos mentais como a depressão e os transtornos ligados ao trauma, diferente do que ocorre em doenças neurodegenerativas como as demências. O esquecimento de memórias que evocam culpa, vergonha, medo e raiva podem ser úteis na regulação afetiva (ANDERSON; HANSLMAYR, 2014). Alguns autores propõem estratégias de treinamento cognitivo para o esquecimento de palavras negativas como forma de manejo dos pensamentos negativos automáticos (JOORMANN et al., 2005, 2009).

No transtorno de estresse pós-traumático, ao contrário do que ocorre na maioria das pessoas, as memórias do trauma não se tornam menos intrusivos com o tempo em uma falha do controle inibitório das memórias aversivas, uma dificuldade de esquecer (CATARINO et al., 2015; COTTENCIN et al., 2006).

5.4. Precursores de miRNA

O envolvimento de miRNAs na depressão e como participantes da resposta aos antidepressivos tem sido reconhecida nos últimos anos. Sua capacidade de regular diversos alvos em redes metabólicas diferentes tornam os miRNAs importantes alvos de estudo e com possibilidade terapêutica. Eles tem papel em processos cerebrais como aprendizado, memória e sua disfunção está relacionada a doenças neurológicas e psiquiátricas (WANG; KWON; TSAI, 2012).

Um dos precursores de miRNAs com aumento de expressão, o pré-mir-14, tem importante envolvimento na regulação do metabolismo e da sobrevivência em *D.melanogaster* (BOEHM; SLACK, 2006). Esse miRNA, através da sua atuação no gene alvo *sugarbabe*, regula a secreção insulina pela células neuro-secretoras de insulina no cérebro (VARGHESE; LIM; COHEN, 2010). Ele também está envolvido no metabolismo de triacilglicerol e diacilglicerol, reduzindo seus níveis (XU et al., 2003).

Além da sua atuação no metabolismo energético, o mir-14 parece funcionar como um agente anti-apoptótico (KUMARSWAMY; CHANDNA, 2010). As larvas de drosófilas que não expressam esse miRNA são mais sensíveis a stress salino, um ativador da via MAPK. Nos indivíduos adultos o mir-14 inibe a síntese da proteína Drice, um importante efetor de morte celular (XU et al., 2003). A ação de mir-14 nos processos de morte celular parecer ser específica e distingue situações de stress e aquelas em que a apoptose é parte do processo de desenvolvimento. Através da regulação de ip3k2 o mir-14 atua na autofagia durante a apoptose da glândula salivar necessária ao desenvolvimento normal (NELSON; AMBROS; BAEHRECKE, 2014).

Mir-1 é um miRNA bem conservado em várias espécies, da *Drosophila* aos mamíferos e tem envolvimento importante no desenvolvimento muscular cardíaco e esquelético (KWON et al., 2005). Ele parece ter também um efeito pró-apoptótico na medida em que o aumento de sua expressão levou a maior sensibilidade ao stress oxidativo, danos celulares causados por privação de oxigênio e glicose, e induzido por oxido

nítrico (CHANG et al., 2016; LEE et al., 2015; XU et al., 2007). Estudos também demonstraram que o mir-1 é um regulador do BDNF e, estando aumentado na lesão de nervo periférico, provoca redução desse fator de crescimento neuronal (VARENDI et al., 2014; YI et al., 2016) .

Outro precursor de miRNA com diminuição de transcrição no experimento, o do mir-31a, é bem conservado também em humanos. A expressão de mir-31 parece estar relacionado a aumento de apoptose em células tumorais inclusive tornando células de tumores de próstata mais sensíveis a quimioterapia (BHATNAGAR et al., 2010; VALASTYAN; WEINBERG, 2010). Em tumores gástricos ele parece aumentar a apoptose e atenuar a migração celular (RUOMING et al., 2015). Sua redução é encontrada, junto com de outros miRNAs, durante o processo de crescimento e mudança estrutural da sinapse em resposta a atividade neural (NESLER et al., 2013). Em drosófila experimentos também demonstraram que a expressão de mir-31a em neurônios colinérgicos é importante para a formação da memória (BUSTO et al., 2015).

Nas moscas tratadas com 5mM de citalopram houve aumento diferencial de 5 precursores de miRNAs: mir-34, mir-124, mir-276a, mir-317. Em drosófilas, o mir-34 parece ser importante para a manutenção do cérebro durante o envelhecimento. A redução de sua expressão resulta em acelerada degeneração cerebral com vacuolização, acúmulo de proteínas com defeito de enovelamento e encurtamento do tempo de vida (LIU et al., 2012). Ele também está envolvido na resposta ao stress atuando na plasticidade neural na amígdala e nas alterações comportamentais e neuroquímicas envolvidas. A redução da sua expressão produz uma espécie de resiliência aos efeitos do stress (ANDOLINA et al., 2016). Por outro lado foi demonstrado que o mir-34c é capaz de reduzir a ansiedade por diminuir a responsividade do CRFR1 ao CRF interferindo na liberação de cortisol (HARAMATI et al., 2011).

Mir-124 é o miRNA mais abundante no cérebro. Tem um papel importante na diferenciação celular de neurônios e está envolvido em diversas doenças neurodegenerativas (SONNTAG; WOO; KRICHEVSKY, 2012). A redução da expressão desse miRNA leva a alterações da arborização dendrítica em cultura e da transmissão sináptica com redução da sobrevivência em drosófilas (JIANG et al., 2016; SUN et al., 2012; WANG et

al., 2014a). Em pacientes com Parkinson os níveis séricos de mir-124 estão reduzidos podendo servir como futuro marcador diagnóstico (LI et al., 2017). Na epilepsia seus níveis também estão reduzidos e é possível que tenha efeitos sobre a excitabilidade neuronal atuando como anticonvulsivante (WANG et al., 2016).

Em drosófilas modelo para Doença de Alzheimer, a expressão de mir-124 também está reduzida, juntamente com a do mir-276a (KONG; WU; YUAN, 2014). Este último é necessário para a adequada formação da memória olfatória por regular receptores de dopamina (DopR) no Corpo de Cogumelo (LI et al., 2013). Um dos alvos do mir-276a é o gene *tim*. O aumento de *tim* pela não expressão de mir-276a leva a alteração do ritmo circadiano (CHEN; ROSBASH, 2016). A relação de alterações no sistema circadiano e depressão está bem estabelecida (KRONFELD-SCHOR; EINAT, 2012). Em humanos polimorfismos do gene *tim* estão associados a depressão, fadiga e perturbação do sono (UTGE et al., 2010).

Considerando as vias metabólicas previstas como alvo da modulação desses miRNAs duas se destacam: a dos receptores de matriz extracelular e da biossíntese de O-glicano tipo mucina. Os glicanos são cadeias de monossacarídeos adicionados às proteínas em modificação pós traducional que modulam suas funções, alteram sua conformação e tem função de sinalização (MOREMEN; TIEMEYER; NAIRN, 2012). Eles estão envolvidos e são fundamentais em processos de desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso, crescimento de neuritos e mielinização (KLEENE; SCHACHNER, 2004).

Os receptores de matriz extracelular atuam na superfície das células e, além de guiar o estabelecimento de conexões neuronais conduzindo as projeções axonais e dendríticas, modulam a excitabilidade dos neurônios interferindo na eficácia da transmissão sináptica (KAZANTSEV et al., 2012; KERRISK; CINGOLANI; KOLESKE, 2014).

5.5. Genes mitocondriais

As mitocôndrias tem um papel importante não apenas na geração de energia para a célula na forma de ATP pela fosforilação oxidativa mas também em outros processos como a apoptose, metabolismo de aminoácidos, lipídeos e controle dos níveis de cálcio iônico (GUNTER et al., 2000; NICHOLLS, 2002). Ela possui um genoma próprio, circular e compacto, que codifica polipeptídeos, RNA ribossomais e RNA transportadores. Nos humanos, o genoma da mitocôndria tem 16.569 pares de bases, com muito poucas regiões não codificadores entre os genes (ANDERSON et al., 1981). Em *Drosophila melanogaster* o genoma tem aproximadamente 19.577 pares de bases (LEWIS; FARR; KAGUNI, 1995).

O envolvimento de disfunções mitocondriais em doenças, transtornos mentais, processos inflamatórios e envelhecimento tem sido reconhecido ao longo dos anos (GREEN; GALLUZZI; KROEMER, 2011; LIN; BEAL, 2006; SHAO et al., 2008).

Variantes de genes mitocondriais já foram associadas a esquizofrenia, depressão e transtorno bipolar (ROLLINS et al., 2009). Evidências de disfunção no metabolismo energético avaliada por ressonância magnética reforçam a teoria de que no transtorno bipolar a disfunção mitocondrial é um fator importante (STORK; RENSHAW, 2005).

Neste estudo um dos genes mitocondriais com nível de expressão modificado pelo tratamento foi o *Hsp60*. As proteínas mitocondriais HSP60 são uma família de proteínas de choque térmico, chaperonas, que auxiliam a conformação tridimensional dos políptídeos (KOZLOVA et al., 1997; MATTOO; GOLOUBINOFF, 2014).

As chaperonas são uma das mais conservadas famílias de proteínas nos seres vivos, podendo ser encontradas das plantas até os mamíferos (LI; SRIVASTAVA, 2004). Uma de suas funções é a resposta ao estresse permitindo que a células se adapte a mudanças do seu ambiente e sobreviva a condições desfavoráveis. Permitem que as células lidem com proteínas desnaturadas por estressores como o calor extremo e outras formas de estresse (JÄÄTTELÄ, 1999).

As chaperonas também estão envolvidas no processo de apoptose, funcionando como ponto regulador da morte celular programada. Algumas dessas proteínas tem funções anti-apoptóticas ou pró-apoptóticas (DIDELOT et al., 2006) . As proteínas da família HSP70 são anti-apoptóticas. Elas são capazes de inibir a ativação de caspases e impedir a depleção de ATP restaurando sua síntese na mitocôndria (JÄÄTTELÄ, 1999). Elas são capazes também de reduzir a ação de outros agentes tóxicos relacionados a doenças degenerativas. Em *D. melanogaster* modelo para Parkinson, a expressão de Hsp70 impediu a degeneração dos neurônios dopaminérgicos provocada pela alfa-sinucleína (AULUCK et al., 2002). Na Doença de Alzheimer a Hsp70 também ofereceu proteção contra os efeitos tóxicos do beta-amiloide (MAGRANÉ et al., 2004).

A Hsp60 tem uma função mais complexa que a Hsp70 nas vias relacionadas a apoptose. Ela pode ter tanto um papel pró-apoptótico quanto anti-apoptótico dependendo do compartimento celular onde se encontra (ARYA; MALLIK; LAKHOTIA, 2007). Na mitocôndria, a Hsp60 é capaz de provocar a maturação da procaspase 3, um importante efetor da cascata de apoptose (CHANDRA; CHOY; TANG, 2007). No citosol a Hsp60 pode se ligar a Bax, uma proteína efetora da apoptose, e ter ação anti-apoptose (GUPTA; KNOWLTON, 2005).

Deficiência ou mutações na Hsp60 podem ser incompatíveis com a vida. No sistema nervoso central de mamíferos, por exemplo, a Hsp60, em conjunto com a Hsp10, tem importante papel no processo de mielinização, no funcionamento dos neurônios e da glia. Mutações nessas proteínas estão relacionadas com neurodegeneração (BROSS; MAGNONI; BIE, 2012) .

A ação da Hsp60 como protetora contra estresse no sistema nervoso pode ser importante em doenças neurológicas em que a excitotoxicidade está presente, como na epilepsia. Tanto em humanos quanto em modelos murinos para epilepsia, os níveis de Hsp60 no plasma estão aumentados após uma crise convulsiva em resposta ao estresse gerado pelas crises convulsivas (GAMMAZZA et al., 2015).

O gene *Nmdmc*, também com aumento de transcrição nesse estudo, codifica a enzima mitocondrial metilenotetrahidrofolato desidrogenase ciclohidrolase NAD-dependente, parte da via do folato para

geração de glicina e unidades metil para a síntese de purinas. Ela está envolvida em processos de resposta ao estresse e ligados ao envelhecimento. O aumento de expressão do gene *Nmdmc* em drosófilas resulta em menor produção de espécies reativas de oxigênio e aumento do tempo de vida (YU et al., 2015). O tratamento com lítio, também em moscas de fruta, resulta em aumento da expressão do *Nmdmc* com efeitos neuroprotetores prevenindo a apoptose dos neurônios (KASUYA; KAAS; KITAMOTO, 2009).

5.6. Visão sistêmica da ação do citalopram

O desafio da Biologia de Sistemas é a análise do todo e das partes de um sistema orgânico dinâmico (KITANO, 2002). Sua abordagem é, por natureza, integrativa e busca dar sentido biológico ao conjunto dos dados descobertos, relacionando-os com aqueles já conhecidos, catalogados e armazenados em bases de dados oriundos de outras metodologias. Os dados produzidos pelos campos da genômica, transcriptômica, epigenômica, proteômica e mirnômica, por exemplo, são reunidos e integrados utilizando estratégias computacionais (WESTERHOFF; PALSSON, 2004).

Problemas em saúde são complexos. Envolvem não somente fatores intrínsecos aos organismos vivos mas também fatores ambientais. Existem obviamente mecanismos biológicos responsáveis por integrar esses fatores de forma a permitir aos organismos sobreviver e se adaptar aos seus ambientes. Disfunções podem ocorrer em qualquer desses níveis e afetar os demais.

O genoma não é o determinante final do destino dos organismos. A epigenética auxilia o material gênico a produzir a melhor resposta ao desafio que o ser vivo enfrenta durante sua vida. Essas ferramentas fazem da genética um processo dinâmico e em evolução dentro de cada célula. Fatores estressores, químicos, nutrientes, fármacos, toxinas, interação com outros organismos, radiação, alterações do comportamento e ambiente. Tudo isso é visto como uma informação que deve ser processada pelo

sistema orgânico, que altera sua organização e desencadeia uma resposta e adaptação (JAENISCH; BIRD, 2003).

A depressão, assim como outros transtornos mentais, é considerada uma condição complexa. A herdabilidade na depressão maior é de aproximadamente 40% (KENDLER et al., 2006), o que implica na existência de uma interação gene/ambiente importante (KRISHNAN; NESTLER, 2010). Assim, é válido pensar que, se os antidepressivos são capazes de trazer melhora aos pacientes com depressão, sua ação também deva ser sistêmica e multifatorial.

De fato as evidências demonstram a décadas que a ação dessas medicações é mais ampla que apenas alterar níveis de neurotransmissores em vias ligadas ao humor, conforme a hipótese das monoaminas. Tanto em modelos animais quanto em seres humanos existem evidências de ação dos antidepressivos em fatores neurotróficos, genes ligados a resposta ao estresse e inflamação, bem como sua alteração pela depressão.

Neste estudo o citalopram foi administrado a uma linhagem selvagem de *Drosophila melanogaster* com o objetivo de avaliar suas ações sobre a expressão gênica normal de forma a obter uma panorama amplo se sua ação.

Avaliando os genes diferencialmente transcritos, a modificação de seus níveis de transcrição em relação ao controle, as vias a que pertencem, os precursores de miRNAs e as vias que podem regular, podemos desenhar um quadro geral de ações do citalopram.

Foram moduladas vias importantes para os processos inflamatórios como a via Toll-IMD, diversas vias relacionadas a proliferação de axônios, plasticidade sináptica, resposta ao estresse (MAPK, mTor, e Wnt) e ciclo circadiano. O mesmo pode ser observado com o padrão de modificação de precursores de miRNAs com a redução de miRNAs pró-apoptóticos (mir-1 e mir-31) e aumento dos anti-apoptóticos (mir-14) e daqueles relacionados com resposta ao estresse e arborização dentrítica (mir-34 e mir-124).

O padrão de resposta ao citalopram observado neste estudo antagoniza os mecanismos relacionados à neurobiologia da depressão pela visão atual. Segundo esse modelo, estão em interação fatores inflamatórios,

estresse oxidativo com importante envolvimento mitocondrial e dano ao DNA, levando a um processo de apoptose de neurônios e micróglia em áreas cerebrais relacionadas ao humor e memória. O processo inflamatório pode ter origem no estresse psicológico, em condições como obesidade, diabetes e até mesmo resultado da interação com a microbiota intestinal (ANDERSON, 2017; DE MELO et al., 2017; TONG et al., 2017).

O citalopram demonstra produzir efeitos semelhantes aos já descritos para a fluoxetina, outro ISRS. A fluoxetina, um dos antidepressivos mais utilizados, demonstra ter também ações anti-inflamatórias, antioxidantes e modulador da cascata de apoptose (CAIAFFO et al., 2016). Estudo de transcrição gênica em camundongo com outra substância antidepressiva, a quetamina, mostrou modificações agudas em genes da via MAPK, IL-6 e sinalização ligada à insulina (FICEK et al., 2016).

A ação anti-inflamatória dos ISRS é independente do estado depressivo. O citalopram foi capaz de reduzir, nas doses utilizadas para tratamento de depressão, a expressão de receptores CD4, CCR5 e CXCR4 em macrófagos *ex vivo*, o que pode indicar sua utilidade como coadjuvante no tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (GREESON et al., 2016). Também reduziu os níveis de TNF-alfa em camundongos após administração de lipopolissacárides bacterianos (DONG et al., 2016).

O escitalopram, o s-enantiômero presente na mistura racêmica de citalopram, demonstrou normalizar marcadores de estresse oxidativo melhorando a função endotelial de camundongos (MATCHKOV et al., 2015). Ele também reduziu vias pró-apoptose em células do miocárdio de ratos após lesão isquêmica (WANG et al., 2014b).

Mesmo em cultura de células os antidepressivos foram capazes de manter células neuroprogenitoras e melhorar a eficácia da diferenciação de células tronco mesenquimais em precursores neurais (BORKOWSKA et al., 2015; SOUSA-FERREIRA et al., 2014)

6. Conclusão

O uso do sequenciamento de nova geração de RNA (RNA-seq) para estudo do transcriptoma de cabeça de *Drosophila melanogaster* tratada cronicamente com citalopram permitiu demonstrar modificações da expressão gênica que indicam uma ação anti-inflamatória, anti-apoptótica, estimuladora dos mecanismos de plasticidade sináptica e de resposta ao estresse mesmo em um modelo selvagem. Esses dados concordam com a ação demonstrada pelos antidepressivos na literatura, em sua maior parte gerada a partir de pacientes portadores de transtornos de humor ou de modelos animais de estresse e depressão. Demonstramos que diferenças de dose não resultaram em significativa mudança no padrão de transcrição dos genes.

Foi possível também avaliar a relação entre os genes diferencialmente transcritos, precursores de miRNAs e vias metabólicas em que participam. Demonstra que o RNA-seq é metodologia interessante para investigação de condições complexas quando a visão sistêmica é importante.

7. Bibliografia

ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 41–53, jan. 2006.

ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5461, p. 2185–2195, 24 mar. 2000.

AHN, E. H. et al. PEP-1-ribosomal protein S3 protects dopaminergic neurons in an MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 55, p. 36–45, fev. 2013.

ANDERSON, G. Linking the biological underpinnings of depression: Role of mitochondria interactions with melatonin, inflammation, sirtuins, tryptophan catabolites, DNA repair and oxidative and nitrosative stress, with consequences for classification and cognition. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 20 abr. 2017.

ANDERSON, M. C.; HANSLMAYR, S. Neural mechanisms of motivated forgetting. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 18, n. 6, p. 279–292, jun. 2014.

ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, n. 5806, p. 457–465, 9 abr. 1981.

ANDOLINA, D. et al. Effects of lack of microRNA-34 on the neural circuitry underlying the stress response and anxiety. **Neuropharmacology**, v. 107, p. 305–316, ago. 2016.

ANGELUCCI, F.; BRENE, S.; MATHÉ, A. A. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. **Molecular Psychiatry**, v. 10, n. 4, p. 345–352, abr. 2005.

ARYA, R.; MALLIK, M.; LAKHOTIA, S. C. Heat shock genes - integrating cell survival and death. **Journal of Biosciences**, v. 32, n. 3, p. 595–610, abr. 2007.

ASHLEY, E. A. Towards precision medicine. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 9, p. 507–522, 16 ago. 2016.

ATAMAN, B. et al. Rapid Activity-Dependent Modifications in Synaptic Structure and Function Require Bidirectional Wnt Signaling. **Neuron**, v. 57, n. 5, p. 705–718, mar. 2008.

AULUCK, P. K. et al. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 295, n. 5556, p. 865–868, 1 fev. 2002.

BENATTI, C. et al. Behavioural and transcriptional effects of escitalopram in the chronic escape deficit model of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 272, p. 121–130, out. 2014.

- BHATNAGAR, N. et al. Downregulation of miR-205 and miR-31 confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis in prostate cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 1, n. 12, p. e105, dez. 2010.
- BJÖRKHOLM, C.; MONTEGGIA, L. M. BDNF – a key transducer of antidepressant effects. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 72–79, mar. 2016.
- BOEHM, M.; SLACK, F. J. MicroRNA control of lifespan and metabolism. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 5, n. 8, p. 837–840, abr. 2006.
- BORKOWSKA, P. et al. Affect of antidepressants on the in vitro differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into neuronal cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 81–87, jun. 2015.
- BRANTON, D. et al. The potential and challenges of nanopore sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1146–1153, out. 2008.
- BROSS, P.; MAGNONI, R.; BIE, A. S. Molecular chaperone disorders: defective Hsp60 in neurodegeneration. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 22, p. 2491–2503, 2012.
- BUFALINO, C. et al. The role of immune genes in the association between depression and inflammation: A review of recent clinical studies. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 31, p. 31–47, jul. 2013.
- BURGESS, D. J. RNA: Putting transcriptomics in its place. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 6, p. 319–319, 7 maio 2015.
- BUSTO, G. U. et al. microRNAs That Promote or Inhibit Memory Formation in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 569–580, 1 jun. 2015.
- CACCAMO, A. et al. Naturally secreted amyloid-beta increases mammalian target of rapamycin (mTOR) activity via a PRAS40-mediated mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 8924–8932, 18 mar. 2011.
- CAIAFFO, V. et al. Anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant activity of fluoxetine. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 4, n. 3, p. e00231, jun. 2016.
- CAPRIOTTI, E. et al. Bioinformatics for personal genome interpretation. **Briefings in Bioinformatics**, v. 13, n. 4, p. 495–512, 1 jul. 2012.
- CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 1, p. 50–83, 1 mar. 2011.
- CASTRÉN, E. Is mood chemistry? **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 241–246, mar. 2005.

CATARINO, A. et al. Failing to forget: inhibitory-control deficits compromise memory suppression in posttraumatic stress disorder. **Psychological Science**, v. 26, n. 5, p. 604–616, maio 2015.

CHANDRA, D.; CHOY, G.; TANG, D. G. Cytosolic Accumulation of HSP60 during Apoptosis with or without Apparent Mitochondrial Release: EVIDENCE THAT ITS PRO-APOPTOTIC OR PRO-SURVIVAL FUNCTIONS INVOLVE DIFFERENTIAL INTERACTIONS WITH CASPASE-3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 43, p. 31289–31301, 6 set. 2007.

CHANG, C.-Y. et al. Roles of microRNA-1 in hypoxia-induced apoptotic insults to neuronal cells. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 191–202, jan. 2016.

CHEN, X.; ROSBASH, M. mir-276a strengthens *Drosophila* circadian rhythms by regulating timeless expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 21, p. E2965–2972, 24 maio 2016.

CHENG, Y. et al. Stress-induced neuroinflammation is mediated by GSK3-dependent TLR4 signaling that promotes susceptibility to depression-like behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 53, p. 207–222, mar. 2016.

CHOKSI, S. P. et al. Prospero Acts as a Binary Switch between Self-Renewal and Differentiation in *Drosophila* Neural Stem Cells. **Developmental Cell**, v. 11, n. 6, p. 775–789, dez. 2006.

CIANI, L.; SALINAS, P. C. Signalling in neural development: WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 5, p. 351–362, maio 2005.

CODELUPPI, S. et al. The Rheb-mTOR Pathway Is Upregulated in Reactive Astrocytes of the Injured Spinal Cord. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 4, p. 1093–1104, 28 jan. 2009.

COTTENCIN, O. et al. Directed forgetting in PTSD: A comparative study versus normal controls. **Journal of Psychiatric Research**, v. 40, n. 1, p. 70–80, fev. 2006.

CZÉH, B.; DI BENEDETTO, B. Antidepressants act directly on astrocytes: Evidences and functional consequences. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 3, p. 171–185, mar. 2013.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 46–56, jan. 2008.

DE FOUBERT, G. et al. Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. **Neuroscience**, v. 128, n. 3, p. 597–604, 2004.

- DE LA CRUZ, J.; KARBSTEIN, K.; WOOLFORD, J. L. Functions of Ribosomal Proteins in Assembly of Eukaryotic Ribosomes In Vivo. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 93–129, 2 jun. 2015.
- DE MELO, L. G. P. et al. Shared metabolic and immune-inflammatory, oxidative and nitrosative stress pathways in the metabolic syndrome and mood disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 21 abr. 2017.
- DESAI, A. N.; JERE, A. Next-generation sequencing: ready for the clinics? **Clinical Genetics**, v. 81, n. 6, p. 503–510, jun. 2012.
- DIAS, B. G. et al. Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 4, p. 553–563, set. 2003.
- DIDELOT, C. et al. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 172, p. 171–198, 2006.
- DING, Q. Ribosome Dysfunction Is an Early Event in Alzheimer's Disease. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 40, p. 9171–9175, 5 out. 2005.
- DOE, C. Q. et al. The prospero gene specifies cell fates in the Drosophila central nervous system. **Cell**, v. 65, n. 3, p. 451–464, 3 maio 1991.
- DONG, C. et al. Effects of escitalopram, R-citalopram, and reboxetine on serum levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-10, and depression-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 144, p. 7–12, maio 2016.
- DWYER, J. M.; DUMAN, R. S. Activation of Mammalian Target of Rapamycin and Synaptogenesis: Role in the Actions of Rapid-Acting Antidepressants. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1189–1198, jun. 2013.
- ENGLISH, J. A. et al. Reduced protein synthesis in schizophrenia patient-derived olfactory cells. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 10, p. e663, 20 out. 2015.
- FERNALD, G. H. et al. Bioinformatics challenges for personalized medicine. **Bioinformatics**, v. 27, n. 13, p. 1741–1748, 1 jul. 2011.
- FICEK, J. et al. Molecular profile of dissociative drug ketamine in relation to its rapid antidepressant action. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, dez. 2016.
- GAMMAZZA, A. M. et al. Hsp60 response in experimental and human temporal lobe epilepsy. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, ago. 2015.
- GAWAD, C.; KOH, W.; QUAKE, S. R. Single-cell genome sequencing: current state of the science. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 3, p. 175–188, 25 jan. 2016.

- GOLDEN, S. A. et al. Epigenetic regulation of RAC1 induces synaptic remodeling in stress disorders and depression. **Nature Medicine**, v. 19, n. 3, p. 337–344, 17 fev. 2013.
- GREEN, D. R.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. **Science (New York, N.Y.)**, v. 333, n. 6046, p. 1109–1112, 26 ago. 2011.
- GREESON, J. M. et al. The Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Citalopram Decreases Human Immunodeficiency Virus Receptor and Coreceptor Expression in Immune Cells. **Biological Psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 33–39, 1 jul. 2016.
- GROVES, J. O. Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 12, p. 1079–1088, dez. 2007.
- GUNTER, T. E. et al. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. **Cell Calcium**, v. 28, n. 5–6, p. 285–296, dez. 2000.
- GUPTA, S.; KNOWLTON, A. A. HSP60, Bax, apoptosis and the heart. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, n. 1, p. 51–58, mar. 2005.
- HAKEDA-SUZUKI, S. et al. Rac function and regulation during Drosophila development. **Nature**, v. 416, n. 6879, p. 438–442, 28 mar. 2002.
- HALES, K. G. et al. Genetics on the Fly: A Primer on the Drosophila Model System. **Genetics**, v. 201, n. 3, p. 815–842, 1 nov. 2015.
- HAMILTON, N. B.; ATTWELL, D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 227–238, abr. 2010.
- HARAMATI, S. et al. MicroRNA as repressors of stress-induced anxiety: the case of amygdalar miR-34. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 40, p. 14191–14203, 5 out. 2011.
- HARRAZ, M. M. et al. Antidepressant action of ketamine via mTOR is mediated by inhibition of nitric oxide synthase degradation. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 3, p. 313–319, mar. 2016.
- HEGDE, V.; WANG, M.; DEUTSCH, W. A. Human ribosomal protein S3 interacts with DNA base excision repair proteins hAPE/Ref-1 and hOGG1. **Biochemistry**, v. 43, n. 44, p. 14211–14217, 9 nov. 2004.
- HIEMKE, C.; HÄRTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 85, n. 1, p. 11–28, jan. 2000.
- HODGSON, K. et al. Transcriptomics and the mechanisms of antidepressant efficacy. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 105–112, jan. 2016.

HUNG, Y.-Y. et al. Antidepressants normalize elevated Toll-like receptor profile in major depressive disorder. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 9, p. 1707–1714, maio 2016.

HUNG, Y.-Y. et al. TNFAIP3, a negative regulator of the TLR signaling pathway, is a potential predictive biomarker of response to antidepressant treatment in major depressive disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 59, p. 265–272, jan. 2017.

IMPEY, S.; OBRIETAN, K.; STORM, D. R. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. **Neuron**, v. 23, n. 1, p. 11–14, maio 1999.

JÄÄTTELÄ, M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. **Annals of Medicine**, v. 31, n. 4, p. 261–271, ago. 1999.

JACKSON, G. R. Guide to Understanding Drosophila Models of Neurodegenerative Diseases. **PLoS Biology**, v. 6, n. 2, p. e53, 26 fev. 2008.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3s, p. 245–254, mar. 2003.

JENETT, A. et al. A GAL4-driver line resource for Drosophila neurobiology. **Cell Reports**, v. 2, n. 4, p. 991–1001, 25 out. 2012.

JENNINGS, B. H. Drosophila – a versatile model in biology & medicine. **Materials Today**, v. 14, n. 5, p. 190–195, maio 2011.

JIANG, D. et al. miR-124 promotes the neuronal differentiation of mouse inner ear neural stem cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, n. 5, p. 1367–1376, nov. 2016.

JOORMANN, J. et al. Remembering the Good, Forgetting the Bad: Intentional Forgetting of Emotional Material in Depression. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 114, n. 4, p. 640–648, 2005.

JOORMANN, J. et al. Training forgetting of negative material in depression. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 118, n. 1, p. 34–43, 2009.

KAREGE, F. et al. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. **Psychiatry Research**, v. 109, n. 2, p. 143–148, mar. 2002.

KASUYA, J.; KAAS, G.; KITAMOTO, T. Effects of lithium chloride on the gene expression profiles in Drosophila heads. **Neuroscience Research**, v. 64, n. 4, p. 413–420, ago. 2009.

KATZENBERGER, R. J. et al. A Drosophila model of closed head traumatic brain injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 44, p. E4152–E4159, 29 out. 2013.

- KAZANTSEV, V. et al. A Homeostatic Model of Neuronal Firing Governed by Feedback Signals from the Extracellular Matrix. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41646, 27 jul. 2012.
- KELLEY, M. R. et al. The *Drosophila* S3 multifunctional DNA repair/ribosomal protein protects Fanconi anemia cells against oxidative DNA damaging agents. **Mutation Research**, v. 485, n. 2, p. 107–119, 7 mar. 2001.
- KENDLER, K. S. et al. A Swedish national twin study of lifetime major depression. **The American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 1, p. 109–114, jan. 2006.
- KERRISK, M. E.; CINGOLANI, L. A.; KOLESKE, A. J. ECM receptors in neuronal structure, synaptic plasticity, and behavior. In: **Progress in Brain Research**. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 214p. 101–131.
- KHUNDAKAR, A. A.; ZETTERSTRÖM, T. S. C. Biphasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment explained by differential transcript regulation. **Brain Research**, v. 1106, n. 1, p. 12–20, 23 ago. 2006.
- KINGHORN, K. J. et al. A *Drosophila* Model of Neuronopathic Gaucher Disease Demonstrates Lysosomal-Autophagic Defects and Altered mTOR Signalling and Is Functionally Rescued by Rapamycin. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 46, p. 11654–11670, 16 nov. 2016.
- KITANO, H. Systems biology: a brief overview. **Science (New York, N.Y.)**, v. 295, n. 5560, p. 1662–1664, 1 mar. 2002.
- KLAUCK, S. M. et al. Mutations in the ribosomal protein gene RPL10 suggest a novel modulating disease mechanism for autism. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 12, p. 1073–1084, dez. 2006.
- KLEENE, R.; SCHACHNER, M. Glycans and neural cell interactions. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 195–208, mar. 2004.
- KOHLER, R. E. **Lords of the fly: Drosophila genetics and the experimental life**. Chicago: University of Chicago Press, 1994.
- KONG, Y.; WU, J.; YUAN, L. MicroRNA expression analysis of adult-onset *Drosophila* Alzheimer's disease model. **Current Alzheimer Research**, v. 11, n. 9, p. 882–891, 2014.
- KOROBENIKOVA, A. V.; GARBER, M. B.; GONGADZE, G. M. Ribosomal proteins: Structure, function, and evolution. **Biochemistry (Moscow)**, v. 77, n. 6, p. 562–574, jun. 2012.
- KOZLOVA, T. et al. The *Drosophila melanogaster* homologue of the hsp60 gene is encoded by the essential locus l(1)10Ac and is differentially expressed during fly development. **Development Genes and Evolution**, v. 207, n. 4, p. 253–263, out. 1997.

- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. **The American Journal of Psychiatry**, v. 167, n. 11, p. 1305–1320, nov. 2010.
- KRONFELD-SCHOR, N.; EINAT, H. Circadian rhythms and depression: Human psychopathology and animal models. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 101–114, jan. 2012.
- KUMARSWAMY, R.; CHANDNA, S. Inhibition of microRNA-14 contributes to actinomycin-D-induced apoptosis in the Sf9 insect cell line. **Cell Biology International**, v. 34, n. 8, p. 851–857, ago. 2010.
- KWON, C. et al. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in Drosophila and regulates Notch signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 52, p. 18986–18991, 27 dez. 2005.
- LEE, Y.-E. et al. MicroRNA-1 participates in nitric oxide-induced apoptotic insults to MC3T3-E1 cells by targeting heat-shock protein-70. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 3, p. 246–255, 2015.
- LEULIER, F.; LEMAITRE, B. Toll-like receptors — taking an evolutionary approach. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 3, p. 165–178, mar. 2008.
- LEWIS, D. L.; FARR, C. L.; KAGUNI, L. S. Drosophila melanogaster mitochondrial DNA: completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons. **Insect Molecular Biology**, v. 4, n. 4, p. 263–278, nov. 1995.
- LI, N. et al. Plasma levels of miR-137 and miR-124 are associated with Parkinson's disease but not with Parkinson's disease with depression. **Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, 8 fev. 2017.
- LI, W. et al. MicroRNA-276a Functions in Ellipsoid Body and Mushroom Body Neurons for Naive and Conditioned Olfactory Avoidance in Drosophila. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 13, p. 5821–5833, 27 mar. 2013.
- LI, Y.-H.; WERNER, H.; PÜSCHEL, A. W. Rheb and mTOR regulate neuronal polarity through Rap1B. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 48, p. 33784–33792, 28 nov. 2008.
- LI, Z.; SRIVASTAVA, P. Heat-shock proteins. **Current Protocols in Immunology**, v. Appendix 1, p. Appendix 1T, fev. 2004.
- LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 787–795, 19 out. 2006.
- LINDBLOM, A.; ROBINSON, P. N. Bioinformatics for human genetics: promises and challenges. **Human Mutation**, v. 32, n. 5, p. 495–500, maio 2011.
- LIPTON, J. O.; SAHIN, M. The Neurology of mTOR. **Neuron**, v. 84, n. 2, p. 275–291, out. 2014.

- LIU, N. et al. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*. **Nature**, v. 482, n. 7386, p. 519–523, 15 fev. 2012.
- LOHMANN, K.; KLEIN, C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 11, n. 4, p. 699–707, out. 2014.
- LOPEZ-MUNOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic Neurotransmission: The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 14, p. 1563–1586, 1 maio 2009.
- LOUREIRO, J.; PEIFER, M. Roles of Armadillo, a *Drosophila* catenin, during central nervous system development. **Current Biology**, v. 8, n. 11, p. 622–633, maio 1998.
- LUPPINO, F. S. et al. Overweight, Obesity, and Depression: A Systematic Review and Meta-analysis of Longitudinal Studies. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 3, p. 220, 1 mar. 2010.
- MAGRANÉ, J. et al. Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 7, p. 1700–1706, 18 fev. 2004.
- MARZO, A. et al. Reversal of Synapse Degeneration by Restoring Wnt Signaling in the Adult Hippocampus. **Current biology: CB**, v. 26, n. 19, p. 2551–2561, 10 out. 2016.
- MATCHKOV, V. V. et al. Chronic selective serotonin reuptake inhibition modulates endothelial dysfunction and oxidative state in rat chronic mild stress model of depression. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 8, p. R814-823, 15 out. 2015.
- MATTOO, R. U. H.; GOLOUBINOFF, P. Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 71, n. 17, p. 3311–3325, set. 2014.
- MCNALLY, L.; BHAGWAGAR, Z.; HANNESTAD, J. Inflammation, Glutamate, and Glia in Depression: A Literature Review. **CNS Spectrums**, v. 13, n. 6, p. 501–510, jun. 2008.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, jan. 2010.
- MILES, W. O.; DYSON, N. J.; WALKER, J. A. Modeling tumor invasion and metastasis in *Drosophila*. **Disease Models & Mechanisms**, v. 4, n. 6, p. 753–761, 1 nov. 2011.

- MISTRY, R.; KOUNATIDIS, I.; LIGOXYGAKIS, P. Exploring interactions between pathogens and the Drosophila gut. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 64, p. 3–10, nov. 2016.
- MONTAG, C. et al. The BDNF Val66Met polymorphism impacts parahippocampal and amygdala volume in healthy humans: incremental support for a genetic risk factor for depression. **Psychological Medicine**, v. 39, n. 11, p. 1831, nov. 2009.
- MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 7, p. 448–462, 22 jun. 2012.
- NELSON, C.; AMBROS, V.; BAEHRECKE, E. H. miR-14 regulates autophagy during developmental cell death by targeting ip3-kinase 2. **Molecular Cell**, v. 56, n. 3, p. 376–388, 6 nov. 2014.
- NESLER, K. R. et al. The miRNA Pathway Controls Rapid Changes in Activity-Dependent Synaptic Structure at the Drosophila melanogaster Neuromuscular Junction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68385, 2 jul. 2013.
- NG, J. et al. Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. **Nature**, v. 416, n. 6879, p. 442–447, 28 mar. 2002.
- NICHOLLS, D. G. Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 11, p. 1372–1381, nov. 2002.
- OKUN, E.; GRIFFIOEN, K. J.; MATTSON, M. P. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 5, p. 269–281, maio 2011.
- OSHIRO, C. et al. PharmGKB very important pharmacogene: SLC01B1. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 20, n. 3, p. 211–216, mar. 2010.
- OWEN, R. P. et al. VKORC1 Pharmacogenomics Summary: **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 20, n. 10, p. 642–644, out. 2010.
- OZAN, E. et al. The effect of depression, BDNF gene val66met polymorphism and gender on serum BDNF levels. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 1, p. 61–65, jan. 2010.
- PACKARD, M.; MATHEW, D.; BUDNIK, V. Wnts and TGF β in synaptogenesis: old friends signalling at new places. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 113–120, fev. 2003.
- PALAZZO, A. F.; LEE, E. S. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 2, 2015.
- PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human Disease Models in Drosophila melanogaster and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 411–436, 1 jun. 2011.

PASINI, M. E.; BERTOLOTTO, F.; FASANO, P. The role of models in science: an experience with *Drosophila*. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 2, n. 2, p. 1164–1168, 2010.

PIZARRO, J. M. et al. Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice. **Brain Research**, v. 1025, n. 1–2, p. 10–20, 29 out. 2004.

POLYAKOVA, M. et al. BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: A systematic & quantitative meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, v. 174, p. 432–440, mar. 2015.

PRÜßING, K.; VOIGT, A.; SCHULZ, J. B. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 8, n. 1, p. 35, 2013.

PURRO, S. A.; GALLI, S.; SALINAS, P. C. Dysfunction of Wnt signaling and synaptic disassembly in neurodegenerative diseases. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 1, p. 75–80, fev. 2014.

RECZKO, M. et al. Functional microRNA targets in protein coding sequences. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 28, n. 6, p. 771–776, 15 mar. 2012.

REITER, L. T. et al. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. **Genome Research**, v. 11, n. 6, p. 1114–1125, jun. 2001.

ROBINSON, M. D.; SMYTH, G. K. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. **Biostatistics (Oxford, England)**, v. 9, n. 2, p. 321–332, abr. 2008.

ROCERI, M. et al. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 708–714, 1 abr. 2004.

ROLLINS, B. et al. Mitochondrial Variants in Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Major Depressive Disorder. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, p. e4913, 17 mar. 2009.

RUOMING, W. et al. Tumor suppressor microRNA-31 inhibits gastric carcinogenesis by targeting Smad4 and SGPP2. **Cancer Gene Therapy**, v. 22, n. 12, p. 564–572, dez. 2015.

RUSSO, G.; ZEGAR, C.; GIORDANO, A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. **Oncogene**, v. 22, n. 42, p. 6497–6507, 29 set. 2003.

SACRE, S. et al. Fluoxetine and citalopram exhibit potent antiinflammatory activity in human and murine models of rheumatoid arthritis and inhibit toll-like receptors. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 3, p. 683–693, 25 fev. 2010.

SALADORES, P. et al. Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 15, n. 1, p. 84–94, fev. 2015.

SAMARAWEERA, S. E. et al. Distinct roles for Toll and autophagy pathways in double-stranded RNA toxicity in a *Drosophila* model of expanded repeat neurodegenerative diseases. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 14, p. 2811–2819, 15 jul. 2013.

SANACORA, G.; BANASR, M. From Pathophysiology to Novel Antidepressant Drugs: Glial Contributions to the Pathology and Treatment of Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1172–1179, jun. 2013.

SANTARELLI, L. Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805–809, 8 ago. 2003.

SCHILDKRAUT, J. J. THE CATECHOLAMINE HYPOTHESIS OF AFFECTIVE DISORDERS: A REVIEW OF SUPPORTING EVIDENCE. **American Journal of Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509–522, nov. 1965.

SEIFERT, G.; SCHILLING, K.; STEINHÄUSER, C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 194–206, mar. 2006.

SHAO, L. et al. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. **Annals of Medicine**, v. 40, n. 4, p. 281–295, jan. 2008.

SHILO, B.-Z. The regulation and functions of MAPK pathways in *Drosophila*. **Methods**, v. 68, n. 1, p. 151–159, jun. 2014.

SHUAI, Y. et al. Forgetting Is Regulated through Rac Activity in *Drosophila*. **Cell**, v. 140, n. 4, p. 579–589, fev. 2010.

SKOULAKIS, E. M.; DAVIS, R. L. Olfactory learning deficits in mutants for leonardo, a *Drosophila* gene encoding a 14-3-3 protein. **Neuron**, v. 17, n. 5, p. 931–944, nov. 1996.

SLOMNICKI, L. P. et al. Requirement of Neuronal Ribosome Synthesis for Growth and Maintenance of the Dendritic Tree. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 11, p. 5721–5739, 11 mar. 2016.

SMAGIN, D. A. et al. Dysfunction in Ribosomal Gene Expression in the Hypothalamus and Hippocampus following Chronic Social Defeat Stress in Male Mice as Revealed by RNA-Seq. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 3289187, 2016.

SONNTAG, K. C.; WOO, T.-U. W.; KRICHEVSKY, A. M. Converging miRNA functions in diverse brain disorders: a case for miR-124 and miR-126. **Experimental Neurology**, v. 235, n. 2, p. 427–435, jun. 2012.

- SOUSA-FERREIRA, L. et al. Fluoxetine Induces Proliferation and Inhibits Differentiation of Hypothalamic Neuroprogenitor Cells In Vitro. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e88917, 5 mar. 2014.
- STAHL, S. M. Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. **Journal of Affective Disorders**, v. 51, n. 3, p. 215–235, dez. 1998.
- STEWART, J. C. et al. A prospective evaluation of the directionality of the depression–inflammation relationship. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 7, p. 936–944, out. 2009.
- STORK, C.; RENSHAW, P. F. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. **Molecular Psychiatry**, v. 10, n. 10, p. 900–919, out. 2005.
- SUN, K. et al. Neurophysiological Defects and Neuronal Gene Deregulation in Drosophila mir-124 Mutants. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 2, p. e1002515, 9 fev. 2012.
- TAKEI, N.; NAWA, H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 7, 23 abr. 2014.
- TONG, L. et al. Microglia Loss Contributes to the Development of Major Depression Induced by Different Types of Chronic Stresses. **Neurochemical Research**, 22 abr. 2017.
- TYNAN, R. J. et al. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 3, p. 469–479, mar. 2012.
- UEYAMA, T. et al. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. **Neuroscience Research**, v. 28, n. 2, p. 103–110, jun. 1997.
- UTGE, S. J. et al. Systematic Analysis of Circadian Genes in a Population-Based Sample Reveals Association of TIMELESS with Depression and Sleep Disturbance. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9259, 18 fev. 2010.
- VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. miR-31: a crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 9, n. 11, p. 2124–2129, 1 jun. 2010.
- VARENDI, K. et al. miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 71, n. 22, p. 4443–4456, nov. 2014.
- VARGHESE, J.; LIM, S. F.; COHEN, S. M. Drosophila miR-14 regulates insulin production and metabolism through its target, sugarbabe. **Genes & Development**, v. 24, n. 24, p. 2748–2753, 15 dez. 2010.

VLACHOS, I. S. et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W460–W466, 1 jul. 2015.

WANG, C. et al. miR-124 controls Drosophila behavior and is required for neural development. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 38, p. 105–112, nov. 2014a.

WANG, W. et al. The microRNA miR-124 suppresses seizure activity and regulates CREB1 activity. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 18, p. e4, 21 mar. 2016.

WANG, W.; KWON, E. J.; TSAI, L.-H. MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. **Learning & Memory**, v. 19, n. 9, p. 359–368, 16 ago. 2012.

WANG, Y. et al. The effects of escitalopram on myocardial apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 during myocardial ischemia/reperfusion in a model of rats with depression. **BMC psychiatry**, v. 14, p. 349, 4 dez. 2014b.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, jan. 2009.

WARNER, J. R.; MCINTOSH, K. B. How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins? **Molecular Cell**, v. 34, n. 1, p. 3–11, abr. 2009.

WEST, G. B. The importance of quantitative systemic thinking in medicine. **Lancet (London, England)**, v. 379, n. 9825, p. 1551–1559, 21 abr. 2012.

WESTERHOFF, H. V.; PALSSON, B. O. The evolution of molecular biology into systems biology. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1249–1252, out. 2004.

WESTERMANN, A. J.; GORSKI, S. A.; VOGEL, J. Dual RNA-seq of pathogen and host. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 618–630, 14 ago. 2012.

WHALLEY, K. Circadian rhythms: Astrocytes keep time. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 5, p. 264–264, 31 mar. 2017.

WIDMANN, C. et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 1, p. 143–180, jan. 1999.

WONG, M.-L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 343–351, maio 2001.

XU, C. et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 17, p. 3045–3052, 7 ago. 2007.

- XU, P. et al. The Drosophila MicroRNA Mir-14 Suppresses Cell Death and Is Required for Normal Fat Metabolism. **Current Biology**, v. 13, n. 9, p. 790–795, abr. 2003.
- YACOUB, A. et al. A Drosophila ribosomal protein contains 8-oxoguanine and abasic site DNA repair activities. **The EMBO journal**, v. 15, n. 9, p. 2306–2312, 1 maio 1996.
- YATES, D. Glia: An astrocytic influence. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 4–4, 15 dez. 2016.
- YI, S. et al. Regulation of Schwann cell proliferation and migration by miR-1 targeting brain-derived neurotrophic factor after peripheral nerve injury. **Scientific Reports**, v. 6, p. 29121, 6 jul. 2016.
- YOU, L. Toward computational systems biology. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 40, n. 2, p. 167–184, 2004.
- YU, S. et al. Nmdmc overexpression extends Drosophila lifespan and reduces levels of mitochondrial reactive oxygen species. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 465, n. 4, p. 845–850, 2 out. 2015.
- YUSTE, R. From the neuron doctrine to neural networks. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 487–497, ago. 2015.
- ZHOU, X. et al. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 92–104, 1 abr. 2015.