Alessandra Satie Ofuchi

**Administração prolongada do ácido 13-*cis*-retinóico (isotretinoína)
em camundongos machos adolescentes: comportamentos
emocionais e quantificação de transcritos de componentes do
sistema serotoninérgico central**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

Alessandra Satie Ofuchi

**Administração prolongada do ácido 13-*cis*-retinóico (isotretinoína)
em camundongos machos adolescentes: comportamentos
emocionais e quantificação de transcritos de componentes do
sistema serotoninérgico central**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Chiavegatto

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ofuchi, Alessandra Satie.

Administração prolongada do ácido 13-*cis*-retinóico (isotretinoína) em camundongos machos adolescentes: comportamentos emocionais e quantificação de transcritos de componentes do sistema serotoninérgico central / Alessandra Satie Ofuchi. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Silvana Chiavegatto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Neurociências.

Versão do título para o inglês: Chronic administration of 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin) in young male mice: emotion-related behaviors and quantification of central serotonergic system transcripts.

Descritores: 1. Retinóides 2. Serotonina 3. Expressão gênica 4. Depressão 5. Comportamento animal 6. Receptores I. Chiavegatto, Silvana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0191/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alessandra Satie Ofuchi.

Título da Dissertação: Administração prolongada do ácido 13-*cis*-retinóico
(isotretinoína) em camundongos machos adolescentes:
transcritos comportamentos emocionais e quantificação de
de componentes do sistema serotoninérgico central.

Orientador(a): Silvana Chiavegatto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **134** nas fls. **64** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Silvana Chiavegatto, Coordenador(a) da Linha de pesquisa ***"Efeitos da administração prolongada do ácido 13 cis-retinóico (isotretinoína) em camundongos machos adolescentes sobre comportamentos emocionais e transcrição gênica cerebral de receptores serotoninérgicos"*** do qual participou(aram) o(s) alunos ***Alessandra Satie Ofuchi*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA) em **15.12.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de dezembro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA – ICB/USP

Aos meus pais, familiares e amigos pelo
incentivo e apoio constante para a minha
formação.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Profa. Dra. Silvana Chiavegatto pela dedicação e paciência durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Rosana Camarini, Profa. Dra. Luciana Haddad e Profa. Dra. Helena Brentani por todos os conselhos dados no momento da qualificação.

À Rosangela e à Andrea pela atenção e paciência em me ensinar técnicas de biologia molecular para o desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. José Eduardo Krieger pela disponibilização de toda infraestrutura do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, onde foi realizada uma etapa do presente estudo.

Ao Luiz Roberto M. Mundel e José Carlos da Silva Santos, por todo o auxílio na manutenção do biotério.

À Profa. Dra. Hiro Goto (IMT), chefe do Biotério de Experimentação.

Aos meus pais, Keiji e Helena, e ao meu irmão, André, pelo carinho e apoio em todos os momentos do desenvolvimento do estudo.

Ao meu namorado Helcio pelo companheirismo em todos os momentos.

À Suelen pela amizade e por tornar-se minha nova família em São Paulo.

Aos amigos de laboratório Natália, Maria Cristina, Camila, Anne e Janaína pelo apoio e amizade durante a realização deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa de mestrado e apoio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Ofuchi AS. Administração prolongada do ácido 13-*cis*-retinóico (isotretinoína) em camundongos machos adolescentes: comportamentos emocionais e quantificação de transcritos de componentes do sistema serotoninérgico central [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

O ácido 13-*cis*-retinóico (13-*cis*-RA, isotretinoína) é um retinóide sintético de uso oral prolongado, prescrito em altas doses, para o tratamento da acne. Age primariamente diminuindo a atividade da glândula sebácea e reduzindo a inflamação. Desde a aprovação do uso do 13-*cis*-RA, tem-se relatos na literatura de sintomas psiquiátricos incluindo depressão, idealização de suicídio e psicoses. Estudos comportamentais utilizando modelos animais indicam possível associação com distúrbios cognitivos e depressão, entretanto as investigações tanto em humanos, como em animais ainda são controversas. Como os componentes da via do ácido retinóico possuem uma ampla distribuição no SNC e a participação do sistema serotoninérgico na modulação de comportamentos emocionais já é bem estabelecida, investigamos uma possível relação entre estes sistemas. Camundongos machos adolescentes da linhagem C57BL/6 receberam injeções intraperitoneais diárias, de 1mg/kg do 13-*cis*-RA ou veículo, durante 42 dias. Diferentes grupos foram utilizados para a análise comportamental e para quantificação de genes relacionados à via serotoninérgica, utilizando a metodologia de transcrição reversa do RNAm, associada à técnica de PCR em tempo real. Os camundongos tratados com 13-*cis*-RA apresentaram uma redução na atividade locomotora nos quadrantes periféricos, mas não centrais do campo-aberto (CA). Esta redução na atividade locomotora não foi observada no labirinto em cruz elevado (LCE), no qual os animais movimentaram-se de forma semelhante. O comportamento relacionado à ansiedade verificada através da locomoção central no CA e exploração dos braços abertos no LCE, não diferiu entre os grupos. Já o aparecimento de um comportamento relacionado à depressão foi evidenciado no nado-forçado (NF), através do aumento no tempo de imobilidade. De forma concordante, outro parâmetro da depressão, a anedonia (independente da atividade motora), foi avaliada no teste de preferência por sacarose (PPS), no qual observamos uma redução. Assim, a redução da atividade locomotora evidenciada no CA, juntamente com o aumento da imobilidade no NF e o aparecimento de um

comportamento relacionado à anedonia no PPS, sugerem a existência de um efeito pró-depressivo do fármaco. Adicionalmente, a análise do comportamento pró-depressivo no NF, 20 dias após interrupção do tratamento com 13-*cis*-RA, sugeriu reversão deste quadro. O mesencéfalo é uma área importante na modulação do sistema serotoninérgico devido à presença da maquinaria responsável pela sua retroalimentação. Nesta região verificamos uma redução na quantidade de transcritos para a proteína transportadora de 5-HT (5-HTT), bem como para a enzima de síntese de 5-HT (Tph2). O córtex pré-frontal demonstrou ser a região mais vulnerável ao tratamento com 13-*cis*-RA, no qual observamos uma redução nos transcritos para os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇. No hipocampo e hipotálamo as alterações foram mais sutis, havendo respectivamente uma redução nos transcritos para o receptor 5-HT₇ e um aumento nos transcritos para o receptor 5-HT_{2A}. Assim, demonstramos em animais de que o 13-*cis*-RA prescrito em humanos para o tratamento da acne pode levar a mudanças comportamentais e interferência na transcrição gênica de componentes do sistema serotoninérgico central.

Palavras-chave: Ácido 13-*cis*-retinóico. Isotretinoína. Depressão. Sistema serotoninérgico. Expressão gênica

ABSTRACT

Ofuchi AS. Chronic administration of 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin) in young male mice: emotion-related behaviors and quantification of central serotonergic system transcripts [Master thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

13-*cis*-retinoic acid (13-*cis*-RA, isotretinoin) is a synthetic retinoid used for prolonged period at high oral doses for acne treatment. 13-*cis*-RA reduces the sebaceous gland activity and related inflammatory processes. Since the beginning of 13-*cis*-RA use, there are reports in the literature about psychiatric symptoms as depression, suicide idealization and psychosis in some individuals. Behavioral studies in animals have detected possible association with depression and cognitive disturbances. However, human and animal investigations results are still controversial. Since the retinoic acid components are widespread distributed in the CNS and serotonergic system is a well known modulator of emotion behaviors, we investigated a possible relation between these systems. Male adolescent C57BL/6 mice received 13-*cis*-RA (1mg/kg *ip*) or vehicle once daily for 42 days. Different sets of animals were used to investigate emotion-related behaviors or 5-HT system-related mRNA levels by qRT-PCR. 13-*cis*-RA injected mice exhibited reduced peripheric locomotor activity in the open field (OF), without difference in central locomotor activity. In the elevated plus maze (EPM), no difference was observed in locomotor activity. Anxiety-related behaviors were not observed in both the OF or the EPM tests. A depressive-like behavior was exhibited in the forced swim test (FST) with increased immobility time. In agreement with depressive fenotype, anhedonia was measured in sucrose preference test (SPT) and we found a reduction in this parameter. Taken together, this behavioral results in the OF, FST and SPT reflect a depression-related behavior in mice treated with the drug. In addition, depression-related behavior was analysed after 20 days without the 13-*cis*-RA prolonged treatment and the increased immobility in the FST has not verified, suggesting reversion of the phenomenon. The midbrain is an important area in serotonergic modulation due to presence of feedback machinery. 13-*cis*-RA injected mice showed reduced levels of 5-HTT mRNA and Tph2 mRNA in this area. In the prefrontal cortex, a vulnerable area to 13-*cis*-RA, reduction was observed for 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptor transcripts. In the hippocampus and hypothalamus, changes were discrete,

there were reduction in 5-HT₇ receptor mRNA and increase in 5-HT_{2A} receptor mRNA respectively. Our combined findings suggest that 13-*cis*-RA prescribed in humans for acne treatment can induce behavioral changes and interference in gene expression of serotonergic system components in mice.

Keywords: 13-*cis*-retinoic acid. Isotretinoin. Depression. Serotonergic system. Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo de conversão enzimática do retinol a ATRA através de processos oxidativos.....	22
Figura 2 - Mecanismo de ação do retinol.	23
Figura 3 - Mecanismo de ativação do processo de transcrição gênica.	24
Figura 4 - Mecanismo de ação do 13- <i>cis</i> -RA.....	26
Figura 5 - Neurotransmissão serotoninérgica em um desenho esquemático de um corte sagital do cérebro de camundongo.	32
Figura 6 - Linha cronológica dos procedimentos experimentais.....	44
Figura 7 - Animal em um aparelho de campo-aberto.	45
Figura 8 - Animal em um aparelho de labirinto em cruz elevado.....	46
Figura 9 - Animal submetido ao teste do nado-forçado.	47
Figura 10 - Verificação da integridade do RNA em gel de agarose 1%.....	50
Figura 11 - Efeito do tratamento prolongado com o ácido 13- <i>cis</i> -retinóico (1mg/kg, <i>i.p.</i> , por dia) sobre a porcentagem do ganho de peso corpóreo em relação ao peso inicial de camundongos machos (n=12/cada grupo), da adolescência ao início da fase adulta.	56
Figura 12 - Efeitos da administração prolongada do ácido 13- <i>cis</i> -retinóico (1mg/kg/ <i>i.p.</i> , por dia) na locomoção central e lateral em um campo-aberto, frequência de levantar, tempo na periferia e latência para deixar o centro da arena durante 5 minutos de observação no 33º dia de tratamento em camundongos machos (n=12/cada grupo) no início da fase adulta.	57
Figura 13 - Efeitos da administração prolongada do ácido 13- <i>cis</i> -retinóico (1mg/kg/ <i>i.p.</i> , por dia) sobre comportamentos relacionados à ansiedade, atividade locomotora e exploratória observados por 5 minutos em um labirinto em cruz elevado, no 36º dia de tratamento em camundongos machos (n=12/cada grupo) no início da fase adulta.	58
Figura 14 - Efeitos da administração prolongada do ácido 13- <i>cis</i> -retinóico (1mg/kg/ <i>i.p.</i> , por dia) sobre a duração de imobilidade nos 4 últimos minutos do teste de nado forçado analisado no 38º dia de tratamento em camundongos machos (n=12/cada grupo) no início da fase adulta.....	59
Figura 15 - Efeitos da administração prolongada do ácido 13- <i>cis</i> -retinóico (1mg/kg/ <i>i.p.</i> , por dia) sobre a porcentagem de preferência por sacarose e o	

consumo total de fluido analisado no 38º dia de tratamento em camundongos machos (controle n=10; 13- <i>cis</i> -RA, n=9) no início da fase adulta.....	60
Figura 16 - Efeitos da administração prolongada do ácido 13- <i>cis</i> -retinóico (1mg/kg/ <i>i.p.</i> , por dia) sobre a duração de imobilidade nos 4 últimos minutos do teste de nado forçado analisado após 20 dias sem tratamento (62º dia) em camundongos machos adultos (n=12/cada grupo).	60
Figura 17 - Efeitos da administração diária de ácido 13- <i>cis</i> -retinóico (1mg/kg/ <i>i.p.</i>) durante 42 dias sobre a quantidade normalizada de transcritos de receptores, enzima de síntese (Tph2) e transportador (5-HTT) da via serotoninérgica na região do mesencéfalo de camundongos machos (n=12/cada grupo) no início da fase adulta.....	63
Figura 18 - Efeitos da administração diária de ácido 13- <i>cis</i> -retinóico (1mg/kg/ <i>i.p.</i>) durante 42 dias sobre a quantidade normalizada de transcritos referentes aos receptores de 5-HT na região do hipotálamo de camundongos machos (controle n=12; 13- <i>cis</i> -RA n=10) no início da fase adulta.	65
Figura 19 - Efeitos da administração diária de ácido 13- <i>cis</i> -retinóico (1mg/kg/ <i>i.p.</i>) durante 42 dias sobre a quantidade normalizada dos transcritos referentes aos receptores de 5-HT na região do córtex pré-frontal de camundongos machos (controle n=9; 13- <i>cis</i> -RA n=10) no início da fase adulta..	66
Figura 20 - Efeitos da administração diária de ácido 13- <i>cis</i> -retinóico (1mg/kg/ <i>i.p.</i>) durante 42 dias sobre a quantidade normalizada dos transcritos referentes aos receptores de 5-HT na região do hipocampo de camundongos machos (controle n=12; 13- <i>cis</i> -RA n=11) no início da fase adulta.	68
Figura 21 - Localização do RARE na região regulatória dos genes para os receptores 5-HT _{1A} , 5-HT _{2A} , 5-HT _{5A} e 5-HT ₇	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes da via serotoninérgica, localização encefálica e principais comportamentos relacionados	34
Tabela 2 - Dados comportamentais adicionais observados no labirinto em cruz elevado.....	59
Tabela 3 - Sequência dos pares de iniciadores utilizados para <i>qPCR</i> e o tamanho do produto (pares de base)	61
Tabela 4 - Genes de referência escolhidos	62
Tabela 5 - Quantidade normalizada dos transcritos de receptores, enzima de síntese (Tph2) e transportador (5-HTT) da via serotoninérgica na região do mesencéfalo de camundongos machos (n=12/cada grupo) no início da fase adulta, após tratamento durante 42 dias com ácido 13- <i>cis</i> -retinóico.....	63
Tabela 6 - Quantidade normalizada dos transcritos referentes aos receptores de 5-HT na região do hipotálamo de camundongos machos (controle n=12; 13- <i>cis</i> -RA n=10) no início da fase adulta, após tratamento durante 42 dias com ácido 13- <i>cis</i> -retinóico.	65
Tabela 7 - Quantidade normalizada dos transcritos referentes aos receptores de 5-HT na região do córtex pré-frontal de camundongos machos (controle n=9; 13- <i>cis</i> -RA n=10) no início da fase adulta, após tratamento durante 42 dias com ácido 13- <i>cis</i> -retinóico.	67
Tabela 8 - Quantidade normalizada dos transcritos referentes aos receptores de 5-HT na região do hipocampo de camundongos machos (controle n=12; 13- <i>cis</i> -RA n=11) no início da fase adulta, após tratamento durante 42 dias com ácido 13- <i>cis</i> -retinóico.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{-/-} – nocaute (*knockout*)

13-*cis*-4-oxo-RA – ácido 13-*cis*-4-oxo-retinóico

13-*cis*-RA – ácido 13-*cis*-retinóico (isotretinoína)

5-HT – 5-hidroxitriptamina (serotonina)

5-HT_{1A} – receptor da serotonina do tipo 1A

5-HT_{1B} – receptor da serotonina do tipo 1B

5-HT_{2A} – receptor da serotonina do tipo 2A

5-HT_{2C} – receptor da serotonina do tipo 2C

5-HT_{3A} – receptor da serotonina do tipo 3A

5-HT₄ – receptor da serotonina do tipo 4

5-HT_{5A} – receptor da serotonina do tipo 5A

5-HT₆ – receptor da serotonina do tipo 6

5-HT₇ – receptor da serotonina do tipo 7

5-HTT – transportador da serotonina

Actb – gene para b-actina

ADH – álcool desidrogenase

AMPc – adenosina 3', 5'- monofosfato cíclico

ATG – códon sinalizador do início da tradução

ATRA – ácido *all-trans*-retinóico (tretinoína)

CA – Campo-aberto

CEEA – Comissão de ética em experimentação animal

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

Cq – Ciclo de quantificação

CRABP – proteína celular ligante de ácido retinóico (*cellular retinoic acid binding protein*)

CRBP – proteína celular ligante de retinol (*cellular retinol binding protein*)

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNAc – DNA complementar

EPM – erro padrão da média

FSL – Linhagem *Flinders Sensitive*

GABA – ácido gama-aminobutírico

Gapdh – gene para a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HATs – complexo de histonas acetil transferases

HDACs – complexo de histonas deacetilases

HPA – eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

Hprt-1 – gene para a hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase 1

Htr1a – gene para o receptor da serotonina do tipo 1A

Htr1b – gene para o receptor da serotonina do tipo 1B

Htr2a – gene para o receptor da serotonina do tipo 2A

Htr2c – gene para o receptor da serotonina do tipo 2C

Htr3a – gene para o receptor da serotonina do tipo 3A

Htr4 – gene para o receptor da serotonina do tipo 4

Htr5a – gene para o receptor da serotonina do tipo 5A

Htr6 – gene para o receptor da serotonina do tipo 6

Htr7 – gene para o receptor da serotonina do tipo 7

IL-1 β – interleucina 1 β

ISRS – inibidor seletivo da recaptura de 5-HT

i.p – intraperitoneal

LCE – labirinto em cruz elevado

LRAT – Lecitina retinol aciltransferase

min – minuto

NA – noradrenalina

NF – nado-forçado

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

PET – tomografia por emissão de pósitron

Ppia – gene para a peptidilpropil isomerase A (ciclofilina)

PPS – preferência por sacarose

PVN – núcleo paraventricular

qPCR – PCR quantitativo em tempo real

RA – ácido retinóico

RALDHs – retinaldeído desidrogenase

RAR – receptor de ácido retinóico

RARE – elemento responsivo ao ácido retinóico (*retinoic acid response element*)

RBP – proteína ligante de retinol (*retinol binding protein*)

RNA – ácido ribonucléico

RNA_m – RNA mensageiro

ROLDH – Retinol desidrogenase

RXR – receptor retinóide X

s – segundos

Slc6a4 – gene para a proteína transportadora de serotonina (5-HTT) (*solute carrier family 6, member 4*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SUS – Sistema Único de Saúde

Tph – triptofano hidroxilase (enzima de síntese da 5-HT)

Tph2 – gene para a enzima triptofano hidroxilase do tipo 2

TTR – transtiretina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Retinóides	20
1.2 Ácido 13- <i>cis</i> -retinóico	25
1.6 Sistema serotoninérgico e comportamentos emocionais	31
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivo geral.....	41
2.2 Objetivos específicos	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Animais.....	42
3.2 Drogas	42
3.3 Delineamento experimental	43
3.4 Aspectos fisiológicos e modelos comportamentais	45
3.4.1 <i>Medida do peso corpóreo dos animais ao longo do tratamento</i>	45
3.4.2 <i>Atividade motora espontânea no Campo-Aberto</i>	45
3.4.3 <i>Comportamento relacionado à ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado</i>	46
3.4.4 <i>Comportamento relacionado à depressão no Teste do Nado-forçado (Porsolt)</i>	47
3.4.5 <i>Comportamento de anedonia no Teste de Preferência por Sacarose</i>	48
3.5 Preparação das amostras para determinação da expressão gênica	49
3.5.1 <i>Extração do RNA Total</i>	49
3.5.2 <i>Síntese do DNA complementar (DNAc)</i>	50
3.5.3 <i>Procedimento para síntese de oligonucleotídeos iniciadores (primers)</i>	50
3.6 Reação em cadeia de polimerases (PCR) em Tempo Real	51
3.7 Busca “ <i>in silico</i> ” de elementos responsivos ao ácido retinóico (RARE)	52
4 CRITÉRIOS PARA ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	54
4.1 Análise da expressão gênica relativa	54
4.2 Análise estatística	54
5 RESULTADOS.....	56
5.1 Aspectos fisiológicos e comportamentais	56
5.1.1 <i>Medida do peso corpóreo dos animais ao longo do tratamento</i>	56

5.1.2 Atividade motora espontânea no Campo-Aberto (CA)	57
5.1.3 Comportamento relacionado à ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	58
5.1.4 Comportamento relacionado à depressão no Teste do Nado Forçado (Porsolt)	59
5.1.5 Comportamento de anedonia no Teste de Preferência por Sacarose.....	59
5.1.6 Imobilidade no Teste do Nado Forçado avaliada 20 dias após o término do tratamento	60
5.2 Análise de expressão gênica diferencial	61
5.2.1 Pares de iniciadores utilizados para a amplificação dos genes	61
5.2.2 Genes de referência utilizados em cada estrutura encefálica.....	62
5.2.3 Quantificação de RNAm no mesencéfalo	63
5.2.4 Quantificação de RNAm no hipotálamo	64
5.2.5 Quantificação de RNAm no córtex pré-frontal.....	66
5.2.6 Quantificação de RNAm no hipocampo	67
5.3 Busca “in silico” de elementos responsivos ao ácido retinóico (RARE) ..	69
6 DISCUSSÃO	70
6.1 Aspectos fisiológicos e comportamentais	70
6.2 Regulação gênica da atividade transcricional pelo RARE	74
6.3 Concentração de transcritos de componentes do sistema serotoninérgico	76
6.3.1 Mesencéfalo.....	76
6.3.2 Hipotálamo.....	79
6.3.3 Córtex pré-frontal.....	79
6.3.4 Hipocampo.....	81
7 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Retinóides

A classe dos retinóides é composta por moléculas com estrutura química semelhante à vitamina A (retinol). Estes compostos podem ser naturalmente encontrados no organismo após metabolização do retinol, sendo estes o retinaldeído, o ácido all-*trans*-retinóico (ATRA) e o ácido 13-*cis*-retinóico (13-*cis*-RA), ou ter origem sintética representada por análogos modificados do retinol, como o etretinato e a acitretina (Allen e Bloxham, 1989). O retinol não pode ser produzido pelo organismo, sendo adquirido através da dieta animal na forma de retinil éster, bem como da dieta vegetal na forma de pró-vitamina A carotenóides, sendo sua necessidade diária inferior a 1 mg. A carência de vitamina A acarreta principalmente o aparecimento de sintomas como xerofthalmia e cegueira, tratando-se de uma deficiência nutricional grave encontrada principalmente em populações de países em desenvolvimento, como o Brasil (Ramalho et al., 2002). Por outro lado, a hipervitaminose A é menos frequente e é acompanhada de sintomas como aumento da pressão intracraniana, disfunção hepática, ressecamento de pele e mucosas, entre outros (Patel et al., 1988).

Os retinóides estão envolvidos na manutenção de diferentes processos fisiológicos no organismo. Estudos evidenciaram que tanto a carência quanto o excesso de suprimento de retinóides são prejudiciais na fase embriogênica e adulta, demonstrando a importância de se ter um suprimento adequado de retinol (Bonnet et al., 2008; Crandall et al., 2004; Lammer et al., 1985; Maden et al., 1996). No embrião, o ácido retinóico (RA) é imprescindível na morfogênese, atuando no padrão de desenvolvimento anteroposterior, dorsoventral e na formação do tubo neural (Maden et al., 1996). No adulto, o RA mantém ainda a capacidade de modular processos de neuroplasticidade no SNC e há evidências de que promova a regeneração axonal no sistema nervoso periférico (Misner et al., 2001; Bonnet et al., 2008; Yip et al., 2006).

Os retinóides são capazes de acentuar o processo de diferenciação neuronal e reduzir a proliferação celular, promovendo a formação de neurônios e células da glia a partir de células embrionárias indiferenciadas (Bain et al., 1996; Fraichard et al., 1995; Kim et al., 2009). Neste sentido, Bain et al. (1996) demonstraram que a

administração de RA em células embrionárias indiferenciadas aumentava a expressão de genes normalmente encontrados em tecidos neurais, enquanto reduzia aqueles relacionados a tecidos periféricos, tais como o cardíaco. Estes resultados sugeriram uma possível ação seletiva do RA na maturação de células neuronais. Estudos conduzidos *in vitro* utilizando retinóides em altas concentrações demonstraram aumento no processo de apoptose em células indiferenciadas, mecanismo que possivelmente contribui para o uso terapêutico dos retinóides no tratamento de diversos tipos de câncer (Horn et al., 1996; Kaba et al., 1996; Motzer et al., 1995; Stadler et al., 1998). Por outro lado, em baixas concentrações, os retinóides parecem ter um efeito celular benéfico demonstrado pelo aumento da sobrevivência de neurônios (Liu et al., 2008).

A maquinaria da via dos retinóides é composta pelo receptor do ácido retinóico (RAR), pelo receptor retinóide X (RXR) nas isoformas α , β e γ , pelas proteínas transportadoras de retinóides e ainda pela enzima de síntese de RA. Estes componentes encontram-se distribuídos no encéfalo maduro em diversas áreas como: córtex, hipocampo, hipotálamo, cerebelo, caudado-putamen, núcleo *acumbens*, tubérculo olfatório e estriado (Krezel et al., 1999; Zetterström et al., 1999).

A farmacocinética do retinol obtido através da dieta ocorre inicialmente através da absorção da molécula no intestino e posterior modificação enzimática através do processo de esterificação do retinol pela enzima lecitina retinol aciltransferase (LRAT) (Ruiz et al., 1999). A forma esterificada do retinol é transportada via quilomicrons para o fígado ou tecidos alvos (Goodman et al., 1966). No fígado, o retinil éster é estocado e de acordo com a necessidade corpórea pode ser processada novamente a retinol através de uma reação de hidrólise. O retinol é transportado no sangue ligado a um complexo formado pela proteína ligante de retinol (*retinol binding protein*, RBP) e pela proteína transtiretina (TTR) (Yamamoto et al., 1997). Estudos evidenciaram que a RBP liga-se a um receptor de membrana, possibilitando a liberação do retinol para o interior da célula (Shingleton, Skinner e Ong, 1989; Redondo et al., 2008). O retinol livre, devido ao seu caráter lipofílico, também pode entrar em grande parte das células através de um processo de difusão pela membrana celular (Lane e Bailey, 2005). No interior da célula, o retinol encontra-se ligado à proteína celular ligante de retinol (*cellular retinol binding protein*, CRBP) (Li et al., 1991) e pode ser convertido a RA através de dois processos

oxidativos seqüenciais: a) o primeiro é via retinol desidrogenase ou via álcool desidrogenase, formando o *all-trans*-retinaldeído (Boerman e Napoli, 1996; Van Thiel, Gavaler e Lester, 1974); b) o segundo através das enzimas retinaldeído desidrogenases (RALDHs) formando ATRA (**Figura 1**) (Lane e Bailey, 2005; Wang, Penzes e Napoli, 1996).

Figura 1 - Mecanismo de conversão enzimática do retinol a ATRA através de processos oxidativos.

No interior da célula ATRA se liga à proteína celular ligante de RA (*cellular retinoic acid binding protein*, CRABP) (Norris et al., 1994) e em seguida é transportada para o núcleo, onde ATRA se liga ao RAR (Tsukada et al., 2000) (**Figura 2**). O RAR existe na forma de um complexo heterodimérico com o RXR. O RXR é membro da superfamília de receptores hormonais nucleares e é integrante de outros receptores nucleares como da vitamina D, receptor do hormônio da tireóide e receptor ativado por proliferador de peroxissomo, entre outros (Leid, Kastner e Chambon, 1992; Theodosiou, Laudet e Schubert, 2010).

A farmacodinâmica dos retinóides tem início com a ativação do complexo receptor RXR-RAR, denominado como fator de transcrição, que se encontra ligado ao elemento responsivo ao RA (*retinoic acid response element*, RARE) localizado em regiões promotoras do DNA dando início à transcrição gênica (Umesono et al., 1991) (**Figura 2**). Estudo baseado em técnicas farmacológicas e moleculares evidenciou que a ativação do processo de transcrição é dependente da interação de um agonista ao RAR ("fenômeno RAR dominante"), assim o RXR teria apenas uma função acentuadora na presença do seu ligante (Lane e Bailey, 2005; Minucci et al., 1997).

Figura 2 - Mecanismo de ação do retinol.

Na ausência do ligante, proteínas co-repressoras permanecem ligadas ao RAR, prevenindo o processo de transcrição gênica via RARE. Porém, quando ATRA se liga ao RAR, ocorre uma mudança conformacional no receptor e os co-repressores são liberados e substituídos por proteínas co-ativadoras (**Figura 3**). Estes fatores co-regulatórios medeiam seus efeitos principalmente através da modulação do nível de acetilação de resíduos de lisina pertencentes às histonas. Desta forma, co-repressores recrutam o complexo de histonas deacetilases (HDACs) removendo grupo acetila de resíduos de lisina de histonas, prevenindo assim o processo de transcrição gênica. Por outro lado, co-ativadores recrutam o complexo de histonas acetil transferases (HATs), promovendo a acetilação de resíduos de lisina e facilitando o processo de transcrição gênica (Bastien e Rochete-Egly, 2004; Blanco et al., 1998; Lane e Bailey, 2005).

Figura 3 - Mecanismo de ativação do processo de transcrição gênica.
Fonte: Baseado em Marletaz et al. (2006).

O RARE é composto pela repetição de uma sequência formada por 6 nucleotídeos (A/G)G(G/T)TCA (ou seja, AGGTCA, GGGTCA, AGTTCA, GGTTCA e suas formas palindrômicas), ou ainda por uma forma mais “relaxada” (A/G)G(G/T)(G/T)(G/C)A (ou seja, AGGGGA, AGGGCA, AGGTGA, AGGTCA, AGTGGA, AGTGCA, AGTTGA, AGTTCA, GGGGGA, GGGGCA, GGGTGA, GGGTCA, GGTGGA, GGTGCA, GGTTGA, GGTTCA e suas formas palindrômicas) (Balmer e Blomhoff, 2005). São nestas possíveis combinações de nucleotídeos que o complexo receptor formado por RXR-RAR se encontra ligado. A repetição da sequência de 6 nucleotídeos pode ser encontrada espaçada por 5 nucleotídeos quaisquer (forma clássica), entretanto pode estar separada também por 1 ou 2 nucleotídeos (Bastien e Rochete-Egly, 2004). Curiosamente, a sequência que compõe o RARE é muito semelhante à de outros *cis*-elementos presentes em genes pertencentes a receptores nucleares, como os receptores do hormônio da tireóide e vitamina D₃ (Umesono et al., 1991). Há evidências de que a especificidade da ligação dos diferentes fatores de transcrição (tais como o RA, hormônio da tireóide e vitamina D₃) para cada receptor nuclear esteja associada ao número de nucleotídeos que separam estas sequências (Umesono et al., 1991). Entretanto, estudo recente demonstrou também a possibilidade da existência de outros fatores que contribuem para a especificidade e estabilidade da ligação, tais como: a presença de proteínas auxiliares co-ativadoras e a existência de pequenas diferenças nas sequências de nucleotídeos do elemento de resposta (Phan et al., 2010).

1.2 Ácido 13-*cis*-retinóico

O 13-*cis*-RA (ou isotretinoína) é o composto ativo do fármaco comercializado com o nome de Roacutan[®] (Laboratório Roche, São Paulo, S.P., Brasil) ou Accutane[®] nos EUA (Roche Pharmaceuticals, Nutley, N.J., EUA) e trata-se de um retinóide sintético utilizado em altas doses para o tratamento de acnes severas. O seu uso terapêutico para acnes iniciou-se em 1982 com a aprovação deste tratamento pela agência regulamentadora nos EUA. No Brasil, a comercialização do 13-*cis*-RA teve início em 1993, e a regulamentação do produto genérico ocorreu em 2002 (Ministério da Saúde, [2010]).

A absorção do fármaco 13-*cis*-RA ocorre no intestino, que devido ao seu caráter lipofílico é aumentada com a ingestão concomitante de alimento. No sangue, o 13-*cis*-RA é transportado ligado à proteína albumina e entra na célula por um processo de difusão passiva (Tsukada et al., 2002). No interior da célula, o 13-*cis*-RA, diferentemente do ATRA, não é transportado pela CRABP, devido à sua baixa afinidade por esta proteína (¹Siegenthaler e Saurat, 1989 apud Zoubolis, 2006). O 13-*cis*-RA pode ativar o processo de transcrição gênica de forma semelhante ao retinol, através da interação com o RAR de duas maneiras (**Figura 4**): a) ligando-se diretamente ao RAR, porém com uma baixa afinidade; b) sofrer isomerização à ATRA, que é um ligante de alta afinidade (Allenby et al., 1993; O'Reilly et al., 2008; Tsukada et al., 2000).

¹Siegenthaler G, Saurat J-H. Binding of isotretinoin to cellular retinoic acid-binding protein: a reappraisal. In: Marks R, Plewig G (eds). Acne and Related Disorders. Dunitz: London. 1989;169-77.

Figura 4 - Mecanismo de ação do 13-*cis*-RA.

A acne é uma patologia multifatorial que envolve a glândula sebácea. Os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da acne incluem estimulação da produção de sebo por androgênios, processo de hiperqueratinização anormal obstruindo a glândula, colonização por bactérias como *Propionibacterium acnes* e processo inflamatório (Clarke et al., 2007). De acordo com a gravidade das lesões, a acne pode ser dividida em: a) não inflamatória – acne comedogênica (grau I) ou b) inflamatória – papulopustulosa (grau II), nodulocística (grau III), conglobata (grau IV) (Sinclair e Jordaan, 2005). O tratamento com 13-*cis*-RA é preconizado principalmente nos casos de acne inflamatória grau III e IV (Brasil, 2001).

Estudos *in vitro* e em vivo evidenciaram os efeitos terapêuticos do 13-*cis*-RA no tratamento da acne, que podem ocorrer de diversas maneiras, tais como: a) redução acentuada do tamanho e da atividade da glândula sebácea, que demonstrou ser superior a de outros retinóides (Hommel et al., 1996; Plewig et al., 2004); b) redução do processo de hiperqueratinização e inflamação (Plewig et al., 2004); c) indução do processo de apoptose em glândulas sebáceas (Nelson et al., 2006) e d) inibição da síntese de diidrotestosterona (Karlsson et al., 2003). Entretanto, o exato mecanismo de ação do 13-*cis*-RA para promover a redução duradoura da atividade da glândula sebácea permanece ainda desconhecido. Estudos adicionais ainda são necessários para elucidar se o 13-*cis*-RA age por

interação ao RAR e/ou por outros mecanismos independentes da ligação ao receptor na glândula sebácea (Karlsson et al., 2003; Nelson et al., 2006). Uma investigação recente de expressão gênica em alta escala, a partir de biópsia da pele de pacientes tratados com 13-*cis*-RA, evidenciou modificações em genes relacionados à metabolização de lipídios e remodelamento da matriz protéica extracelular (Nelson et al., 2009). Estes resultados sugerem possíveis candidatos moleculares envolvidos na ação do 13-*cis*-RA sobre as glândulas sebáceas.

A posologia do 13-*cis*-RA para o tratamento acne varia de 0,5-1,0 mg/kg/dia, por via oral, durante 4 a 6 meses, afim de se obter uma dose acumulada teórica de 120 mg/kg no término do tratamento (Strauss et al., 1984). Seguindo esta posologia, aproximadamente 40% dos pacientes se tornam livres da acne, outros 40% podem ter recorrências que são facilmente tratadas com medicamentos de uso tópico e para os demais 20% recomenda-se um segundo tratamento com 13-*cis*-RA (Clarke et al., 2007). Assim, a possibilidade de cura definitiva da acne é o que atrai um número crescente de usuários, principalmente em adolescentes, onde sua alta prevalência pode interferir na auto-estima.

Considerando a necessidade de adotar mecanismos capazes de permitir o acesso da população ao tratamento com 13-*cis*-RA nos casos de acnes graves e refratárias, o SUS (Sistema Único de Saúde) em 2002 começou a disponibilização gratuita deste tratamento no Brasil. Isto ocorreu a partir do estabelecimento de um “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas” para o tratamento da acne com 13-*cis*-RA pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2001). Estas diretrizes foram atualizadas recentemente com a criação do anexo “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Acne Grave” (Brasil, 2010).

Os efeitos terapêuticos do 13-*cis*-RA no tratamento da acne não são desprovidos de efeitos adversos (semelhante ao quadro de hipervitaminose A descrito anteriormente), que incluem teratogenicidade, disfunção hepática, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, ressecamento de pele e mucosas, alopecia, distúrbios visuais, pseudotumor cerebral, artralgia e dores musculares (Ellis e Krach, 2001). Outro efeito adverso importante é a possibilidade do aparecimento de alterações psiquiátricas que tem sido investigada em diferentes estudos clínicos e pré-clínicos, com o intuito de se encontrar possíveis mecanismos associados.

Desde a aprovação do uso do 13-*cis*-RA, a literatura científica, através de relatos de caso e estudos epidemiológicos, tem reportado sintomas psiquiátricos

incluindo depressão, idealização de suicídio, psicoses, agressividade e impulsividade (Azoulay et al., 2008; Barak et al., 2005; Byrne et al., 1998; Friedman et al., 2006). Entretanto, devido ao aumento de casos de depressão na população em geral por consequência da ação de agentes estressores, bem como susceptibilidade individual, tais estudos correlacionais ainda são controversos (Friedman et al., 2006; Jick, Kremers e Vasilakis-Scaramozza, 2000; Rehn et al., 2009).

Um estudo clínico verificou o metabolismo cerebral em humanos adultos, através de tomografia com emissão de pósitrons (PET), antes e após tratamento de quatro meses com 13-*cis*-RA ou antibiótico. Os pesquisadores observaram uma associação do 13-*cis*-RA, mas não do antibiótico, à redução no metabolismo cerebral do córtex orbitofrontal, sugerindo que o uso de 13-*cis*-RA possa estar relacionado com mudanças no metabolismo cerebral. Entretanto, não detectaram alterações nos sintomas de depressão nestes indivíduos (Bremner et al., 2005).

Como mencionado anteriormente, a alta incidência de depressão presente na população em geral torna difícil distinguir um aumento gerado especificamente por um fator adicional como a administração do 13-*cis*-RA (Gupta e Gupta, 1998). Além disso, pacientes que apresentam desfiguração devido à acne severa, geralmente apresentam problemas com auto-estima, depressão e raiva (Koo, 1995), que poderiam confundir potenciais sintomas de depressão causados pelo tratamento. Neste caso, o uso de modelos animais se mostra uma importante estratégia para separar o comportamento depressivo relacionado diretamente com o medicamento, daquele relacionado com a auto-estima e humor do indivíduo.

Em camundongos adolescentes, a administração prolongada do 13-*cis*-RA (1mg/kg/*i.p.*, por dia) evidenciou um aumento da imobilidade em testes comportamentais validados para o estudo da depressão, como o nado-forçado e a suspensão pela cauda, sugerindo o aparecimento de um comportamento pró-depressivo decorrente do tratamento (O'Reilly et al., 2006).

Em contraste aos estudos conduzidos em camundongos, a administração prolongada do 13-*cis*-RA (7,5 mg/kg ou 22,5 mg/kg, por dia, através da via oral) em ratos adultos não alterou a imobilidade no nado forçado e nem a ingestão de sacarose (teste de anedonia). Neste estudo, somente uma redução na atividade locomotora no campo-aberto foi observada (Ferguson et al., 2005). Recentemente, outro estudo conduzido em ratos jovens e adultos (13-*cis*-RA, 1mg/kg, *i.p.*) também

não demonstrou alterações relacionadas à depressão em modelos animais geralmente utilizados no estudo desta patologia, porém verificou uma redução da agressividade que poderia ser correlacionada com um efeito pró-depressivo do 13-*cis*-RA (Trent et al., 2009).

Entretanto, a análise destes trabalhos em conjunto deve levar em consideração a diversidade de condições experimentais utilizadas, como dose do fármaco, duração do tratamento, via de administração, idade, linhagem dos animais e sensibilidade do teste comportamental, como importantes geradores de variabilidade.

A investigação de eventos moleculares cerebrais em decorrência da administração do 13-*cis*-RA em roedores tem sido o foco de trabalhos recentes. Neste sentido, um estudo envolvendo administração crônica do 13-*cis*-RA em camundongos verificou uma redução na taxa de proliferação e neurogênese no hipocampo de camundongos (Crandall et al., 2004). O hipocampo é uma das poucas áreas encefálicas onde ainda ocorre proliferação de neurônios no cérebro maduro (Eriksson et al., 1998). Esta neurogênese hipocampal parece ser passível de modulação, uma vez que estudos demonstraram um aumento da formação de novos neurônios após a administração de antidepressivos (Malberg et al., 2000). Considerando ainda a importância do hipocampo na modulação de processos cognitivos e emocionais, outros pesquisadores estudaram a morfologia de neurônios hipocampais de ratos, após o tratamento *in vitro* de uma cultura primária de hipocampo com diferentes concentrações de 13-*cis*-RA. Neste estudo, as mudanças morfológicas decorrentes do tratamento com 13-*cis*-RA demonstraram ser dependentes da concentração e foram evidenciadas por técnicas de imunohistoquímica. Desta forma, o retinóide em baixa concentração demonstrou ter efeitos benéficos na morfologia dos dendritos, além de aumentar a sobrevivência dos neurônios, enquanto que a concentração elevada do 13-*cis*-RA causou efeitos neuronais deletérios (Liu et al., 2008). Adicionalmente, estudo da atividade da citocromo oxidase, um marcador da atividade metabólica basal de neurônios, verificou um prejuízo na correlação da atividade desta enzima entre o núcleo dorsal da *raphé* e o hipocampo em camundongos tratados cronicamente com 13-*cis*-RA (1mg/kg/*i.p.*), evidenciando uma vulnerabilidade na conexão neuronal entre regiões encefálicas (O' Reilly et al., 2009).

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é um achado biológico na depressão (Dinan, 1994). Recentemente, um estudo demonstrou que a administração do 13-*cis*-RA em cultura de células derivadas do hipotálamo acarretou uma redução no número de células, evidenciando um efeito tóxico deste fármaco em uma área encefálica importante na modulação da resposta ao estresse (Griffin et al., 2010).

Em conjunto, estes dados sugerem distintas alterações neuronais, que parecem ocorrer em áreas específicas do cérebro, em decorrência da administração do 13-*cis*-RA.

O envolvimento da serotonina (5-HT) em transtornos psiquiátricos, já é bem estabelecido (Holmes, 2008). Neste sentido, uma possível interação entre o sistema serotoninérgico e o 13-*cis*-RA foi investigada em diferentes modelos experimentais. Inicialmente, estudo *in vitro* dos possíveis efeitos deletérios do 13-*cis*-RA foi conduzido em cultura de células derivadas dos núcleos da *raphé* de ratos. Estas células são capazes de expressar os auto-receptores serotoninérgicos inibitórios do subtipo 5-HT_{1A}, bem como a proteína transportadora de serotonina (5-HTT). Assim, um aumento nos auto-receptores 5-HT_{1A} e na proteína 5-HTT foram observados, que teria como consequência a redução de serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) na fenda sináptica (O'Reilly et al., 2007). Este resultado evidencia alterações importantes em componentes cruciais na modulação dos níveis de 5-HT no cérebro. Investigação da morfologia de neurônios serotoninérgica foi realizada em cultura de cortes histológicos derivados do mesencéfalo, que foram tratados com 13-*cis*-RA. O ensaio de imuno-histoquímica indicou alterações morfológicas na região somática dos neurônios em consequência do 13-*cis*-RA (Ishikawa et al., 2008). Recentemente, outro estudo foi conduzido na área dos núcleos da *raphé* com o intuito de verificar se o tratamento com 13-*cis*-RA poderia reduzir também o número de neurônios serotoninérgicos. Entretanto, os pesquisadores não observaram nenhuma alteração no número de neurônios sugerindo que as alterações que ocorrem no sistema serotoninérgico sejam possivelmente em decorrência de uma mudança na atividade desta via (Drew et al., 2010).

Assim, estes dados sugerem evidências de uma possível associação entre a via serotoninérgica e o 13-*cis*-RA. Devido à necessidade de aprofundar os conhecimentos obtidos até o momento, o presente trabalho se propôs a estudar os

efeitos comportamentais e transcricionais do 13-*cis*-RA no sistema serotoninérgico utilizando modelo animal.

1.6 Sistema serotoninérgico e comportamentos emocionais

A neurotransmissão serotoninérgica se origina no mesencéfalo, precisamente nos núcleos da *raphé*, região que apresenta alta densidade de corpos neuronais serotoninérgicos e projeta aferências para outras áreas encefálicas. A 5-HT é um neurotransmissor abundante no SNC e participa no processo de neuroplasticidade em neurônios serotoninérgicos, assim como no processo de desenvolvimento e maturação de diversos sistemas neuronais (Mazer et al., 1997; Whitaker-Azmitia e Azmitia, 1986; Whitaker-Azmitia et al., 1996).

O circuito neuronal corticolímbico pode sofrer modificações associadas à incidência de diferentes transtornos psiquiátricos, provavelmente através da interação entre diversos neurotransmissores. A 5-HT tem se destacado entre estes neurotransmissores por apresentar elevada densidade de receptores e neurônios neste circuito, sugerindo sua possível participação na manutenção destes fenótipos (Graeff et al., 1996; Holmes, 2008). Além disso, muitos fármacos utilizados no tratamento de pacientes com transtornos de humor, ansiedade e pânico tem como alvo primário o sistema serotoninérgico, confirmando o envolvimento da 5-HT na modulação de estados emocionais (Graeff et al., 1996; Nelson e Chiavegatto, 2001).

O sistema serotoninérgico é composto por diferentes tipos de receptores, enzima de síntese da 5-HT e seu transportador. No cérebro de mamíferos foram clonados 14 genes codificadores de receptores da 5-HT, divididos em seis classes de receptores metabotrópicos (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇) e uma classe de receptor do tipo canal iônico (5-HT₃) (Hoyer, Hannon e Martin, 2002) (**Tabela 1**). Os componentes do sistema serotoninérgico que estão presentes em neurônios na área do mesencéfalo encontram-se principalmente em neurônios serotoninérgicos, enquanto que os receptores serotoninérgicos presentes em outras áreas são provenientes predominantemente de neurônios não serotoninérgicos e são denominados heterorreceptores (**Figura 5**).

Figura 5 - Neurotransmissão serotoninérgica em um desenho esquemático de um corte sagital do cérebro de camundongo.

Fonte: Ambar e Chiavegatto (2009) com permissão da autora.

Os receptores 5-HT_{1A} localizam-se predominantemente na região somatodendrítica dos neurônios, são acoplados à proteína G_i que após ativação inibe a adenilil ciclase, reduzindo a formação de AMPc, promovendo a abertura dos canais de potássio (hiperpolarização) e inibindo canais de cálcio (Albert et al., 1990). Pré-sinápticamente, os receptores 5-HT_{1A} são denominados auto-receptores inibitórios dos neurônios serotoninérgicos e encontram-se no mesencéfalo, mais precisamente nos núcleos dorsal e mediano da *raphé*, controlando a liberação da 5-HT para a fenda sináptica (Riad et al., 2000; Sprouse e Aghajanian, 1987). Os receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos são heterorreceptores encontrados mais densamente em neurônios das regiões corticais, núcleo septal, hipocampo podendo modular a liberação de outros neurotransmissores (Chalmers e Watson, 1991; Laporte et al., 1994; Olivier et al., 1999; Pike et al., 1995; Torres-Escalante et al., 2004). No hipotálamo, este receptor participa da regulação da função neuroendócrina e da resposta ao estresse associado ao eixo límbico-hipotálamo-pituitária-adrenal (Morley-Fletcher et al., 2004; Osei-Owusu et al., 2005).

Alguns fármacos utilizados no tratamento da ansiedade apresentam atividade agonista do receptor 5-HT_{1A}. Estudos pré-clínicos utilizando animais geneticamente modificados nos quais o gene para este receptor encontrava-se desativado, ou seja, em animais nocaute para o receptor 5-HT_{1A} (*knockout*, 5-HT_{1A}^{-/-}) verificaram um fenótipo ansiogênico e antidepressivo nesses animais, confirmando resultados obtidos em estudos farmacológicos (Artigas et al., 1996; Heisler et al., 1998; Parks et

al., 1998; Picazo, López-Rubalcava e Fernández-Guasti, 1995). Os receptores 5-HT_{1A} são amplamente estudados devido a sua importante função regulatória sobre a neurotransmissão serotoninérgica. O processo de dessensibilização de auto-receptores 5-HT_{1A} pode ocorrer com o uso crônico de antidepressivos, que possivelmente contribui para a ocorrência de processos neuroadaptativos associados ao efeito terapêutico (Albert e Lemonde, 2004; Banasr et al., 2004). Há evidências de que o uso de antagonista para este receptor associado a um fármaco antidepressivo parece potencializar a resposta terapêutica em humanos deprimidos. Este efeito parece ser devido ao bloqueio da redução da concentração de 5-HT que ocorre no início do tratamento com antidepressivos (Blier et al., 1995).

Os receptores do tipo 5-HT_{1B}, de forma semelhante aos receptores 5-HT_{1A}, apresentam ação inibitória sobre a adenilil ciclase quando ativados, localizando-se predominantemente na região pré-terminal dos axônios (Adham et al., 1992; Riad et al., 2000). Pré-sinápticamente, os auto-receptores 5-HT_{1B} localizam-se nos núcleos da *raphé*, reduzindo a liberação da 5-HT (Davidson e Stamford, 1995). Pós-sinápticamente, os heterorreceptores 5-HT_{1B} encontram-se amplamente distribuídos no SNC, localizando-se em maior densidade em áreas como núcleo caudado, globo pálido e substância *nigra* (Vergé et al., 1986). Há evidências de que a ativação pré e pós-sinápticas dos receptores 5-HT_{1B} influenciam de forma direta ou indireta a liberação de outros neurotransmissores, como a dopamina, GABA e acetilcolina em diferentes regiões cerebrais (Cassel et al., 1995; Johnson, Mercuri e North, 1992; Lyer e Bradberry, 1996).

Estudos pré-clínicos com agonistas 5-HT_{1B} observaram redução da agressividade de maneira seletiva em roedores, sugerindo que este receptor seja um possível alvo terapêutico no futuro (Chiavegatto et al., 2001; Miczek et al., 2002; Miczek et al., 2004; Nelson e Chiavegatto, 2001;). Este papel no comportamento agressivo foi confirmado em investigação utilizando camundongos mutantes nulos 5-HT_{1B}^{-/-}, que apresentaram fenótipo agressivo, além de redução no comportamento ansioso quando comparados aos animais *wild-types* (Zhuang et al., 1999). Investigações utilizando técnicas farmacológicas e genéticas sugeriram envolvimento do receptor 5-HT_{1B} na vulnerabilidade ao abuso de drogas, como ingestão de etanol e cocaína, provavelmente através de uma ação indireta no sistema dopaminérgico (Hoplight, Sandygren e Neumaier, 2006; Pentkowski et al., 2009). Em humanos, estudo de diferentes variações genéticas do receptor 5-HT_{1B}

associou este receptor a um perfil antissocial, acompanhado de predisposição ao alcoolismo (Laplainen et al., 1998).

Tabela 1 - Componentes da via serotoninérgica, localização encefálica e principais comportamentos relacionados

(continua)

Componentes do sistema serotoninérgico	Mecanismo de transdução celular	Localização encefálica mais abundante	Principais comportamentos relacionados
5-HT_{1A}	Proteína G _i , Inibição da adenilil ciclase, ↓ [AMPc]	Núcleos da <i>raphé</i> , córtex, núcleo septal e hipocampo	Ansiedade, depressão e resposta ao estresse
5-HT_{1B}	Proteína G _i , Inibição da adenilil ciclase, ↓[AMPc]	Núcleos da <i>raphé</i> , núcleo caudado, globo pálido e substância nigra	Agressividade, ansiedade e vulnerabilidade ao abuso de drogas
5-HT_{2A}	Proteína G _q , estimulação da fosfolipase C, ↑[IP ₃] e [Ca ²⁺]	Córtex, sistema olfatório, hipocampo, núcleos da base, amígdala, diencéfalo, cerebelo e tronco encefálico	Ansiedade, depressão, esquizofrenia e resposta ao estresse
5-HT_{2C}	Proteína G _q , estimulação da fosfolipase C, ↑[IP ₃] e [Ca ²⁺]	Córtex, hipocampo, estriado, substância nigra e plexo coroidal	Comportamento alimentar, ansiedade e resposta ao estresse
5-HT₃	Canal iônico, influxo de cátions, processo excitatório	Complexo vagal dorsal do tronco encefálico, áreas límbicas e extrapiramidais	Ansiedade, pânico, depressão, abuso de drogas e resposta ao estresse
5-HT₄	Proteína G _s , estimulação da adenilil ciclase, ↑[AMPc]	Gânglio basal, hipocampo e córtex	Depressão e comportamento alimentar

Tabela 1 - Componentes da via serotoninérgica, localização encefálica e principais comportamentos relacionados

(conclusão)

Componentes do sistema serotoninérgico	Mecanismo de transdução celular	Localização encefálica mais abundante	Principais comportamentos relacionados
5-HT_{5A}	Proteína G _i , Inibição da adenilil ciclase, ↓ [AMPc],	Núcleos da <i>raphé</i> , córtex cerebral, amígdala, hipotálamo e núcleo supraquiasmático	Possível participação no controle do ritmo circadiano, humor, e na patofisiologia da esquizofrenia
5-HT₆	Proteína G _s , estimulação da adenilil ciclase, ↑[AMPc]	Estriado, tubérculo olfatório, núcleo <i>accumbens</i> e hipocampo	Sono, processos cognitivos, depressão e ansiedade, doença de Alzheimer e depressão bipolar
5-HT₇	Proteína G _s , estimulação da adenilil ciclase, ↑[AMPc]	Córtex, hipocampo, tálamo, hipotálamo e núcleo supraquiasmático	Controle do ritmo circadiano, termorregulação, sono, memória e aprendizagem, ansiedade, depressão e esquizofrenia
Tph2	Promove hidroxilação do triptofano	Núcleos da <i>raphé</i>	Depressão, suicídio, ansiedade e autismo
5-HTT	Transporte de 5-HT	Ampla distribuição cerebral	Depressão, ansiedade, medo, agressividade, resposta ao estresse e cognição

Os receptores 5-HT_{2A} estão envolvidos predominantemente no processo de excitação neuronal, tratam-se de receptores acoplados à proteína G_q, que na presença de agonistas, ativam a fosfolipase C, aumentando a concentração intracelular de inositol trifosfato e cálcio (Pritchett et al., 1988). Estes receptores apresentam ampla distribuição no SNC, sendo encontrados em regiões como o sistema olfatório, hipocampo, núcleos da base, amígdala, diencéfalo, cerebelo, tronco encefálico e em maior densidade no córtex cerebral (Cornea-Hébert et al., 1999). Estudos farmacológicos do receptor 5-HT_{2A} verificaram a participação deste

receptor na modulação de neurônios glutamatérgicos e gabaérgicos, contribuindo para o processo de excitação ou inibição neuronal (Liu, Jolas e Aghajanian, 2000; Scruggs et al., 2000). Adicionalmente, investigações utilizando agonistas deste receptor observaram aumento na liberação de dopamina e corticosterona (Hemrick-Luecke e Evans, 2002; Pehek et al., 2006).

Estudo com animais nocaute para o gene deste receptor (5-HT_{2A}^{-/-}) observou uma redução em comportamentos relacionados à ansiedade, porém sem alteração naqueles relacionados à depressão (Weisstaub et al., 2006). Entretanto, uma investigação de variação genética do receptor 5-HT_{2A} descrita em humanos com diagnóstico de depressão foi associada a uma predisposição ao comportamento suicida (Arias et al., 2001). Além disso, os receptores 5-HT_{2A} são reconhecidamente sítios de ação de alucinógenos como o ácido lisérgico (LSD), e alvo de alguns antidepressivos e antipsicóticos atípicos (Aghajanian e Marek, 1999).

Os receptores metabotrópicos 5-HT_{2C}, após ativação de forma semelhante aos receptores 5-HT_{2A}, aumentam a atividade da fosfolipase C, elevando a concentração intracelular de cálcio (Pritchett et al., 1988). Estes receptores são amplamente distribuídos e podem ser encontrados em áreas como córtex cerebral, hipocampo, estriado, substância *nigra* e plexo coroidal (Abramowski et al., 1995). Investigação utilizando agonista inverso do receptor 5-HT_{2C} observou uma atividade basal constitutiva significativa deste receptor (De Deurwaerdere et al., 2004). A sua ativação, diferentemente de outros receptores serotoninérgicos, está relacionada à inibição de neurônios dopaminérgicos, provavelmente através da ativação de neurônios gabaérgicos. Este efeito poderia contribuir para o tratamento de patologias como esquizofrenia, doença de Parkinson, abuso de drogas, depressão e ansiedade (Alex et al., 2005). Com a geração dos camundongos nocaute para o gene 5-HT_{2C}, observou-se aumento na ingestão alimentar e na excitabilidade neuronal com predisposição a ataques epiléticos nestes animais mutantes, sendo estes resultados confirmados em estudos farmacológicos (Tecott et al., 1995). Adicionalmente, os animais 5-HT_{2C}^{-/-} apresentaram uma redução do comportamento ansioso e da ativação do eixo HPA (Heisler et al., 2007a, 2007b).

Os receptores 5-HT₃, subdivididos em 5-HT_{3A} e 5-HT_{3B}, pertencem à classe de receptores serotoninérgicos do tipo canal iônico, diferente das outras classes que são compostos por receptores acoplados à proteína G (Davies et al., 1999; Derkach, Suprenant e North, 1989). O processo de ativação destes receptores envolve o

influxo de cátions, com consequente surgimento de processo excitatório (Derkach, Suprenant e North, 1989). Os receptores 5-HT₃ encontram-se distribuídos em maior densidade em núcleos pertencentes ao complexo vagal dorsal do tronco encefálico, e em menor densidade em áreas límbicas e extrapiramidais (Parker, Bentley e Barnes, 1996). A modulação alostérica do receptor 5-HT₃ por outras substâncias, tais como álcool e anestésicos, pode ocorrer através de ligação a um sítio distinto, de forma semelhante a outros receptores de canais iônicos (Parker et al., 1996). Estudos farmacológicos evidenciaram a possibilidade deste receptor modular diretamente, ou indiretamente, a atividade neuronal de outros sistemas, tais como dopaminérgicos, colinérgicos e gabaérgicos (Díez-Ariza et al., 1998; Porras et al., 2003).

O antagonista do receptor 5-HT₃, ondansetrona, é utilizado nos tratamentos de náuseas e vômitos, também o antagonismo deste receptor tem despertado interesse em investigações pré-clínicas e clínicas, em uma possível eficácia no tratamento de psicopatologias como ansiedade, pânico e depressão (Freeman et al., 1997; Nakagawa, Ishima e Takashima, 1998; Schneier et al., 1996). Estudos comportamentais utilizando camundongos com deleção para o gene da subunidade 3A confirmaram o perfil ansiolítico obtido em estudos farmacológicos com antagonistas do receptor 5-HT₃, além de verificarem uma atenuada resposta do eixo HPA em situações estressantes (Bhatnagar et al., 2004; Costall et al., 1993; Kelley, Bratt e Hodge, 2003). Investigações em animais e humanos observaram o envolvimento do receptor 5-HT₃ na liberação de dopamina no sistema mesolímbico e possivelmente uma participação na dependência induzida por drogas de abuso e etanol (Campbell e McBride, 1995; Chu et al., 2009; Myrick et al., 2008).

Os receptores metabotrópicos 5-HT₄, quando ativados estimulam a adenilil ciclase, elevando a concentração de AMPc intracelular, promovendo a fosforilação de diversas proteínas (Claeysen, Sebben e Journot, 1996). Estes receptores estão distribuídos em maior densidade na região dos núcleos da base e hipocampo e em menor densidade no córtex (Varnäs et al., 2003). Estudo recente com animais 5-HT₄^{-/-} verificou a existência de mudanças adaptativas em neurônios serotoninérgicos nos núcleos da *raphé*, associadas a uma redução na concentração de 5-HT tecidual. Estes resultados sugerem uma possível participação deste receptor no processo de retroalimentação do sistema serotoninérgico (Conductier et al., 2006). Adicionalmente, investigações farmacológicas e moleculares em roedores

observaram um possível envolvimento deste receptor nos comportamentos relacionados à depressão e regulação da ingestão alimentar (Jean et al., 2007; Tamburella et al., 2009).

O receptor 5-HT₅ é subdividido em 5-HT_{5A} e 5-HT_{5B}, porém em humanos o receptor 5-HT_{5B} demonstrou não ser funcional devido à interrupção na síntese protéica por um *códon* de parada, originando uma proteína não funcional (Grailhe, Grabtree e Hen, 2001). O mecanismo de ação do receptor 5-HT_{5A} ainda não é bem compreendido, porém há evidências de que trata-se de um receptor acoplado a proteína G_i e sua ativação tem como consequência a inibição da atividade da adenilil ciclase (Grailhe, Grabtree e Hen, 2001; Thomas et al., 2004). O subtipo 5-HT_{5A} apresenta ampla distribuição cerebral e em maior densidade em áreas como núcleos da *raphé*, córtex cerebral, amígdala, hipotálamo e núcleo supraquiasmático (Oliver et al., 2000). Um estudo farmacológico em cobaia (*guinea pig*) demonstrou a possibilidade da participação do receptor 5-HT_{5A} no processo de retroalimentação negativa do sistema serotoninérgico, funcionando provavelmente como auto-receptor (Thomas et al., 2006). São raros os estudos farmacológicos realizados até o momento para estes receptores, devido à escassa disponibilidade de ligantes seletivos. Com a criação dos animais 5-HT_{5A}^{-/-} foi possível observar uma elevação na atividade locomotora e exploratória, sem alterações em parâmetros relacionados à ansiedade (Grailhe et al., 1999). Este estudo ainda evidenciou a possibilidade de que o receptor 5-HT_{5A} seja um sítio de ação para agentes alucinógenos (Grailhe et al., 1999). Investigações em humanos e animais indicam uma possível participação deste receptor no controle do ritmo circadiano, humor e na patofisiologia da esquizofrenia (Birkett et al., 2000; Gannon, Peglion e Millan, 2009).

Os receptores 5-HT₆, de forma semelhante aos receptores 5-HT₄, são acoplados à proteína G_s, que estimulam a adenilil ciclase, aumentando a concentração intracelular de AMPc (Ruat et al., 1993a). Os receptores 5-HT₆ são distribuídos em maior densidade em regiões do estriado, tubérculo olfatório, núcleo *accumbens* e hipocampo (Ruat et al., 1993a). Estudos farmacológicos em animais indicam possível participação deste receptor no controle do sono, processos cognitivos, depressão e ansiedade (Lieben et al., 2005; Morairty et al., 2008; Svenningsson et al., 2007; Wesolowska, 2008). Investigações em humanos evidenciaram uma correlação do receptor 5-HT₆ com doença de Alzheimer e transtorno bipolar (Lorke et al., 2006; Vogt et al., 2000).

Os receptores metabotrópicos 5-HT₇, após ativação, aumentam a atividade da adenilil ciclase com consequente acúmulo de AMPc (Ruat et al., 1993b). Estes receptores podem ser encontrados em maior densidade em áreas como córtex, hipocampo, tálamo, hipotálamo e núcleo supraquiasmático (Neumaier et al., 2001). Há evidências de que o receptor 5-HT₇ esteja envolvido no controle de processos fisiológicos, tais como ritmo circadiano, termorregulação, sono e no processo de memória e aprendizagem (Eriksson et al., 2008; Glass et al., 2003; Hedlund et al., 2004; Thomas et al., 2003). Estudos pré-clínicos utilizando técnicas farmacológicas e moleculares indicaram o envolvimento do receptor 5-HT₇ na modulação de transtornos psiquiátricos como ansiedade, depressão e esquizofrenia (Galici et al., 2008; Sarkisyan, Roberts e Hedlund, 2010; Wesolowska et al., 2006).

A enzima de biossíntese da 5-HT é a triptofano hidroxilase (Tph), que atua como passo limitante da reação, promovendo a hidroxilação do triptofano. Esta enzima apresenta duas isoformas, Tph1 e Tph2, codificadas por genes distintos. A proteína Tph2 é detectada exclusivamente no cérebro, enquanto que a Tph1 é encontrada no cérebro e também de forma abundante em tecidos periféricos (Walther e Bader, 2003). Estudos dos transcritos para o gene Tph2 em roedores e em humanos demonstraram que os RNAm do gene Tph2 são expressos de forma predominante nos núcleos da *raphé* e em maior quantidade do que o gene Tph1 (Patel, Pontrello e Burke, 2004; Zill et al., 2007). Estes resultados foram confirmados em camundongos Tph2^{-/-} que apresentaram depleção de 5-HT em neurônios da *raphé*, porém sem alterações morfológicas em fibras neuronais serotoninérgicas (Gutknecht et al., 2008). Adicionalmente, estudo utilizando animais duplo nocaute Tph1^{-/-}/Tph2^{-/-} e animais Tph2^{-/-}, demonstrou que estes animais são viáveis, mesmo com redução acentuada da 5-HT (Savelieva et al., 2008). Surpreendentemente, estes animais apenas apresentaram alterações fisiológicas e comportamentais sutis, sugerindo que a 5-HT talvez não tenha um papel tão crucial na etapa do desenvolvimento animal (Savelieva et al., 2008). Entretanto, estes resultados ainda necessitam de replicações independentes e investigações adicionais.

A depleção da 5-HT, através do processo de inibição irreversível da enzima de síntese Tph2, bloqueia o efeito antidepressivo de inibidores seletivos da recaptura da 5-HT (ISRS) em roedores, demonstrando sua importante participação no mecanismo de ação desta classe de antidepressivos (Page et al., 1999). Polimorfismos no gene que expressa Tph2 em roedores foram relacionados à

redução da concentração de 5-HT no SNC (Zhang et al., 2004). Investigações em humanos encontraram correlações entre variações genéticas no gene da Tph2 com aumento da incidência de casos clínicos de depressão e suicídio (Zill et al., 2004a, 2004b), com o risco de desenvolver quadro de ansiedade/depressão em mulheres em período peri-parto (Lin et al., 2009), bem como com a ocorrência de autismo (Coon et al., 2005).

A proteína transportadora da 5-HT, 5-HTT age como um mecanismo regulador chave na neurotransmissão serotoninérgica, responsável pela recaptura da 5-HT após sua liberação na fenda sináptica, controlando assim sua concentração extra-sináptica. Esta proteína apresenta ampla distribuição no SNC, com exceção do cerebelo, onde é mais escasso (Kish et al., 2005). O tratamento de diversas psicopatologias tem como alvo primário a 5-HTT, muito embora os mecanismos associados a estes efeitos terapêuticos ainda permanecem obscuros e sob intensa investigação.

Animais 5-HTT^{-/-} demonstraram ser viáveis e sem alterações anatomicas (Bengel et al., 1998), porém apresentaram uma elevação na concentração de 5-HT extracelular em áreas como estriado e córtex frontal (Mathews et al., 2004). Estudos comportamentais utilizando este modelo animal relataram aumento da ansiedade, redução da depressão e redução da agressividade. Entretanto, estas alterações comportamentais parecem ser dependentes das linhagens dos camundongos utilizados (Holmes et al., 2003; Holmes, Murphy e Crawley, 2002a; Holmes et al., 2002b). Não surpreendentemente, os animais 5-HTT^{-/-} apresentaram refratariedade ao tratamento com ISRS, mas não com fármacos inibidores da recaptura de 5-HT/NA (Holmes, Murphy e Crawley, 2002a). Polimorfismos encontrados na região promotora deste gene em humanos tem sido amplamente estudados e sugerem uma correlação com fenótipos de medo e ansiedade (Hariri et al., 2002), depressão (Caspi et al., 2003) e aumento da atividade do eixo HPA acompanhado de déficit cognitivo em idosos (O'Hara et al., 2007).

Assim, diante das evidências relacionando o uso do 13-*cis*-RA com o desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos e dados experimentais e clínicos controversos, estudos adicionais tornam-se necessários. Como a 5-HT possui um papel importante na neuromodulação e na regulação de vários comportamentos observados nestes pacientes, nossa hipótese é que exista uma interação do 13-*cis*-RA sobre o sistema serotoninérgico *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar em camundongos os efeitos da administração prolongada de doses elevadas do 13-*cis*-RA sobre os comportamentos emocionais, assim como avaliar os níveis de expressão dos transcritos de genes relacionados à neurotransmissão serotoninérgica em diversas áreas encefálicas.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar comportamentos emocionais de camundongos tratados cronicamente com 13-*cis*-RA ou veículo, submetidos a diferentes testes comportamentais como campo-aberto, labirinto em cruz elevado, nado-forçado e preferência por sacarose.
- ✓ Quantificar relativamente os transcritos de genes dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{3A}, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ no mesencéfalo, hipotálamo, córtex pré-frontal e hipocampo através do processo de transcrição reversa seguida do *qPCR*, em camundongos tratados cronicamente com 13-*cis*-RA ou veículo.
- ✓ Quantificar relativamente os transcritos de genes do 5-HTT e Tph2 no mesencéfalo de camundongos tratados cronicamente com 13-*cis*-RA ou veículo, por meio do processo de transcrição reversa seguida do *qPCR*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Casais de camundongos da linhagem C57BL/6, provenientes da colônia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP foram mantidos em nosso biotério no Instituto de Medicina Tropical (IMT) da FMUSP e a partir destes casais obtivemos uma nova colônia. Camundongos machos adolescentes com 30 dias (desmame no 21º dia) foram selecionados de forma a não utilizar mais que dois filhotes da mesma fêmea para conduzir os grupos experimentais, evitando um possível efeito de ninhada. Os animais foram mantidos em grupos de 3 ou 4 por gaiola de polipropileno (28x17x12 cm), recebendo água e comida *ad libitum* em um ciclo de claro-escuro de 12 horas (claro às 7h) e com temperatura ambiente de 22 ± 2 °C. A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com as normas de “Uso de Animais de Laboratório” do centro de Bioterismo da FMUSP, e todo esforço foi feito para minimizar o desconforto dos animais durante o estudo. Este trabalho está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) do ICB, com protocolo registrado sob nº 134 na fl. 64 do livro 02.

3.2 Drogas

Utilizou-se o 13-*cis*-RA que foi obtido da empresa Sigma-Aldrich (CAS 4759-48-2, Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, M.O., EUA). Preparou-se uma solução estoque de 10mg/mL de 13-*cis*-RA diluído em dimetilsulfóxido estétil (DMSO, Sigma-Aldrich), em ambiente com baixa luminosidade. Devido à fotossensibilidade, esta solução foi acondicionada em múltiplos frascos envoltos em papel alumínio e mantidos em freezer à -80 °C. A solução de trabalho foi feita diariamente através da diluição centesimal em solução salina estétil a 0,9% (solução fisiológica) e submetida à homogeneização em vórtex. A solução para o grupo controle consistiu do veículo, ou seja, 1% de DMSO em solução fisiológica. O volume de injeção da solução de trabalho de 13-*cis*-RA ou do veículo foi de 10mL/kg e as seringas foram protegidas com papel alumínio para preservar a estabilidade da droga.

3.3 Delineamento experimental

Os camundongos que se encontravam agrupados em suas gaiolas foram divididos em 2 grupos:

1. **13-*cis*-RA** - Injeção intraperitoneal (*i.p*) diária de 1mg/kg/dia de 13-*cis*-RA, em um tratamento prolongado que variou de 38 à 42 dias conforme a série experimental em 36 animais.
2. **Controle** – Injeção *i.p* diária do veículo (1% DMSO/salina 0,9%) em um tratamento prolongado que variou de 38 à 42 dias conforme a série experimental em 36 animais.

As injeções foram feitas sempre no período da manhã.

Avaliação do comportamento motor e emocional do animal – A bateria de testes comportamentais foi iniciada no 33º dia de tratamento. Todos os testes foram conduzidos no período da tarde entre 14 e 17 horas. Foram utilizados 12 animais do grupo com administração de 13-*cis*-RA e 12 animais do grupo controle. Os experimentos ocorreram na seguinte ordem: campo-aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE) e nado-forçado (NF) (**Figura 6**, série 1). A ordem escolhida para a bateria de testes pretendeu seguir uma ordem crescente de aversividade (Ambar e Chiavegatto, 2009). Apenas um teste comportamental foi realizado por dia e um período mínimo entre testes de 48 horas e um máximo de 72 horas foi utilizado. Em cada dia de teste, os experimentos foram feitos intercalando-se os camundongos do grupo 13-*cis*-RA e veículo. Durante todo este período, os animais continuaram recebendo doses diárias de 13-*cis*-RA ou veículo, até o 38º dia, sendo que nos dias em que foram submetidos aos testes comportamentais, as injeções ocorreram somente após o término do experimento, com objetivo de se evitar a influência de qualquer efeito agudo da droga ou da manipulação. Com o intuito de melhor investigar o comportamento relacionado à depressão, grupos adicionais de animais foram submetidos ao teste de preferência por sacarose (PPS) no 38º dia do tratamento com 13-*cis*-RA ou veículo (**Figura 6**, série 2). Os animais receberam injeções diárias até o 42º dia, quando a administração da droga foi descontinuada por 20 dias e o comportamento relacionado à depressão foi avaliado através do NF no 62º dia.

Expressão gênica: Um dia após a última administração do 13-*cis*-RA ou veículo, ou seja, no 43º dia, outros 12 animais de cada grupo (animais *naïve*, ou seja, não passaram por nenhum procedimento experimental prévio) foram sacrificados por decapitação e imediatamente tiveram o cérebro coletado (**Figura 6**, série 3). O procedimento foi realizado entre 14 e 18 horas, e as seguintes áreas cerebrais: córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo foram dissecadas de maneira cuidadosa, porém rápida sobre placa de *Petri* contendo gelo picado, circundadas por gelo seco, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Os microtubos contendo as amostras cerebrais foram armazenados a -80 °C até o uso.

Série 1 – Bateria de teste comportamentais

Série 2 – Comportamento relacionado à depressão e anedonia

Série 3 – Expressão gênica

Figura 6 - Linha cronológica dos procedimentos experimentais.

3.4 Aspectos fisiológicos e modelos comportamentais

3.4.1 Medida do peso corpóreo dos animais ao longo do tratamento

A medida do peso corpóreo dos animais fornece indícios a respeito do quadro de saúde e bem estar do roedor. Além disto, uma mudança no peso é um achado biológico encontrado em algumas patologias em humanos, como é o caso da depressão. Desta forma, a medida do peso corpóreo dos animais é uma investigação que pode fornecer dados adicionais sobre a ação de um fármaco como o 13-*cis*-RA, que supostamente apresenta efeitos adversos psiquiátricos. Para isto, os animais foram pesados semanalmente com auxílio de um béquer, que foi posicionado sobre uma balança de precisão.

3.4.2 Atividade motora espontânea no Campo-Aberto

O CA é um aparelho utilizado para a avaliação da atividade locomotora espontânea dos camundongos e consiste em uma arena quadrangular de fórmica branca de 60 cm, dividida em 36 quadrantes e com paredes de 30 cm altura (**Figura 7**). Possui uma abertura superior que permite ao observador uma visão global do animal. O nível de luminosidade foi semelhante ao do biotério (aproximadamente 62 lux). O animal foi colocado individualmente no centro da arena, cada sessão teve 5 minutos de duração e foi gravada em videocassete, para verificação posterior do comportamento. O CA foi limpo com uma solução de álcool 5% entre cada animal, para minimizar a influência por odores emitidos pelo animal anterior.

Figura 7 - Animal em um aparelho de campo-aberto.

Os parâmetros avaliados foram (conforme Ambar e Chiavegatto, 2009; Bibancos et al., 2007):

- a) frequência de locomoção, determinada através da contagem dos quadrantes nos quais o animal esteve com as quatro patas;

- b) frequência de levantar, ou seja, o número de vezes em que o camundongo ficou apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tocando ou não as paredes com as patas anteriores;
- c) latência para deixar os quadrantes centrais do CA;
- d) permanência nos 20 quadrantes adjacentes às paredes da arena.

O objetivo principal deste teste é avaliar a atividade motora e exploratória do animal, através do número de quadrantes percorridos e da frequência de levantar. Entretanto, possibilita também observar comportamentos relacionados à ansiedade e medo, devido ao conflito do roedor entre o estímulo de explorar um ambiente novo e o medo gerado por ambientes abertos e claros. Isto é avaliado através da comparação entre a exploração no centro do CA (região aversiva) e na periferia, ou seja, quadrantes próximos às paredes do CA que representam regiões mais seguras ao animal (Archer, 1973).

3.4.3 Comportamento relacionado à ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado

O comportamento relacionado à ansiedade foi avaliado através da utilização do LCE, construído a partir do descrito em Lister em 1987, com pequenas modificações (**Figura 8**).

Figura 8 - Animal em um aparelho de labirinto em cruz elevado.

O aparato consiste em dois braços abertos e dois braços fechados de madeira recoberto por fórmica preta, cada braço apresenta 30 cm de comprimento e 5 cm de largura, estando a 50 cm do solo. Adicionalmente, os braços fechados possuem paredes de 15 cm de altura, e os braços abertos um pequeno degrau de 0,5 cm para minimizar possíveis quedas do camundongo. O ponto onde os braços se cruzam é formado por uma arena central de 5x5 cm, onde o animal é colocado,

de frente para o braço aberto. Seu comportamento foi observado e gravado por 5 minutos e o nível de luminosidade foi similar ao do biotério.

Os parâmetros avaliados foram (conforme Ambar e Chiavegatto, 2009; Bibancos et al., 2007):

- a) latência para a fuga da área central;
- b) frequência de entradas com as quatro patas em cada braço;
- c) frequência de transições entre os braços;
- d) permanência em cada braço;
- e) tentativas de entrar no braço aberto;
- f) frequência de mergulhar a cabeça no braço aberto ("head dipping").

O LCE é um aparelho que induz o surgimento de uma situação de conflito no roedor, entre a tendência de explorar os braços do labirinto (ambiente novo) e a esquiva (interpretada com medo ou insegurança) ao ambiente aberto, estreito e elevado representado pelos braços abertos. Neste sentido, a análise do padrão de exploração dos braços fechados (região segura) e abertos (região aversiva), permite avaliar o comportamento relacionado à ansiedade nos animais.

3.4.4 Comportamento relacionado à depressão no Teste do Nado-forçado (Porsolt)

O teste do NF é um modelo farmacológico validado para avaliar comportamentos associados à depressão em ratos (Detke e Lucki, 1996; Porsolt et al., 1978) e camundongos (Lucki, Dalvi e Mayorga, 2001; Porsolt et al., 1977a) (**Figura 9**).

Figura 9 - Animal submetido ao teste do nado-forçado.

Os animais foram colocados individualmente, pela cauda, em um cilindro de vidro de 24 cm de profundidade e 17 cm de diâmetro, preenchido com 19 cm de água à $25 \pm 0,5$ °C (**Figura 9**). Os testes tiveram duração de 6 minutos e foram filmados em fitas de videocassete. A medida comportamental foi feita nos últimos 4 minutos do teste, já que durante os primeiros 2 minutos o comportamento de imobilidade dificilmente é observado (Porsolt et al., 1977b).

Os parâmetros analisados foram:

- a) duração de imobilidade (somente os movimentos mínimos necessários para a flutuação);
- b) duração do nado (movimento das patas anteriores e posteriores dentro da água).

O NF é um teste comportamental que induz um estresse do tipo inescapável no roedor, o qual após um período inicial de atividade vigorosa na tentativa de escapar adota uma postura imóvel. A administração de antidepressivos reduz o tempo de imobilidade (Porsolt et al., 1977b). Desta forma, trata-se de um teste utilizado normalmente na triagem de novos fármacos com possível potencial antidepressivo.

3.4.5 Comportamento de anedonia no Teste de Preferência por Sacarose

A anedonia pode ser definida como incapacidade de sentir prazer diante de um estímulo prazeroso e trata-se de um dos sintomas descritos na depressão (American Psychiatric Association, 2000). Em modelo animal este comportamento pode ser estudado através do teste de PPS, já que soluções adocicadas normalmente eliciam um comportamento hedônico (prazeroso) em roedores (Leeb, Parker e Eikelboom, 1991).

O teste de PPS consistiu na quantificação da porcentagem de preferência do animal por sacarose, ao invés de água. O procedimento experimental foi realizado segundo a metodologia descrita por Pothion et al. (2004) com pequenas modificações feitas por nós. Desta forma, no final da tarde do 35º dia os animais foram alojados em gaiolas individuais e submetidos a um período de habituação de 24 horas com dois bebedouros contendo água que foram posicionadas ao redor da ração (no lado direito ou esquerdo da caixa). Após 24 horas, no 36º dia um dos bebedouros contendo água foi substituído por outro contendo uma solução de

sacarose 2% (Synth, Diadema, S.P., Brasil) e um período de habituação de 24 horas com a solução adocicada foi oferecido aos animais. No final da tarde do 37º dia deu início a avaliação do consumo de fluidos e após 24 horas no 38º dia, o consumo de água e solução de sacarose 2% foi quantificado através da diferença do volume de líquido inicial e final, afim de se obter o volume ingerido de cada bebedouro. Assim, a PPS foi obtida através da seguinte fórmula: $\text{Preferência (\%)} = [\text{sacarose ingerida (mL)} / \text{total de fluido ingerido (mL)}] \times 100$. Diariamente, os bebedouros foram trocados e uma nova solução de sacarose foi feita. Com o intuito de evitar a possibilidade de o animal ingerir mais líquido de um bebedouro, em detrimento do outro devido à localização, a posição dos bebedouros foi invertida de 12 em 12 horas.

3.5 Preparação das amostras para determinação da expressão gênica

3.5.1 Extração do RNA Total

O RNA total foi extraído com reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, C.A, EUA), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante, com pequenas modificações.

Os tecidos cerebrais congelados foram rapidamente imersos em 1mL de TRIzol gelado, homogeneizados por 30 segundos (Polytron PT10/35- Brinkmann, NY) e incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos, para promover a dissociação de complexos nucleoprotéicos.

Em seguida, 200µL de clorofórmio (Merck Inc., Darmstadt, Hessen, Alemanha) foi adicionado, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas à 12.000g, 4 °C, durante 15 minutos. O sobrenadante (fase aquosa) contendo RNA foi coletado e adicionou-se 0,5mL de álcool isopropílico (Merck), promovendo precipitação do RNA. O material foi incubado durante 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugado à 12.000g, 4 °C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi removido e a fração precipitada de RNA foi lavada com etanol (Merck) e centrifugada à 7.500g, 4 °C, durante 5 minutos. O precipitado obtido foi então ressuspensionado em 25µL de água livre de RNases/DNases (Gibco, Grand Island, N.Y., EUA). A concentração e a pureza das amostras foram verificadas em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Mass, EUA) e preparações com uma razão de densidade óptica 260/280nm < 1,7 (um dos critérios de pureza da amostra) foram descartadas.

Adicionalmente, foi feito um gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, C.A, EUA) para certificar-se da integridade do material (**Figura 10**). As soluções de RNA foram armazenadas em freezer à -80 °C até o uso.

Figura 10 - Verificação da integridade do RNA em gel de agarose 1%.

3.5.2 Síntese do DNA complementar (DNAC)

A síntese do DNAC, ou seja, uma reação de transcrição reversa, foi feita utilizando-se 2µg do RNA total, 4µL de buffer 5X (250mM de Tris-HCl pH 8,3; 375mM KCl e 15mM de MgCl₂), 1 µL de DTT 0,1M, 0,5µg de *primer* oligo(dT) (Invitrogen), 0,5mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP, 40U da enzima Rnase OUT (Invitrogen) e 200U da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), em um volume total de 20µl de água isenta de RNases e DNases. Inicialmente, o RNA foi aquecido a 65 °C por 5 minutos e colocado no gelo até adição dos demais componentes. A reação foi incubada à 50 °C por 1 hora e interrompida pelo aquecimento à 70 °C por 15 minutos. As soluções de DNAC foram armazenadas em freezer à -80 °C até o uso. Esta reação teve como objetivo principal promover a transcrição reversa do RNAm.

3.5.3 Procedimento para síntese de oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene de interesse dos camundongos (*Mus musculus*) e para genes candidatos a controle interno (genes com expressão similar entre os tratamentos, definido como genes de referência), foram desenhados utilizando-se o software Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), sua especificidade foi verificada através do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e a qualidade confirmada no programa Netprimer (www.premierbiosoft.com/netprimer). Os oligonucleotídeos foram obtidos da IDT (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, I.A., EUA). Os parâmetros teóricos utilizados na confecção consideraram: a) temperatura de

anelamento em torno de 60 °C; b) tamanho máximo do produto de até 180 pb; c) porcentagem GC em torno de 50%; d) preferência por regiões situadas em diferentes exons (exceto para os genes Htr1a e Htr1b que apresentam apenas 1 exon); e) tamanho do iniciador de no máximo 21 pb.

3.6 Reação em cadeia de polimerases (PCR) em Tempo Real

As reações de PCR quantitativo em tempo real (*qPCR*) foram feitas no equipamento *Rotor Gene 3000* (Corbett Research, Concord, Australia). A quantificação no *qPCR* é feita através do Cq (ciclo de quantificação) para cada amostra, que é o número de ciclos necessários para que a fluorescência emitida pela amostra alcance uma linha de detecção arbitrária (*threshold*), que está presente na fase exponencial da reação no qual a linearidade é mantida. É nesta fase que o resultado e a eficiência da reação são obtidos, e a fluorescência adquirida é proporcional ao número inicial de cópias da amostra. As reações continham 1 µL de amostra (DNAc), 200nM de iniciadores senso e antisenso, sais, deoxinucleotídeos, a enzima *AmpliTaq Gold* DNA polimerase (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), o composto fluorescente *Sybr Green I* otimizados para um volume final de 20µL. Para a escolha da concentração ideal de DNAc a ser amplificado, confeccionou-se uma curva padrão de amplificação, contendo 5 pontos de uma diluição seriada (50ng, 25ng, 12,5ng, 6,25ng, 3,125ng) para cada par de primer e em cada região cerebral. Após a análise desta curva, a diluição que apresentou maior eficiência foi escolhida para a concentração de trabalho. As reações foram incubadas inicialmente à 95 °C por 10min para a ativação da enzima DNA polimerase, seguidas por 40 ciclos de: a) 15 segundos à 95 °C para desnaturação, b) 60 segundos à 60 °C para anelamento, extensão e coleta do sinal de fluorescência. Para cada corrida foram feitos os controles negativos: NTC (ausência de DNAc) e uma amostra de RNA total (controle negativo para verificar a possível presença de DNA genômico). As amostras referentes ao grupo controle e experimental, para cada gene, foram processadas sempre na mesma corrida, ou seja, na mesma série de microtubos e em triplicata. Após o término de cada corrida, a especificidade do produto de PCR formado foi determinada através de uma corrida de dissociação (95 °C por 15 segundos, estabilização à 60 °C seguida de aumento gradual de temperatura de 2 °C por minutos). Assim, somente foram utilizados os

iniciadores cujos produtos amplificados mostraram pico único, claro e bem definido na temperatura correta.

3.7 Busca “*in silico*” de elementos responsivos ao ácido retinóico (RARE)

O RARE é um *cis*-elemento que está presente na região promotora de determinados genes e quando ativados podem modular a expressão destes genes. Desta forma, as alterações transcricionais serotoninérgicas observadas no presente trabalho poderiam ocorrer através da interação do receptor heterodimérico RXR-RAR ativado com RARE (ação direta) ou através de ações indiretas, cujos mecanismos permanecem ainda pouco conhecidos. Realizamos um estudo *in silico* de regiões promotoras dos genes relacionados ao sistema serotoninérgico investigados no presente trabalho. Vale ressaltar que tal estudo não permite inferir quanto à efetiva funcionalidade do RARE em ativar o processo de transcrição gênica, necessitando para isto estudos funcionais adicionais.

Primeiramente, selecionou-se em torno de 1000 pares de bases antes do códon sinalizador do início da tradução (ATG) para cada gene (*Htr1a*, *Htr1b*, *Htr2a*, *Htr2c*, *Htr3a*, *Htr4*, *Htr5a*, *Htr6*, *Htr7*, *Slc6a4* e *Tph2*), utilizando a ferramenta de *BLAST* para sequências de camundongo (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Estas sequências foram utilizadas para posterior análise *in silico*.

O RARE é composto por uma repetição de 6 nucleotídeos, geralmente presente na forma de (A/G)G(G/T)TCA com as seguintes variações: AGGTCA, GGGTCA, AGTTCA, GGTTCa e suas formas palindrômicas. Ou ainda em uma forma mais “relaxada” (A/G)G(G/T)(G/T)(G/C)A com as seguintes variações: AGGGGA, AGGGCA, AGGTGA, AGGTCA, AGTGGA, AGTGCA, AGTTGA, AGTTCA, GGGGGA, GGGGCA, GGGTGA, GGGTCA, GGTGGA, GGTGCA, GGTTGA, GGTTCA e suas formas palindrômicas (Balmer e Blomhoff, 2005). Estas sequências normalmente encontram-se separadas por 1, 2 ou 5 nucleotídeos, originando o RARE (Bastien e Rochette-Egly, 2004). A análise *in silico* da região promotora dos genes foi realizada de forma simplificada utilizando ferramenta do *Microsoft Word*. Desta forma, genes que apresentaram a repetição do elemento de resposta separados por 1, 2 ou 5 nucleotídeos, foram considerados como genes que possivelmente possuam o RARE. A estratégia adotada neste estudo apresenta as seguintes limitações: o RARE pode ainda estar presente em regiões diferentes dos

1000 pares de base selecionados; o RARE pode possuir trocas de nucleotídeos em suas sequências e ainda assim permitir a ligação do fator de transcrição e a sequência que compõe o RARE é muito semelhante à de outros *cis*-elementos como os elementos responsivos à vitamina D₃ e hormônio da tireóide.

4 CRITÉRIOS PARA ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 Análise da expressão gênica relativa

A técnica de *qPCR* foi utilizada para a análise da expressão relativa de diferentes genes da via serotoninérgica. O equipamento utilizado possui um programa denominado *RG-3000* (*Corbett Research, Concord, Austrália*), o qual foi utilizado para gerar a curva padrão de cada produto de amplificação, as curvas de dissociação, bem como suas respectivas análises. As análises de expressão relativas foram feitas utilizando programa Excel (*Microsoft*), seguindo metodologia descrita por Vandesompele et al. (2002). Através da média das triplicatas dos Cq obtidos para cada amostra e o valor de eficiência da amplificação, foi possível converter os dados obtidos de escala logarítmica para escala linear. Eficiências das reações de amplificação entre 92% e 100% foram utilizadas, acompanhadas de coeficientes de correlação superiores a 0,97. Os genes de referência utilizados no processo de normalização dos genes de interesse foram obtidos através do programa *geNorm applet versão 3.4* (Vandesompele et al., 2002), o qual a partir de comparações pareadas sugere os transcritos com maior estabilidade para cada região cerebral. Desta forma, a quantidade final normalizada de cada gene de interesse foi obtida através da divisão de seu valor absoluto pela média geométrica dos valores absolutos dos genes de referência selecionados.

4.2 Análise estatística

Todos os resultados obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises foram feitas utilizando os programas estatísticos SPSS (versão 13.0.0, Chicago, I.L., EUA) e GraphPad InStat (versão 3.05, GraphPad Software, San Diego, C.A., EUA). Os resultados foram analisados com relação a normalidade de distribuição dos dados numéricos (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Teste *F*). Desta forma, para análise dos resultados que apresentavam distribuição paramétrica foi utilizado teste *t* de Student, para os não paramétricos foi utilizado o teste *U* de Mann-Whitney. Para a análise de dados obtidos em porcentagem, primeiro foi feita uma transformação (arco seno ($\sqrt{\%/100}$)) e posteriormente os resultados foram analisados através do teste *t* de Student ou através do teste *U* de Mann-Whitney. A evolução semanal do ganho de peso dos

animais de ambos grupos experimentais foi analisada através do teste de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc* Bonferroni de múltiplas comparações. A probabilidade de $p < 0,05$ foi utilizada para revelar diferença estatisticamente significativa entre os grupos comparados.

5 RESULTADOS

Os experimentos comportamentais e moleculares foram realizados em séries de camundongos diferentes. Portanto, para a análise molecular foram utilizados grupos adicionais controle e 13-*cis*-RA, para que os resultados de expressão gênica obtidos refletissem apenas o tratamento farmacológico, sem qualquer manipulação comportamental.

5.1 Aspectos fisiológicos e comportamentais

5.1.1 Medida do peso corpóreo dos animais ao longo do tratamento

Os animais foram pesados semanalmente no mesmo período do dia, desde o início do tratamento. Os pesos iniciais foram: grupo controle (n=12) 13,5 g e grupo 13-*cis*-RA (n=12) 13,8 g. Não foi observada influência do tratamento no ganho de peso corporal, assim os grupos controle e 13-*cis*-RA tiveram um padrão de ganho de peso muito semelhante durante o período estudado (ANOVA fator tratamento: $F_{(1,22)}=1,029$, $p>0,05$). Por outro lado, a análise estatística do ganho de peso em relação aos dias de tratamento, mostrou um aumento gradativo ocorrido a cada semana nos animais de ambos os grupos (fator tempo (dias): $F_{(5,110)}=129,97$, $p<0,001$; e ausência de interação entre as variáveis: $F_{(5,110)}=0,108$, $p>0,05$; **Figura 11**).

Figura 11 - Efeito do tratamento prolongado com o ácido 13-*cis*-retinóico (1mg/kg, *i.p.*, por dia) sobre a porcentagem do ganho de peso corpóreo em relação ao peso inicial de camundongos machos (n=12/cada grupo), da adolescência ao início da fase adulta.

5.1.2 Atividade motora espontânea no Campo-Aberto (CA)

A atividade motora dos animais foi avaliada no CA no 33º dia de tratamento. Os animais do grupo 13-*cis*-RA (n=12) apresentaram uma redução estatisticamente significativa na locomoção lateral (adjacente às paredes), quando comparados aos animais do grupo controle (n=12; * $p < 0,05$, **Figura 12**). O mesmo não foi observado na locomoção central, que não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$, **Figura 12**). O comportamento exploratório verificado pelo ato de levantar não diferiu entre os grupos durante os 5 minutos de observação ($p > 0,05$, **Figura 12**). Adicionalmente, os demais parâmetros observados, ou seja, o tempo gasto nos quadrantes da região lateral do CA, e a latência para deixar o centro da arena foram semelhantes ($p > 0,05$, **Figura 12**).

Figura 12 - Efeitos da administração prolongada do ácido 13-*cis*-retinóico (1mg/kg/*i.p.*, por dia) na locomoção central e lateral em um campo-aberto, frequência de levantar, tempo na periferia e latência para deixar o centro da arena durante 5 minutos de observação no 33º dia de tratamento em camundongos machos (n=12/cada grupo) no início da fase adulta. Média ± EPM; * $p < 0,05$, teste *t* de Student.

5.1.3 Comportamento relacionado à ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

No 36º dia de tratamento, os animais foram testados quanto à presença de comportamentos relacionados à ansiedade no modelo do LCE. Os resultados mostraram que o tratamento com 13-*cis*-RA não interferiu no comportamento ansioso observado através das medidas de frequência de entradas no braço aberto e permanência no braço aberto ($p > 0,05$, **Figura 13**). A redução da atividade locomotora verificada no CA não foi observada no LCE, no qual os animais do grupo controle ($n=12$) e 13-*cis*-RA ($n=12$) movimentaram-se de forma semelhante, sem diferença na frequência de transição entre os braços ($p > 0,05$, **Figura 13**). A latência para fuga e frequência de mergulhar a cabeça foram semelhantes entre os grupos ($p > 0,05$, **Figura 13 e Tabela 2**).

Figura 13 - Efeitos da administração prolongada do ácido 13-*cis*-retinóico (1mg/kg/*i.p.*, por dia) sobre comportamentos relacionados à ansiedade, atividade locomotora e exploratória observados por 5 minutos em um labirinto em cruz elevado, no 36º dia de tratamento em camundongos machos ($n=12$ /cada grupo) no início da fase adulta. Média ± EPM.

Tabela 2 - Dados comportamentais adicionais observados no labirinto em cruz elevado (média $\pm$ EPM)

	<i>Tentativas de entrada no braço aberto</i>	<i>Latência para fuga (s)</i>	<i>Frequência de entradas no braço aberto</i>	<i>Tempo no braço aberto (s)</i>
13-<i>cis</i>-RA	7 $\pm$ 1,10	15,00 $\pm$ 2,94	2 $\pm$ 0,29	7,25 $\pm$ 1,33
Controle	7 $\pm$ 0,58	15,92 $\pm$ 4,37	1 $\pm$ 0,36	11,08 $\pm$ 3,15

5.1.4 Comportamento relacionado à depressão no Teste do Nado Forçado (Porsolt)

A duração da imobilidade no teste do NF foi avaliada no 38º dia de tratamento. A análise dos 4 últimos minutos do teste mostrou um efeito pró-depressivo da droga através de um aumento na imobilidade observada no grupo 13-*cis*-RA (n=12) em relação ao grupo controle (n=12) (*p<0,05, **Figura 14**).

Figura 14 - Efeitos da administração prolongada do ácido 13-*cis*-retinóico (1mg/kg/*i.p.*, por dia) sobre a duração de imobilidade nos 4 últimos minutos do teste de nado forçado analisado no 38º dia de tratamento em camundongos machos (n=12/cada grupo) no início da fase adulta. Média $\pm$ EPM; * p<0,05, teste *t* de Student.

5.1.5 Comportamento de anedonia no Teste de Preferência por Sacarose

O comportamento relacionado à anedonia foi verificado no 38º dia, em que o consumo de água e solução de sacarose 2% foram avaliados após 24 horas através da medida do volume dos bebedouros. A análise dos resultados evidenciou uma redução na porcentagem de preferência por sacarose no grupo tratado com 13-*cis*-RA (n=9) em relação ao grupo controle (n=10) (*p<0,05, **Figura 15**), sem diferença no consumo total de fluidos (p>0,05, **Figura 15**).

Figura 15 - Efeitos da administração prolongada do ácido 13-*cis*-retinóico (1mg/kg/*i.p.*, por dia) sobre a porcentagem de preferência por sacarose e o consumo total de fluido analisado no 38º dia de tratamento em camundongos machos (controle n=10; 13-*cis*-RA, n=9) no início da fase adulta. Média $\pm$ EPM; * $p < 0,05$, teste *t* de Student.

5.1.6 Imobilidade no Teste do Nado Forçado avaliada 20 dias após o término do tratamento

A duração da imobilidade no teste do NF foi avaliada 20 dias após o término do tratamento prolongado com 13-*cis*-RA. Esta série de animais recebeu a droga diariamente por 42 dias, passou pelo teste de anedonia no 38º dia e no 43º dia o tratamento foi interrompido. Após 20 dias livre de manipulação, ou seja, no 62º dia a análise dos 4 últimos minutos do teste não mais evidenciou um efeito pró-depressivo da droga, assim não houve diferença no tempo de imobilidade entre o grupo 13-*cis*-RA (n=12) em relação ao grupo controle (n=12) ($p > 0,05$, **Figura 16**).

Figura 16 - Efeitos da administração prolongada do ácido 13-*cis*-retinóico (1mg/kg/*i.p.*, por dia) sobre a duração de imobilidade nos 4 últimos minutos do teste de nado forçado analisado após 20 dias sem tratamento (62º dia) em camundongos machos adultos (n=12/cada grupo). Média $\pm$ EPM.

5.2 Análise de expressão gênica diferencial

A quantidade de transcritos (referente ao RNAm) de cada gene e em cada estrutura cerebral específica foi calculada de forma relativa através da normalização dos resultados brutos pela expressão de genes que não se alteraram nessas regiões com o tratamento realizado (genes de referência). Para cada região cerebral foram testados 4 genes de referência: *Ppia* (ciclofilina), *Hprt1* (hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase 1), *Gapdh* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e *Actb* (*b*-actina).

5.2.1 Pares de iniciadores utilizados para a amplificação dos genes

A tabela abaixo (**Tabela 3**) apresenta os iniciadores desenhados para a produção dos transcritos referentes aos genes de interesse e aos genes de referência, bem como o seu tamanho.

Tabela 3 - Sequência dos pares de iniciadores utilizados para *qPCR* e o tamanho do produto (pares de base)

(continua)

GENES	SEQUÊNCIAS SENSE / ANTISENSE (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)
Htr1a (NM_008308)	GGATGTTTTCTGTCCTGGT/ CACAAGGCCTTTCCAGAACT	121
Htr1b (NM_010482)	CTGCTGGTTGCTTTGTTGG/ ATCAGGTAGTTAGCCGGGGT	113
Htr2a (NM_172812)	AACCCCATTCACCATAGCC/ TCCTGTAGCCCGAAGACTG	116
Htr2c (NM_008312)	GATTGGACTGAGGGACGAAA/ ATGAAGAATGCCACGAAGGA	102
Htr3a (NM_013561)	TTCCAAGCCAACAAGACTGA/ GGGTCTTCTCCAAGTCCTGA	103
Htr4 (NM_008313)	TGCCTTCCTCATCATCCTCT / CCACCACATTCCACTGTATCC	135
Htr5a (NM_008314)	GTGGAGGGAGCAGAAGGAG / GAACCAGCAGAGCACAAACA	76

Tabela 3 - Sequência dos pares de iniciadores utilizados para *qPCR* e o tamanho do produto (pares de base)

(conclusão)		
GENES	SEQUÊNCIAS SENSE / ANTISENSE (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)
Htr6 (NM_021358)	CATAGCTCAGGCCGTATGTG/ CGCATGAAGAGGGGATAGA	111
Htr7 (NM_008315)	TTCTGCAACGTCTTCATCG/ ATTCTGCCTCACGGGGTA	126
5-HTT (Slc6a4) (NM_010484)	CAACTCCGGCTTTTCCAATA/ ATTTCCGTTGGTGTTCAGG	176
Tph2 (NM_173391)	TGCAAGCAAGAGGGTCAACT/ CATGCTTCAATTCTCCGATG	70
Ppia (NM_008907)	AATGCTGGACCAAACACAAA/ CCTTCTTTCACCTTCCCAA	101
Hprt1 (NM_013556)	TGTTGTTGGATATGCCCTTG/ GCGCTCATCTTAGGCTTTGT	106
Gapdh (NM_001001303)	AGGAGCGAGACCCCACTAAC/ GTGGTTCACACCCATCACAA	179
Actb (NM_007393)	GTGGGAATGGGTCAGAAGG/ GGTCATCTTTTCACGGTTGG	228

5.2.2 Genes de referência utilizados em cada estrutura encefálica

A tabela abaixo (**Tabela 4**) apresenta os genes de referência, ou seja, os genes mais estáveis obtidos que serviram de controle interno para cada estrutura cerebral.

Tabela 4 - Genes de referência escolhidos

Estruturas	Controle Interno
Mesencéfalo	<i>Ppia, Hprt-1 e Gapdh</i>
Hipotálamo	<i>Ppia, Actb e Gapdh</i>
Córtex pré-frontal	<i>Hprt-1 e Gapdh</i>
Hipocampo	<i>Ppia, Hprt-1 e Actb</i>

5.2.3 Quantificação de RNAm no mesencéfalo

A administração prolongada do 13-*cis*-RA (1mg/kg/dia, n=12) resultou em uma redução na quantidade de transcritos referentes ao gene responsável pela produção da enzima de síntese de 5-HT (Tph2; *p<0,05) e adicionalmente verificou-se redução semelhante nos transcritos referentes ao transportador de 5-HT (5-HTT; *p<0,05); quando comparados ao grupo controle (n=12). As porcentagens de redução foram 23,1% para Tph2 e 22,1% para 5-HTT. Os demais transcritos (*Htr1a*, *Htr1b*, *Htr2a*, *Htr2c*, *Htr3a*, *Htr4*, *Htr5a*, *Htr6* e *Htr7*) não diferiram estatisticamente entre os grupos (p>0,05) (**Figura 17**; **Tabela 5**).

Figura 17 - Efeitos da administração diária de ácido 13-*cis*-retinóico (1mg/kg/*i.p*) durante 42 dias sobre a quantidade normalizada de transcritos de receptores, enzima de síntese (Tph2) e transportador (5-HTT) da via serotoninérgica na região do mesencéfalo de camundongos machos (n=12/cada grupo) no início da fase adulta. Média ± EPM; * p<0,05, teste *t* de Student.

Tabela 5 - Quantidade normalizada dos transcritos de receptores, enzima de síntese (Tph2) e transportador (5-HTT) da via serotoninérgica na região do mesencéfalo de camundongos machos (n=12/cada grupo) no início da fase adulta, após tratamento durante 42 dias com ácido 13-*cis*-retinóico. Média ± EPM; * p<0,05, teste *t* de Student

	(continua)	
	Controle	13- <i>cis</i> -RA
Htr1a	1,40 ± 0,09	1,30 ± 0,08
Htr1b	1,05 ± 0,07	1,05 ± 0,08
Htr2a	1,31 ± 0,06	1,29 ± 0,09

Tabela 5 - Quantidade normalizada dos transcritos de receptores, enzima de síntese (Tph2) e transportador (5-HTT) da via serotoninérgica na região do mesencéfalo de camundongos machos (n=12/cada grupo) no início da fase adulta, após tratamento durante 42 dias com ácido 13-*cis*-retinóico. Média $\pm$ EPM; * $p < 0,05$, teste *t* de Student

	(conclusão)	
	Controle	13-<i>cis</i>-RA
Htr2c	1,28 $\pm$ 0,05	1,16 $\pm$ 0,06
Htr3a	1,25 $\pm$ 0,06	1,15 $\pm$ 0,09
Htr4	1,15 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,06
Htr5a	1,21 $\pm$ 0,06	1,18 $\pm$ 0,07
Htr6	1,18 $\pm$ 0,08	1,22 $\pm$ 0,08
Htr7	1,32 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 0,06
Tph2	1,12 $\pm$ 0,10	0,86 $\pm$ 0,07*
5-HTT	1,15 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,08*

5.2.4 Quantificação de RNAm no hipotálamo

O tratamento diário com 13-*cis*-RA (1mg/kg/dia; n=10) durante 42 dias resultou em um aumento de 32,5% na quantidade normalizada dos transcritos para o gene *Htr2a* (** $p < 0,01$) na região do hipotálamo, quando comparado ao grupo controle (n=12). Os demais transcritos (*Htr1a*, *Htr1b*, *Htr2c*, *Htr3a*, *Htr4*, *Htr5a*, *Htr6* e *Htr7*) não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$) (**Figura 18; Tabela 6**).

Figura 18 - Efeitos da administração diária de ácido 13-*cis*-retinóico (1mg/kg/*i.p*) durante 42 dias sobre a quantidade normalizada de transcritos referentes aos receptores de 5-HT na região do hipotálamo de camundongos machos (controle n=12; 13-*cis*-RA n=10) no início da fase adulta. Média ± EPM; ** p<0,01, teste *t* de Student.

Tabela 6 - Quantidade normalizada dos transcritos referentes aos receptores de 5-HT na região do hipotálamo de camundongos machos (controle n=12; 13-*cis*-RA n=10) no início da fase adulta, após tratamento durante 42 dias com ácido 13-*cis*-retinóico. Média ± EPM; **p<0,01, teste *t* de Student

	Controle	13-<i>cis</i>-RA
Htr1a	1,00 ± 0,07	1,12 ± 0,06
Htr1b	0,99 ± 0,07	1,14 ± 0,06
Htr2a	0,84 ± 0,05	1,11 ± 0,06**
Htr2c	1,00 ± 0,06	1,10 ± 0,05
Htr3a	1,03 ± 0,09	1,00 ± 0,07
Htr4	1,06 ± 0,05	1,10 ± 0,06
Htr5a	1,08 ± 0,04	1,13 ± 0,02
Htr6	0,94 ± 0,08	0,86 ± 0,07
Htr7	0,97 ± 0,06	0,97 ± 0,02

5.2.5 Quantificação de RNAm no córtex pré-frontal

Os camundongos tratados por 42 dias com 13-*cis*-RA (1mg/kg; n=10, com exceção do gene *Htr5a* n=9) apresentaram uma redução estatisticamente significativa nos transcritos para os receptores *Htr1a*, *Htr1b*, *Htr2a*, *Htr4*, *Htr5a*, *Htr6* e *Htr7* (**Figura 19; Tabela 7**) no córtex pré-frontal quando comparados ao grupo controle (n=9). As porcentagens de redução foram as seguintes: *Htr1a* 18,4% (**p<0,01); *Htr1b* 57,7% (**p<0,001); *Htr2a* 26,9% (**p<0,01); *Htr4* 56,4% (*p<0,05); *Htr5a* 20,3% (*p<0,05); *Htr6* 47,9% (**p<0,001); *Htr7* 18,4% (**p<0,01). Os transcritos *Htr2c* e *Htr3a* não diferiram entre os grupos (p>0,05; **Figura 19; Tabela 7**).

Figura 19 - Efeitos da administração diária de ácido 13-*cis*-retinóico (1mg/kg/*i.p*) durante 42 dias sobre a quantidade normalizada dos transcritos referentes aos receptores de 5-HT na região do córtex pré-frontal de camundongos machos (controle n=9; 13-*cis*-RA n=10) no início da fase adulta. Média ± EPM; *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 teste *t* de Student e teste de *U* de Mann-Whitney.

Tabela 7 - Quantidade normalizada dos transcritos referentes aos receptores de 5-HT na região do córtex pré-frontal de camundongos machos (controle n=9; 13-*cis*-RA n=10) no início da fase adulta, após tratamento durante 42 dias com ácido 13-*cis*-retinóico. Média $\pm$ EPM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, teste *t* Student e teste de *U* de Mann-Whitney

	Controle	13-<i>cis</i>-RA
Htr1a	1,11 $\pm$ 0,03	0,91 $\pm$ 0,06**
Htr1b	0,90 $\pm$ 0,11	0,38 $\pm$ 0,05***
Htr2a	0,99 $\pm$ 0,07	0,73 $\pm$ 0,05**
Htr2c	0,70 $\pm$ 0,05	0,59 $\pm$ 0,07
Htr3a	1,02 $\pm$ 0,07	1,11 $\pm$ 0,03
Htr4	0,66 $\pm$ 0,15	0,29 $\pm$ 0,06*
Htr5a	0,94 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,12*
Htr6	1,07 $\pm$ 0,06	0,56 $\pm$ 0,04***
Htr7	1,12 $\pm$ 0,06	0,91 $\pm$ 0,04**

5.2.6 Quantificação de RNAm no hipocampo

A administração diária do 13-*cis*-RA (1mg/kg; n=11) durante 42 dias resultou em uma redução de 18,5% na quantidade normalizada dos transcritos para o gene *Htr7* ($p < 0,05$) na região do hipocampo, quando comparado ao grupo controle (n=12). Os demais transcritos (*Htr1a*, *Htr1b*, *Htr2a*, *Htr2c*, *Htr3a*, *Htr4*, *Htr5a*, *Htr6*) não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$) (**Figura 20; Tabela 8**).

Figura 20 - Efeitos da administração diária de ácido 13-*cis*-retinóico (1mg/kg/*i.p*) durante 42 dias sobre a quantidade normalizada dos transcritos referentes aos receptores de 5-HT na região do hipocampo de camundongos machos (controle n=12; 13-*cis*-RA n=11) no início da fase adulta. Média ± EPM; * p<0,05, teste *t* Student e teste de *U* de Mann-Whitney.

Tabela 8 - Quantidade normalizada dos transcritos referentes aos receptores de 5-HT na região do hipocampo de camundongos machos (controle n=12; 13-*cis*-RA n=11) no início da fase adulta, após tratamento durante 42 dias com ácido 13-*cis*-retinóico. Média ± EPM; * p<0,05, teste *t* Student e teste de *U* de Mann-Whitney

	Controle	13-<i>cis</i>-RA
Htr1a	1,04 ± 0,03	0,97 ± 0,05
Htr1b	1,04 ± 0,05	0,96 ± 0,10
Htr2a	0,99 ± 0,04	0,97 ± 0,05
Htr2c	0,80 ± 0,07	0,72 ± 0,04
Htr3a	0,98 ± 0,03	1,06 ± 0,05
Htr4	0,95 ± 0,05	0,83 ± 0,06
Htr5a	1,06 ± 0,04	0,96 ± 0,06
Htr6	0,94 ± 0,04	0,82 ± 0,06
Htr7	0,95 ± 0,04	0,78 ± 0,05*

5.3 Busca “*in silico*” de elementos responsivos ao ácido retinóico (RARE)

A análise das regiões promotoras dos genes relacionados a via serotoninérgica evidenciou a presença de um possível RARE nos genes para os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{5A} e 5-HT₇ (**Figura 21**). Nos demais genes *Htr1b*, *Htr2c*, *Htr3a*, *Htr4*, *Htr6*, *Htr7*, *Tph2* e *5-HTT* não observamos a presença de sequências correspondentes à este *cis*-elemento. Caso o RARE encontrado no presente estudo seja funcional, há a possibilidade de uma modulação direta no processo de transcrição destes genes. Considerando o mecanismo de ação dos retinóides no nível de acetilação do DNA, um aumento na expressão gênica poderia ser esperado.

5-HT_{1A} cromossomo 13, RARE na posição 13.442.549 pb

13.442.461 GAAGCCGGGAGAAGGAAGCTGGGAAAAGAGAAGCAGACTGGAGAAGGCAGGAGAGATGGA
13.442.521 GAGACAGAGAGAAGGAAGCTAGGAGATGAGGGTCACTCGAGTGACCCGGGAGGATGGGGTTT
13.442.528 CTGGAATCCAGAGACTTCTGAGACTATTAGTTACTCGGGAGAGTCCGGCCCCACGCAGC

5-HT_{2A} cromossomo 14, RARE na posição 47.475.140 pb

47.475.041 GAAAGTAATCCATTTTCTTATCTGTCATGAGTGCATCTATCTTCCTTTAAGGACCACTTG
47.475.101 GGAGAGAGCTTCTTTTGCATGTGAGTCGCTTTATCATTAGGGTCACTTCTGGGGGAAAAA
47.475.161 AACATAGAACAAAATAGAACAAAACCCTTCATTTTCTAACATGAAGTTTTTCATTATTTC

5-HT_{5A} cromossomo 5, RARE na posição 1.845.484 pb

1.845.389 CCACCCCTCGGAGCCACTGCCGGGAGAGGGGGGAGGTGGGCAAGGAGCAACCCTGGACCA
1.845.449 GCGACTGTTCTGACGCACTAGCTGAGTTCTGGGCATCCACCCTGCACTGGGCGGGGGCCG
1.845.509 ACCTCAAGGATGCTCTGCTGCAGGCGACCAGACAACAGTCTCCGCCTAGGTGAGGAACAG

5-HT₇ cromossomo 19, RARE na posição 29.244.240 pb

29.244.150 CCTGGCTCGCCCTGCCGCAGACCCCTGGCCTCAGCACTGTAGCAAATGACAAGCGGGGT
29.244.210 GGGAGCGGTTTGTCTTTCAAGAAGACTCGGGGGTCACTGCATGAACCGGTGAAGAACCTT
29.244.270 GTTGGAGAATATATTTTAAAGCCCTTAATAAAAATAAATAAATAAATAAATTAAGGGAAAAA

Figura 21 - Localização do RARE na região regulatória dos genes para os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{5A} e 5-HT₇.

6 DISCUSSÃO

6.1 Aspectos fisiológicos e comportamentais

O 13-*cis*-RA é um fármaco amplamente utilizado em dermatologia, sendo muito eficaz no tratamento de acnes severas através da administração de altas doses por via oral e períodos prolongados. Devido a sua considerável lipossolubilidade pode atravessar facilmente a barreira hematoencefálica e assim exercer efeitos no SNC. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil ([2010]), a faixa etária onde se tem a maior incidência de acne está entre 15 e 25 anos. Neste sentido, o 13-*cis*-RA é um fármaco muito prescrito para adolescentes. O período da adolescência é marcado por diversas mudanças fisiológicas e psicológicas no organismo. Além disso, a consolidação das redes neuronais através do fenômeno de “*prunning*” (“podas neuronais”), que ocorre na infância, continua até o início da adolescência (Chechik, Meilijson e Ruppín, 1999). Desta forma, o 13-*cis*-RA poderia causar modificações no desenvolvimento normal do cérebro destes indivíduos. Com o intuito de investigar possíveis alterações decorrentes do tratamento com 13-*cis*-RA em adolescentes, iniciamos a administração do retinóide nos camundongos aos 30 dias de vida (considerado período de adolescência) e continuamos até o início da vida adulta, em uma dose compatível à prescrita em humanos.

A administração prolongada do 13-*cis*-RA não alterou o ganho de peso semanal dos animais. Os camundongos de ambos os grupos apresentaram um ganho de peso habitual para sua espécie, durante todo o período de tratamento. A medida do peso corpóreo é um dado importante, que possibilita inferir quanto às condições de saúde e bem-estar do animal. Além disso, diversas patologias em humanos influenciam o peso e entre elas está o transtorno do humor, que pode aumentá-lo ou diminuí-lo (American Psychiatric Association, 2000). Resultados semelhantes na análise do peso foram observados em outros estudos conduzidos tanto em ratos, como em camundongos sob a administração crônica do 13-*cis*-RA (Ferguson et al., 2005, O’Reilly et al., 2006).

A bateria comportamental seguiu uma ordem crescente de aversividade e teve início com o CA. A análise do CA revelou uma redução da atividade locomotora dos animais em consequência do tratamento com o 13-*cis*-RA. Ao estudar mais detalhadamente esta hipolocomoção, verificamos que foi evidenciada pela

diminuição do número de quadrantes periféricos percorridos pelo animal (quadrantes adjacentes à parede do CA, considerada a área menos aversiva ao animal), mas não no número de quadrantes centrais. Ambientes claros e abertos são aversivos para os roedores, desta forma a análise do padrão de exploração (central ou periférico) possibilita inferir quanto à presença de um comportamento ansioso no animal. Neste sentido, fármacos ansiolíticos como os benzodiazepínicos aumentam a exploração no centro do CA (Archer, 1973). Assim, a diminuição na locomoção em quadrantes periféricos induzida pelo 13-*cis*-RA sugere uma redução na atividade locomotora de forma independente a componentes ansiogênicos. Se o padrão de locomoção observado tivesse ocorrido de maneira contrária, ou seja, redução somente na região central do CA, poderíamos sugerir que o aumento do medo/ansiedade do animal fossem responsáveis pela redução da locomoção.

A motivação do animal em explorar um ambiente novo pode ser avaliada através de sua frequência locomotora no CA. Neste sentido, a redução da atividade locomotora revelada no CA, poderia sugerir uma deficiência na motivação do animal em explorar o aparelho. Tal redução foi previamente verificada também em ratos após a administração do 13-*cis*-RA (Ferguson et al., 2005), ou através da suplementação de vitamina A (precursor do ácido retinóico) em doses terapêuticas (Oliveira et al., 2008). Curiosamente, animais submetidos a uma dieta livre de vitamina A e animais nocaute para o RAR também apresentaram uma redução da atividade locomotora, demonstrando que o organismo necessita de doses adequadas de retinóides (Carta et al., 2006; Krezel et al., 1998). Reduções da locomoção, ou da atividade exploratória no CA, podem ser observadas em modelos de estresse social (também considerados modelos animais de depressão). Neste caso, devido a fatores ambientais aversivos, os roedores desenvolvem um quadro de redução motivacional, levando a um prejuízo psicomotor (Pistovcakova et al., 2005). Reforçando esta hipótese, ratos consanguíneos da linhagem *Flinders Sensitive* (FSL), selecionados por mimetizarem diversos sintomas de depressão observados em humanos, também apresentam redução da atividade locomotora no CA (²Overstreet e Russel, 1982 apud Overstreet et al., 2005).

No presente estudo, o componente emocional relacionado à ansiedade foi avaliado também através do LCE. A análise do comportamento dos animais no LCE após a administração crônica do 13-*cis*-RA, não revelou nenhuma alteração nos diversos parâmetros estudados. Neste sentido, os animais exploraram de maneira

²Overstreet DH, Russell RW. Selective breeding for sensitivity to DFP. Effects of cholinergic agonists and antagonists. *Psychopharmacology*. 1982;78:150-4.

semelhante os braços fechados (região segura) e abertos (região aversiva) do aparelho. Neste teste, fármacos ansiolíticos do tipo benzodiazepínicos aumentam a exploração dos braços abertos, enquanto reduzem a exploração dos braços fechados (Lister et al., 1987). Assim, a análise da ansiedade em dois paradigmas diferentes, o CA e o LCE, sugeriu que a administração do 13-*cis*-RA possivelmente não altere este componente emocional. Ao estudar o perfil de locomoção dos animais no LCE, através da frequência de transição entre os braços, verificamos que a hipolocomoção observada no CA, não foi confirmada no LCE. Logo, a redução da atividade locomotora dos animais após o tratamento com o 13-*cis*-RA não é decorrente de um prejuízo motor, já que os animais se movimentaram de forma semelhante no LCE.

Portanto, sugerimos que a redução da atividade locomotora verificada em nosso estudo esteja relacionada a um prejuízo motivacional no animal, decorrente do tratamento prolongado com 13-*cis*-RA. Este retardo psicomotor já foi evidenciado em diferentes modelos comportamentais utilizados para estudar depressão.

O teste do NF foi idealizado por Porsolt e colaboradores em 1977, sendo um experimento clássico utilizado para verificar o efeito de drogas sobre o comportamento relacionado à depressão em roedores. Após um período de atividade de nado vigoroso, o roedor adota uma postura passiva de imobilidade que é inibida por antidepressivos (Porsolt et al., 1977b). Neste sentido, a análise do comportamento dos animais neste teste revelou um aumento do período de imobilidade no grupo tratado com 13-*cis*-RA quando comparado ao controle. Assim, o aumento do período de imobilidade observado após o tratamento com 13-*cis*-RA sugere indícios de um efeito pró-depressivo gerado por este fármaco, resultado previamente observado em outro estudo (O'Reilly et al., 2007).

Indivíduos deprimidos podem apresentar um prejuízo na resposta emocional ao estímulo prazeroso (Pizzagalli et al., 2009), bem como disfunção cerebral em áreas relacionadas à recompensa (Keedwell et al., 2005). Esta incapacidade de sentir prazer diante de um estímulo prazeroso pode ser definida como anedonia. Em roedores, um modelo que mimetiza o sintoma de anedonia é o teste de preferência por sacarose, que é baseado na capacidade de soluções adocicadas em induzir o aparecimento de um comportamento hedônico (prazeroso) em roedores (Leeb

Parker e Eikelboom, 1991). Assim, em nosso estudo o teste de preferência por sacarose evidenciou uma redução na porcentagem de preferência pela solução adocicada nos animais tratados com 13-*cis*-RA, corroborando o comportamento pró-depressivo observado no CA e NF. A redução na preferência por sacarose pode ser observada em animais submetidos a um período de estresse crônico e há evidências de que o tratamento com antidepressivo seja eficiente em aumentar o consumo desta solução adocicada (Strekalova et al., 2006). Recentemente, um novo aspecto da depressão tem sido investigado, o qual associa a elevação na concentração de citocinas pró-inflamatórias no sangue à patogênese da depressão. Assim, a administração intracerebroventricular da citocina pró-inflamatória IL-1 β em camundongos reduziu a taxa de proliferação celular, ou seja, o processo de neurogênese no hipocampo, que é uma característica observada em animais e indivíduos deprimidos (Eriksson et al., 1998; Koo e Duman, 2008; Malberg et al., 2000). Estudo em humanos dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no sangue evidenciou que o uso de antidepressivo foi capaz de normalizar as alterações inflamatórias decorrentes da depressão, exercendo uma atividade imunomodulatória (Sutcgil et al., 2007). Neste sentido, a administração de uma solução de lipopolissacarídeo (potente indutor de respostas inflamatórias) em roedores evidenciou o aparecimento de um comportamento pró-depressivo em testes como o NF e a preferência por sacarose, resultado semelhante ao que observamos após a administração crônica do 13-*cis*-RA (Frenois et al., 2007).

Com o intuito de investigar a reversibilidade do efeito pró-depressivo do 13-*cis*-RA, os animais foram avaliados novamente no teste do NF após um período de 20 dias sem a administração do medicamento. De fato, o aumento da imobilidade verificado anteriormente, durante o tratamento com 13-*cis*-RA, deixou de existir, demonstrando que o efeito comportamental pró-depressivo deste retinóide tem caráter reversível. Em concordância com nossos resultados, a reversibilidade dos efeitos do 13-*cis*-RA após a descontinuação do fármaco foram recentemente evidenciados em ratos submetidos ao paradigma do residente-intruso, no qual a redução do comportamento agressivo diante da presença de um intruso foi revertido (Trent et al., 2009). Em humanos, a melhora dos sintomas psiquiátricos após a descontinuação do 13-*cis*-RA também foi relatada e ainda foi observada a

recorrência dos sintomas com a retomada do tratamento (McCance-Katz e Price, 1992; Wysowski et al., 2001).

Em conjunto, a hipolocomoção observada no CA, o aumento da imobilidade no NF e a redução na preferência por sacarose sugerem uma redução da motivação do animal, o que poderia ser interpretada como comportamento do tipo depressivo. Adicionalmente, o comportamento relacionado à depressão observado nos animais, demonstrou ser reversível após um período sem o medicamento.

6.2 Regulação gênica da atividade transcricional pelo RARE

O 13-*cis*-RA é um retinóide de estrutura química semelhante ao retinol e pode modular a atividade celular através de sua ligação direta, ou através de seu isômero ATRA, com o RAR (Allenby et al., 1993; Tsukada et al., 2000). A sinalização retinóide é composta pelo RAR, RXR, enzimas de síntese de RA e proteínas transportadoras, que apresentam uma ampla distribuição no SNC (Krezel et al., 1999; Zetterström et al., 1999). O receptor heterodimérico RAR-RXR, quando ativado, age como um fator de transcrição gênica ao interagir com RARE, presente na região promotora de determinados genes. O RARE, por sua vez, promove o recrutamento de proteínas co-ativadoras com atividade acetiladora de histonas, que possibilitam o relaxamento da dupla fita de DNA, permitindo que o processo de transcrição ocorra (Bastien e Rochette-Egly, 2004). Assim, a presença deste *cis*-elemento funcional em regiões regulatórias dos genes possibilita uma modulação direta, promovendo um aumento na atividade transcricional.

Em nosso estudo, a região promotora dos genes relacionados à via serotoninérgica foi analisada com o intuito de investigar uma possível ação direta do 13-*cis*-RA na modulação da transcrição destes genes (*Htr1a*, *Htr1b*, *Htr2a*, *Htr2c*, *Htr3a*, *Htr4*, *Htr5a*, *Htr6*, *Htr7*, *Tph2* e *5-HTT*). Identificamos a presença de sequências representativas do RARE (A/G)G(G/T)(G/T)(G/C)A nos genes para os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{5A} e 5-HT₇, sendo que a repetição desta sequência, separada por um número adequado de nucleotídeos, foi observada uma única vez para cada gene. Considerando que estas sequências encontradas representem de fato elementos de resposta funcionais, a atuação do retinóide seria de elevar a concentração dos transcritos para estes genes. Entretanto, isto não foi observado

para a maioria deles, pelo contrário, o *Htr1a*, *Htr5a* e *Htr7* tiveram seus transcritos reduzidos em algumas regiões estudadas, ou não alterados em outras. A expressão do gene para o receptor 5-HT_{2A} foi aumentada somente no hipotálamo, já no córtex pré-frontal estava reduzida. Desta forma, as modificações transcricionais observadas nos genes *Htr1a*, *Htr2a*, *Htr5a* e *Htr7*, assim como em outros genes investigados neste estudo, não parecem ser devido à modulação direta por RARE. Uma possível hipótese seria que o 13-*cis*-RA pudesse modular a atividade de outras vias neuronais, que por sua vez exercessem influência sobre o sistema serotoninérgico, entretanto pouco se sabe a respeito destes mecanismos. Outra possibilidade, seria a existência de alterações pós-transcricionais como a modificação na estabilidade do RNAm. Estudos *in vitro* evidenciaram tanto um aumento, como uma redução, na estabilidade de transcritos após a administração do ácido retinóico, porém ainda não se conhece ao certo como os retinóides exercem este mecanismo (Crowe et al., 1993; Motomura et al., 2001).

Mais de 500 genes demonstraram sofrer alterações com a administração de retinóides, porém nem todas as modificações ocorreram devido a ativação do receptor heterodimérico presente no RARE (ação direta), e sim possivelmente através de ações indiretas, cujos mecanismos permanecem ainda pouco conhecidos (Balmer e Blomhoff, 2002). Um dos genes descritos dentre aqueles ativados de maneira direta pelos retinóides é o gene da ocitocina (OT), no qual foi evidenciado a presença de sequências correspondentes ao RARE funcionais (Richard e Zingg, 1991). A OT é um hormônio sintetizado no hipotálamo e é liberado na corrente sanguínea, exercendo sua função em diferentes tecidos. No SNC, a OT interage com seu receptor que é amplamente distribuído em diversas áreas encefálicas, como o hipotálamo, hipocampo, amígdala, córtex e sistema olfatório (Tribollet et al., 1989). Alterações neste hormônio podem ser encontradas em patologias como depressão, transtorno alimentar, esquizofrenia e doenças neurodegenerativas (Gimpl e Fahrenholz, 2001). Na depressão, há evidências de que ocorra um aumento da atividade da OT. Investigação em cérebro de humanos com depressão, utilizando técnica de imuno-histoquímica, encontrou um aumento na densidade de neurônios ocitocinérgicos no hipotálamo (Purba et al., 1996). Avaliação dos níveis séricos do hormônio da OT revelou um aumento em sua concentração em indivíduos deprimidos (Parker et al., 2010). Desta forma, a administração de altas doses do 13-*cis*-RA em nosso estudo pode ter induzido um aumento no processo de transcrição

do gene da OT, via RARE, contribuindo para o efeito pró-depressivo observado em nossos animais. Esta é uma hipótese interessante que pretendemos investigar no futuro.

6.3 Concentração de transcritos de componentes do sistema serotoninérgico

O envolvimento do sistema serotoninérgico na modulação de comportamentos emocionais já é bem estabelecido. Nosso trabalho selecionou áreas cerebrais importantes na modulação de estados emocionais, que são ricas em componentes da via serotoninérgica, com o intuito de observar uma possível correlação entre o tratamento prolongado com 13-*cis*-RA e alterações transcricionais de componentes do sistema serotoninérgico.

O sistema serotoninérgico tem origem nos núcleos dorsal e mediano da *raphé* no mesencéfalo, que projetam aferências para as áreas caudais e rostrais do cérebro (Aghajanian et al., 1967; Azmitia e Whitaker-Azmitia, 1991). Os transcritos obtidos de cada área cerebral dissecada neste estudo são derivados de corpos neuronais que expressam os genes correspondentes. Assim, os transcritos das regiões rostrais do cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo) são provenientes de corpos neuronais presentes em regiões pós-sinápticas serotoninérgicas, ou seja, em neurônios não serotoninérgicos. Os RNAm obtidos do mesencéfalo são provenientes de neurônios serotoninérgicos em sua grande maioria, entretanto a presença de corpos neuronais não serotoninérgicos provenientes de circuitos locais mesencefálicos também deve ser considerada (Ambar e Chiavegatto, 2009; Bibancos et al., 2007).

6.3.1 Mesencéfalo

O mesencéfalo é uma região importante na modulação do sistema serotoninérgico, devido à presença dos corpos neuronais serotoninérgicos e da maquinaria responsável pelo mecanismo de retroalimentação, que é composta por auto-receptores inibitórios 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}, enzima de síntese de 5-HT (Tph2) e seu transportador (5-HTT).

A administração prolongada do 13-*cis*-RA induziu uma redução nos transcritos de Tph2 e 5-HTT no mesencéfalo, mostrando um efeito importante na

pré-sinapse serotoninérgica. O resultado obtido no presente trabalho difere um pouco dos dados observados por outros pesquisadores em cultura de células derivadas dos núcleos da *raphé*. Assim, este estudo *in vitro* inicialmente não verificou alterações significativas para os RNAm do 5-HTT e de forma concordante com o nosso estudo não verificou mudança nos transcritos para o receptor 5-HT_{1A}. Entretanto, ao investigar a proteína referente ao 5-HTT e 5-HT_{1A}, um aumento em ambas as proteínas acompanhado de uma elevação na concentração intracelular de 5-HT foi observada (O'Reilly et al., 2007). Desta forma, segundo estes autores, caso este mecanismo encontrado por eles ocorra também em vivo, uma redução de 5-HT na fenda sináptica seria esperado, o que estaria de acordo com a teoria monoaminérgica da depressão.

Considerando a importância do mesencéfalo para a via serotoninérgica, outros estudos foram conduzidos com o 13-*cis*-RA nesta área encefálica. Investigação *in vitro* da morfologia de neurônios serotoninérgicos derivadas de cortes histológicos do mesencéfalo de ratos, evidenciou uma mudança morfológica na região somática do neurônios induzida pelo tratamento com 13-*cis*-RA (Ishikawa et al., 2008). Os retinóides apresentam a capacidade de induzir processo de apoptose celular, entretanto ao investigar a densidade de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da *raphé* em camundongos tratados cronicamente com 13-*cis*-RA, não foi observada mudanças na quantidade destes neurônios (Drew et al., 2010; Horn et al., 1996). Em conjunto, os dados obtidos nestes estudos relatados na literatura com o 13-*cis*-RA e o sistema serotoninérgico no mesencéfalo, sugerem a existência de uma mudança na atividade da via serotoninérgica, independente de processo de apoptose neuronal.

Recentemente, a expressão gênica de Tph2 no mesencéfalo de ratos foi implicada na depressão e respostas ao estresse (Shishkina, Kalinina e Dygalo, 2007). Estes pesquisadores demonstraram que o aparecimento do efeito antidepressivo de ISRS em ratos, avaliados pelo modelo do NF, estava associado à elevação na concentração dos transcritos de Tph2 no mesencéfalo. Por outro lado, hormônios glicocorticóides, que se encontram elevados em situações de estresse, promovem redução da expressão de RNAm para Tph2 nos núcleos dorsais da *raphé* de camundongos (Clark et al., 2005). Em humanos, a existência de um polimorfismo no gene da Tph2, que leva à redução em 80% da síntese de 5-HT quando testado *in*

vitro (substituição de Arg por His na posição 441), foi verificada em alguns indivíduos com depressão unipolar (Zhang et al., 2005). Estes pesquisadores também associaram o polimorfismo com menor responsividade ao tratamento com ISRS. Portanto, estudos tanto em animais quanto em humanos tem revelado um papel para a regulação da expressão do gene Tph2 em distúrbios depressivos, bem como na eficácia do efeito terapêutico de antidepressivos como os ISRS.

Assim, nossos resultados demonstrando um efeito comportamental depressivo induzido pelo 13-*cis*-RA, associado à redução dos transcritos para Tph2 em camundongos, estão em acordo com este importante papel para a enzima de síntese da 5-HT.

O 5-HTT determina o término da ação da 5-HT sobre os receptores pós-sinápticos, controlando a neurotransmissão serotoninérgica. A redução na expressão deste transportador pode ser compreendida como um mecanismo compensatório à redução da síntese de 5-HT, como pode ser observado em roedores submetidos a um quadro de depleção de 5-HT (Koed e Linnet, 2000; Linnet et al., 1995). Assim, a redução dos transcritos da 5-HTT em nossos animais experimentais poderia ser decorrente, ou mesmo secundário, à redução observada nos RNAm para a Tph2, se a mesma se traduzisse em redução da expressão proteica de Tph2.

Vários estudos tem sugerido que, tanto a redução na expressão gênica de 5-HTT, quanto sua ausência (5-HTT^{-/-}), estão correlacionadas ao desenvolvimento de depressão comportamental em roedores (Collin et al., 2000; Lira et al., 2003). No modelo de separação materna no início da vida, um modelo indutor de estresse na idade adulta, ratos apresentam redução nos níveis de RNAm para o 5-HTT na região da *raphé* (Lee et al., 2007). Similarmente aos nossos resultados, estes animais também apresentam hipolocomoção no CA e aumento na imobilidade no NF (Lee et al., 2007).

Estudos de tomografia computadorizada em pacientes com diagnóstico de depressão que não estavam recebendo nenhuma medicação antidepressiva, observaram reduções na densidade de 5-HTT no mesencéfalo (Malison et al., 1998; Joensuu et al., 2007).

Assim, coletivamente, estes dados fornecem fortes evidências de que as reduções dos transcritos de 5-HTT e Tph2 observadas em nosso estudo possam

contribuir para o aparecimento do comportamento relacionado à depressão nestes animais.

6.3.2 Hipotálamo

Neurônios serotoninérgicos projetam aferências da região dos núcleos da *raphé* ao hipotálamo, especificamente ao núcleo paraventricular (PVN), onde podem participar dos processos neuroendócrinos, através da ativação de diferentes receptores serotoninérgicos (Jørgensen, 2007).

O eixo HPA é um importante componente na modulação da resposta ao estresse. Investigação à partir de cultura de células derivadas do hipotálamo tratadas com 13-*cis*-RA observou uma redução no número de células, sugerindo um efeito citotóxico do 13-*cis*-RA nesta área encefálica (Griffin et al., 2010). Em nosso estudo observamos um aumento na concentração de transcritos do receptor 5-HT_{2A} hipotalâmico após o tratamento com 13-*cis*-RA. A ativação principalmente dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} no hipotálamo estão envolvidos com um aumento da atividade do eixo HPA em roedores (Osei-Owusu et al., 2005; Mikkelsen, Hay-Schmidt e Kiss, 2004; Zhang et al., 2002).

A hiperatividade do eixo HPA é um dos achados biológicos mais consistentes encontrado na depressão, que pode ser corrigido com o uso crônico de antidepressivos (Dinan, 1994). Nesse sentido foi encontrado que os ISRS reduzem a hiperatividade do eixo HPA induzida por agonista do receptor 5-HT_{2A}, provavelmente através do processo de dessensibilização deste receptor (Yamauchi et al., 2006).

Assim, em nosso estudo verificamos um aumento na concentração dos transcritos do receptor 5-HT_{2A} no hipotálamo, que caso ocorra também ao nível proteico poderia estar associado a um aumento da atividade do eixo HPA, e consequentemente contribuir para o fenótipo depressivo observado neste estudo.

6.3.3 Córtex pré-frontal

Estudos de lesão e imagem em humanos indicam importante participação dos diferentes hemisférios do córtex pré-frontal na modulação de processos cognitivos, desinibição comportamental, emoções e transtornos psiquiátricos (Rolls et al., 1994; Tenenback et al., 1999; Wible et al., 2001). Descobertas recentes do nosso grupo

evidenciaram uma grande vulnerabilidade do sistema serotoninérgico no córtex pré-frontal, em camundongos submetidos a diferentes procedimentos experimentais, tais como, o isolamento social, e também após administração de hormônio esteróide anabólico-androgênico (Bibancos et al., 2007; Ambar e Chiavegatto, 2009).

No presente estudo, o 13-*cis*-RA induziu uma diminuição nos transcritos para os genes dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ no córtex pré-frontal. Prejuízo da atividade serotoninérgica cortical, observada através da ampla redução em receptores serotoninérgicos após tratamento prolongado com 13-*cis*-RA, pode estar associada ao fenótipo depressivo, demonstrando um perfil concordante com o aumento da neurotransmissão serotoninérgica no córtex frontal de animais tratados com antidepressivos (Ceglia et al., 2004).

Estudo de neuroimagem em humanos evidenciou alterações no córtex orbitofrontal decorrente do tratamento com 13-*cis*-RA, que foi observado através de uma redução no metabolismo cerebral (Bremner et al., 2005). A patofisiologia da depressão ainda não é bem compreendida, e achados biológicos como redução do volume e funcionamento do córtex pré-frontal, descritos em alguns pacientes, pode contribuir para o desenvolvimento da depressão (Lacerda et al., 2004; Kennedy et al., 2001). Adicionalmente, a indução da depleção do triptofano (precursor da síntese de 5-HT) em humanos, teve como consequência a redução do metabolismo cortical, associado a uma piora dos sintomas de depressão (Bremner et al., 1997), evidenciando a contribuição do sistema serotoninérgico nesta região para a modulação do metabolismo cerebral.

Redução na densidade de receptores 5-HT_{1A} no córtex foi descrito em humanos com diagnóstico de depressão (Drevet et al., 2007). Em animais que apresentaram fenótipo depressivo em testes comportamentais, observou-se redução cortical nos transcritos para os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A} (Pang et al., 2009). O aumento de glicocorticóides é normalmente encontrado em pacientes deprimidos e a administração de dexametasona em cultura de astrócitos derivadas do córtex frontal de ratos, que tentaria mimetizar o excesso de glicocorticóides, reduziu a expressão de receptores 5-HT₇. Neste mesmo modelo, a exposição a diversos antidepressivos aumentou a atividade deste receptor (Shimizu et al., 1996 e 1997).

Coletivamente, esses dados sugerem uma possível correlação entre o comportamento depressivo e a perturbação na transcrição de diversos genes de receptores serotoninérgicos no córtex pré-frontal.

6.3.4 Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura límbica importante na modulação de comportamentos relacionados à memória, aprendizagem e depressão, e é principalmente nesta área encefálica que ocorrem processos de neuroplasticidade, como neurogênese e fortalecimentos sinápticos (Eriksson et al., 1998; Malberg et al., 2000; Tsien, Huerta e Tonegawa, 1996; Whitlock et al., 2006). Os retinóides apresentam capacidade de modular alterações na sinapse como LTP (*long term potentiation*) e LTD (*long term depression*), e devido sua atividade na diferenciação celular, é capaz de regular o processo de neurogênese (Bonnet et al., 2008; Crandall et al., 2004; Misner et al., 2001).

A vulnerabilidade do hipocampo ao tratamento com 13-*cis*-RA já foi evidenciada em alguns estudos. Investigações em animais submetidos à administração crônica do 13-*cis*-RA observaram uma redução na taxa de neurogênese nesta área cerebral e um prejuízo na correlação enzimática da citocromo oxidase, entre o núcleo dorsal da *raphé* e o hipocampo (Crandall et al., 2004; O' Reilly et al., 2009).

Em nosso estudo a administração prolongada do 13-*cis*-RA induziu no hipocampo somente uma redução nos transcritos do receptor 5-HT₇. Estudo eletrofisiológico, aliado à técnica farmacológica, demonstrou a importância deste receptor na modulação da atividade sincronizada neuronal do hipocampo de ratos (Gill et al., 2002). Animais 5-HT₇^{-/-} apresentaram um prejuízo na aprendizagem do tipo contextual, que foi associada a uma redução na eficiência sináptica no hipocampo representado pelo LTP (Roberts et al., 2004). Tal prejuízo cognitivo foi observado com a administração prolongada do 13-*cis*-RA, tanto em ratos, como camundongos submetidos a diferentes labirintos de memória (Crandall et al., 2004; Dopheide e Morgan, 2008). Desta forma, há evidências de que a redução nos transcritos para o receptor 5-HT₇ possa estar associada ao déficit cognitivo descrito na literatura decorrente do tratamento com 13-*cis*-RA.

Conforme mencionado anteriormente, o aumento de hormônios glicocorticóides é um achado biológico encontrado em alguns tipos de depressão (Dinan, 1994). A redução da concentração de glicocorticóides, que teria um efeito benéfico na depressão, foi induzida através do bloqueio farmacológico de sua síntese em um estudo relatado em ratos (Yau et al., 1997). Neste trabalho os autores observaram um aumento da expressão dos receptores 5-HT₇ no hipocampo, o que estaria de acordo com uma contribuição deste receptor no fenótipo depressivo observado em nossos animais.

Assim, há indícios de que a redução nos transcritos para o receptor 5-HT₇ no hipocampo esteja relacionada ao fenótipo de déficit cognitivo relatado em diferentes estudos e também ao comportamento relacionado à depressão observado em nossos animais.

O presente estudo revelou alterações comportamentais e transcricionais associadas a um efeito pró-depressivo do 13-*cis*-RA em camundongos machos submetidos a um tratamento prolongado com o retinóide. Trata-se da primeira investigação envolvendo o 13-*cis*-RA abrangendo diversos transcritos de componentes da via serotoninérgica em diferentes regiões cerebrais de camundongos. Estes resultados podem sugerir um embasamento científico em modelo animal aos efeitos psiquiátricos observados em humanos com o uso prolongado deste fármaco.

7 CONCLUSÕES

Os camundongos que receberam administração prolongada do 13-*cis*-RA apresentaram um perfil comportamental depressivo evidenciado através da análise conjunta do CA, NF e anedonia. Quantificação dos transcritos para os genes relacionados à via serotoninérgica evidenciou reduções em importantes componentes no mesencéfalo, uma área pré-sináptica serotoninérgica, o que poderia acarretar mudanças neuroadaptativas em regiões pós-sinápticas. O córtex pré-frontal apresentou ampla redução dos transcritos, demonstrando ser uma área muito vulnerável ao tratamento com 13-*cis*-RA. Apesar da possibilidade de um efeito pós-transcricional do 13-*cis*-RA sobre componentes da neurotransmissão serotoninérgica não ter sido investigada, nossos resultados comportamentais e moleculares em camundongos substanciam a ocorrência de efeitos colaterais psiquiátricos descritos em investigações clínicas, possibilitando o questionamento da segurança do uso deste fármaco distribuído pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em nosso país.

REFERÊNCIAS*

Abramowski D, Rigo M, Duc D, Hoyer D, Staunfenbieli M. Localization of the 5-hydroxytryptamine 2C receptor protein in human and rat brain using specific antisera. *Neuropharmacology*. 1995;34(12):1635-45.

Adham N, Romanienko P, Hartig P, Weinshank RL, Branchck T. The rat 5-hydroxytryptamine 1B receptor is the species homologue of the human 5-hydroxytryptamine 1D β receptor. *Mol. Pharmacol*. 1992;41:1-7.

Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin and hallucinogens. *Neuropsychopharmacology*. 1999;21(2):16-23.

Aghajanian GK, Rosecrans JA, Sheard MH. Serotonin: release in the forebrain by stimulation of midbrain raphe. *Science*. 1967;156:402-3.

Albert PR, Lemonde S. 5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: Guilt by association. *Neuroscientist*. 2004;10(6):575-93.

Albert PR, Zhou QY, Van Tol HH, Bunzow JR, Civelli O. Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene. *J Biol Chem*. 1990;265(10):5825-32.

Alex KD, Yavanian GJ, McFarlane HG, Pluto CP, Pehek EA. Modulation of dopamine release by striatal 5-HT_{2C} receptors. *Synapse*. 2005;55:242-51.

Allen JG, Bloxham DP. The pharmacology and pharmacokinetics of the retinoids. *Pharmacol Ther*. 1989;40(1):1-27.

Allenby G, Bocquel MT, Saunders M, Kazmer S, Speck J, Rosenberger M, Lovey A, Kastner P, Grippo JF, Chambon P, Levin AA. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(1):30-4.

Ambar G, Chiavegatto S. Anabolic-androgenic steroid induces behavioral disinhibition associated with decreased transcription of serotonin receptors in the prefrontal cortex and amygdala of male mice. *Genes Brain Behav*. 2009;8(2):161-73.

American Psychiatric Association. DSM-IV-TR: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. Washington: Artmed; 2000.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav.* 1973;21(2):205-35.

Arias B, Gasto C, Catalán R, Gutiérrez B, Pintor L, Fañanás L. The 5-HT_{2A} receptor gene 102T/C polymorphism is associated with suicidal behavior in depressed patients. *Am J Med Genet.* 2001;105(8):801-4.

Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci.* 1996;19(9):378-83.

Azoulay L, Blais L, Koren G, LeLorier J, Bérard A. Isotretinoin and the risk of depression in patients with acne vulgaris: a case-crossover study. *J Clin Psychiatry.* 2008;69(4):526-32.

Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI. Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;223(3):691-4.

Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 2002;43:1773-808. Review.

Balmer JE, Blomhoff R. A robust characterization of retinoic acid response elements based on a comparison of sites in three species. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;96(5):347-54.

Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology.* 2004;29(3):450-60.

Barak Y, Wohl Y, Greenberg Y, Bar Dayan Y, Friedman T, Shoval G, Knobler HY. Affective psychosis following Accutane (isotretinoin) treatment. *Int Clin Psychopharmacol.* 2005;20:39-41.

Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Genes.* 2004;328:1-16. Review.

Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mossner R, Westphal H, Lesch KP. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol.* 1998;53(4):649-55.

Bhatnagar S, Sun LM, Raber J, Maren S, Julius D, Dallman MF. Changes in anxiety-related behaviors and hypothalamic–pituitary–adrenal activity in mice lacking the 5-HT_{3A} receptor. *Physiol Behav.* 2004;81(4):545–55.

Bibancos T, Jardim DL, Aneas I, Chiavegatto S. Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. *Genes Brain Behav.* 2007;6(6):529-39.

Birkett JT, Arranz MJ, Munro J, Osbourn S, Kerwin RW, Collier DA. Association analysis of the 5-HT_{5A} gene in depression, psychosis and antipsychotic response. *Neuroreport.* 2000;11(9):2017-20.

Blanco JC, Minucci S, Lu J, Yang XJ, Walker KK, Chen H, Evans RM, Nakatani Y, Ozato K. The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.* 1998;12(11):1638-51.

Blier P, Bergeron Richard. Effectiveness of pindolol with selected antidepressant drugs in the treatment of major depression. *J Clin Psychopharmacol.* 1995;15(3):217-22.

Boerman MH, Napoli JL. Cellular retinol-binding protein-supported retinoic acid synthesis. Relative roles of microsomes and cytosol. *J Biol Chem.* 1996;271(10):5610-16.

Bonnet E, Touyarot K, Alfons S, Pallet V, Higuieret P, Abrous DN. Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS One.* 2008;3(10):e3487.

Brasil. Portaria SAS/MS Nº 389. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)* 2001 jul. 21;Sec 1:84.

Brasil. Portaria SAS/MS Nº143. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – Acne grave. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)* 2010 mar. 31.

Bremner JD, Fani N., Ashraf A, Votaw JR., Brummer ME., Cummins T, Vaccarino V, Goodman MM, Reed L, Siddiq S, Nemeroff CB. Functional brain imaging alterations in acne patients treated with isotretinoin. *Am J Psychiatry.* 2005;162:983-91.

Bremner JD, Innis RB, Salomon RM, Staib LH, Ng CK, Miller HL, Bronen RA, Krystal JH, Duncan J, Rich D, Price LH, Malison R, Dey H, Soufer R, Charney DS. Positron emission tomography measurement of cerebral metabolic correlates of tryptophan depletion-induced depressive relapse. *Arch Gen Psychiatry.* 1997;54(4):364-74.

Byrne A, Costello M, Greene E, Zibin T. Isotretinoin therapy and depression – Evidence for an association. *Ir J Psych Med.* 1998;45(2):59-60.

Campbell AD, McBride WJ. Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995;51(4):835-42.

Carta M, Stancampiano R, Tronci E, Collu M, Lisiello A, Morelli M, Fadda E. Vitamin a deficiency induces motor impairments and striatal cholinergic dysfunction in rats. *Neuroscience.* 2006;139:1163–72.

Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science.* 2003;301(5631):386-9.

Cassel JC, Jeltsch H, Neufang B, Lauth D, Szabo B, Jackisch R. Downregulation of muscarinic and 5-HT_{1B} mediated modulation of [³H]acetylcholine release in hippocampal slices of rats with fimbria-fornix lesions and intra-hippocampal grafts of septal origin. *Brain Res.* 1995;704(2):153-66.

Ceglia I, Acconcia S, Fracasso C, Colovic M, Caccia S, Invernizzi RW. Effects of chronic treatment with escitalopram or citalopram on extracellular 5-HT in the prefrontal cortex of rats: role of 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol.* 2004;142(3):469-78.

Chalmers DT, Watson SJ. Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain — a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res.* 1991;561(1):51-60.

Chechik G, Meilijson I, Ruppin E. Neuronal regulation: A mechanism for synaptic pruning during brain maturation. *Neural Comput.* 1999;11(8):2061-80.

Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM, Nelson RJ. Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(3):1277-81.

Chu LF, Liang DY, Li X, Sahbaie P, D'arcy N, Liao G, Peltz G, David Clark J. From mouse to man: the 5-HT₃ receptor modulates physical dependence on opioid narcotics. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19(3):193-205.

Claeysen S, Sebben M, Journot L. Cloning, expression and pharmacology of the mouse 5-HT_{4L} receptor. *FEBS Lett.* 1996;398:19–25.

Clark JA, Pai LY, Flick RB, Rohrer SP. Differential hormonal regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the murine dorsal raphe nucleus. *Biol Psychiatry*. 2005; 57(8):943-46.

Clarke SB, Nelson AM, George RE, Triboutot DM. Pharmacologic modulation of sebaceous gland activity: Mechanisms and clinical applications. *Dermatologic Clinics*. 2007;25:137-46.

Collin M, Hakansson-Ovesjo ML, Misane I, Ogren SO, Meister B. Decreased 5-HT transporter mRNA in neurons of the dorsal raphe nucleus and behavioral depression in the obese leptin-deficient ob/ob mouse. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;81(1-2): 51-61.

Conductier G, Dusticier N, Lucas G, Côté F, Debonnel G, Daszuta A, Dumuis A, Nieoullon A, Hen R, Bockaert J, Compan V. Adaptive changes in serotonin neurons of the raphe nuclei in 5-HT(4) receptor knock-out mouse. *Eur J Neurosci*. 2006;24(4):1053-62.

Coon H, Dunn D, Lainhart J, Miller J, Hamil C, Battaglia A, Tancredi R, Leppert MF, Weiss R, McMahon W. Possible association between autism and variants in the brain-expressed tryptophan hydroxylase gene (Tph2). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;135(1):42-6.

Cornea-Hébert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat. *J Comp Neurol*. 1999;409(2):187-209.

Costall B, Domeney AM, Kelly ME, Tomkins DM, Naylor RJ, Wong EH, Smith WL, Whiting RL, Eglen RM. The effect of the 5-HT₃ receptor antagonist, RS-42358-197, in animal models of anxiety. *Eur J Pharmacol*. 1993;234(1):91-9.

Crandall J, Sakai Y, Zhang J, Koul O, Mineur Y, Crusio WE, McCaffery P. 13-*cis*-retinoic acid suppress hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:5111-16.

Crowe DL. Retinoic acid mediates post-transcriptional regulation of keratin 19 mRNA levels. *J Cell Sci*. 1993;106(Pt 1):183-88.

Davidson C, Stamford JA. Evidence that 5-hydroxytryptamine release in rat dorsal raphe nucleus is controlled by 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} autoreceptors. *Br. J. Pharmacol*. 1995;114:1107-9.

Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF. The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature*. 1999;397:359–63.

De Deurwaerdere P, Navailles S, Berg KA, Clarke WP, Spampinato U. Constitutive activity of the serotonin 2C receptor inhibits in vivo dopamine release in the rat striatum and nucleus accumbens. *J Neurosci*. 2004;24:3235-41.

Derkach V, Surprenant A, North RA. 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature*. 1989;339:706–9.

Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res*. 1996;73(1-2):43-6.

Diéz-Ariza M, Ramírez MJ, Lasheras B, Del Rio J. Differential interaction between 5-HT₃ receptors and GABAergic neurons inhibiting acetylcholine release in rat entorhinal cortex slices. *Brain Res*. 1998;801(1-2):228-32.

Dinan TG. Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model. *Br J Psychiatry*. 1994;164(3):365-71.

Dopheide MM, Morgan RE. Isotretinoin (13-*cis*-retinoic acid) alters learning and memory, but not anxiety-like. *Pharmacol Biochem and Behav*. 2008;91(2): 243-51.

Drevets WC, Thase ME, Moses-Kolko EL, Price J, Frank E, Kupfer DJ, Mathis C. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl Med Biol*. 2007;34(7):865-77.

Drew CI, O'Reilly KC, Lane MA, Bailey SJ. Chronic administration of 13-*cis*-retinoic acid does not alter the number of serotonergic neurons in the mouse raphe nuclei. *Neuroscience*. 2010. In Press.

Ellis CN, Krach KJ. Uses and complications of isotretinoin therapy. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45:150-7.

Eriksson P, Perfilova E, Bjork-Eriksson T, Alborn A, Nordborg C, Peterson D, Gage F. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med*. 1998;4:1313-17.

Eriksson TM, Golkar A, Ekström JC, Svenningsson P, Ogren SO. 5-HT₇ receptor stimulation by 8-OH-DPAT counteracts the impairing effect of 5-HT(1A) receptor stimulation on contextual learning in mice. *Eur J Pharmacol*. 2008;596(1-3):107-10.

Ferguson SA, Cisneros FJ, Gough B, Hanig J, Berry K. Chronic oral treatment with 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin) or all-*trans*-retinoic acid does not alter depression-like behaviors in rats. *Toxicological Sciences*. 2005;87(2):451-9.

Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci*. 1995; 108(Pt 10):3181-88.

Freeman AM, Westphal JR, Norris GT, Roggero BA, Webb PB, Freeman KL, Rush JA, Hearne EM III, Evoniuk G. Efficacy of ondansetron in the treatment of generalized anxiety disorder. *Depress Anxiety*. 1997;5(3):140-1.

Frenois F, Moreau M, O'Connor J, Lawson M, Micon C, Lestage J, Kelley KW, Dantzer R, Castanon N. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32(5):516-31.

Friedman T, Wohl Y, Knobler HY, Lubin G, Brenner S, Levi Y, Barak Y. Increased use of mental health services related to isotretinoin treatment: A 5-year analysis. *Neuropsychopharmacology*. 2006;16:413-6.

Galici R, Boggs JD, Miller KL, Bonaventure P, Atack JR. Effects of SB-269970, a 5-HT₇ receptor antagonist, in mouse models predictive of antipsychotic-like activity. *Behav Pharmacol*. 2008;19(2):153-9.

Gannon RL, Peglion JL, Millan MJ. Differential influence of selective 5-HT_{5A} vs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, or 5-HT_{2C} receptor blockade upon light-induced phase shifts in circadian activity rhythms: interaction studies with citalopram. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009;19(12):887-97.

Gill CH, Soffin EM, Hagan JJ, Davies CH. 5-HT₇ receptors modulate synchronized network activity in rat hippocampus. *Neuropharmacology*. 2002;42:82-92.

Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*. 2001;81(2):629-83.

Glass JD, Grossman GH, Farnbauch L, DiNardo L. Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*. 2003;23(20):7451-60.

Goodman DS, Blomstrand R, Werner B, Huang HS, Shiratori T. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and beta-carotene in man. *J Clin Invest.* 1966;45(10):1615–23.

Graeff FG, Guimarães FS, De Andrade TG, Deakin JF. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;54(1):129-41.

Grailhe R, Grabtree GW, Hen, R. Human 5-HT₅ receptors: the 5-HT_{5A} receptor is functional but the 5-HT_{5B} receptor was lost during mammalian evolution. *Eur J Pharmacol.* 2001;418:157–67.

Grailhe R, Waeber C, Dulawa SC, Hornung JP, Zhuang X, Brunner D, Geyer MA, Hen R. Increased exploratory activity and altered response to LSD in mice lacking the 5-HT(5A) receptor. *Neuron.* 1999;22(3):581-91.

Griffin JN, Pinali D, Olds K, Lu N, Appleby L, Doan L, Lane MA. 13-*cis*-retinoic acid decreases hypothalamic cell number in vitro. *Neurosci Res.* 2010;68(3):185-90.

Gupta MA, Gupta AK. Depression and suicidal ideation in dermatology patients with acne, alopecia areata, atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol.* 1998;139(5):846-50.

Gutknecht L, Waider J, Kraft S, Kriegebaum C, Holtmann B, Reif A, Schmitt A, Lesch K. Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice. *J Neural Transm.* 2008;115(8):1127-32.

Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A, Kolachana B, Fera F, Goldman D, Egan MF, Weinberger DR. Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. *Science.* 2002;297(5580):400-3.

Hedlund PB, Kelly L, Mazur C, Lovenberg T, Sutcliffe JG, Bonaventure P. 8-OH-DPAT acts on both 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors to induce hypothermia in rodents. *Eur J Pharmacol.* 2004;487(1-3):125-32.

Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(25):15049-54.

Heisler LK, Pronchuk N, Nonogaki K, Zhou L, Raber J, Tung L, Yeo GS, O'Rahilly S, Colmers WF, Elmquist JK, Tecott LH. Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *J Neurosci.* 2007b;27:6956-64.

Heisler LK, Zhou L, Bajwa P, Hsu J, Tecott LH. Serotonin 5-HT(2C) receptors regulate anxiety-like behavior. *Genes Brain Behav.* 2007a;6:491-6.

Hemrick-Luecke SK, Evans DC. Comparison of the potency of MDL 100,907 and SB 242084 in blocking the serotonin (5-HT)(2) receptor agonist-induced increases in rat serum corticosterone concentrations: evidence for 5-HT(2A) receptor mediation of the HPA axis. *Neuropharmacology.* 2002;42(2):162-9.

Holmes A, Li Q, Murphy DL, Gold E, Crawley JN. Abnormal anxiety-related behavior in serotonin transporter null mutant mice: the influence of genetic background. *Genes Brain Behav.* 2003;2(6):365-80.

Holmes A, Murphy DL, Crawley JN. Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter. *Psychopharmacology (Berl).* 2002a;161(2):160-167.

Holmes A, Yang RJ, Murphy DL, Crawley JN. Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. *Neuropsychopharmacology.* 2002b;27(6):914-23.

Holmes A. Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(7):1293-314.

Hommel L, Geiger JM, Harms M, Saurat JH. Sebum excretion rate in subjects treated with oral all-*trans*-retinoic acid. *Dermatology.* 1996;193(2):127-30.

Hoplight BJ, Sandygren NA, Neumaier JF. Increased expression of 5-HT_{1B} receptors in rat nucleus accumbens via virally mediated gene transfer increases voluntary alcohol consumption. *Alcohol.* 2006;38(2):73-9.

Horn V, Minucci S, Ogryzko VV, Adamson ED, Howard BH, Levin AA, Ozato K. RAR and RXR selective ligands cooperatively induce apoptosis and neuronal differentiation in P19 embryonal carcinoma cells. *FASEB J.* 1996;10(9):1071-7.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;71(4):533-54.

Ishikawa J, Sutoh C, Ishikawa A, Kagechika H, Hirano H, Nakamura S. 13-*cis*-retinoic acid alters the cellular morphology of slice-cultured serotonergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci.* 2008;27(9):2363-72.

Jean A, Conductier G, Manrique C, Bouras C, Berta P, Hen R, Charnay Y, Bockaert J, Compan V. Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT₄ receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;41:16335-40.

Jick SS, Kremers HM, Vasilakis-Scaramozza C. Isotretinoin use and risk of depression, psychotic symptoms, suicide and attempted suicide. *Arch Dermatol*. 2000;136:1231-36.

Joensuu M, Tolmunen T, Saarinen PL, Tiihonen J, Kuikka J, Ahola P, Vanninen R, Lehtonen J. Reduced midbrain serotonin transporter availability in drug-naïve patients with depression measured by SERT-specific [123I] nor-β-CIT SPECT imaging. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2007;154(2):125-31.

Johnson SW, Mercuri NB, North RA. 5-hydroxytryptamine 1B receptors block the GABA_B synaptic potential in rat dopamine neurons. *J Neurosci*. 1992;12: 2000-6.

Jørgensen, H. Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Dan Med Bull*. 2007;54(4):266-88.

Kaba SE, Langford LA, Yung WK, Kyritsis AP. Resolution of recurrent malignant ganglioglioma after treatment with *cis*-retinoic acid. *J Neurooncol*. 1996;30(1):55-60.

Karlsson T, Vahlquist A, Kedishvili N, Törmä H. 13-*cis*-retinoic acid competitively inhibits 3 alpha-hydroxysteroid oxidation by retinol dehydrogenase RoDH-4: a mechanism for its anti-androgenic effects in sebaceous glands? *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303(1):273–8.

Keedwell PA, Andrew C, Williams SC, Brammer MJ, Phillips ML. The neural correlates of anhedonia in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2005;58(11):843-53.

Kelley SP, Bratt AM, Hodge CW. Targeted gene deletion of the 5-HT_{3A} receptor subunit produces an anxiolytic phenotype in mice. *Eur J Pharmacol*. 2003;461(1):19-25.

Kennedy SH, Evans KR, Krüger S, Mayberg HS, Meyer JH, McCann S, Arifuzzman AI, Houle S, Vaccarino FJ. Changes in regional brain glucose metabolism measured with positron emission tomography after paroxetine treatment of major depression. *Am J Psychiatry*. 2001;158:899-905.

Kim M, Habiba A, Doherty JM, Mills JC, Mercer RW, Huettner JE. Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid. *Dev Biol.* 2009;328(2):456-71.

Kish SJ, Furukawa Y, Chang L, Tong J, Ginovart N, Wilson A, Houle S, Meyer JH. Regional distribution of serotonin transporter protein in postmortem human brain. Is the cerebellum a SERT-free brain region? *Nucl Med Biol.* 2005;32(2):123-8.

Koed K, Linnet K. Opposing changes in serotonin and norepinephrine transporter mRNA levels after serotonin depletion. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2000;10(6):501-9.

Koo J. The psychosocial impact of acne: patients' perceptions. *J Am Acad Dermatol.* 1995;32:26-30.

Koo JW, Duman RS. IL-1 β is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(2):751-6.

Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupé V, Kastner P, Borrelli E, Chambon P. Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science.* 1998;279(5352):863-7.

Krezel W, Kastner P, Chambon P. Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience.* 1999;89(4):1291-300.

Lacerda AL, Keshavan MS, Hardan AY, Yorbik O, Brambilla P, Sassi RB, Nicoletti M, Mallinger AG, Frank E, Kupfer DJ, Soares JC. Anatomic evaluation of the orbitofrontal cortex in major depressive disorder. *Biol Psychiatry.* 2004;55(4):353-8.

Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW Jr, Lott IT, Richard JM, Sun SC. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med.* 1985;313(14):837-41.

Lane MA, Bailey SJ. Role of retinoid signaling in the adult brain. *Prog Neurobiol.* 2005;72:275-93.

Laporte AM, Lima L, Gozlan H, Hamon M. Selective in vivo labelling of brain 5-HT_{1A} receptors by [³H]WAY 100635 in the mouse. *Eur J Pharmacol.* 1994;271(2-3):505-14.

Lappalainen J, Long JC, Eggert M, Ozaki N, Robin RW, Brown GL, Naukkarinen H, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D. Linkage of antisocial alcoholism to the

serotonin 5-HT_{1B} receptor gene in 2 populations. *Arch Gen Psychiatry*. 1998;55(11):989-94.

Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, Jahng JW. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res*. 2007;58(1):32-9.

Leeb K, Parker L, Eikelboom R. Effects of pimozide on the hedonic properties of sucrose: analysis by the taste reactivity test. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991;39:895–901.

Leid M, Kastner P, Chambon P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci*. 1992;17(10):427-33.

Li E, Qian SJ, Winter NS, d'Avignon A, Levin MS, Gordon JI. Fluorine nuclear magnetic resonance analysis of the ligand binding properties of two homologous rat cellular retinol-binding proteins expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1991;266(6):3622-9.

Lieben CK, Blokland A, Sik A, Sung E, Van Nieuwenhuizen P, Schreiber R. The selective 5-HT₆ receptor antagonist Ro4368554 restores memory performance in cholinergic and serotonergic models of memory deficiency in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(12):2169-79.

Lin YJ, Ko H, Chang F, Yeh T, Sun S. Population-specific functional variant of the Tph2 gene 2755C>A polymorphism contributes risk association to major depression and anxiety in Chinese peripartum women. *Arch Womens Ment Health*. 2009;12(6):401-8.

Linnet K, Koed K, Wiborg O and Gregersen N. Serotonin depletion decreases serotonin transporter mRNA levels in rat brain. *Brain Res*. 1995;697(1-2):251-3.

Lira A, Zhou M, Castanon N, Ansorge MS, Gordon JA, Francis JH, Bradley-Moore M, Lira J, Underwood MD, Arango V, Kung HF, Hofer MA, Hen R, Gingrich JA. Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry*. 2003;54(10):960-71.

Lister RG. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 1987;92(2):180-5.

Liu R, Jolas T, Aghajanian G. Serotonin 5-HT(2) receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res*. 2000;873(1):34-45.

Liu Y, Kagechika H, Ishikawa J, Hirano H, Matsukuma S, Tanaka K, Nakamura S. Effects of retinoic acids on the dendritic morphology of cultured hippocampal neurons. *J Neurochem*. 2008;106(3):1104-16.

Lorke DE, Lu G, Cho E, Yew DT. Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₆ receptors in the prefrontal cortex of Alzheimer and normal aging patients. *BioMed Central Neurosci*. 2006;7:36-44.

Lucki I, Dalvi A, Mayorga AJ. Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology* 2001;155(3):315-322.

Lyer RN, Bradberry CW. Serotonin-mediated increase in prefrontal cortex dopamine release: pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;277(1):40-7.

Maden M, Gale E, Kostetskii I, Zile M. Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr Biol*. 1996;6:417-26.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 2000;20(24):9104-10.

Malison RT, Price LH, Berman R, van Dyck CH, Pelton GH, Carpenter L, Sanacora G, Owens MJ, Nemeroff CB, Rajeevan N, Baldwin RM, Seibyl JP, Innis RB, Charney DS. Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [123I]-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)tropane and single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry*. 1998;44(11):1090-98.

Marlétaz F, Holland LZ, Laudet V, Schubert M. Retinoic acid signaling and the evolution of chordates. *Int J Biol Sci*. 2006;2(2):38-47.

Mathews TA, Fedele DE, Coppelli FM, Avila AM, Murphy DL, Andrews AM. Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression. *J Neurosci Methods*. 2004;140(1-2):169-81.

Mazer C, Muneyyirci J, Taheny K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Res*. 1997;760(1-2):68-73.

McCance-Katz EF, Price LH. Depression associated with vitamin A intoxication (letter). *Psychosomatics*. 1992;33:117-8.

Miczek KA, Faccidomo S, De Almeida RM, Bannai M, Fish EW, Debold JF. Escalated aggressive behavior: new pharmacotherapeutic approaches and opportunities. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1036:336-55.

Miczek KA, Fish EW, De Bold JF, Almeida RMM. Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and γ -aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology.* 2002;163(3-4):434-58.

Mikkelsen JD, Hay-Schmidt A, Kiss A. .Serotonergic Stimulation of the Rat Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis: Interaction between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} Receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1018:65-70.

Ministério da Saúde. Em busca de uma pele sem marcas. Portal da Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.gov.br/portal/saude>. [2010 mar. 11].

Minucci S, Leid M, Toyama R, Saint-Jeannet JP, Peterson VJ, Horn V, Ishmael JE, Bhattacharyya N, Dey A, Dawid IB, Ozato K. Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression. *Mol Cell Biol.* 1997;17(2):644–55.

Misner DL, Jacobs S, Shimizu Y, de Urquiza AM, Solomin L, Perlmann T, De Luca LM, Stevens CF, Evans RM. Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):11714-9.

Morairty SR, Hedley L, Flores J, Martin R, Kilduff TS. Selective 5HT_{2A} and 5HT₆ receptor antagonists promote sleep in rats. *Sleep.* 2008;31(1):34-44.

Morley-Fletcher S, Darnaudéry M, Mocaer E, Froger N, Lanfumey L, Laviola G, Casolini P, Zuena AR, Marzano L, Hamon M, Maccari S. Chronic treatment with imipramine reverses immobility behaviour, hippocampal corticosteroid receptors and cortical 5-HT(1A) receptor mRNA in prenatally stressed rats. *Neuropharmacology.* 2004;47(6):841-7.

Motomura K, Ohata M, Satre M, Tsukamoto H. Destabilization of TNF- α mRNA by retinoic acid in hepatic macrophages: implications for alcoholic liver disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281(3):E420-E9.

Motzer RJ, Schwartz L, Law TM, Murphy BA, Hoffman AD, Albino AP, Vlamis V, Nanus DM. Interferon alfa-2a and 13-*cis*-retinoic acid in renal cell carcinoma: antitumor activity in a phase II trial and interactions in vitro. *J Clin Oncol.* 1995;13(8):1950-7.

Myrick H, Anton RF, Li X, Henderson S, Randall PK, Voronin K. Effect of naltrexone and ondansetron on alcohol cue-induced activation of the ventral striatum in alcohol-dependent people. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65(4):466-75.

Nakagawa Y, Ishima T, Takashima T. The 5-HT₃ receptor agonist attenuates the action of antidepressants in the forced swim test in rats. *Brain Res*. 1998;786:189-93.

Nelson AM, Gilliland KL, Cong Z, Thiboutot DM. 13-*cis*-retinoic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in human SEB-1 sebocytes. *J Invest Dermatol*. 2006;126(10):2178-89.

Nelson AM, Zhao W, Gilliland KL, Zaenglein AL, Liu W, Thiboutot DM. Early gene changes induced by isotretinoin in the skin provide clues to its mechanism of action. *Dermatoendocrinol*. 2009;1(2):100-1.

Nelson RJ, Chiavegatto S. Molecular basis of aggression. *Trends Neurosci*. 2001;24(12):713-9. Review.

Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM, Brownfield M. Localization of 5-HT(7) receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *J Chem Neuroanat*. 2001;21(1):63-73.

Norris AW, Cheng L, Giguère V, Rosenberger M, Li E. Measurement of subnanomolar retinoic acid binding affinities for cellular retinoic acid binding proteins by fluorometric titration. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1209(1):10-18.

O'Hara R, Schröder CM, Mahadevan R, Schatzberg AF, Lindley S, Fox S, Weiner M, Kraemer HC, Noda A, Lin X, Gray HL, Hallmayer JF. Serotonin transporter polymorphism, memory, and hippocampal volume in the elderly: association and interaction with cortisol. *Mol Psychiatry*. 2007;12(6):544-55.

O'Reilly K, Bailey SJ, Lane MA. Minireview: Retinoid-mediated regulation of mood: possible cellular mechanisms. *Exp Biol Med*. 2008;233:251-8.

O'Reilly KC, Shumake J, Bailey SJ, Gonzalez-Lima F, Lane MA. Chronic 13-*cis*-retinoic acid administration disrupts network interactions between the raphe nuclei and the hippocampal system in young adult mice. *Eur J Pharmacol*. 2009;605:68-77.

O'Reilly KC, Shumake J, Gonzales-Lima F, Lane MA, Bailey SJ. Chronic administration of 13-*cis*-retinoic acid increases depression-related behavior in mice. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:1919-27.

O'Reilly KC, Trent S, Bailey SJ, Lane MA. 13-*cis*-retinoic acid alters intracellular serotonin, increases 5-HT_{1A} receptor and serotonin reuptake transporter levels in vitro. *Exp Biol Med*. 2007;232:1195-203.

Oliveira MR, Silvestrin RB, Souza DM, Moreira JCF. Therapeutic vitamin A doses increase the levels of markers of oxidative insult in substantia nigra and decrease locomotory and exploratory activity in rats after acute and chronic supplementation. *Neurochem Res*. 2008;33(3):378-83.

Oliver KR, Kinsey AM, Wainwright A, Sirinathsinghji DJS. Localization of 5-HT_{5A} receptor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res*. 2000;867:131-42.

Olivier B, Soudijn W, Van Wijngaarden I. The 5-HT_{1A} receptor and its ligands: structure and function. *Prog Drug Res*. 1999;52:103-65.

Osei-Owusu P, James A, Crane J, Scrogin KE. 5-Hydroxytryptamine 1A receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus mediate oxytocin and adrenocorticotropin hormone release and some behavioral components of the serotonin syndrome. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313(3):1324-30.

Overstreet DH, Friedman E, Mathe AA, Yadid G. The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neurosci Biobehav*. 2005;29(4-5):739-59. Review.

Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, Lucki I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology*. 1999;147(2):162-7.

Pang TYC, Zajac MS, Howard ML, Hannan AJ. Altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2009;18(4):753-66.

Parker KJ, Kenna HA, Zeitzer JM, Keller J, Blasey CM, Amico JA, Schatzberg AF. Preliminary evidence that plasma oxytocin levels are elevated in major depression. *Psychiatry Res*. 2010;178(2):359-62.

Parker RM, Barnes JM, Ge J, Barber PC, Barnes NM. Autoradiographic distribution of [³H]-(S)-zacopride-labelled 5-HT₃ receptors in human brain. *J Neurol Sci*. 1996;144(1-2):119-27.

Parker RMC, Bentley KR, Barnes NM. Allosteric modulation of 5-HT₃ receptor: focus on alcohols and anaesthetic agents. *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17:95-8.

Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(18):10734-9.

Patel P, Hanning RM, Atkinson SA, Dent PB, Dolovich J. Intoxication from vitamin A in an asthmatic child. *CMAJ*. 1988 Oct 15;139(8):755-6.

Patel PD, Pontrello C, Burke S. Robust and tissue-specific expression of Tph2 versus Tph1 in rat raphe and pineal gland. *Biol Psychiatry*. 2004;55(4):428-33.

Pehek EA, Nocjar C, Roth BL, Byrd TA, Mabrouk OS. Evidence for the preferential involvement of 5-HT_{2A} serotonin receptors in stress- and drug-induced dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(2):265-77.

Pentkowski NS, Acosta JI, Browning JR, Hamilton EC, Neisewander JL. Stimulation of 5-HT(1B) receptors enhances cocaine reinforcement yet reduces cocaine-seeking behavior. *Addict Biol*. 2009;14(4):419-30.

Phan TQ, Jow MM, Privalsky ML. DNA recognition by thyroid hormone and retinoic acid receptors: 3,4,5 rule modified. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;319(1-2):88-98.

Picazo O, López-Rubalcava C, Fernández-Guasti A. Anxiolytic effect of the 5-HT_{1A} compounds 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin and ipsapirone in the social interaction paradigm: evidence of a presynaptic action. *Brain Res Bull*. 1995;37(2):169-75.

Pike VW, McCarron JA, Lammerstma AA, Hume SP, Poole K, Grasby PM, Malizia A, Cliffe IA, Fletcher A, Bench CJ. First delineation of 5-HT_{1A} receptors in human brain with PET and [11C]WAY-100635. *Eur J Pharmacol*. 1995;283(1-3):R1-3.

Pistovcakova J, Makatsori A, Sulcova A, Jezova D. Felbamate reduces hormone release and locomotor hypoactivity induced by repeated stress of social defeat in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2005;15(2):153-8.

Pizzagalli DA, Iosifescu D, Hallett LA, Ratner KG, Fava M. Reduced hedonic capacity in major depressive disorder: evidence from a probabilistic reward task. *J Psychiatr Res*. 2008;43(1):76-87.

Plewig G, Dressel H, Pflieger M, Michelsen S, Kligman AM. Low dose isotretinoin combined with tretinoin is effective to correct abnormalities of acne. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2004;2(1):31-45.

Porras G, De Deurwaerdere P, Moison D, Spampinato U. Conditional involvement of striatal serotonin 3 receptors in the control of *in vivo* dopamine outflow in the rat striatum. *Eur J Neurosci*. 2003;17:771-81.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatment. *Eur J Pharmacol*. 1978;47(4):379-91.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioural despair in mice: A primary screening test for antidepressant. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977a;229(2):327-36.

Porsolt RD, Le Pichon M and Jalfre M. Depression: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977b; 266(5604):730-2.

Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res*. 2004;155(1):135-46.

Pritchett, D.B., Bach, A.W.J., Wozny, M., Taleb O, Dal Toso R, Shih JC, Seeburg PH. Structure and functional expression of a cloned rat serotonin 5-HT₂ receptor. *EMBO J*. 1988;7(13):4135-40.

Purba JS, Hoogendijk WJ, Hofman MA, Swaab DF. Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Arch Gen Psychiatry*. 1996;53(2):137-43.

Ramalho RA, Flores H, Saunders C. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. *Rev Panam Salud Publica*. 2002;12(2):117-22.

Redondo C, Vouropoulou M, Evans J, Findlay JB. Identification of the retinol-binding protein (RBP) interaction site and functional state of RBPs for the membrane receptor. *FASEB J*. 2008;22(4):1043-54.

Rehn LM, Meririnne E, Höök-Nikanne J, Isometsä E, Henriksson M. Depressive symptoms and suicidal ideation during isotretinoin treatment: a 12-week follow-up study of male Finnish military conscripts. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23(11):1294-7.

Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, El Mestikawy S, Hamon M, Descarries L. Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol*. 2000;417(2):181-94.

Richard S, Zingg HH. Identification of retinoic acid response element in the human oxytocin promoter. *J Biol Chem*. 1991;266(32):21428-33.

Roberts AJ, Krucker T, Levy CL, Slanina KA, Sutcliffe JG, Hedlund PB. Mice lacking 5-HT₇ receptors show specific impairments in contextual learning. *Eur J Neurosci*. 2004;19(7):1913-22.

Rolls ET, Hornak J, Wade D, McGrath J. Emotion-related learning in patients with social and emotional changes associated with frontal lobe damage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57(12):1518-24.

Ruat M, Traiffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Leurs R, Schwartz JC. A novel rat serotonin (5-HT₆) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993a;193(1):268-76.

Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993b;90(18):8547-51.

Ruiz A, Winston A, Lim YH, Gilbert BA, Rando RR, Bok D. Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. *J Biol Chem*. 1999;274(6):3834-41.

Sarkisyan G, Roberts AJ, Hedlund PB. The 5-HT₇ receptor as a mediator and modulator of antidepressant-like behavior. *Behav Brain Res*. 2010. In press.

Savelieva KV, Zhao S, Pogorelov VM, Rajan I, Yang Q, Cullinan E, Lanthorn TH. Genetic Disruption of Both Tryptophan Hydroxylase Genes Dramatically Reduces Serotonin and Affects Behavior in Models Sensitive to Antidepressants. *PLoS ONE*. 2008;3(10):e3301.

Schneier FR, Garfinkel R, Kennedy B, Campeas R, Fallon B, Marshall R, O'Donnell L, Hogan T, Liebowitz MR. Ondansetron in the treatment of panic disorder. *Anxiety*. 1996;2(4):199-202.

Scruggs JL, Patel S, Bubser M, Deutch AY. DOI-Induced activation of the cortex: dependence on 5-HT_{2A} heteroreceptors on thalamocortical glutamatergic neurons. *J Neurosci*. 2000;20:8846-52.

Shimizu M, Nishida A, Zensho H, Miyata M, Yamawaki S. Down-regulation of 5-hydroxytryptamine 7 receptors by dexamethasone in rat frontocortical astrocytes. *J Neurochem*. 1997;68(6):2604-9.

Shimizu M, Nishida A, Zensho H, Yamawaki S. Chronic antidepressant exposure enhances 5-hydroxytryptamine 7 receptor-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation in rat frontocortical astrocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;279(3):1551-8.

Shingleton JL, Skinner MK, Ong DE. Characteristics of retinol accumulation from serum retinol-binding protein by cultured Sertoli cells. *Biochemistry*. 1989;28(25):9641-7.

Shishkina GT, Kalinina TS, Dygalo NN. Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect. *Neuroscience*. 2007;150(2):404-12.

Sinclair W, Jordaan HF. Global Alliance to Improve Outcomes in Acne; Acne guideline 2005 update. *S Afr Med J*. 2005;95(11 Pt 2):881-92.

Sprouse JS, Aghajanian GK. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse*. 1987;1:3-9.

Stadler WM, Kuzel T, Dumas M, Vogelzang NJ. Multicenter phase II trial of interleukin-2, interferon-alpha, and 13-*cis*-retinoic acid in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 1998;16(5):1820-1825.

Strauss JS, Rapini RP, Shalita AR, Konecky E, Pochi PE, Comite H, Exner JH. Isotretinoin therapy for acne: results of a multicenter dose-response study. *J Am Acad Dermatol*. 1984;10(3):490-6.

Strekalova T, Gorenkova N, Schunk E, Dolgov O, Bartsch D. Selective effects of citalopram in a mouse model of stress-induced anhedonia with a control for chronic stress. *Behav Pharmacol*. 2006;7(3):271-87.

Sutçigil L, Oktenli C, MEUAbak U, Bozkurt A, Cansever A, Uzun O, Sanisoglu SY, Yesilova Z, Ozmenler N, Ozsahin A, Sengul A. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy. *Clin Dev Immunol*. 2007;2007:76396.

Svenningsson P, Tzavara ET, Qi H, Carruthers R, Witkin JM, Nomikos GG, Greengard P. Biochemical and behavioral evidence for antidepressant-like effects of 5-HT₆ receptor stimulation. *J Neurosci*. 2007;27(15):4201-9.

Tamburella A, Micale V, Navarria A, Drago F. Antidepressant properties of 5-HT₄ receptor partial agonist, SL65.0155: Behavioral and Neurochemical studies in rats. *Prog in Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33(7):1205-10.

Tecott LH, Sun LM, Akana SF, Strack AM, Lowenstein DH, Dallman MF, Julius D. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2C} serotonin receptors. *Nature*. 1995;374(6522):542-6.

Teneback CC, Nahas Z, Speer AM, Molloy M, Stallings LE, Spicer KM, Risch SC, George MS. Changes in prefrontal cortex and paralimbic activity in depression following two weeks of daily left prefrontal TMS. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1999;11(4):426-35.

Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(9):1423-45.

Thomas DR, Larminie CG, Lyons HR, Fosberry A, Hill MJ, Hayes PD. Cloning and pharmacological characterisation of the guinea pig 5-HT_{5A} receptor. *Eur J Pharmacol*. 2004;494:91-9.

Thomas DR, Melotto S, Massagrande M, Gribble AD, Jeffrey P, Stevens AJ, Deeks NJ, Eddershaw PJ, Fenwick SH, Riley G, Stean T, Scott CM, Hill MJ, Middlemiss DN, Hagan JJ, Price GW, Forbes IT. SB-656104-A, a novel selective 5-HT₇ receptor antagonist, modulates REM sleep in rats. *Br J Pharmacol*. 2003;139(4):705-14.

Thomas DR, Soffin EM, Roberts C, Kew JN, de la Flor RM, Dawson LA, Fry VA, Coggon SA, Faedo S, Hayes PD, Corbett DF, Davies CH, Hagan JJ. SB-699551-A(3-cyclopentyl-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-N-[(4'-{[(2-phenylethyl)amino]methyl}-4-biphenyl)methyl] propanamide dihydrochloride), a novel 5-HT_{5A} receptor-selective antagonist, enhances 5-HT neuronal function: Evidence for an autoreceptor role for the 5-HT_{5A} receptor in guinea pig brain. *Neuropharmacology*. 2006;51(3):566-77.

Torres-Escalante JL, Barral JA, Ibarra-Villa MD, Pérez-Burgos A, Góngora-Alfaro JL, Pineda JC. 5-HT_{1A}, 5-HT₂, and GABA_B receptors interact to modulate neurotransmitter release probability in layer 2/3 somatosensory rat cortex as evaluated by the paired pulse protocol. *J Neurosci Res*. 2004;78(2):268-78.

Trent S, Drew CJG, Mitchell PJ, Bailey SJ. Chronic treatment with 13-*cis*-retinoic acid changes aggressive behaviours in the resident-intruder paradigm in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009;19(12):876-86.

Tribollet E, Charpak S, Schmidt A, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ. Appearance and transient expression of oxytocin receptors in fetal, infant, and peripubertal rat brain studied by autoradiography and electrophysiology. *J Neurosci*. 1989;9(5):1764-73.

Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*. 1996;87(7):1327-38.

Tsukada M, Schröder M, Roos TC, Chandraratna RA, Reichert U, Merk HF, Orfanos CE, Zouboulis CC. 13-*cis*-retinoic acid exerts its specific activity on human sebocytes through selective intracellular isomerization to all-trans retinoic acid and binding to retinoid acid receptors. *J Invest Dermatol*. 2000;115(2):321-7.

Tsukada M, Schröder M, Seltmann H, Orfanos CE, Zouboulis CC. High albumin levels restrict the kinetics of 13-cis retinoic acid uptake and intracellular isomerization to all-trans retinoic acid and inhibit its anti-proliferative effect on SZ95 sebocytes. *J Invest Dermatol*. 2002;119(1):182-5.

Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors. *Cell*. 1991;65(7):1255-66.

Van Thiel DH, Gavaler J, Lester R. Ethanol inhibition of vitamin A metabolism in the testes: possible mechanism for sterility in alcoholics. *Science*. 1974;186(4167):941-2.

Vandesompele J, Katleen DP, Filip P, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):RESEARCH0034.1-RESEARCH0034.11.

Varnäs K, Halldin C, Pike VW, Hall H. Distribution of 5-HT₄ receptors in the postmortem human brain--an autoradiographic study using [125I]SB 207710. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2003;13(4):228-34.

Vergé D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, el Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci*. 1986;6(12):3474-82.

Vogt IR, Shimron-Abarbanell D, Neidt H, Erdmann J, Cichon S, Schulze TG, Müller DJ, Maier W, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Knapp M, Rietschel M, Propping P, Nöthen MM. Investigation of the human serotonin 6 [5-HT₆] receptor gene in bipolar affective disorder and schizophrenia. *Am J Med Genet*. 2000;96(2):217-21.

Walther DJ, Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(9):1673-80.

Wang X; Penzes P, Napoli J. Cloning of a cDNA Encoding an Aldehyde Dehydrogenase and Its Expression in *Escherichia coli* RECOGNITION OF RETINAL AS SUBSTRATE. *J Biol Chem*. 1996;271(27):16288-93.

Weisstaub NV, Zhou M, Lira A, Lambe E, Gonzalez-Maeso J, Hornung JP, Sibille E, Underwood M, Itohara S, Dauer WT, Ansorge MS, Morelli E, Mann JJ, Toth M, Aghajanian G, Sealfon SC, Hen R, Gingrich JA. Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science*. 2006;313(5786):536-40.

Wesolowska A, Nikiforuk A, Stachowicz K, Tatarczynska E. Effect of the selective 5-HT(7) receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology*. 2006;51(3):578-86.

Wesolowska A. The anxiolytic-like effect of the selective 5-HT(6) receptor antagonist SB-399885: The impact of benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol*. 2008;580:355-60.

Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors. *Neurosci Lett*. 1986;67(3):307-12.

Whitaker-Azmitia PM, Druse M, Walker P, Lauder JM. Serotonin as a developmental signal. *Behav Brain Res*. 1996;73(1-2):19-29.

Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 2006;313(5790):1093-7.

Wible CG, Anderson J, Shenton ME, Kricun A, Hirayasu Y, Tanaka S, Levitt JJ, O'Donnell BF, Kikinis R, Jolesz FA, McCarley RW. Prefrontal cortex, negative symptoms, and schizophrenia: an MRI study. *Psychiatry Res*. 2001;108(2):65-78.

Wysowski DK, Pitts M, Betz J. An analysis of reports of depression and suicide in patients treated with isotretinoin. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45:515-9.

Yamamoto Y, Yoshizawa T, Kamio S, Aoki O, Kawamata Y, Masushige S, Kato S. Interactions of transthyretin (TTR) and retinol-binding protein (RBP) in the uptake of retinol by primary rat hepatocytes. *Exp Cell Res*. 1997;234(2):373-8.

Yamauchi M, Miyara T, Matsushima T, Imanishi T. Desensitization of 5-HT_{2A} receptor function by chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Brain Res*. 2006;1067(1):164-9.

Yau JL, Noble J, Widdowson J, Seckl JR. Impact of adrenalectomy on 5-HT₆ and 5-HT₇ receptor gene expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;45(1):182-6.

Yip PK, Wong LF, Pattinson D, Battaglia A, Grist J, Bradbury EJ, Maden M, McMahon SB, Mazarakis ND. Lentiviral vector expressing retinoic acid receptor beta2 promotes recovery of function after corticospinal tract injury in the adult rat spinal cord. *Hum Mol Genet.* 2006;15(21):3107-18.

Zetterström RH, Lindqvist E, Mata de Urquiza A, Tomac A, Eriksson U, Perlmann T, Olson L. Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding protein and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci.* 1999;11(2):407-16.

Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science.* 2004;305(5681):217.

Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Burch LH, Williams RB, Schwartz DA, Krishnan KRR, Caron MG. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron.* 2005;45(1):11-6.

Zhang Y, Damjanoska KJ, Carrasco GA, Dudas B, D'Souza DN, Tetzlaff J, Garcia F, Hanley NRS, Scripathirathan K, Petersen BR, Gray TS, Battaglia G, Muma NA, Van de Kar LD. Evidence That 5-HT_{2A} Receptors in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Mediate Neuroendocrine Responses to (–)DOI. *J Neurosci.* 2002;22(21):9635-42.

Zhuang X, Gross C, Santarelli L, Compan V, Trillat AC, Hen R. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology.* 1999; 21:52-60.

Zill P, Baghai TC, Zwanzger P, Schule C, Eser D, Rupprecht R, Moller HJ, Bondy B, Ackenheil M. SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (Tph2) gene provide evidence for association with major depression. *Mol Psychiatry.* 2004a;9(11):1030-6.

Zill P, Buttner A, Eisenmenger W, Moller HJ, Ackenheil M, Bondy B. Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study. *J Psychiatr Res.* 2007;41(1-2):168-73.

Zill P, Buttner A, Eisenmenger W, Moller HJ, Bondy B, Ackenheil M. Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (Tph2) gene in suicide victims. *Biol Psychiatry.* 2004b;56(8):581-6.

Zouboulis CC. Isotretinoin revisited: pluripotent effects on human sebaceous gland cells. *J Invest Dermatol.* 2006;126(10):2154-6.