

Bruno Rezende de Souza

**MODULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO DOPAMINÉRGICA
EM CÉLULAS PC12 QUE SUPEREXPRESSAM NCS-1**

Belo Horizonte

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Bruno Rezende de Souza

MODULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO DOPAMINÉRGICA EM CÉLULAS PC12 SUPEREXPRESSANDO NCS-1

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau mestre em Biologia: Farmacologia Bioquímica e Molecular

Orientação: Marco Aurélio Romano-Silva

Belo Horizonte
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

2005

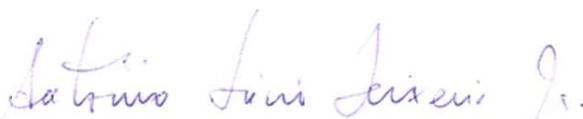
**Dissertação defendida e aprovada, em 26 de outubro de 2005, pela
Banca Examinadora constituída pelos professores:**



Prof. Marco Aurélio Romano Silva (Orientador)



Prof. André Ricardo Massensini



Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior

Dedico esse trabalho aos meus pais, meu irmão
e a Mone

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Marquinho, pelos conselhos, apoio, confiança e por me ensinar o que é ser pesquisador. Minha admiração não se resume apenas ao profissional, mas ao indivíduo em si.

Aos professores Marcus Vinícius, Marco Antônio, Luis Armando e Wolfanga. A convivência já leva ao aprendizado.

Aos amigos e companheiros do laboratório de Neurofarmacologia. Vocês tornaram meu trabalho diário mais agradável. Obrigado!

Aos grandes amigos Bruno Pinheiro, Geraldo, Bráulio, Flávio, Eliane e Livinha pelas ajudas e pela amizade. Nossa empatia vai além do espaço laboratorial.

Aos meus “eternos ICs” e futuros companheiros de profissão, Bernardo, Caetano, Felipe e Rapha, pela amizade, pela paciência com minhas loucuras e pela cooperação. Admiro e confio muito em vocês!

À “Tia” Dani “Blot” “Vadalão” pelos três anos de excepcional amizade e grande “caroneira”. Sempre disposta, me ajudou muito durante o mestrado (principalmente com os protocolos de soluções!). Te adoro!

À Aninha pela imensa amizade construída nos últimos meses. Sua alegria, empolgação, experiência e, especialmente, suas loucuras, me ajudaram muito. Você faz a diferença! Um grande aperto de mão!

Ao Renan pela amizade e companheirismo! Sua inteligência e competência são admiráveis, e seu futuro previsível: sucesso! Obrigado pelos conselhos e convivência.

Ao Stéfany, companheiro de aprovação na seleção do mestrado, pela paciência, conselhos e amizade.

Ao Professor Helton, pela confiança, conselhos, amizade e alegria. Um grande beijo no seu coração!

Aos meus pais, Osvino e Cássia. Meu sucesso é de vocês! O apoio, educação, incentivo, carinho e atenção de vocês são incomparáveis e lhes devo muito!!! Amo vocês!!!!

Ao meu irmão, Thales, grande amigo e conselheiro, mesmo sendo caçula. Se irmão a gente pudesse escolher, o teria escolhido. Te amo!!!

À Mone, minha gatinha, fiel companheira, maior amiga, minha paixão, minha maior inspiração! Sua importância é indescritível! Muito obrigado por toda a paciência, compreensão e apoio durante essa fase! Te amo muito muito!!!

Aos meus amigos de Ouro Branco, Bico, Ana, Funny, Gaysa, Ricardo, Vi, Bá, Jú, Tatê, Thalles, Fessôra, Murilo, Tia Nirma, Edmétrio; aos amigos da PUC-MG, Lú, Lele, Flutu, Quel, Rapha, Paulinha, Flávia, Christian e tantos outros que me ajudaram a completar essa etapa.

À toda minha família e primos, e à família da Mone pelo carinho e apoio.

À vida.

"Uma vida sem questionamentos não vale a pena ser vivida"
(Sócrates)

"A imaginação é uma das maiores prerrogativas do homem. Por essa faculdade ele une imagens e idéias criadas, independentes da vontade, e desse modo cria resultados novos e brilhantes"
(Charles Darwin)

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

RESUMO

Uma das funções da proteína sensora neuronal de cálcio (NCS-1) é inibir a dessensibilização do receptor dopaminérgico D₂, aumentando sua ativação e conseqüentemente a inibição da via de sinalização por adenosina monofosfato cíclica (AMPc). A fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de 32 KDa (DARPP-32) tem importante papel modulatório central na sinalização dopaminérgica e conseqüentemente na integração das sinalizações. Foi demonstrado que no córtex pré-frontal dorsolateral (CPF DL) de indivíduos com esquizofrenia ocorre um aumento da expressão de NCS-1 e uma diminuição da expressão de DARPP-32. Nesse trabalho, investigamos a modulação de DARPP-32 pela NCS-1, utilizando células PC12 superexpressando NCS-1. Estas células apresentaram uma diminuição de DARPP-32, estando assim com um fenótipo semelhante ao apresentado no CPF DL de indivíduos com esquizofrenia. Portanto, investigamos a existência de interação direta entre NCS-1 e DARPP-32 e a modulação da expressão de DARPP-32 através da via AMPc/PKA inibida pela ativação de do receptor dopaminérgico D₂. Nossos resultados sugerem que, devido a superexpressão de NCS-1 e conseqüentemente a inibição da dessensibilização de D₂, ocorreria a diminuição da sinalização por AMPc/PKA e fosforilação de elemento ligante responsivo a AMPc (CREB), diminuindo a expressão de DARPP-32. Esses resultados têm potencial aplicação para futuros estudos sobre disfunções relacionadas ao CPF DL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Vias dopaminérgicas	16
Figura 2:	Vias de síntese e degradação da dopamina	18
Figura 3:	Modulação da adenilato ciclase mediada por receptores dopaminérgicos	20
Figura 4:	Sinalização dopaminérgica em neurônios pós-sinápticos	24
Figura 5:	Sítios de fosforilação da DARPP-32	25
Figura 6:	Modulação de GRK2/ D2 por NCS-1	33
Figura 7:	Efeitos da superexpressão de NCS-1 nos níveis de expressão de DARPP-32	55
Figura 8:	Influência da superexpressão de NCS-1 na expressão de DARPP-32	56
Figura 9:	Ausência de interação entre NCS-1 e DARPP-32	59
Figura 10:	Diminuição dos níveis totais de AMPc em células PC12 NCS-1 comparado a células PC12 W.T.	60
Figura 11:	Níveis de p-CREB em células PC12 NCS-1 são menores comparados com células PC12 W.T.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
AAAD	Descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos
AMPA	Alfa-amino-3-hidróxido-5-metil-isoxazole-propionato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Cdk-5	Quinase dependente de ciclina 5
CK	Caseína quinase
COMT	Catecol-O-metil-transferase
CPF DL	Córtex Pré-Frontal Dorsolateral
CREB	Elemento ligante responsivo a AMPc
Da	Dalton
DARPP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de 32 KDa
DAT	Transportador de dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
FGF-2	Fator de crescimento para fibroblasto
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD67	Ácido glutâmico descarboxilase
GRK2	Proteína quinase 2 acoplada à proteína G
L-DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MAO	Monoamino oxidase
NMDA	N-metil-D-aspartato
NCS-1	Sensora de cálcio neuronal 1
NGF	Fator de crescimento neuronal
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino

PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
PP	Proteína fosfatase
PET	Tomografia de emissão Positrônica
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
Ser	Serina
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TH	Tirosina hidroxilase
Thr	Treonina
TrkB	Tirosina quinase B
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1.1 A dopamina e sistema dopaminérgico	14
1.1.1 Síntese e liberação de dopamina	16
1.1.2 Receptores dopaminérgicos e sinalização de segundo mensageiros	18
1.2 DARPP-32 e sinalização dopaminérgica	23
1.3 NCS-1 e modulação do receptor dopaminérgico D₂	29
1.4 Esquizofrenia e suas alterações dopaminérgicas	34
OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo geral	44
2.2 Objetivos específicos	44
MÉTODOS	45
3.1 Cultura celular	46
3.2 Dosagem de proteína	46
3.3 Co-imunoprecipitação	47
3.4 Imunoensaio enzimático	48
3.5 Imunofluorescência	49
3.6 Microscopia confocal	50
3.7 Imunoblot	50

3.8	Análise dos imunoblots	52
	RESULTADOS	53
4.1	Expressão de DARPP-32 em células PC12 superexpressando NCS-1	54
4.2	Interação direta entre NCS-1 E DARPP-32	57
4.3	Mensuração dos níveis de AMPc em células PC12 superexpressando NCS-1	59
4.4	Nível de p-CREB em células PC12 superexpressando NCS-1	61
	DISCUSSÃO	63
	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1- INTRODUÇÃO

1.1 DOPAMINA E O SISTEMA DOPAMINÉRGICO

A dopamina é responsável pela regulação de muitas funções em mamíferos, tais como o controle: motor, hormonal, de processos cognitivos, de humor, da resposta imune, da motivação e da atenção, entre outros (Giros e *cols.*, 1996; Packard e Knowlton, 2002; Lourenco e *cols.*, 2005; Kavelaars e *cols.*, 2005).

Até a metade da década de 1950, pouco se sabia sobre esse neurotransmissor, sendo considerado exclusivamente um precursor intermediário da biossíntese de outros neurotransmissores, como noradrenalina e adrenalina. Porém, houve um considerável avanço nos estudos sobre a dopamina e suas vias nesses últimos anos.

Foram diferenças marcantes na distribuição regional de dopamina e noradrenalina que levaram investigadores suecos, na década de 1960, a propor um papel biológico específico desta na sinalização neuronal. (Carlsson e *cols.*, 1958; Carlsoon e Waldeck, 1958). Portanto, a dopamina, a partir desta década, foi relacionada como mais um neurotransmissor, evidenciando sua importância no funcionamento cerebral.

A dopamina, diferentemente de outros sistemas de neurotransmissão, encontrados difusamente no sistema nervoso central, se encontra de maneira

circunscrita (Glenthoj, 1995) no sistema nervoso central (SNC), e também pode ser encontrada no sistema nervoso periférico.

Atualmente são conhecidas quatro projeções principais do sistema dopaminérgico (Stahl, 2002) (FIG 1). Destas quatro projeções, três se originam do mesencéfalo e uma na substância negra (Kandell e *cols.*, 2003):

- Via mesolímbica - projeta-se dos corpos celulares da área tegumentar ventral do mesencéfalo para os axônios terminais das áreas límbicas do cérebro, como o núcleo acumbens. Essa via tem importante função para afeto, emoção e motivação.
- Via mesocortical - os corpos celulares desta via surgem na área tegumentar ventral, próximo aos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos da via mesolímbica, e projetam-se para áreas do córtex cerebral, particularmente do córtex límbico. Também tem importante função para afeto, emoção e motivação.
- Via nigroestriatal - projeta-se dos corpos celulares da substância negra do mesencéfalo, por meio de axônios que terminam nos gânglios da base ou *striatum*. Esta via é importante para controle do movimento.
- Via túbero-infundibular- projeta-se do hipotálamo para a glândula pituitária anterior. Esta via regula a secreção de hormônios.

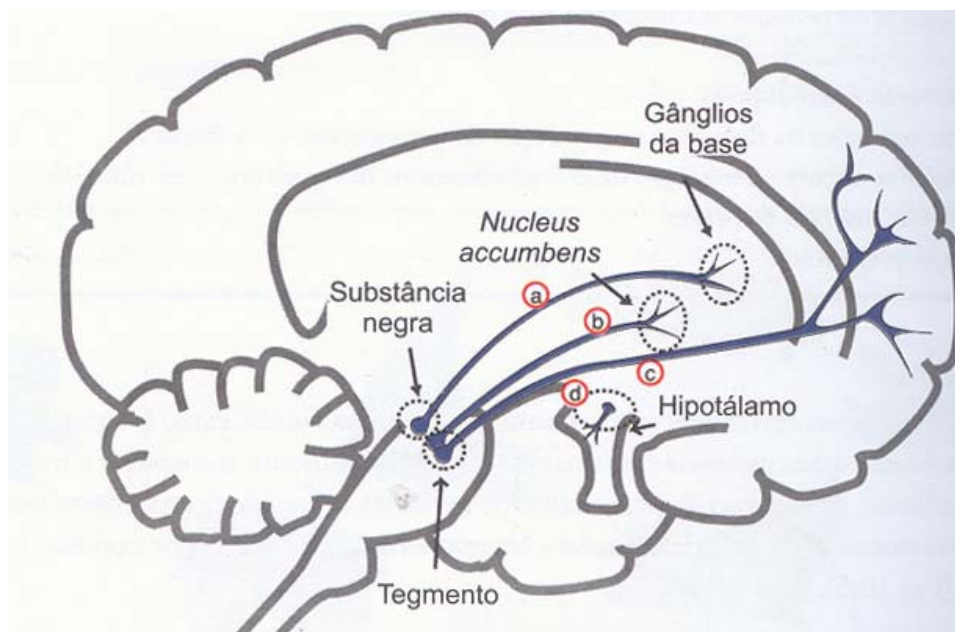


Figura 1: As quatro vias dopaminérgicas. (a) via nigroestriatal, (b) via mesolímbica, (c) via mesocortical, (d) via túbero-infundibular. Modificado de Stahl, 2002.

1.1.1 SÍNTESE E LIBERAÇÃO DE DOPAMINA

A dopamina é um neurotransmissor catecolaminérgico, sintetizado a partir de tirosina por duas reações seqüenciais, catalizadas pelas enzimas tirosina hidroxilase (TH) (formação de 3,4-dihidroxifenilalanina ou L-DOPA) e descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos (AAAD) (FIG 2A).

Após a síntese, a dopamina livre no citosol é rapidamente captada pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT) que utiliza um gradiente eletroquímico de prótons para transportá-la para o interior das vesículas, sendo que este apresenta duas isoformas: VMAT-1, presente na periferia, e VMAT-2,

localizado em estruturas do SNC (Erickson e *cols.*, 1992). As vesículas são então preenchidas com dopamina e ancoradas próximas à membrana do neurônio pré-sináptico. Através da despolarização da membrana, abrem-se os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, levando ao influxo de Ca^{2+} e, conseqüentemente, a liberação dos neurotransmissores.

Algumas proteínas ativadas por Ca^{2+} são essenciais para a exocitose, como a proteína receptora anexada ao fator sensível à N-etilmaleimida solúvel (SNARE), SNAP-25, proteína de membrana associada à vesícula (VAMP), sinaptobrevina, syntaxina e proteína de ligação à syntaxina, munc 18 (Staal e *cols.*, 2004; Binda e *cols.*, 2005). Apesar dos mecanismos de síntese e liberação de dopamina já serem bem descritos, ainda ocorrem avanços no conhecimento desse mecanismo. Binda e *cols.* (2005) sugerem que a interação de receptores pré-sinápticos D_2 com a proteína ativadora de secreção dependente de cálcio (CAPS) pode consistir em um mecanismo de regulação direta entre receptor e componentes da via da exocitose.

Após a liberação da dopamina na fenda sináptica, ocorre a ativação de receptores pré-sinápticos e pós sinápticos através da ligação da dopamina aos seus receptores específicos. A dopamina é então recaptada pelo transportador de dopamina (DAT) e posteriormente degradada no citosol, em produtos inativos (FIG 2B) pela monoamina oxidase (MAO) e pela catecol-O-metil-transferase (COMT). Devido à degradação, são formados 3-metoxitiramina, ácido diidroxifenilacético e o ácido homovanílico (Thorpe e *cols.*, 1987).

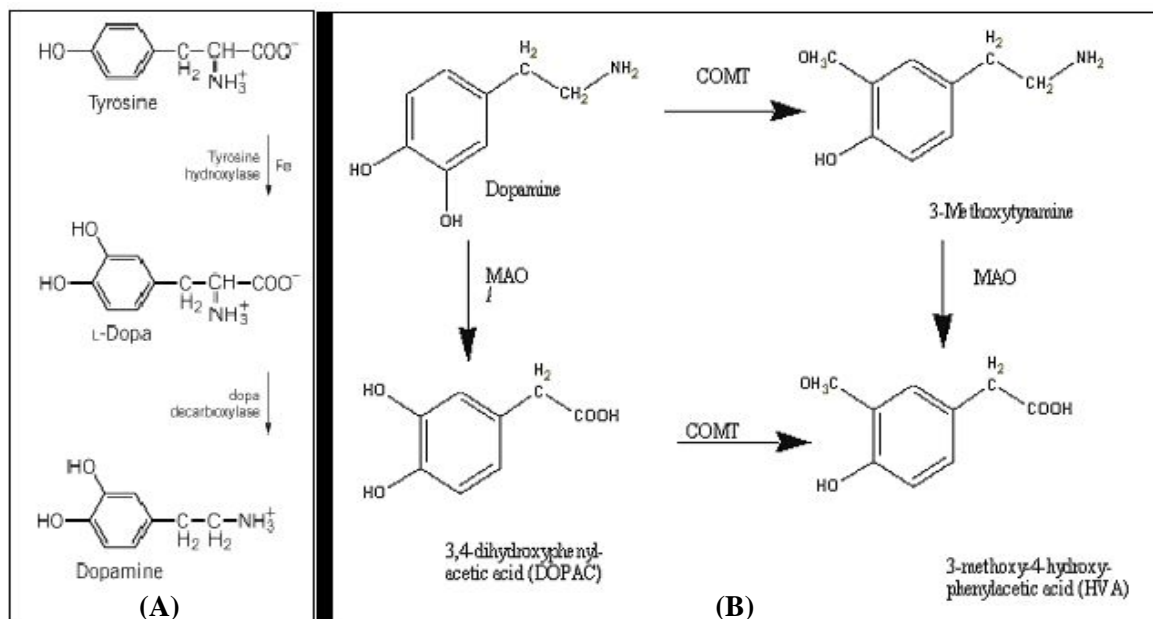


Figura 2: Vias de síntese (2A) e degradação (2B) da dopamina

1.1.2 RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS E SINALIZAÇÃO DE SEGUNDO MENSAGEIROS

Em 1966, Van Rossum apresentou receptores como importantes pontos modulatórios da via dopaminérgica e de distúrbios a ela relacionados. Até 1990, acreditava-se que existiam somente dois tipos de receptores: D1 e D2. No entanto, estudos realizados através de técnicas de biologia molecular possibilitaram a identificação de mais três tipos: D3, D4 e D5. Avaliando-se as propriedades bioquímicas, estruturais e farmacológicas *in vitro* e *in vivo*, estes foram agrupados em duas famílias: receptores do tipo D1 (D1 e D5) e receptores do tipo D2 (D2, D3 e D4) (Levant, 1997).

Foram descritas diferenças estruturais e topológicas entre os dois tipos de receptores dopaminérgicos. O receptor D₁ exibe um terceiro *loop* citoplasmático pequeno, mas uma cauda C-terminal muito longa, enquanto que receptor D₂ exibe um terceiro *loop* citoplasmático grande e uma cauda C-terminal pequena (Callier e cols., 2003). Os receptores dopaminérgicos pertencem à superfamília de receptores acoplados heteromericamente à proteína G (GPCR) (Civelli e cols., 1993), classificados assim como receptores metabotrópicos. Os receptores dopaminérgicos também podem interagir entre si e outros receptores, formando heterodímeros com propriedades farmacológicas distintas. (Rocheville e cols., 2000; Scarselli e cols., 2001; Nimchinsky e cols., 1997; Lee e cols., 2002; Fiorentini e cols., 2003; Gines e cols., 2000; Franco e cols., 2000; Lavine e cols., 2002).

Apesar de ambas as superfamílias de receptores dopaminérgicos serem acopladas a proteína G, as duas tem efeitos antagônicos na sinalização de segundo mensageiros. Os receptores do tipo D₁ são acoplados a proteína G_sα/G_{o1r}α (FIG 3) que ativam a adenilato ciclase (AC) resultando no aumento dos níveis intracelulares do AMPc e conseqüentemente a ativação da Proteína Quinase A (PKA) (Missale e cols., 1998). Já os do tipo D₂ estão acoplados a G_iα/G_oα gerando inativação desta enzima e redução dos níveis de AMPc (Missale e cols. 1998; Vallone e cols., 2000; Bentivoglio e Morelli, 2005) e conseqüentemente a diminuição da ativação de PKA (Missale e cols., 1998). Também foram descritos o aumento de níveis de Ca²⁺ intracelular e ativação da cascata de sinalização da fosfolipase C (PLC)/proteína fosfatase 2B (PP-2B) (Nishi e cols., 1997) através da sinalização por D₂. PKA, quando ativada, fosforila:

canais de Na^+ , levando a uma diminuição do fluxo de íon Na^+ (Li e *co/s.*, 1992; Cantrell e *co/s.*, 1999; Smith e Goldin, 1997); fosfoproteína regulada por AMPc e dopamina – peso molecular 32kDa (DARPP-32) na treonina 34 (Svenningsson, 2004), modulando assim, diversas outras vias; e estimula a fosforilação da proteína ligante de elemento em resposta ao AMPc (CREB) na serina 133, regulando assim a expressão de diversos genes (Svenningsson, 2004).

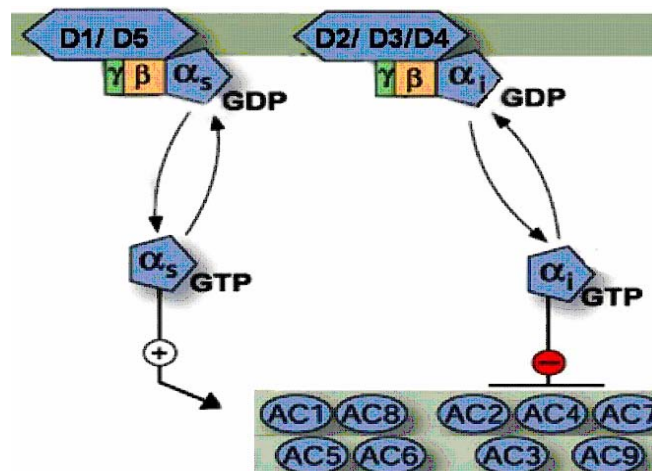


Figura 3: Modulação da adenilato ciclase (AC) mediada por receptores dopaminérgicos (GDP: guanosina difosfato, GTP: guanosina trifosfato).

No entanto, devido aos diferentes mecanismos de sinalização por segundo mensageiros, esses dois subtipos de receptores, D_1 e D_2 , podem ser diferenciados pelas suas propriedades farmacológicas e ações nos segundo mensageiros intracelulares (Missale e *co/s.*, 1998; Vallone e *co/s.*, 2000). Ambos os subtipos de receptores dopaminérgicos foram descritos no córtex pré-frontal (CPF) (Levey e *co/s.*, 1993; Lidow e *co/s.*, 1998; Meador-Woodruff e *co/s.*, 1996), região cortical envolvida em distúrbios psiquiátricos, como esquizofrenia e distúrbio bi-polar (Albert e *co/s.*, 2002; Lewis e *co/s.*, 2005; Ogden e *co/s.*, 2004).

A importância funcional dos receptores dopaminérgicos D₂ é demonstrada através da sua afinidade com os antipsicóticos típicos e atípicos (Lidow e cols., 1998; Strange, 2001). Porém, a função do receptor D₂ na transmissão sináptica no CPF é bem menos entendida que a do receptor D₁ nesta mesma região (Lidow, 2000; Goldman-Rakic e cols., 2000). Sabe-se que a função do receptor D₂ na atividade neuronal do *striatum* é altamente controversa, onde existe em alta densidade (Nicola e cols., 2000). Portanto, a necessidade de um melhor entendimento do mecanismo de funcionamento de D₂ no CPF é evidente devido a sua importância farmacoterapêutica.

Diversos estudos demonstraram que a sinalização dopaminérgica mediada por receptores D₂ inibe a sinalização de segundos mensageiros intracelulares (Gerfen e cols., 1990; West e Grace, 2002; Svenningsson e cols., 2000), porém, estudos eletrofisiológicos sugerem um complexo de ações excitatórias e inibitórias do D₂ no CPF (Zheng e cols., 1999; Seamans e cols., 2001, Urban e cols., 2002; Tseng e O'Donnell, 2004) devido à localização de receptores D₂ em processos dendríticos, tanto pré-sinápticos quanto pós-sinápticos, de neurônios piramidais, interneurônios e glias. (Paspalas e Goldman-Rakic, 2004; Khan e cols., 2001; Negyessy e Goldman-Rakic, 2005).

1.1.4 MODULAÇÃO DO RECEPTOR

Sabe-se que, para modulação da sinalização através de receptores metabotrópicos ocorre um mecanismo de dessensibilização e ressensibilização do receptor. O mecanismo de dessensibilização do receptor representa uma adaptação contra a super-estimulação do mesmo. (Lohse, 1993; Krupnick e Benovic, 1998). A dessensibilização de receptores metabotrópicos é mediado pela fosforilação dos resíduos de serina e treonina em domínios intracelulares do receptor (Ferguson, 2001). A fosforilação do receptor promove a ligação de arrestina e internalização (Krupnick e Benovic, 1998), deixando-o temporariamente inapto para a ativação por neurotransmissores. O mecanismo de dessensibilização foi descrito demonstrando que, tanto quinases dependente de segundo mensageiros, como a proteína quinase sensível a AMPc (PKA), quanto receptor quinase acoplado a proteína G (GRK), contribuem para a dessensibilização de receptores dopaminérgico ativados. (Mason e *cols.*, 2002). Foi observado que o receptor dopaminérgico D₂ ativado é internalizado pela co-expressão de GRK2 e GRK5 (Ito e *cols.*, 1999; Iwata e *cols.*, 1999). Portanto, nota-se que a dessensibilização pode ser modulada pela ativação da via do AMPc, atuando assim como um *feedback* negativo.

Sabe-se que existem certas dificuldades metodológicas para estudar os efeitos fisiológicos da ativação de D₂ no CPF, devido ao seu processo de sensibilização e dessensibilização (Maggio e *cols.*, 1995; Kabbani e *cols.*, 2002). Esses processos, especialmente a dessensibilização, podem potencializar ou até mesmo diminuir

os efeitos de tratamentos terapêuticos (Negyessy e Goldman-Rakic, 2005). Kabbani e cols. (2002) mostraram que a proteína neuronal sensora de cálcio-1 (NCS-1) forma complexos com a GRK2 e com o receptor de dopamina D₂, regulando, assim, a dessensibilização do receptor D₂ ativado. Devido esta interação, NCS-1 é importante para regulação dos processos mediados por D₂ *in vivo* já que foram demonstrados que D₂ e NCS-1 estão colocalizados no CPF de primatas, existindo uma coexistência de aproximadamente 10%, em estruturas pré-sinápticas e pós sinápticas (Negyessy e Goldman-Rakic, 2005).

1.2 DARPP-32 E SINALIZAÇÃO DOPAMINÉRGICA

DARPP-32 é uma proteína, descoberta por S. Ivar Walaas e Dana W. Aswad (Walaas, Aswad e Greengard, 1983) e extensivamente estudada desde então. Estudos sobre os mecanismos de funcionamento da DARPP-32 têm desempenhado um papel central na compreensão da sinalização dopaminérgica e suas interações com outros neurotransmissores, drogas terapêuticas e de abuso (Self e cols., 1998; Maldve e cols., 2002). Sabe-se que se localiza em neurônios que possuem receptores dopaminérgicos, sendo identificada como o maior alvo dos produtos da adenilato ciclase ativada por dopamina no *striatum* (Wallas e cols., 1983) (FIG 4).

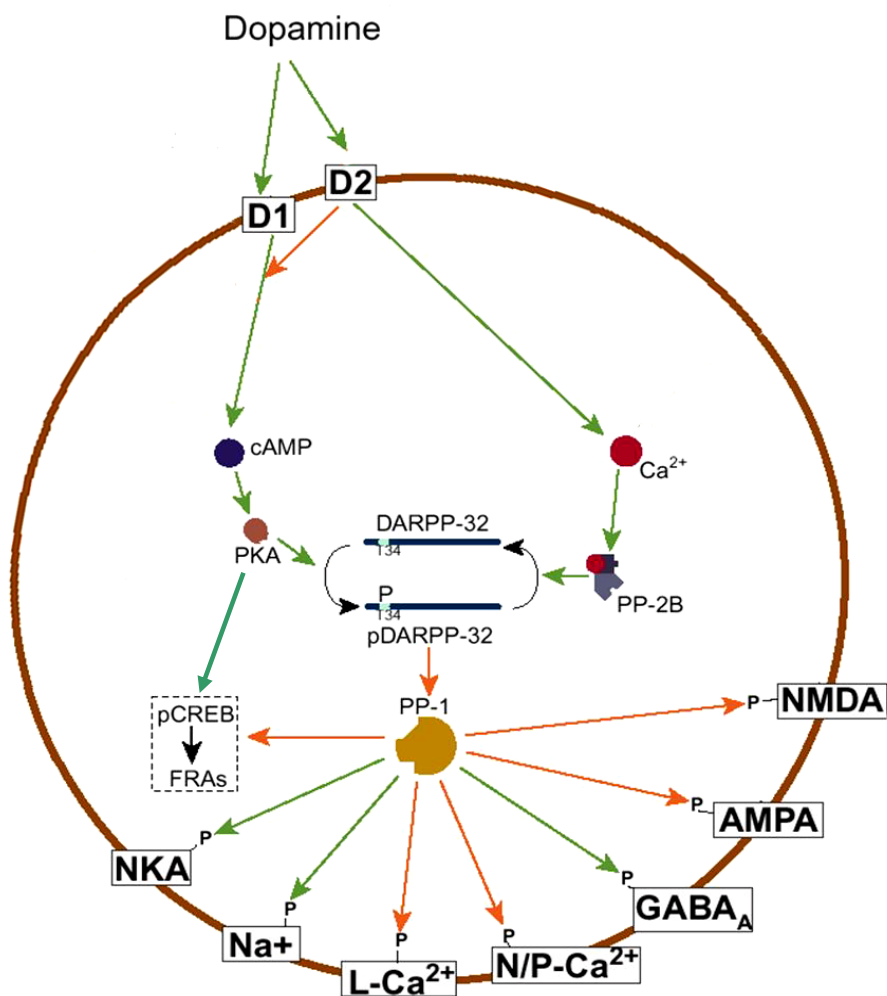


Figura 4: Sinalização dopaminérgica em neurônios pós-sinápticos (modificado de Greengard, 2001)

Através da ativação de adenilato ciclase e aumentando a disponibilidade de AMPc, ocorre ativação da PKA, fosforila a DARPP-32 no resíduo de treonina na posição 34 (Thr³⁴) (FIG 5), passando a atuar como potente inibidor da proteína fosfatase 1 (PP-1) (Yan e cols., 1999). Além da Thr³⁴, essa fosfoproteína apresenta outros três sítios de fosforilação:

- treonina na posição 75 (Thr⁷⁵), que ao ser fosforilada pela quinase dependente de ciclina 5 (Cdk-5) provoca inibição de PKA e conseqüentemente a diminuição da fosforilação da própria DARPP-32 na Thr³⁴;
- serina na posição 102 (Ser¹⁰²), que fosforilada pela caseína quinase 2 (CK-2) favorece a fosforilação da Thr³⁴ pela PKA, amplificando a inibição de PP-1;
- serina na posição 137 (Ser¹³⁷), fosforilada pela caseína quinase 1 (CK-1) passa a inibir a atividade da proteína fosfatase 2B (PP-2B) que desfosforila o resíduo Thr³⁴, também amplificando a inibição de PP-1 (King e cols., 1984; Girault e cols., 1989; Desdouits e cols., 1998; Bibb e cols., 1999; Nishi e cols., 1999).

A PP1, cuja atividade é modulada pela DARPP-32, é capaz de regular o estado de ativação de diversos canais iônicos, como canais de Na⁺; receptores, como GABA_A; e o fator de regulação da transcrição gênica p-CREB (Greengard e cols., 1999; Hsieh-Wilson e cols., 1999).

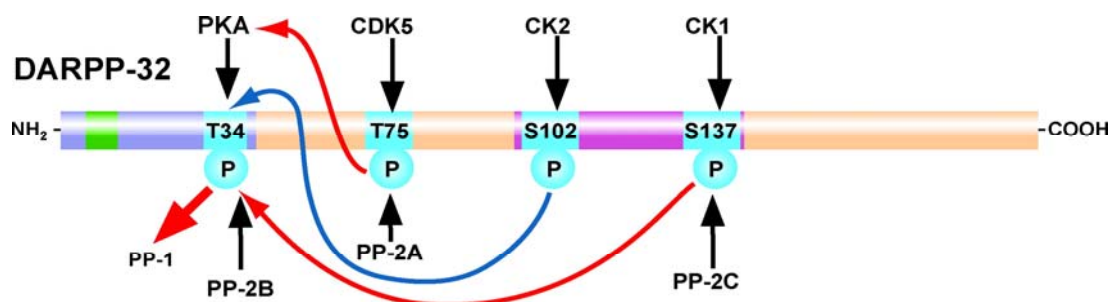


Figura 5: Sítios de fosforilação da DARPP-32 (adaptado de Svenningsson e cols., 2004). Em vermelho são indicadas vias inibitórias e em azul as estimulatórias.

Diversos estudos realizados em camundongos que não expressam DARPP-32 (Fienberg, *e cols.*, 1998) têm permitido maior detalhamento do envolvimento desta proteína nas ações da dopamina. Há evidências de um importante papel na mediação dos efeitos deste neurotransmissor nas mudanças em longo prazo na excitabilidade neuronal, através da indução de ambas, depressão e potenciação de longa duração (LTD e LTP, respectivamente), formas opostas de plasticidade sináptica (Calabresi *e cols.*, 2000). O envolvimento pode ser explicado pelo fato de estes efeitos serem mediados via proteína quinase sensível a GMPc (PKG) e PKA.

No entanto, mudanças a longo prazo na plasticidade sináptica geram alterações na transcrição gênica que são importantes para manutenção das adaptações moleculares e início das adaptações morfológicas. Há evidências de que a regulação da transcrição gênica envolve fosforilação alterada de fatores de transcrição, e conseqüente modulação de sua atividade (Hyman *e cols.*, 2001).

Como descrito anteriormente, perturbações nos sistemas de neurotransmissores contribuem para a etiologia de vários transtornos neuropsiquiátricos. No entanto, os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico parecem ser alvos primários para a maioria das medicações usadas no tratamento destes transtornos psiquiátricos (Parsons *e cols.*, 2000). Estudos detalhados com animais têm demonstrado que a serotonina causa um aumento da fosforilação na Thr³⁴ e Ser¹³⁷ e diminuição na Thr⁷⁵ da DARPP-32 (Sveningsson, *e cols.*, 2002). As ações da serotonina na fosforilação da Thr³⁴ e Thr⁷⁵ são mediadas primariamente pela ativação de receptores 5-HT₄ e 5-HT₆, enquanto a regulação da Ser¹³⁷ é mediada

primariamente via receptores 5-HT₂. Esses três caminhos parecem inibir PP-1 através de mecanismos sinérgicos.

Glutamato e GABA são os principais neurotransmissores que controlam a fosforilação da DARPP-32 estriatal. O principal efeito anti-dopaminérgico do glutamato é a desfosforilação da DARPP-32 na Thr³⁴, através da ativação da PP-2B induzida pelos receptores NMDA/AMPA.

Além deste, o glutamato tem vários outros efeitos regulatórios na fosforilação da DARPP-32. Através da via mGluR1/CK1/Cdk5/fosfo-Thr⁷⁵-DARPP-32, o glutamato antagoniza a sinalização PKA/fosfo-Thr³⁴-DARPP-32. Porém, o glutamato pode potencializar a sinalização PKA/fosfo-Thr³⁴-DARPP-32 através de três cascatas por:

- receptores NMDA-AMPA/Ca²⁺/PP-2A/desfosforilação da DARPP-32 na Thr⁷⁵;
- favorecer a formação de AMPc acoplado ao receptor A_{2A} mediada pela ativação de receptores mGlu5;
- aumentar a fosforilação na Ser¹³⁷ da DARPP-32 mediada através da ativação induzida do receptor mGlu da CK1 (Nishi e *co/s.*, 2003).

Através de estudos realizados em fatias estriatais, foi demonstrado que o GABA foi capaz de produzir um rápido aumento no estado de fosforilação da Thr³⁴. Este efeito foi prevenido por bicuculina, antagonista de receptores GABA_A. GABA potencializou significativamente o aumento na fosforilação da Thr³⁴ da DARPP-32 produzido por forskolina, ativador de adenilato ciclase. Isto sugere que o GABA

aumenta a fosforilação da Thr³⁴ através da inibição de PP-2B (Snyder e cols., 1994).

Como se sabe, o tratamento com antagonistas de D₂ e 5HT₂, e atualmente o efeito agonista parcial de D₂, representam as terapias mais comuns para esquizofrenia (Meltzer e cols., 2003; Lindgren e cols., 2003; Lieberman, 2004) e ambos os receptores sinalizam através da fosforilação de DARPP-32 em Thr³⁴. Portanto, DARPP-32 está envolvida nas ações de uma variedade de substâncias usadas para o tratamento de vários transtornos psiquiátricos e neurológicos. Um efeito comum das drogas antipsicóticas é agir como antagonista de receptores D₂ (Lindgren e cols., 2003). A ativação de receptores D₂ reduz a ativação de PKA e conseqüentemente o estado de fosforilação na Thr³⁴. Portanto, aumenta-se a ativação de PP-1, que inibe a ativação de diversos receptores e canais iônicos.

Mostrou-se que o tratamento com vários antidepressivos, incluindo fluoxetina, favorece a eficácia da sinalização de PKA em vários níveis diferentes no córtex pré-frontal, hipocampo e núcleo acumbens (Nestler e cols., 2002). O tratamento agudo e crônico com fluoxetina causou um aumento na fosforilação da DARPP-32 na Thr³⁴ e uma diminuição na fosforilação da Thr⁷⁵ no hipocampo, córtex frontal e corpo estriado (Svenningsson e cols., 2002).

Relata-se, ainda, o envolvimento de DARPP-32 nas ações de muitas categorias de drogas de abuso, incluindo etanol, cocaína e anfetamina, além da cafeína.

- Etanol: a DARPP-32 está envolvida nas respostas agudas e a longo prazo ao etanol. Tem sido proposto que o envolvimento da DARPP-32 na dependência

ao etanol depende da habilidade dela em regular o estado de fosforilação do receptor NMDA. Dopamina, via receptores D_1 , estimula fosforilação mediada por PKA da subunidade NR1 do receptor NMDA na Ser⁸⁹⁷ e reduz a sensibilidade do receptor NMDA ao etanol (Maldve e *cols.*, 2002). Estas observações indicam que a DARPP-32 pode mediar o reforço por reduzir a fosforilação de receptores NMDA e, conseqüentemente, por prevenir a sensibilidade ao etanol.

- Cafeína: há fortes evidências para o envolvimento da DARPP-32 nas ações estimulatórias da cafeína. Administração sistêmica de cafeína, ou de SCH58261, um antagonista seletivo do receptor A_{2A} , causa aumento na fosforilação da Thr⁷⁵ em camundongos selvagens (Lindskog, e *cols.*, 2002).

- Cocaína e anfetaminas: o tratamento agudo com cocaína ou anfetamina aumenta a fosforilação da Thr³⁴ e diminui a fosforilação da Thr⁷⁵ (Nishi e *cols.*, 2000). Tratamento com cocaína e anfetamina também aumenta o estado de fosforilação de CREB, ELK e múltiplos genes de expressão imediata (Nestler e *cols.*, 2001). Entretanto, tratamento crônico com cocaína leva ao aumento da fosforilação da Thr⁷⁵ e diminuição da Thr³⁴ (Bibb e *cols.*, 2001).

Logo, DARPP-32 aparece como um elemento intermediário com potencial para associar o funcionamento de diversas vias sinalizatórias e o estudo da expressão pode auxiliar na compreensão das vias envolvidas em transtornos psiquiátricos e neurológicos.

1.3 NCS-1 E MODULAÇÃO DO RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D₂

Atualmente, diversos trabalhos vêm demonstrando a contribuição dos íons cálcio em inúmeras vias sinalizatórias, tais como o acoplamento contração-relaxamento, secreção, endocitose e exocitose, tráfego de receptores e canais iônicos ao longo dos compartimentos de membrana, transcrição gênica e atividade enzimática (fosforilação e desfosforilação). Portanto, o cálcio é considerado um dos mensageiros intracelulares mais versáteis e indispensáveis para o ajuste fino e para regulação da atividade e plasticidade nervosa. Para que cada uma das suas funções seja garantida de maneira específica é importante notar que os sinais e concentrações intracelulares de cálcio são rigorosamente compartimentalizados e obedecem a uma grande variação temporal, indo de frações de milisegundos a horas, dias e até mesmo semanas.

O processo de transdução espaço-temporal do sinal de cálcio em funções específicas intracelulares deve-se, em grande parte, à interação desse íon com algumas proteínas conhecidas como ligantes de cálcio (“*calcium binding proteins*”) e/ou sensoras de cálcio (“*calcium sensor proteins*”), dentre elas a proteína NCS-1.

A NCS-1 é uma proteína ligante de cálcio específica de neurônios, expressa no cérebro de diferentes espécies com neocórtex, como demonstrado no cérebro humano (Martone e cols., 1999; Chen e cols., 2002). Pertence a uma família de proteínas do tipo “*EF-hand*” apresentando 4 sítios de ligação ao Ca²⁺, um grupo miristoil capaz de interagir com membranas e regiões de associação com quinases e outras proteínas (Bourne e cols., 2000). Localizada em terminações

axonais e estruturas pré e pós-sinápticas, sugere-se que tenha função na transmissão sináptica no córtex. (Marton e cols., 1999; Negyessy e Goldman-Rakic, 2005). Sabe-se que tanto a NCS-1 quanto sua ortóloga freqüenina encontrada em *Drosófila sp.* são capazes de:

- regular a exocitose de neurotransmissores e agentes secretórios;
- controlar o tráfego de proteínas celulares e modular a atividade de canais iônicos, como os canais de Ca^{2+} e os canais de K^+ ;
- modular alguns processos de plasticidade celular (Pongs e cols., 1993; Nakamura e cols., 2001; Mora e cols., 2002; Tsujimoto, 2002).

No entanto, evidências sugerem o envolvimento da NCS-1 no processo de facilitação da neurotransmissão, atuando tanto pré quanto pós-sinápticamente. Também é possível que NCS-1 esteja relacionada a alguns transtornos do sistema nervoso, como a esquizofrenia e o transtorno bipolar.

Recentemente, alguns trabalhos têm mostrado que a NCS-1 ocupa uma posição importante na regulação de diversas vias de sinalização intracelular. Esta é capaz de inibir/ativar canais de cálcio e potássio dependentes de voltagem, ativar a calcineurina e a óxido nítrico sintase, inibir a guanilato ciclase, inibir a dessensibilização de receptores de dopamina D_2 , ativar a fosfatidilinositol 4-hidroxiquinase- β do tipo III (PI4K β -III) dentre outras (Rajebhosale e cols., 2003).

A dessensibilização do receptor metabotrópico, caracterizada pelo declínio da resposta a agonistas, representa um mecanismo de adaptação que protege o receptor de uma superestimulação (Lohse, 1993; Krupnick e Benovic, 1998). A

dessensibilização das proteínas metabotrópicas ativadas é mediado pela fosforilação dos resíduos de serina e treonina nos domínios intracelulares dos receptores (Ferguson, 2001). Portanto, a fosforilação do receptor atua no desacoplamento do receptor com a proteína G, promovendo a ligação de arrestina e a internalização (Krupnick e Benovic, 1998). Também foi demonstrado o papel da dinamina-2 na regulação da internalização de D₂. (Kabbani e *cols.*, 2004).

Sabe-se que GRK2 atua na fosforilação do receptor D₂ e conseqüentemente sua internalização e dessensibilização. (Ito e *cols.*, 1999; Itawa e *cols.*, 1999; Kim e *cols.*, 2001). Porém, foi observado que NCS-1 atenua a fosforilação de D₂, e conseqüentemente sua internalização, ou seja, NCS-1 inibe a dessensibilização de D₂ amplificando sua sinalização (Kabbani e *cols.*, 2002). A inibição da dessensibilização de D₂ ocorre com a interação entre receptor D₂, NCS-1 e GRK2. (FIG 6) (Kabbani e *cols.*, 2002).

Na maioria dos mamíferos, a ativação de D₂ leva ao decréscimo dos níveis de AMPc (Missale e *cols.*, 1998). Portanto, foi demonstrado que a super-expressão de NCS-1 diminui os níveis de cAMP (Kabbani e *cols.*, 2002).

Recentemente, Negyessy e Goldman-Racik (2005) relataram, em córtex pré-frontal de primatas, a localização ultraestrutural de D₂ e compararam com a localização de NCS-1. Foi observada imunorreatividade abundante em estruturas pré e pós-sinápticas, nas quais também estava colocalizada com D₂. Relatou-se, também, a coexistência de NCS-1 e D₂ (Negyessy e Goldman-Racik, 2005). Estes

dados corroboram com a idéia de um papel da NCS-1 na dessensibilização de D₂ no córtex pré-frontal, fortalecendo ainda mais a hipótese sobre a importância de NCS-1 na sinalização por D₂.

Sabe-se que a ativação de PKA e PKC, ativações que podem ser iniciadas com a ativação de D₁, pode levar a formação de complexos NCS-1-GRK2 e D₂ (FIG 6) (Mason e cols., 2002; Ferguson, 2001). Portanto, esse mecanismo é importante para dessensibilização de D₂ e amplificação de sua sinalização, sendo considerado um *feedback* negativo da ativação de D₁ e manutenção do equilíbrio do mecanismo de sinalização dopaminérgica.

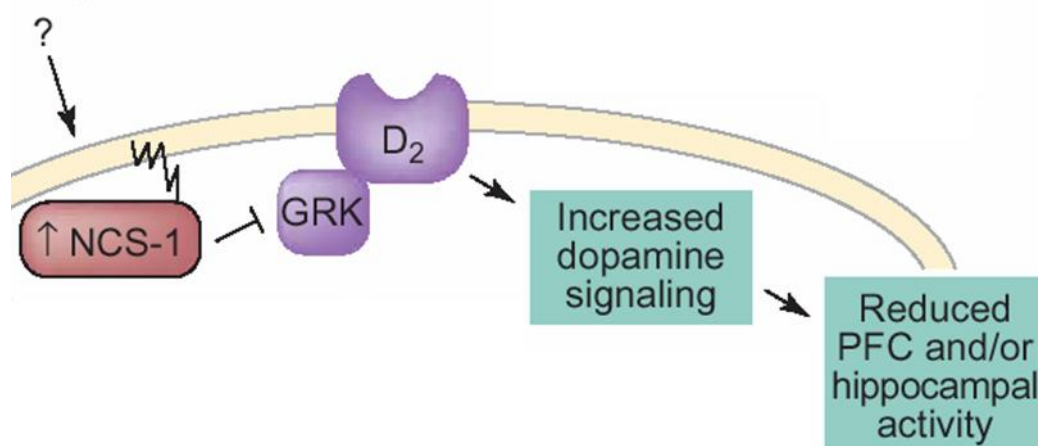


Figura 6: Modulação de GRK2/ D2 por NCS-1(modificado de Braunewell, 2005)

Kabbani e cols. (2002) demonstraram que a super-expressão de NCS-1 em células HEK 293 diminui a internalização de D₂ após a ativação através de dopamina, mesmo com super-expressão de GRK, proteína envolvida na dessensibilização de D₂ (Negyessy e Goldman-Racik, 2005).

1.4 ESQUIZOFRENIA E SUAS ALTERAÇÕES DOPAMINÉRGICAS

A importância da pesquisa sobre esquizofrenia é diretamente proporcional a sua importância social e econômica. A esquizofrenia é uma doença que afeta aproximadamente 1% da população mundial (Lewis e Lieberman, 2000 *apud* Lewis e cols., 2005). Indivíduos afetados, frequentemente são diagnosticados no final da adolescência ou no início da vida adulta, e cerca de 10% destes indivíduos irão cometer suicídio. Como resultado, a esquizofrenia está associada com uma sobrecarga emocional para familiares e leva a um custo econômico elevado para a sociedade, através de gastos médicos e perda de produtividade (Lewis e cols., 2005).

Diversas publicações científicas vêm demonstrando a influência genética no distúrbio esquizofrenia. O risco para seu desenvolvimento é diretamente proporcional à predisposição genética relacionada à susceptibilidade de genes já identificados (Gottesman, 1991 *apud* Lewis e cols., 2005). Porém, o risco conferido para cada gene demonstra ser pequeno já que o grau de concordância para esquizofrenia em indivíduos com a mesma genética é de cerca de 50%, o que indica que apenas o fator genético não é suficiente para o desenvolvimento da doença. Consistente com esta interpretação, vários fatores ambientais, como idade avançada do pai na concepção e uso de cannabis durante a adolescência, demonstram aumentar o risco de desenvolvimento da esquizofrenia durante a vida (Lewis e Levitt, 2002 *apud* Lewis e cols., 2005). No entanto, pode-se afirmar que, para o desenvolvimento da etiologia, é necessária uma interação entre

susceptibilidade genética e fatores de risco ambientais (Lewis e cols., 2005). Devido essas informações, estudos sobre os mecanismos de funcionamento neuronal e cerebral visam elucidar as causas e efeitos dessa etiologia.

Apesar dos grandes avanços nos estudos relacionados à esquizofrenia no último século, atualmente não existem procedimentos laboratoriais, métodos de neuroimagem e testes psicológicos que possam diagnosticar esquizofrenia (Lewis e cols., 2005). A esquizofrenia só é diagnosticada baseada em síndromes clínicas. A *American Psychiatry Association* (1994) apresenta critérios para o diagnóstico, como a presença de duas ou mais das seguintes características clínicas: delírio, alucinações, pensamento desorganizado (ex: fala incoerente), comportamento catatônico e sintomas negativos. Os sintomas negativos incluem embotamento afetivo (sem expressão emocional), alogia (pobreza na fala) e avolição (sem iniciativa para atividades). Além dessas disfunções, deve existir evidência de disfunção social e ocupacional, duração contínua por seis meses e a certeza de que as disfunções não estão atribuídas à outra desordem. No entanto, é interessante o desenvolvimento de marcadores para um diagnóstico seguro da esquizofrenia.

Indivíduos com esquizofrenia demonstram déficits cognitivos. Certos déficits cognitivos cruciais na esquizofrenia parecem refletir em alterações na representação contextual e manutenção de funções, como a memória operacional, que depende do córtex pré-frontal dorsolateral (CPF DL) (Miller e Cohen, 2001). Indivíduos com esquizofrenia tendem a ter um baixo desempenho em tarefas que exigem memória operacional, demonstrando redução na ativação

do CPFDL (Weinberger e *cols.*, 1986 *apud* Lewis e *cols.*, 2005; Perlstein e *cols.*, 2001 *apud* Lewis e *cols.*, 2005). No entanto, avanços na pesquisa sobre os mecanismos da memória operacional vêm ajudando no esclarecimento do seu funcionamento anormal e de distúrbios relacionados, como a esquizofrenia.

Devido à hipótese e evidências do mau funcionamento da memória operacional em indivíduos com esquizofrenia, estudos vêm demonstrando várias alterações no CPFDL em indivíduos com a doença. Primeiro, indivíduos com outros transtornos psicóticos (MacDonald e *cols.*, *in the press apud* Lewis e *cols.*, 2005) ou depressão maior (Barch e *cols.*, 2003 *apud* Lewis e *cols.*, 2005) demonstram ativação normal do CPFDL quando realizando tarefas que exigem memória operacional. Segundo, a gravidade dos déficits de ativação no CPFDL, sem alteração nas outras regiões corticais, durante tarefas que exigem memória operacional em indivíduos com esquizofrenia (Perlstein e *cols.*, 2001 *apud* Lewis e *cols.*, 2005). Terceiro, é sugerido que o déficit da memória operacional pode estar limitando o desempenho de outras capacidades cognitivas na esquizofrenia (Silver e *cols.*, 2003 *apud* Lewis e *cols.*, 2005). No entanto, devido essas evidências, o déficit da memória operacional pode ser a característica central da esquizofrenia, e a identificação das alterações do CPFDL que produz essas alterações funcionais é essencial para o entendimento do processo da esquizofrenia (Lewis e *cols.*, 2005).

Existem alguns trabalhos demonstrando que, durante alguns episódios psicóticos em indivíduos com esquizofrenia, existe um funcionamento anormal do CPFDL. Blakemore e *cols.*(2003) demonstraram, através de experimentos com Tomografia

de Emissão Positrônica (PET), que indivíduos com esquizofrenia durante delírios, nos quais estariam sendo passivamente controlado por alienígenas, têm maior ativação do CPFDL esquerdo que quando realizando movimentos voluntários ou através de movimentos passivos reais. Também foi relatada ativação do CPFDL durante alucinação auditiva em indivíduos com esquizofrenia (Copolov e cols., 2003). Portanto, existem evidências do funcionamento anormal do CPFDL de indivíduos com esquizofrenia não apenas no déficit cognitivo, mas também durante os processos psicóticos.

Muitas pesquisas e hipóteses vêm sendo realizadas para a explicação do funcionamento anormal do CPFDL de indivíduos com esquizofrenia. Algumas alterações já foram descritas, como: reduções nos níveis de RNAm para codificação de ácido glutâmico descarboxilase (GAD67), uma enzima que sintetiza ácido γ -aminobutírico (GABA) (Akbarian e cols., 1995; Mirnics e cols., 2000); diminuição de níveis protéicos e RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e seu receptor, tirosina quinase Trk (*tropomyosin-related kinase*) B (Hashimoto e cols., 2005; Welckert e cols., 2003; Takahashi e cols., 2000); redução do RNAm (Burnet e cols., 1996) e de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} (Dean e cols., 1999; Matsumoto e cols., 2005); redução de receptores muscarínicos M₁/M₄ (Crook e cols., 2001); redução de receptores dopaminérgico D₁ (Okubo e cols., 1997; Abi-Dargham e cols., 2002); e aumento dos receptores canabinóides CB1 (Glass e cols., 1997; Biegon e Kerman, 2001; Dean e cols., 2001). No entanto, evidências sugerem que o mecanismo de funcionamento anormal do CPFDL em indivíduos com esquizofrenia é multi-fatorial.

Porém, apesar de muitas destas alterações serem descritas do CPFDL de indivíduos com esquizofrenia, a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia continua sendo, após décadas de estudo, a mais proeminente das investigações desta patofisiologia (Bennet, 1998; Carlsson, 2001; Kasper, 2002). Sabe-se que no CPFDL são encontrados tanto receptores dopaminérgicos D₁ quanto D₂ (Levey e cols., 1993; Lidow e cols., 1998; Meador-Woodruff e cols., 1996). Portanto, a utilização de antagonistas dos receptores dopaminérgicos D₂ é um pré-requisito essencial para eficácia terapêutica de medicações com antipsicóticos (Lidow, 2000)

Disfunções no mecanismo de funcionamento do sistema dopaminérgico estão relacionadas com diversos transtornos neuropsiquiátricos. Foi demonstrado reduções de dopamina no *striatum* de pacientes com Parkinson e a demonstração que L-DOPA tem efeitos benéficos nesses pacientes tornando evidente a importância da dopamina nesse distúrbio (Walton-Hadlock, 2005). Também foi demonstrado que transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é outra manifestação clínica cuja etiologia é creditada a um desequilíbrio em sistemas de neurotransmissão, entre eles o dopaminérgico. Outros quadros clínicos como depressão maior, depressão bipolar, alcoolismo, transtorno do pânico, dependência de drogas e déficits cognitivos estão também associados com perturbações nesse sistema (Nass e Bressman, 2002; Tsuang e cols., 2004; Tupala e Tiihonen, 2004). Já a esquizofrenia, como foi descrito anteriormente, é um distúrbio com ampla variedade de sintomas que sugerem disfunção nos circuitos de recompensa e do córtex pré-frontal (Goldstein e Deutch, 1992; Lewis e cols., 2005).

Atualmente, estão sendo realizados diversos estudos descrevendo alterações nos mecanismos de regulação e de sinalização de segundo mensageiros na transmissão sináptica, relevantes para a compreensão da doença. Recentemente, experimentos realizados com amostras de cérebro de indivíduos com esquizofrenia foram relatados por diferentes grupos de pesquisa, os quais estudaram a expressão de duas proteínas moduladoras da sinalização celular na região do CPFDL, DARPP-32 e NCS-1.

Sabe-se que DARPP-32 é uma proteína para qual diversos sinais de segundo mensageiros convergem (Svenningsson, 2003), sugerindo assim que seu funcionamento normal seria de importância para o mecanismo de sinalização dopaminérgica. Em uma recente publicação, foi demonstrado que DARPP-32, na região CPFDL em esquizofrênicos, está significativamente reduzida quando comparado com indivíduos controles pareados (Albert e *cols.*, 2002). O trabalho consistiu da mensuração, tanto da quantidade de DARPP-32 quanto de outras proteínas neuronais, em amostras *post-mortem* de cérebros de indivíduos com esquizofrenia. Além disso, nesse trabalho foi demonstrado que as demais proteínas sinapsina I e subunidade alfa da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina, não estavam alteradas no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia.

Além do estudo, acima descrito, que demonstra evidência na alteração da expressão de DARPP-32, e conseqüentemente na sinalização de segundo mensageiros relacionados ao sistema dopaminérgico, recentemente foram

publicados dois trabalhos demonstrando alteração no sistema de regulação da sinalização dopaminérgica em indivíduos com esquizofrenia. Sabe-se que NCS-1 tem um papel na modulação da sinalização dopaminérgica, regulando a liberação de neurotransmissores e aumentando a sinalização via receptores D_2 , inibindo sua dessensibilização (Rajebhosale e *cols.*, 2003). No entanto, em dois trabalhos foi demonstrado um aumento significativo nos níveis de proteína e RNAm de NCS-1 e Calcyon, proteína responsável pela dessensibilização de D_1 , no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia, comparados com indivíduos controle, sem o diagnóstico de esquizofrenia (Bai e *cols.*, 2004; Koh e *cols.*, 2003). Koh e *cols.* descreveram um aumento maior que 50% nos níveis de NCS-1 na região DLCPF de pacientes esquizofrênicos e bipolares, comparados com controles normais. Controles para o uso de antipsicóticos e/ou estabilizadores do humor também foram feitos, o que foi confirmado por estudo dos níveis de NCS-1 em macacos submetidos a tratamento crônico com haloperidol, onde não foi observada diferença significativa com o grupo controle (Negyessy e Goldman-Rakic, 2005).

Bai e *cols.*, além de mensurar os níveis protéicos de NCS-1 e Calcyon, investigou também os níveis de RNAm em amostras de cérebros provenientes do banco de cérebros *Brain Collection of the Mount Sinai Medical School/Bronx Veterans Administration Medical Center*. Foi demonstrado que os níveis protéicos e de RNAm de NCS-1 e Calcyon estavam aumentados no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia. Nesse trabalho, foi demonstrado também um aumento de RNAm de NCS-1 no córtex occipital de indivíduos com esquizofrenia, porém, sem o aumento dos níveis protéicos de NCS-1. Como todos os indivíduos com esquizofrenia estavam sob medicação de antipsicóticos, foram estudados os

efeitos destes nos níveis de NCS-1 e calcyon em cérebros de primatas não-humanos. Como já foi descrita a função de NCS-1 em amplificar a sinalização via D₂, uma via inibitória, sugere que o aumento desta proteína no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia também está associado aos seus distúrbios cognitivos.

Sabe-se que estas proteínas estão envolvidas na regulação eletrofisiológica, transcricional e respostas comportamentais a estímulos fisiológicos e farmacológicos, incluindo antidepressivos, neurolépticos e dependência de drogas (Svenningsson, 2004; Hanlon e Wallace, 2002). NCS-1, portanto, têm um importante papel funcional no mecanismo de funcionamento neuronal. Porém, apesar de já ter sido demonstrado que ambas proteínas fazem parte da sinalização do sistema dopaminérgico e que estão associadas à esquizofrenia, não existem estudos e nem evidências associando NCS-1 e DARPP-32.

Foi demonstrada a localização de D₂ e NCS-1 em neurônios piramidais e interneurônios no CPF de primatas (Negyessy e Goldman-Rakic, 2005). No entanto, Koh e cols, (2003) demonstraram que a NCS-1 encontra-se superexpressa no córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos e bipolares *postmortem*. Sabe-se que o tratamento com antipsicóticos atua na inibição por antagonistas de D₂ e que esse receptor está associado à NCS-1, que o dessensibiliza. Portanto, essa associação entre os altos níveis da NCS-1 encontrada em pacientes esquizofrênicos e bipolares e a regulação da atividade dos receptores D₂ favorecem, assim, a hipótese do envolvimento da NCS-1 em distúrbios neurológicos e psiquiátricos.

Apesar da evolução no esclarecimento sobre os mecanismos relacionados a esquizofrenia, sua importância clínica e do número de pesquisas envolvidas com esta patologia, não existe nenhum tratamento farmacológico totalmente eficiente. O desenvolvimento de tratamentos mais efetivos, e, possivelmente, medidas preventivas, requerem mais estudos para o conhecimento sobre esses processos (Suo e cols, 2004; Lewis e cols., 2005).

2- OBJETIVOS

Objetivo geral

- avaliar expressão de DARPP-32 em células PC12 que superexpressam estavelmente NCS-1 e verificar se a via de sinalização AMPc-PKA estaria envolvida nesta regulação.

Objetivos específicos

- medir a expressão de DARPP-32 e NCS-1 em células PC12 W.T. e NCS-1;
- verificar a existência de interação entre DARPP-32 e NCS-1;
- medir os níveis de AMPc em células PC12 W.T. e NCS-1;
- medir os níveis de p-CREB em células PC12 W.T. e NCS-1.

3– MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – CULTURA CELULAR

Células PC12 (*Rat pheochromocytoma*) Wild Type (W.T.) e superexpressando NCS-1 (NCS-1) foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Andreas Jeromin (Division of Neuroscience, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, EUA). As células foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) alta glicose (GIBCO) suplementadas com 5% de soro fetal eqüino (FES) (GIBCO), 5% de soro fetal bovino (FSB) (GIBCO), 1% de penicilina (GIBCO) e 1% de streptomicona (GIBCO) em frascos de 50cm³ na estufa a 37°C e 5% de CO₂, com troca de meio a cada 2 dias e passagens a cada 7 dias. Células superexpressando NCS-1 foram cultivadas em meio seletivo contendo G418 (400mg/mL - Clontech).

3.2 - DOSAGEM DE PROTEÍNA

Para a quantificação protéica foi utilizado o método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Entre 0,5 e 2,0µL de extrato protéico foram adicionados a 1,0mL de solução de NaCl 0,15M e 1,0mL de reagente de Bradford (0,06% (p/v) de azul de Comassie G-250 e 3% (v/v) de ácido perclórico). Após a homogeneização, incubou-se a mistura por 2 minutos a temperatura ambiente. Foram feitas as leituras das absorbâncias no espectrofotômetro (Kinetics/ Endpoint System

Analyser - Hitachi) no comprimento de onda de 595nm. Em cada dosagem, uma curva de calibração com albumina bovina (1 a 10 μ g) foi utilizada.

3.3 - CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO

Células W.T. e NCS-1 foram lisadas com tampão CHAPS (CHAPS 1%, PBS 0.1M - pH7.2, glicerol 10%, NaCl 150mM). Em seguida, foram retiradas alíquotas para dosagem de proteínas pelo método de Bradford, usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Foram adicionados 2 μ g de anticorpo policlonal rabbit anti NCS-1 conjugado com agarose (FL-190 – Santa Cruz) em alíquotas de 500 μ g de proteína total para a imunoprecipitação. As amostras foram incubadas em agitador a 4°C por 2 horas e em seguida centrifugadas a 1000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado 300 μ L de tampão CHAPS e submetido à centrifugação por 1 minuto a 1000 g. O pellet foi ressuspenso em 40 μ L de tampão SDS (7mL de Tris-HCL 0,5M + 0,4% SDS, 3.6mL Glicerol, 1g SDS, 600 μ L β -mercaptoetanol, 1.2mg azul de bromofenol) com 5% de β -mercaptoetanol, sendo aquecido a 50°C por 15 minutos. Os imunocomplexos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (Acrilamida 4mL, Tris 2mL pH8.8, H₂O 2mL, SDS 10% 80 μ L, APS 80 μ L, TEMED 8 μ L) e transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond - Amersham Biosciences), sendo coradas com Ponceau Red. As membranas foram incubadas em solução de bloqueio PBS (Na₂HPO₄ 23mM, NaH₂PO₄ 6,7mM, NaCl 34,2mM, pH 7,4) contendo 0,1% de Tween 20 e 5% de leite desnatado por 45 minutos. Em

seguida, as membranas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas com anticorpo policlonal *rabbit* anti-DARPP-32 (1:500 - H-62 - Santa Cruz) e *chicken* anti-NCS-1 (1:2000 – doado pelo Dr. Andreas Jeromin), todos diluídos em PBS Tween 0,1%. Após a incubação em anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS Tween 0,1% e incubadas com anticorpo secundário *goat anti-rabbit horseradish peroxidase-linked* IgG (1:15000 - Molecular Probes) e *goat anti-chicken horseradish peroxidase-linked* IgG (1:15000 - Molecular Probes) diluídos em PBS Tween 0,1% por uma hora em temperatura ambiente. Após serem lavadas 3 vezes novamente em PBS Tween 0,1%, as membranas foram submetidas à detecção quimioluminescente, utilizando kit ECL Plus (Amersham Biosciences) e filme autoradiográfico da Kodak.

3.4 - IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO

Foram incubadas 1×10^6 células W.T. e NCS-1 em 100 μ L de meio DMEM alta glicose descrito acima, em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por uma noite. Os níveis de AMPc foram determinados por imunensaio enzimático (Biotrak, Amersham-Biosciences) sem acetilação, conforme instruções do kit. Os valores demonstrados através de unidades absolutas e foram corrigidos através da dosagem de proteínas pelo método Bradford descrito acima. Resultados foram considerados significativos quando $p < 0.01$.

3.5 - IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para detecção de DARPP-32 e NCS-1, as células foram fixadas com metanol gelado por 20 minutos. As células fixadas foram lavadas com PBS (Na_2HPO_4 23mM, NaH_2PO_4 6,7mM, NaCl 34,2mM, pH 7,4) gelado 2 vezes por 10 minutos. Para detecção de D_2R , D_1R e TrkB, as células foram fixadas com paraformaldeído 3% por 20 minutos em temperatura ambiente. Foi feita a permeabilização com solução bloqueadora (PBS, Triton X-100 0.1%, BSA 0.5%) por 10 minutos para a detecção de DARPP-32 e NCS-1, e apenas bloqueio sem permeabilização para detecção de receptores dopaminérgicos D_2 ou D_1 (dados não mostrados). Em seguida as células foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo policlonal *rabbit* anti-DARPP-32 (1:200 - H-62 - Santa Cruz) e policlonal *rabbit* anti-NCS-1 (1:200 - FL-190 - Santa Cruz). Em seguida as células foram incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente e protegidas da luz, com anticorpo Alexa Fluor 488 goat *anti-rabbit* (1:200 - Molecular Probes).

Como controle de marcação específica, algumas lamínulas não foram incubadas com anticorpo primário. As imagens das células foram obtidas utilizando microscópio confocal (ver adiante).

3.6 - MICROSCOPIA CONFOCAL

As imagens foram obtidas em microscópio confocal Bio-Rad (modelo 1024, acoplado a microscópios Zeiss - Axiovert 100), utilizando o software Laserssharp (versão 3.1; Bio-Rad) com objetiva de 40X de imersão em óleo. Foi utilizado laser UV de argônio (488nm) para excitar Alexa 488, e a luz emitida foi selecionada com os filtros 522/35 para FITC. Todas as imagens foram coletadas com a mesma configuração. As análises após a aquisição foram feitas com Laserssharp (Bio-Rad), Confocal Assistant e Adobe Photoshop.

3.7 - IMUNOBLOT

Para a preparação dos extratos celulares para *imunoblot*, as células foram incubadas com tampão de lise (20mM MOPS – pH7, 2mM EGTA, 5mM EDTA, 30mM Floreto de sódio, 40mM β -glicerofosfato – pH 7,2, 20mM Pirofosfato, 1mM Ortovanadato de sódio, 1mM Fenilmetilsulfonil fluoreto, 3mM Benzamidina, 10 μ M Leupeptina e 0,5% Nonidet P40) no gelo por 30 minutos e centrifugadas a 13.000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer - 80°C. O hipocampo de camundongo foi utilizado como controle positivo. Em seguida, foram retiradas alíquotas para dosagem de proteínas pelo método de Bradford, usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. O *western blot* foi realizado como descrito por Towbin (Towbin e cols., 1979). Quantidades iguais de

proteína (100µg) foram preparadas para eletroforese com tampão de amostra NuPAGE LDS (Invitrogen) e 10% de β-Mercaptoetanol, fervidas a 70°C por 10 minutos e aplicadas em gel Bis-Tris NuPAGE 4-12% (Invitrogen) para eletroforese. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond - Amersham Biosciences) e coradas com Ponceau Red. A eletroforese e a transferência foram desenvolvidas conforme orientações do kit. As membranas, para análise de DARPP-32, NCS-1 e actina, foram incubadas em solução de bloqueio PBS (Na₂HPO₄ 23mM, NaH₂PO₄ 6,7mM, NaCl 34,2mM, pH 7,4) contendo 0,5% de Tween 20 e 5% de leite desnatado por 45 minutos. Quando para análise de p-CREB, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio TBS (Tris 20mM, NaCl 137mM, pH 7,4) contendo 0,1% de Tween 20 e 5% de BSA por 40 minutos. Em seguida, incubaram-se as membranas em temperatura ambiente por 2 horas com anticorpo monoclonal *mouse* anti-actina (1:2000 - MAB1521R - Chemicon), policlonal *rabbit* anti-DARPP-32 (1:250 - H-62 - Santa Cruz) e policlonal *rabbit* anti-NCS-1 (1:2000 - FL-190 - Santa Cruz), todos diluídos em PBS Tween 0,5%. Para análise de p-CREB, incubou-se as membranas *overnight* a 4°C com anticorpo policlonal *rabbit* anti-p-CREB (1:1000 - AB3442 - Chemicon) diluído em TBS Tween 0,1%. Após a incubação em anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes e incubadas com anticorpo secundário *goat anti-mouse peroxidase-linked* IgG (1:7000 - Molecular Probes) ou *goat anti-rabbit horseradish peroxidase-linked* IgG (1:15000 - Molecular Probes) por uma hora em temperatura ambiente, sendo o anticorpo secundário do p-CREB diluído em TBS Tween 0,1% e os demais em PBS Tween 0,5%. As membranas foram submetidas à detecção quimioluminescente conforme

instruções do kit ECL Plus (Amersham Biosciences), e filme autorradiográfico da Kodak ou Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences).

3.8 – ANÁLISE DOS *IMUNOBLOTS*

Bandas imunorreativas não saturadas foram submetidas ao scanner densitométrico e a quantificação pelo Scion Image Software (Scion Corporation, National Institutes of Health, EUA). Os valores obtidos para DARPP-32, NCS-1 e p-CREB foram corrigidos pelos valores da actina. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student e foram considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0.05$.

4 - RESULTADOS

4.1 – EXPRESSÃO DE DARPP-32 EM CÉLULAS PC12 SUPEREXPRESSANDO NCS-1

Imunoblots foram realizados demonstrando que células PC12 que superexpressam NCS-1 têm uma diminuição significativa na expressão de DARPP-32. (FIG 7A). Análises quantitativas da expressão de NCS-1 e DARPP-32, normalizada com a expressão de actina, demonstraram que a diferença entre as células W.T. e NCS-1 é significativa. A média dos níveis de NCS-1 nas células NCS-1 é 214,76 % do valor da média dos níveis de NCS-1 nas células W.T. (FIG 7B). Já, nas mesmas células NCS-1, a média dos níveis de DARPP-32 é 51,54% do valor da média dos níveis de DARPP-32 nas células W.T. (FIG 7C).

Para visualização da expressão das proteínas NCS-1 e DARPP-32, imagens foram obtidas através da microscopia confocal. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos anteriormente com imunoblots. Foi observado o aumento de expressão de NCS-1 em células NCS-1 (FIG 8B) em relação às células W.T. (FIG 8A). Observa-se também a diminuição da expressão de DARPP-32 em células NCS-1 (FIG 8D) em relação às células W.T. (FIG 8C).

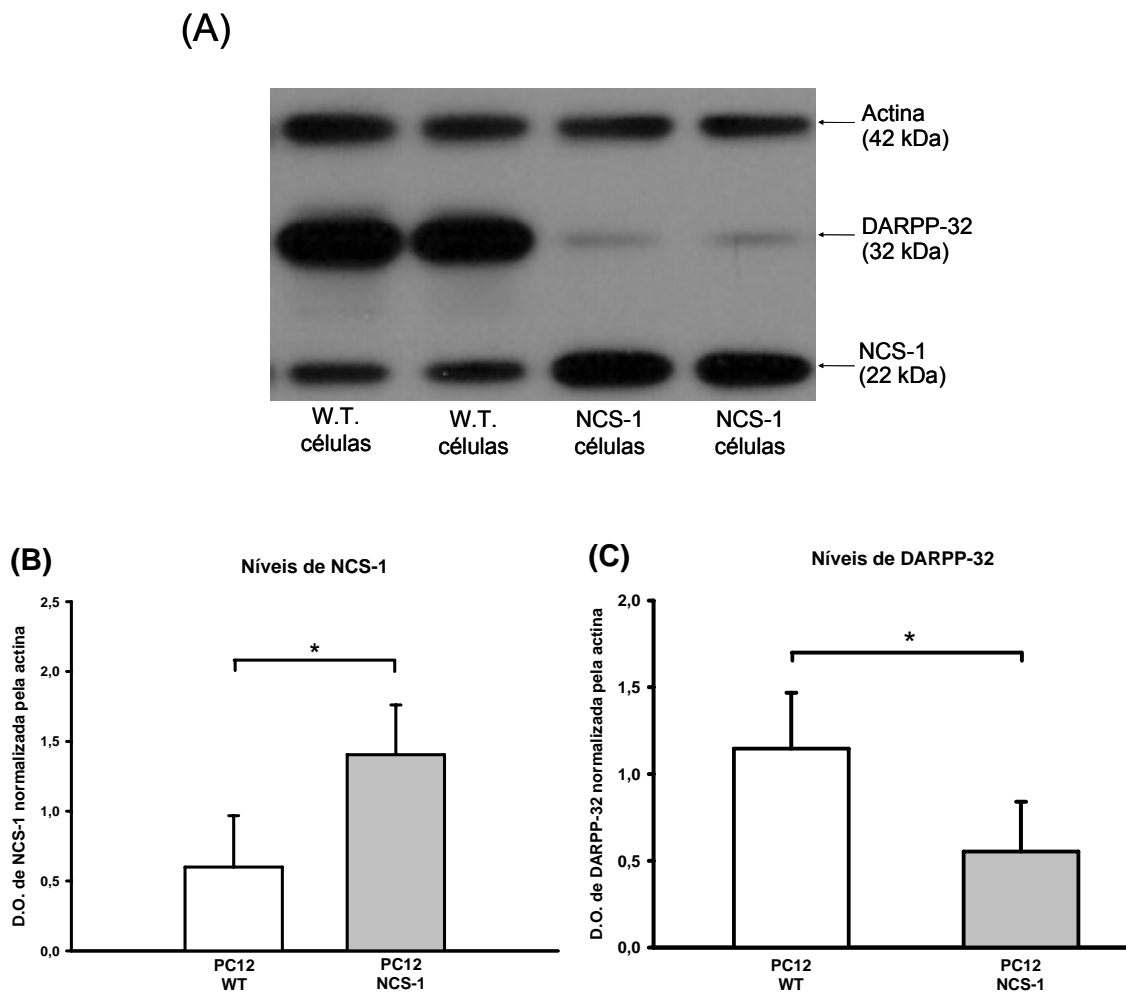


Figura 7: Efeitos da superexpressão de NCS-1 nos níveis de expressão de DARPP-32. *Imunoblot* com células W.T. e NCS-1 foram realizados para análise de expressão de NCS-1 e DARPP-32 (A). Quantificação da expressão das proteínas NCS-1 (B) e DARPP-32 (C) foi normalizada com a expressão da actina. Ocorre uma diminuição de 52% da expressão de DARPP-32 nas células PC12 que superexpressam 134% mais NCS-1. Todos os experimentos foram realizados em duplicata (* $p < 0.01$, todos os gráficos foram plotados com média, desvio padrão e $n=10$).

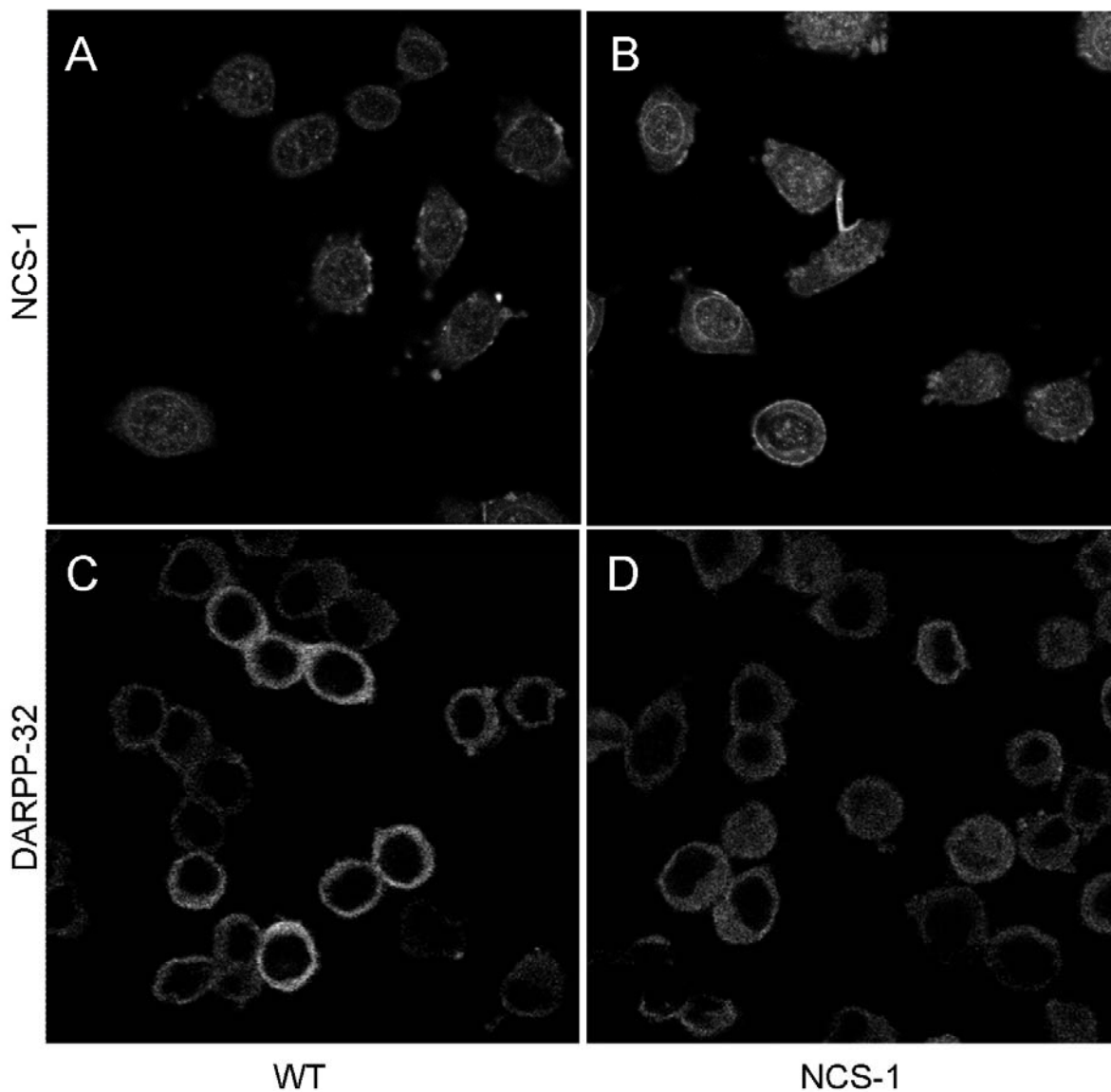


Figura 8: Influência da superexpressão de NCS-1 na expressão de DARPP-32. Imagens de células PC12 W.T. e NCS-1 obtidas através de microscopia confocal foram realizadas para visualização de expressão de NCS-1 e DARPP-32. Observa-se o aumento de expressão de NCS-1 em células NCS-1 (B) em relação às células W.T. (A). Observa-se também a diminuição da expressão de DARPP-32 em células NCS-1 (D) em relação às células W.T. (C).

4.2 – INTERAÇÃO DIRETA ENTRE NCS-1 E DARPP-32

Devido aos resultados de que em células que superexpressam NCS-1 ocorre uma redução da expressão de DARPP-32, nosso primeiro objetivo foi verificarmos se NCS-1 estaria interagindo diretamente com DARPP-32. Para demonstrar se, nas condições experimentais utilizadas, existe interação entre NCS-1 e DARPP-32 em células PC12, foram realizados experimentos de co-imunoprecipitação. Foi utilizado anticorpo anti-NCS-1 conjugado com agarose para co-imunoprecipitar NCS-1 e verificar se também ocorreria a imunoprecipitação de DARPP-32. Através de *imunoblot*, primeiramente foi verificada a imunoprecipitação de NCS-1 (FIG 9A). Foram utilizados, para controle positivo, extratos celulares sem a imunoprecipitação (FIG 9A). Para a verificação da interação entre NCS-1 e DARPP-32, amostras foram co-imunoprecipitadas com anti-NCS-1 conjugado com agarose e submetidas à *imunoblot* com anticorpo anti-DARPP-32 (FIG 9B). Foram utilizados, para controle positivo, extratos celulares sem a co-imunoprecipitação (FIG 9B), sugerindo que não ocorre interação entre NCS-1 e DARPP-32 em células PC12, tanto na W.T. quanto na NCS-1.

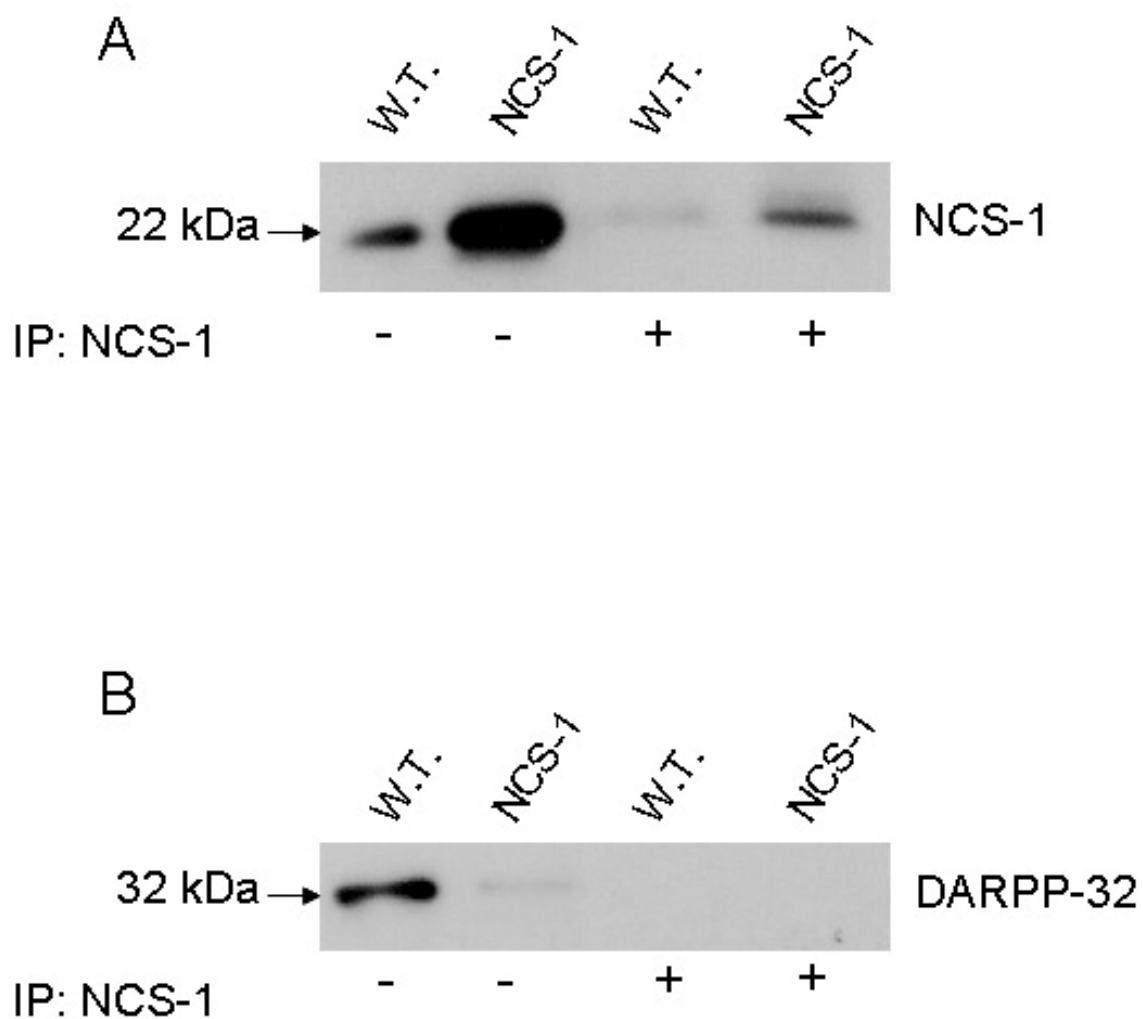


Figura 9: Ausência de interação entre NCS-1 e DARPP-32. Foram realizadas co-immunoprecipitações de extratos de células PC12 W.T e NCS-1 através do anticorpo anti-NCS-1 conjugado com agarose. Foi utilizado anticorpo anti-NCS-1 para detecção da proteína NCS-1 em co-immunoprecipitação das amostras de células W.T. e NCS-1 (A). Foi utilizado anticorpo anti-DARPP-32 para detecção da proteína DARPP-32 em co-immunoprecipitação das amostras de células W.T. e NCS-1 (B). Para controle positivo nos experimentos, foi realizado *imunoblot* de extratos celulares W.T. e NCS-1.

4.3 – MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE AMPc EM CÉLULAS PC12 SUPEREXPRESSANDO NCS-1

Os receptores D₂ são acoplados a proteína G, inibindo a produção de AMPc. Sabendo-se que NCS-1 diminui a dessensibilização desse receptor, investigamos se os níveis de AMPc estariam diminuídos na células NCS-1 em relação as células W.T. Foram realizadas análises de imunensaio enzimático para verificação dos níveis totais de AMPc em células PC12 W.T. e NCS-1. Os valores foram normalizados através da dosagem de proteínas. Foi observado que a média dos níveis de AMPc em células PC12 NCS-1 é 43,93% da média de AMPc de células PC12 W.T. (FIG 10).

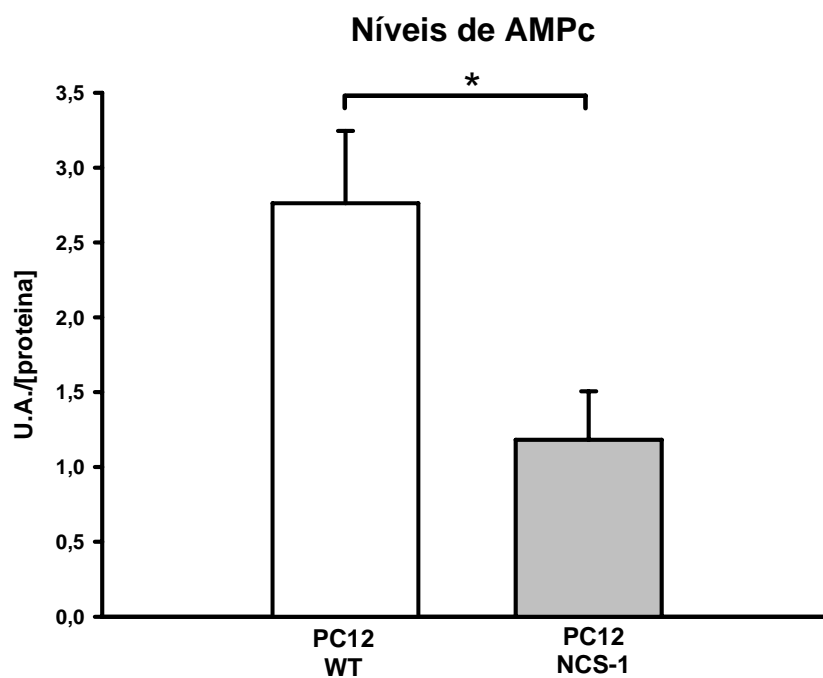


Figura 10 - Diminuição dos níveis totais de AMPc em células PC12 NCS-1 comparado células PC12 W.T. Os níveis totais de AMPc de células PC12 W.T. e NCS-1 foram mensurados através de imunoensaio enzimático e normalizadas através de dosagem de proteínas, demonstrando uma diminuição de 57% de AMPc nas células PC12. Todos os experimentos foram realizados em duplicata ($*p < 0.05$, o gráfico foi plotado com média, desvio padrão e $n=4$).

4.4 – NÍVEL DE p-CREB EM CÉLULAS PC12 SUPEREXPRESSANDO NCS-1

Sabe-se que PKA fosforila CREB na Ser¹³³ ativando-a. Após a observação de que as células NCS-1 apresentavam menores níveis de AMPc, investigamos se os níveis de p-CREB nas células NCS-1 estariam menores que em células W.T. Para verificar os níveis de p-CREB nas células PC12 W.T. e NCS-1, foram realizados *immunoblots* demonstrando que células PC12 NCS-1 tem nível de p-CREB menor em relação às células PC12 W.T. (FIG 11A). Análises quantitativas dos níveis de p-CREB, normalizada com a expressão de actina, demonstraram que a média dos níveis de p-CREB nas células NCS-1 é 34,05% do valor da média dos níveis de p-CREB nas células W.T. (FIG 11B)

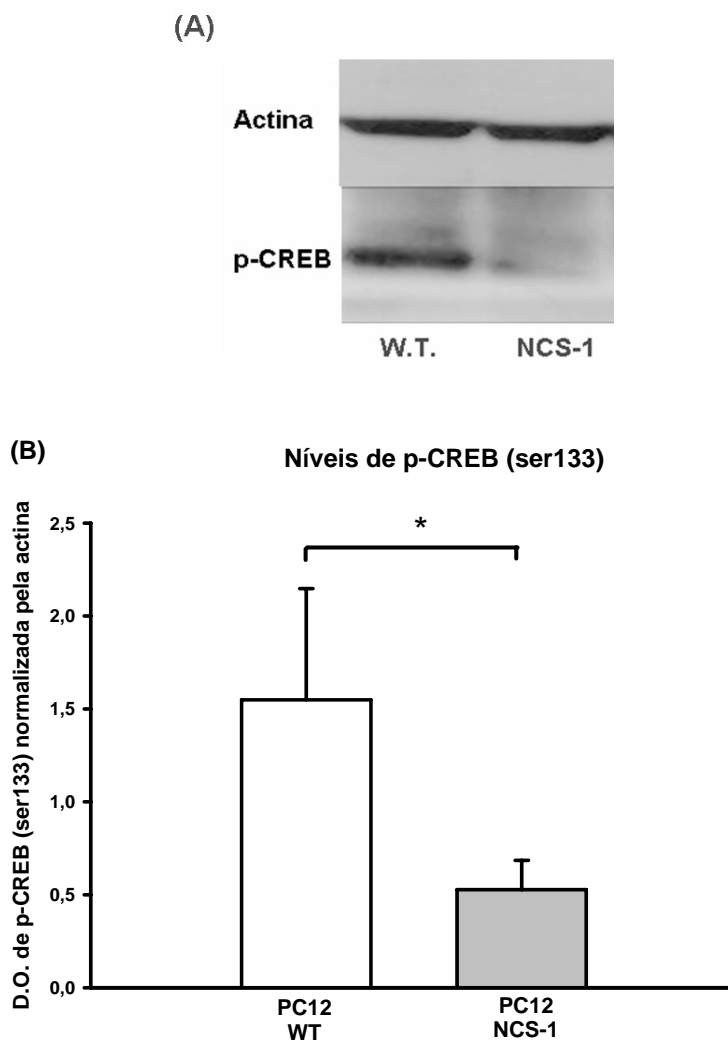


Figura 11 - Níveis de p-CREB em células PC12 NCS-1 são menores comparado com células PC12 W.T. Foram realizados *imunoblots* para detecção de p-CREB em células PC12 W.T e NCS-1, demonstrando que níveis de p-CREB em células PC12 NCS-1 são 66% menores comparado com células PC12 W.T. (A). Quantificação dos níveis de p-CREB (B) foi normalizada com a expressão da actina. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. (* $p < 0.05$, o gráfico foi plotado com média, desvio padrão e $n=3$).

5 – DISCUSSÃO

A NCS-1 é encontrada em terminações pré e pós-sinápticas de interneurônios e neurônios piramidais do neocórtex de primatas humanos e não-humanos, colocalizando com receptores dopaminérgicos D2, sugerindo assim que tenha função na transmissão sináptica dopaminérgica (Martone e *cols.*, 1999; Chen e *cols.*, 2002; Negyesse e Goldman-Rakic, 2005). Já DARPP-32 se localiza em neurônios que possuem receptores dopaminérgicos (Wallas e *cols.*, 1983), tendo como função a regulação central da sinalização dopaminérgica e suas interações (Self e *cols.*, 1998; Maldve e *cols.*, 2002; Wallas e *cols.*, 1983).

Foram encontradas alterações nos níveis de expressão de ambas proteínas, NCS-1 e DARPP-32, no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia. Recentes estudos demonstraram que existe redução dos níveis de expressão de DARPP-32 (Albert e *cols.*, 2002) e aumento dos níveis de expressão protéica e RNAm de NCS-1 (Bai e *cols.*, 2004; Koh e *cols.*, 2003) no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia. Porém, não existem relatos de estudos descrevendo correlação entre as duas proteínas.

Portanto, com o objetivo de estudar um possível efeito modulatório de NCS-1 na expressão de DARPP-32, utilizamos células PC12 W.T. e células PC12 superexpressando NCS-1. Observamos, através de imunoblot, que as células PC12 superexpressando NCS-1 têm menores níveis de expressão de DARPP-32 que as células PC12 W.T. (FIG 7). Estes dados foram confirmados através da visualização de NCS-1 e DARPP-32 por microscopia confocal (FIG 8). Portanto, a correlação inversamente proporcional entre NCS-1 e DARPP-32 encontrada no

CPFDL de indivíduos com esquizofrenia, foi também encontrada em células superexpressando NCS-1.

Após os resultados de que as células PC12 NCS-1 apresentavam menor expressão de DARPP-32, estudamos, através de co-imunoprecipitação, a existência de interação direta entre as duas proteínas. Observamos que não ocorre interação direta entre NCS-1 e DARPP-32 dentro das condições experimentais utilizadas (FIG 9). Porém, como ambas proteínas têm em comum a via de sinalização AMPc/PKA, foi levantada a hipótese de que a modulação de DARPP-32 por NCS-1 estaria ocorrendo através desta via.

Para estudarmos se a expressão de DARPP-32 estaria sendo modulada por NCS-1 através da via AMPc/PKA, primeiramente verificamos a expressão de receptores dopaminérgicos D1 e D2, o que foi confirmado através da visualização por imunofluorescência e microscopia confocal (dados não apresentados).

Uma das funções de NCS-1 é a capacidade de inibir a dessensibilização dos receptores de dopamina D2 (Rajebhosale e *cols.*, 2003) amplificando sua sinalização (Kabbani e *cols.*, 2002). Sabe-se que, na maioria dos mamíferos, a ativação de D2 leva ao decréscimo dos níveis de AMPc proteína Gi (Missale e *cols.*, 1998) e conseqüentemente a uma redução da atividade de PKA. Portanto, a superexpressão de NCS-1 diminui os níveis de AMPc (Kabbani e *cols.*, 2002). Baseando nessas informações, esperávamos que existissem menores níveis de AMPc nas células PC12 superexpressando NCS-1 que nas células W.T., o que

confirmamos através de imunoensaio enzimático (FIG 10). Portanto, podemos sugerir que, nas células NCS-1, existe menor atividade de PKA.

A PKA tem funções diversas, sendo uma delas a fosforilação CREB na Ser-133 (Svenningsson, 2004) e conseqüentemente a transcrição gênica (Hymane *cols.*, 2001). Existem evidências de que a fosforilação de alguns fatores de transcrição regula a expressão de diversos genes (Hyman e *cols.*, 2001). Foi observado que não existe nenhum relato na literatura que a fosforilação de CREB por PKA regula a transcrição gênica de DARPP-32. Porém, foi demonstrado que a estimulação de TrkB por BDNF, ativa a sinalização por PI3K/Akt, ocorrendo a fosforilação de CREB e conseqüentemente a regulação da transcrição de DARPP-32 (Stroppolo e *cols.*, 2001). Portanto, devido ao fato de que, quando CREB é fosforilada pela ativação de via PI3K/Akt, ocorre transcrição gênica de DARPP-32, sugerimos que o mesmo ocorra através da fosforilação de CREB pela ativação de PKA pelo AMPc.

Observamos que os níveis de AMPc estão menores em células PC12 NCS-1 que em células PC12 W.T., portanto, esperávamos também uma diminuição nos níveis de CREB fosforilada nas mesmas células, já que existiria uma menor ativação de PKA. Confirmamos nossa expectativa através de imunoblot, demonstrando que os níveis de CREB fosforilada estavam menores nas células PC12 NCS-1 que nas células PC12 W.T. (FIG 11). Portanto, sugerimos que parte da regulação da transcrição de DARPP-32 ocorre através da fosforilação de CREB por PKA. Porém, estudos sobre a relação entre os níveis de p-CREB e CREB são necessários para afirmações mais precisas.

Já foi demonstrado que receptor dopaminérgico D₂ inibe a ativação de Akt (Beaulieu e *cols.*, 2004). Como descrito anteriormente, a ativação de Akt por TrkB aumenta a expressão de DARPP-32 (Stroppolo, 2002). Portanto, podemos sugerir que, através da superexpressão de NCS-1, ocorre a diminuição da dessensibilização de D₂ aumentando a inibição de Akt. Conseqüentemente diminui-se a fosforilação de CREB e a expressão de DARPP-32. Dessa maneira, a inibição da via de sinalização PI3K/Akt pela ativação do receptor dopaminérgico D₂ pode ser parcialmente responsável pela diminuição da expressão de DARPP-32.

Sabe-se também que PKA, quando ativada, leva a formação de um complexo NCS-1-GRK2 e D2 (Mason e *cols.*, 2002; Ferguson, 2001). A formação desse complexo diminui a ativação de PKA, pois este inibe a dessensibilização de D2 (Rajebhosale e *cols.*, 2003). No entanto, com a diminuição da ativação de PKA, reduz-se a formação do complexo NCS-1-GRK2 e D2, ocorrendo um feedback negativo e um equilíbrio na sinalização. Observamos uma diminuição na expressão protéica de NCS-1 e um aumento na expressão protéica de DARPP-32 nas células PC12 NCS-1 durante a manutenção da cultura celular (dados não mostrados), sugerindo assim uma regulação dos níveis protéicos de NCS-1 através da sinalização de PKA e conseqüentemente de DARPP-32. Porém, ainda é necessário um estudo mais detalhado sobre esses dados.

Durante testes para memória operacional, foi observado uma diminuição da ativação do CPFDL de indivíduos com esquizofrenia comparados com indivíduos

do grupo controle. Foi demonstrado a colocalização de receptor D_2 e NCS-1 em neurônios piramidais do CPF de primatas e que existe um aumento na expressão de NCS-1 no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia. Também foi demonstrada a diminuição de DARPP-32 na mesma região. Podemos inferir que o aumento da via de sinalização inibitória pela ativação de D_2 diminui a ativação de redes neuronais piramidais, e conseqüentemente o funcionamento cognitivo normal para formulação de pensamentos complexos.

Porém, foi demonstrado que durante processos psicóticos, tanto na alucinação quanto delírio, ocorre a ativação anormal do CPFDL de indivíduos com esquizofrenia. Também foi demonstrado a colocalização de receptor D_2 e NCS-1 em interneurônios do CPF de primatas e, como descrito anteriormente, existe um aumento na expressão de NCS-1 no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia além da a diminuição de DARPP-32 na mesma região. Podemos inferir que o aumento da atividade da via de sinalização inibitória pela ativação de D_2 diminui a ativação de interneurônios e conseqüentemente a modulação da ativação cortical normal do CPFDL.

Além de alterações dopaminérgicas no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia, sabe-se que existem outras alterações, como a diminuição dos níveis de RNAm e protéicos de BDNF e seu receptor, TrkB (Hashimoto e *cols.*, 2005; Welckert e *cols.*, 2003; Takahashi e *cols.*, 2000). Como já foi discutido, a ativação de TrkB por BDNF, aumenta a expressão de DARPP-32 através da fosforilação de CREB pela via do AKT (Stroppolo e *cols.*, 2001). Portanto, podemos sugerir que a

diminuição de BDNF e TrkB no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia pode ter participação na diminuição de DARPP-32 na mesma região cerebral.

Como foi demonstrado o aumento dos níveis de NCS-1 e a diminuição dos níveis de DARPP-32 no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia, e a colocalização de NCS-1 e D₂ no córtex frontal de primatas, sugerimos que a alteração nos níveis de DARPP-32, no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia, seja regulada por NCS-1 através da via de sinalização do receptor dopaminérgico D₂, como descrevemos nas células PC12. Portanto, a caracterização dos diversos elementos dessas vias de sinalização pode colaborar na elucidação dos mecanismos relacionados à esquizofrenia e seu tratamento farmacológico.

6 - CONCLUSÃO

Células PC12 superexpressando NCS-1 apresentam níveis de DARPP-32 menores que células PC12 WT. As mesmas células apresentam níveis de AMPc e p-CREB menores que as células PC12 WT, sugerindo a participação da via AMPc/PKA na regulação da expressão de DARPP-32.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edn (American Psychiatry Association, Washington, D.C., 1994)

ABI-DARGHAM, A.; MAWLAWI, O.; LOMBARDO, I.; GIL, R.; MARTINEZ, D.; HUANG, Y.; HWANG, D. R.; KEILP, J.; KOCHAN, L.; VAN HEERTUM, R.; GORMAN, J. M.; LARUELLE, M. Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *J Neurosci.*, vol. 22, n. 9, 2002. p. 3708-3719.

AKBARIAN, S.; KIM, J. J.; POTKIN, S. G.; HAGMAN, J. O.; TAFAZZOLI, A.; BUNNEY, W. E., JR.; JONES, E. G. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry*, vol. 52, n. 4, 1995. p. 258-266.

ALBERT, K. A.; HEMMINGS, H. C., JR.; ADAMO, A. I.; POTKIN, S. G.; AKBARIAN, S.; SANDMAN, C. A.; COTMAN, C. W.; BUNNEY, W. E., JR.; GREENGARD, P. Evidence for decreased DARPP-32 in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Arch.Gen.Psychiatry*, vol. 59, 2002. p. 705-712.

BAI, J.; HE, F.; NOVIKOVA, S. I.; UNDE, A. S.; DRACHEVA, S.; HAROUTUNIAN, V.; LIDOW, M. S. Abnormalities in the dopamine system in schizophrenia may lie in altered levels of dopamine receptor-interacting proteins. *Biological Psychiatry*, vol. 56, 2004. p. 427-440.

BARCH, D. M.; SHELINE, Y. I.; CSERNANSKY, J. G.; SNYDER, A. Z. Working memory and prefrontal cortex dysfunction: specificity to schizophrenia compared with major depression. *Biol Psychiatry*, vol. 53, n. 5, 2003. p. 376-384.

BENNETT, M. R. Monoaminergic synapses and schizophrenia: 45 years of neuroleptics. *J Psychopharmacol.*, vol. 12, n. 3, 1998. p. 289-304.

BENTIVOGLIO, M.; MORELLI, M. 2005. The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. In: Handbook of chemical neuroanatomy, vol 21. Amsterdam: Elsevier. p 1-105.

BIBB, J. A.; CHEN, J.; TAYLOR, J. R.; SVENNINGSSON, P.; NISHI, A.; SNYDER, G. L.; YAN, Z.; SAGAWA, Z. K.; OUIOMET, C. C.; NAIRN, A. C.; NESTLER, E. J.; GREENGARD, P. Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature*, vol. 410, 2001. p. 376-380.

BIBB, J. A.; SNYDER, G. L.; NISHI, A.; YAN, Z.; MEIJER, L.; FIENBERG, A. A.; TSAI, L. H.; KWON, Y. T.; GIRAULT, J. A.; CZERNIK, A. J.; HUGANIR, R. L.; HEMMINGS, H. C., JR.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature*, vol. 402, 1999. p. 669-671.

BIEGON, A.; KERMAN, I. A. Autoradiographic study of pre- and postnatal distribution of cannabinoid receptors in human brain. *Neuroimage*, vol. 14, n. 6, 2001. p. 1463-1468.

BINDA, A. V.; KABBANI, N.; LEVENSON, R. Regulation of dense core vesicle release from PC12 cells by interaction between the D2 dopamine receptor and calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS). *Biochem Pharmacol.*, vol. 69, n. 10, 2005. p. 1451-1461.

BURNET, P. W.; EASTWOOD, S. L.; HARRISON, P. J. 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, vol. 15, n. 5, 1996. p. 442-455.

CALABRESI, P.; GUBELLINI, P.; CENTONZE, D.; PICCONI, B.; BERNARDI, G.; CHERGUI, K.; SVENNINGSSON, P.; FIENBERG, A. A.; GREENGARD, P. Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. *J. Neurosci.*, vol. 20, 2000. p. 8443-8451.

CALLIER, S.; SNAPYAN, M.; LE CROM, S.; PROU, D.; VINCENT, J. D.; VERNIER, P. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol. Cell*, vol. 95, n. 7, 2003. p. 489-502.

CANTRELL, A. R.; TIBBS, V. C.; WESTENBROEK, R. E.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. Dopaminergic modulation of voltage-gated Na⁺ current in rat hippocampal neurons requires anchoring of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci.*, vol. 19, n. 17, 1999. p. RC21.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T.; WALDECK, B. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*, vol. 127, n. 3296, 1958. p. 471.

CARLSSON, A.; WALDECK, B. A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). *Acta Physiol Scand.*, vol. 44, n. 3-4, 1958. p. 293-298.

CARLSSON, A.; WATERS, N.; HOLM-WATERS, S.; TEDROFF, J.; NILSSON, M.; CARLSSON, M. L. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, vol. 41, 2001. p. 237-260.

CHEN, C.; YU, L.; ZHANG, P.; JIANG, J.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; WU, Q.; WU, Q.; ZHAO, S. Human neuronal calcium sensor-1 shows the highest expression level in cerebral cortex. *Neurosci Lett.*, vol. 319, n. 2, 2002. p. 67-70.

CIVELLI, O.; BUNZOW, JR.; GRANDY, D. K. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, vol. 33, 1993. p. 281-307.

COPOLOV, D. L.; SEAL, M. L.; MARUFF, P.; ULUSOY, R.; WONG, M. T.; TOCHON-DANGUY, H. J.; EGAN, G. F. Cortical activation associated with the experience of auditory hallucinations and perception of human speech in schizophrenia: a PET correlation study. *Psychiatry Res.*, vol. 122, n. 3, 2003. p. 139-152.

CROOK, J. M.; TOMASKOVIC-CROOK, E.; COPOLOV, D. L.; DEAN, B. Low muscarinic receptor binding in prefrontal cortex from subjects with schizophrenia: a study of Brodmann's areas 8, 9, 10, and 46 and the effects of neuroleptic drug treatment. *Am J Psychiatry*, vol. 158, n. 6, 2001. p. 918-925.

DEAN, B.; SUNDRAM, S.; BRADBURY, R.; SCARR, E.; COPOLOV, D. Studies on [3H]CP-55940 binding in the human central nervous system: regional specific

changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use. *Neuroscience*, vol. 103, n. 1, 2001. p. 9-15.

DESDOUIITS, F.; SICILIANO, J. C.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P.; GIRAULT, J. A. Dephosphorylation of Ser-137 in DARPP-32 by protein phosphatases 2A and 2C: different roles in vitro and in striatonigral neurons. *Biochem.J.*, vol. 330, 1998. p. 211-216.

ERICKSON, J. D.; EIDEN, L. E.; HOFFMAN, B. J. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 89, n. 22, 1992. p. 10993-10997.

FERGUSON, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.*, vol. 53, n. 1, 2001. p. 1-24.

FIENBERG, A. A.; HIROI, N.; MERMELSTEIN, P. G.; SONG, W.; SNYDER, G. L.; NISHI, A.; CHERAMY, A.; O'CALLAGHAN, J. P.; MILLER, D. B.; COLE, D. G.; CORBETT, R.; HAILE, C. N.; COOPER, D. C.; ONN, S. P.; GRACE, A. A.; OUIMET, C. C.; WHITE, F. J.; HYMAN, S. E.; SURMEIER, D. J.; GIRAULT, J.; NESTLER, E. J.; GREENGARD, P. DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science*, vol. 281, 1998. p. 838-842.

FIORENTINI, C.; GARDONI, F.; SPANO, P.; DI LUCA, M.; MISSALE, C. Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem.*, vol. 278, n. 22, 2003. p. 20196-20202.

FRANCO, R.; FERRE, S.; AGNATI, L.; TORVINEN, M.; GINES, S.; HILLION, J.; CASADO, V.; LLEDO, P.; ZOLI, M.; LLUIS, C.; FUXE, K. Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology*, Vol. 23, n. 4 suppl, 2000. p. S50-9.

FRANCO, R.; FERRE, S.; AGNATI, L.; TORVINEN, M.; GINES, S.; HILLION, J.; CASADO, V.; LLEDO, P.; ZOLI, M.; LLUIS, C.; FUXE, K. Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology*, vol. 23, n. 4 suppl, 2000. p. S50-59.

GERFEN, C. R.; ENGBER, T. M.; MAHAN, L. C.; SUSEL, Z.; CHASE, T. N.; MONSMA, F. J. JR.; SIBLEY, D. R. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, vol. 250, n. 4986, 1990. p. 1429-1432.

GIRAULT, J. A.; RAISMAN-VOZARI, R.; AGID, Y.; GREENGARD, P. Striatal phosphoproteins in Parkinson disease and progressive supranuclear palsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S A*, vol. 86, 1989. p. 2493-2497.

GIROS, B.; JABER, M.; JONES, S. R.; WIGHTMAN, R. M.; CARON, M. G. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, vol. 379, n. 6566, 1996. p. 606-612.

GLENTHOJ, B. Y. The brain dopaminergic system. Pharmacological, behavioural and electrophysiological studies. *Dan Med Bull.*, vol. 42, n. 1, 1995. p. 1-21.

GOLDMAN-RAKIC, P. S.; MULLY EC 3RD.; WILLIAMS, G. V. D(1) receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Res Brain Res Rev.*, vol. 31, n. 2-3, 2000. p. 295-301.

GOLDSTEIN, M.; DEUTCH, A. Y. Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia. *FASEB J.*, vol. 6, 1992. p. 2413-2421.

GREENGARD, P.; ALLEN, P. B.; NAIRN, A. C. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/Protein phosphatase-1 cascade. *Neuron*, vol. 23, 1999. p. 435-447.

HASHIMOTO, T.; BERGEN, S. E.; NGUYEN, Q. L.; XU, B.; MONTEGGIA, L. M.; PIERRI, J. N.; SUN, Z.; SAMPSON, A. R.; LEWIS, D. A. Relationship of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB to altered inhibitory prefrontal circuitry in schizophrenia. *J Neurosci.*, vol. 25, n. 2, 2005. p. 372-383.

HSIEH-WILSON, L. C.; ALLEN, P. B.; WATANABE, T.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. Characterization of the neuronal targeting protein spinophilin and its interactions with protein phosphatase-1. *Biochemistry*, vol. 38, 1999. p. 4365-4373.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat.Rev.Neurosci.*, vol. 2, 2001. p. 695-703.

IRITANI, S.; NIIZATO, K.; NAWA, H.; IKEDA, K.; EMSON, P. C. Immunohistochemical study of brain-derived neurotrophic factor and its receptor, TrkB, in the hippocampal formation of schizophrenic brains. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, vol. 27, n. 5, 2003. p. 801-807.

ITO, K.; HAGA, T.; LAMEH, J.; SADEE, W. Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5. *Eur J Biochem.*, vol. 260, n. 1, 1999. p. 112-119.

IWATA, K.; ITO, K.; FUKUZAKI, A.; INAKI, K.; HAGA, T. Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors. *Eur J Biochem.*, vol. 263, n. 2, 1999. p. 596-602.

KABBANI, N.; JEROMIN, A.; LEVENSON, R. Dynamin-2 associates with the dopamine receptor signalplex and regulates internalization of activated D2 receptors. *Cell Signal.*, vol. 16, n. 4, 2004. p. 497-503.

KABBANI, N.; NEGYESSY, L.; LIN, R.; GOLDMAN-RAKIC, P.; LEVENSON, R. Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J.Neurosci.*, vol. 22, 2002. p. 8476-8486.

KANDELL, E.R., SHWARTZ, J.H., JESSEL, T.M. Princípios de Neurociência. Editora Manole, 4ªEd, 2000.

KASPER, S. Dopaminergic deficit and the role of amisulpride in the treatment of schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol.*, vol. 17, n. suppl 4, 2002. p. S19-26.

KAVELAARS, A.; COBELENS, P. M.; TEUNIS, M. A.; HEIJNEN, C. J. Changes in innate and acquired immune responses in mice with targeted deletion of the dopamine transporter gene. *J. Neuroimmunol.*, vol. 161, n. 1-2, 2005. p. 162-168.

KHAN, Z. U.; KOULEN, P.; RUBINSTEIN, M.; GRANDY, D. K.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA.*, vol. 98, n. 4, 2001. p. 1964-1969.

KIM, K. M.; VALENZANO, K. J.; ROBINSON, S. R.; YAO, W. D.; BARAK, L. S.; CARON, M. G. Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J Biol Chem.*, vol. 276, n. 40, 2001. p. 37409-37414.

KING, M. M.; HUANG, C. Y.; CHOCK, P. B.; NAIRN, A. C.; HEMMINGS, H. C., JR.; CHAN, K. F.; GREENGARD, P. Mammalian brain phosphoproteins as substrates for calcineurin. *J.Biol.Chem.*, vol. 259, 1984. p. 8080-8083.

KOH, P. O.; UNDE, A. S.; KABBANI, N.; LEVENSON, R.; GOLDMAN-RAKIC, P. S.; LIDOW, M. S. Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, vol. 100, 2003. p. 313-317.

KOH, T. W.; BELLEN, H. J. Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci.*, vol. 26, 2003. p. 413-422.

KOUZMENKO, A. P.; SCAFFIDI, A.; PEREIRA, A. M.; HAYES, W. L.; COPOLOV, D. L.; DEAN, B. No correlation between A(-1438)G polymorphism in 5-HT_{2A} receptor gene promoter and the density of frontal cortical 5-HT_{2A} receptors in schizophrenia. *Hum Hered.*, vol. 49, n. 2, 1999. p. 103-105.

KRUPNICK, J. G.; BENOVIC, J. L. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, vol. 38, 1998. p. 289-319.

LAVINE, N.; ETHIER, N.; OAK, J. N.; PEI, L.; LIU, F.; TRIEU, P.; REBOIS, R. V.; BOUVIER, M.; HEBERT, T. E.; VAN TOL, H. H. G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem.*, vol. 277, n. 48, 2002. p. 46010-46019.

LEE, F. J.; XUE, S.; PEI, L.; VUKUSIC, B.; CHERY, N.; WANG, Y.; WANG, Y. T.; NIZNIK, H. B.; YU, X. M.; LIU, F. Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*, vol. 111, n. 2, 2002. p. 219-230.

LEVANT, B. The D3 dopamine receptor: neurobiology and potential clinical relevance. *Pharmacol.Rev.*, vol. 49, 1997. p. 231-252.

LEVANT, B.; VANSELL, N. R. In vivo occupancy of D2 dopamine receptors by nafadotride. *Neuropsychopharmacology*, vol. 17, n. 2, 1997. p. 67-71.

LEVEY, A. I.; HERSCH, S. M.; RYE, D. B.; SUNAHARA, R. K.; NIZNIK, H. B.; KITT, C. A.; PRICE, D. L.; MAGGIO, R.; BRANN, M. R.; CILIAK, B. J.; ET AL. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 90, n. 19, 1993. p. 8861-8865.

LEWIS, D. A.; HASHIMOTO, T.; VOLK, D. W. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci.*, vol. 6, n. 4, 2005. p. 312-324.

LEWIS, D. A.; LEVITT, P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci.*, vol. 25, 2002. p. 409-432.

LEWIS, D. A.; LIEBERMAN, J. A. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*, vol. 28, n. 2, 2000. p. 325-334.

LI, L.; HELLER-HARRISON, R.; CZECH, M.; OLSON, E. N. Cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the activity of myogenic helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol.*, vol. 12, n. 10, 1992. p. 4478-4485.

LIDOW MS (2000): General overview of contemporary antipsychotic medications. In: Lidow MS, editor. *Neurotransmitter Receptors in Actions of Antipsychotic Medications*. Boca Raton, FL: CRC Press, 17-29.

LIDOW, M. S.; WANG, F.; CAO, Y.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Layer V neurons bear the majority of mRNAs encoding the five distinct dopamine receptor subtypes in the primate prefrontal cortex. *Synapse*, vol. 28, n. 1, 1998. p. 10-20.

LIEBERMAN, J. A. Dopamine partial agonists: a new class of antipsychotic. *CNS Drugs*, vol. 18, n. 4, 2004. p. 251-267.

LINDGREN, N.; USIELLO, A.; GOINY, M.; HAYCOCK, J.; ERBS, E.; GREENGARD, P.; HOKFELT, T.; BORRELLI, E.; FISONE, G. Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, vol. 100, 2003. p. 4305-4309.

LINDSKOG, M.; SVENNINGSSON, P.; POZZI, L.; KIM, Y.; FIENBERG, A. A.; BIBB, J. A.; FREDHOLM, B. B.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P.; FISONE, G. Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. *Nature*, vol. 418, 2002. p. 774-778.

LOHSE, M. J. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1179, n. 2, 1993. p. 171-188.

LOURENCO, G. A.; DORCE, V. A.; PALERMO-NETO, J. Haloperidol treatments increased macrophage activity in male and female rats: influence of corticosterone and prolactin serum levels. *Eur Neuropsychopharmacol.*, vol. 15, n. 3, 2005. p. 271-277.

MACDONALD, A. W. 3RD.; CARTER, C. S.; KERNS, J. G.; URSU, S.; BARCH, D. M.; HOLMES, A. J.; STENGER, V. A.; COHEN, J. D. Specificity of prefrontal dysfunction and context processing deficits to schizophrenia in never-medicated patients with first-episode psychosis. *Am J Psychiatry*, vol. 162, n. 3, 2005. p. 475-484.

MAGGIO, R.; BARBIER, P.; CORSINI, G. U. Apomorphine continuous stimulation in Parkinson's disease: receptor desensitization as a possible mechanism of reduced motor response. *J Neural Transm Suppl.*, vol. 45, 1995. p. 133-136.

MALDVE, R. E.; ZHANG, T. A.; FERRANI-KILE, K.; SCHREIBER, S. S.; LIPPMANN, M. J.; SNYDER, G. L.; FIENBERG, A. A.; LESLIE, S. W.; GONZALES, R. A.; MORRISETT, R. A. DARPP-32 and regulation of the ethanol sensitivity of NMDA receptors in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.*, vol. 5, 2002. p. 641-648.

MARTONE, M. E.; EDELMANN, V. M.; ELLISMAN, M. H.; NEF, P. Cellular and subcellular distribution of the calcium-binding protein NCS-1 in the central nervous system of the rat. *Cell Tissue Res.*, vol. 295, n. 3, 1999. p. 395-407.

MASON, J. N.; KOZELL, L. B.; NEVE, K. A. Regulation of dopamine D(1) receptor trafficking by protein kinase A-dependent phosphorylation. *Mol Pharmacol.*, vol. 61, n. 4, 2002. p. 806-816.

MATSUMOTO, I.; INOUE, Y.; IWAZAKI, T.; PAVEY, G.; DEAN, B. 5-HT_{2A} and muscarinic receptors in schizophrenia: a postmortem study. *Neurosci Lett.*, vol. 379, n. 3, 2005. p. 164-168.

MCGUE, M.; GOTTESMAN, I. I. The genetic epidemiology of schizophrenia and the design of linkage studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*, vol. 240, n. 3, 1991. p. 174-181.

MEADOR-WOODRUFF, J. H.; DAMASK, S. P.; WANG, J.; HAROUTUNIAN, V.; DAVIS, K. L.; WATSON, S. J. Dopamine receptor mRNA expression in human striatum and neocortex. *Neuropsychopharmacology*, vol. 15, n.1, 1996. p. 17-29.

MELTZER, H. Y.; LI, Z.; KANEDA, Y.; ICHIKAWA, J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, vol. 27, n. 7, 2003. p. 1159-1172.

MIRNICS, K.; MIDDLETON, F. A.; MARQUEZ, A.; LEWIS, D. A.; LEVITT, P. Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron*, vol. 28, n. 1, 2000. p. 53-67.

MISSALE, C.; NASH, S. R.; ROBINSON, S. W.; JABER, M.; CARON, M. G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.*, vol. 78, 1998. p. 189-225.

MISSALE, C.; NASH, S. R.; ROBINSON, S. W.; JABER, M.; CARON, M. G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.*, vol. 78, n. 1, 1998. p. 189-225.

MORA, S.; DURHAM, P. L.; SMITH, J. R.; RUSSO, A. F.; JEROMIN, A.; PESSIN, J. E. NCS-1 inhibits insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3L1 adipocytes through a phosphatidylinositol 4-kinase-dependent pathway. *J.Biol.Chem.*, vol. 277, 2002. p. 27494-27500.

MRZLJAK, L.; LEVEY, A. I.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex: morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 90, n. 11, 1993. p. 5194-5198.

NAKAMURA, T. Y.; POUNTNEY, D. J.; OZAITA, A.; NANDI, S.; UEDA, S.; RUDY, B.; COETZEE, W. A. A role for frequenin, a Ca²⁺-binding protein, as a regulator of Kv4 K⁺-currents. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, vol. 98, 2001. p. 12808-12813.

NASS, R.; HALL, D. H.; MILLER, D. M., III; BLAKELY, R. D. Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, vol. 99, 2002. p. 3264-3269.

NEGYESSY, L.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Subcellular localization of the dopamine D2 receptor and coexistence with the calcium-binding protein neuronal calcium sensor-1 in the primate prefrontal cortex. *J.Comp Neurol.*, vol. 488, 2005. p. 464-475.

NESTLER, E. J. Molecular neurobiology of addiction. *Am.J.Addict.*, vol. 10, 2001. p. 201-217.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. *Neuron*, vol. 34, 2002. p. 13-25.

NICOLA, S. M.; SURMEIER, J.; MALENKA, R. C. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci.*, vol. 23, 2000. p. 185-215.

NIMCHINSKY, E. A.; HOF, P. R.; JANSSEN, W. G.; MORRISON, J. H.; SCHMAUSS, C. Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. *J Biol Chem.*, vol. 272, n. 46, 1997. p. 29229-29237.

NISHI, A.; BIBB, J. A.; SNYDER, G. L.; HIGASHI, H.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 97, n. 23, 2000. p. 12840-12845.

NISHI, A.; LIU, F.; MATSUYAMA, S.; HAMADA, M.; HIGASHI, H.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. Metabotropic mGlu5 receptors regulate adenosine A2A receptor signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, vol. 100, 2003. p. 1322-1327.

NISHI, A.; SNYDER, G. L.; GREENGARD, P. Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci.*, vol. 17, n. 21, 1997. p. 8147-8155.

NISHI, A.; SNYDER, G. L.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of DARPP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons. *J. Neurochem.*, vol. 72, 1999. p. 2015-2021.

OGDEN, C. A.; RICH, M. E.; SCHORK, N. J.; PAULUS, M. P.; GEYER, M. A.; LOHR, J. B.; KUCZENSKI, R.; NICULESCU, A. B. Candidate genes, pathways and mechanisms for bipolar (manic-depressive) and related disorders: an expanded convergent functional genomics approach. *Mol Psychiatry*, vol. 9, n. 11, 2004. p. 1007-1029.

OKUBO, Y.; SUHARA, T.; SUZUKI, K.; KOBAYASHI, K.; INOUE, O.; TERASAKI, O.; SOMEYA, Y.; SASSA, T.; SUDO, Y.; MATSUSHIMA, E.; IYO, M.; TATENO, Y.; TORU, M. Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature*, vol. 385, n. 6617, 1997. p. 634-636.

PACKARD, M. G.; KNOWLTON, B. J. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci.*, vol. 25, 2002. p. 563-593.

PARSONS, A. A.; BINGHAM, S. The search for novel migraine therapies: experimental models. *Funct Neurol.*, vol. 15, n. suppl 3, 2000. p. 36-42.

PASPALAS, C. D.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Microdomains for dopamine volume neurotransmission in primate prefrontal cortex. *J Neurosci.*, vol. 24, n. 23, 2004. p. 5292-5300.

PERLSTEIN, W. M.; CARTER, C. S.; NOLL, D. C.; COHEN, J. D. Relation of prefrontal cortex dysfunction to working memory and symptoms in schizophrenia. *Am J Psychiatry*, vol. 158, n. 7, 2001. p. 1105-1113.

PONGS, O.; LINDEMEIER, J.; ZHU, X. R.; THEIL, T.; ENGELKAMP, D.; KRAHJENTGENS, I.; LAMBRECHT, H. G.; KOCH, K. W.; SCHWEMER, J.; RIVOSECCHI, R. Frequentin--a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the Drosophila nervous system. *Neuron*, vol. 11, 1993. p. 15-28.

RAJEBHOSALE, M.; GREENWOOD, S.; VIDUGIRIENE, J.; JEROMIN, A.; HILFIKER, S. Phosphatidylinositol 4-OH kinase is a downstream target of neuronal calcium sensor-1 in enhancing exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem.*, vol. 278, n. 8, 2003. p. 6075-6084.

ROCHEVILLE, M.; LANGE, D. C.; KUMAR, U.; PATEL, S. C.; PATEL, R. C.; PATEL, Y. C. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*, vol. 288, n. 5463, 2000. p. 154-157.

SCARSELLI M.; NOVI F.; SCHALLMACH E.; LIN R.; BARAGLI A.; COLZI A.; GRIFFON N.; CORSINI GU.; SOKOLOFF P.; LEVENSON R.; VOGEL Z.; MAGGIO R. D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem.*, vol. 276, n. 32, 2001. p. 30308-30314.

SEAMANS, J. K.; DURSTEWITZ, D.; CHRISTIE, B. R.; STEVENS, C. F.; SEJNOWSKI, T. J. Dopamine D1/D5 receptor modulation of excitatory synaptic inputs to layer V prefrontal cortex neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.*, vol. 98, n. 1, 2001. p. 301-306.

SELF, D. W.; GENOVA, L. M.; HOPE, B. T.; BARNHART, W. J.; SPENCER, J. J.; NESTLER, E. J. Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the nucleus accumbens in cocaine self-administration and relapse of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci.*, vol. 18, n. 5, 1998. p. 1848-1859.

SMITH, R. D.; GOLDIN, A. L. Phosphorylation at a single site in the rat brain sodium channel is necessary and sufficient for current reduction by protein kinase A. *J Neurosci.*, vol. 17, n. 16, 1997. p. 6086-6093.

SNYDER, G. L.; FISONE, G.; GREENGARD, P. Phosphorylation of DARPP-32 is regulated by GABA in rat striatum and substantia nigra. *J. Neurochem.*, vol. 63, 1994. p. 1766-1771.

STAAL, R. G.; MOSHAROV, E. V.; SULZER, D. Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore. *Nat. Neurosci.*, vol. 7, 2004. p. 341-346.

STRANGE, P. G. Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. *Pharmacol Rev.*, vol. 53, n. 1, 2001. p. 119-133.

STROPPOLO, A.; GUINEA, B.; TIAN, C.; SOMMER, J.; EHRLICH, M. E. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in brain-derived neurotrophic factor-induced

DARPP-32 expression in medium size spiny neurons in vitro. *J Neurochem.*, vol. 79, n. 5, 2001. p. 1027-1032.

SVENNINGSSON, P.; LINDSKOG, M.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M.; GREENGARD, P.; FREDHOLM, B. B.; FISONE, G. Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in vivo by dopamine D1, dopamine D2, and adenosine A2A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.*, vol. 97, n. 4, 2000. p. 1856-1860.

SVENNINGSSON, P.; NISHI, A.; FISONE, G.; GIRAULT, J. A.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, vol. 44, 2004. p. 269-296.

SVENNINGSSON, P.; TZAVARA, E. T.; LIU, F.; FIENBERG, A. A.; NOMIKOS, G. G.; GREENGARD, P. DARPP-32 mediates serotonergic neurotransmission in the forebrain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, vol. 99, 2002. p. 3188-3193.

TAKAHASHI, M.; SHIRAKAWA, O.; TOYOOKA, K.; KITAMURA, N.; HASHIMOTO, T.; MAEDA, K.; KOIZUMI, S.; WAKABAYASHI, K.; TAKAHASHI, H.; SOMEYA, T.; NAWA, H. Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. *Mol Psychiatry*, vol. 5, n. 3, 2000. p. 293-300.

THORPE, L. W.; WESTLUND, K. N.; KOCHERSPERGER, L. M.; ABELL, C. W.; DENNEY, R. M. Immunocytochemical localization of monoamine oxidases A and B in human peripheral tissues and brain. *J.Histochem.Cytochem.*, vol. 35, 1987. p. 23-32.

TSENG, K. Y.; O'DONNELL, P. Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms. *J Neurosci.*, vol. 24, n. 22, 2004. p. 5131-5139.

TSIGELNY, I.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E.; SUDHOF, T. C.; TAYLOR P. Common EF-hand motifs in cholinesterases and neuroligins suggest a role for Ca²⁺ binding in cell surface associations. *Protein Sci.*, vol. 9, n. 1, 2000. p. 180-185.

TSUANG, M. T.; TAYLOR, L.; FARAONE, S. V. An overview of the genetics of psychotic mood disorders. *J.Psychiatr.Res.*, vol. 38, 2004. p. 3-15.

TSUJIMOTO, T.; JEROMIN, A.; SAITOH, N.; RODER, J. C.; TAKAHASHI, T. Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals. *Science*, vol. 295, 2002. p. 2276-2279.

TUPALA, E.; TIIHONEN, J. Dopamine and alcoholism: neurobiological basis of ethanol abuse. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry*, vol. 28, 2004. p. 1221-1247.

URBAN, N. N.; GONZALEZ-BURGOS, G.; HENZE, D. A.; LEWIS, D. A.; BARRIONUEVO, G. Selective reduction by dopamine of excitatory synaptic inputs to pyramidal neurons in primate prefrontal cortex. *J Physiol.*, vol. 539, n. Pt 3, 2002. p. 707-712.

VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, vol. 24, 2000. p. 125-132.

VOGELEY, K.; TEPEST, R.; SCHNEIDER-AXMANN, T.; HUTTE, H.; ZILLES, K.; HONER, W. G.; FALKAI, P. Automated image analysis of disturbed cytoarchitecture in Brodmann area 10 in schizophrenia. *Schizophr Res.*, vol. 62, n. 1-2, 2003. p. 133-140.

WALAAS, S. I.; ASWAD, D. W.; AND GREENGARD, P. A dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. *Nature*, vol. 301, 1983. p. 69-71.

WALTON-HADLOCK, J. L. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med.*, vol. 352, n. 13, 2005. p. 1386.

WEST, A. R.; GRACE, A. A. Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining in vivo intracellular recordings and reverse microdialysis. *J Neurosci.*, vol. 22, n. 1, 2002. p. 294-304.

YAN, Z.; HSIEH-WILSON, L.; FENG, J.; TOMIZAWA, K.; ALLEN, P. B.; FIENBERG, A. A.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. Protein phosphatase 1

modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *Nat.Neurosci.*, vol. 2, 1999. p. 13-17.

ZHENG, P.; ZHANG, X. X.; BUNNEY, B. S.; SHI, W. X. Opposite modulation of cortical N-methyl-D-aspartate receptor-mediated responses by low and high concentrations of dopamine. *Neuroscience*, vol. 91, n. 2, 1999. p. 527-535.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)